UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE INPSICOBIOLOGIA E NEUROSCIENZE COGNITIVE

MAPPATURA FUNZIONALE DELLA CORTECCIA PREFRONTALE VENTRO-LATERALE NEL MACACO

Relatore:
Chiar.mo Prof. Leonardo Fogassi

Correlatore:
Chiar.mo Prof. Stefano Rozzi

Laureando:
Marco Corsi

ANNO ACCADEMICO 2017/2018

Indice

1. La Corteccia Prefrontale 6

1.1 Filogenesi e ontogenesi 6

1.1.1 Filogenesi 6

1.1.2 Ontogenesi 8

1.2 Struttura architettonica della corteccia prefrontale laterale 12

1.3 Funzioni della corteccia prefrontale 14

1.3.1 Memoria di lavoro 14

1.3.2 Funzioni attentive 14

1.3.3 Inibizione delle risposte 15

1.3.4 Preparazione di risposte comportamentali 16

1.3.5 Selezione delle azioni e “decision making” 17

1.4 Connessioni cortico-corticali della corteccia prefrontale 18

1.5 Differenze anatomo-funzionali dei network dorso-laterale e ventro-laterale 22

1.5.1 Network dorso-laterale 22

1.5.2 Network ventro-laterale 24

1.6 Differenze funzionali all’interno della corteccia prefrontale laterale 34

1.6.1 Differenze funzionali lungo l’asse dorso-ventrale: l’ipotesi dei domini 34

1.6.2 Modelli gerarchici di controllo cognitivo del comportamento 37

1.6.3 L’ipotesi del principio di sussidiarietà 41

1.6.4 Modelli dell’attivazione diffusa: una spiegazione alternativa 44

1.7 Scopo dello studio 46

2 Materiali e metodi 48

2.1 Addestramento 48

2.2 Procedure chirurgiche 48

2.3 Acquisizione e calibrazione della posizione oculare 49

2.4 Protocollo di registrazione e isolamento del segnale 50

2.5 Apparati sperimentali 51
2.5.1 Apparato per il compito visuo-motorio.....51
2.5.2 Apparato per il compito di osservazione di video e immagini statiche 53
2.6 Paradigmi sperimentali 54
2.6.1 Compito Visuo-motorio 54
2.6.2 Compito di osservazione di video 56
2.6.3 Compito di osservazione di immagini statiche 58
2.7 Elaborazione dei dati e analisi statistica 59
2.7.1 Analisi delle risposte nel compito motorio 60
2.7.2 Analisi delle risposte nei compiti di osservazione di stimoli statici e videoclip.61
2.7 Metodi di costruzione mappe 63
2.8 Clusterizzazione delle risposte funzionali.....64
3. Risultati 66
3.1 Risposte neuronali nel compito visuo-motorio 66
3.2 Mappa dei neuroni con risposte selettive nell'epoca di Cue.....68
3.3 Mappatura delle risposte nell'epoca di Presentazione 70
3.4 Mappatura delle risposte nell'epoca di Go/No Go.....72
3.5 Mappatura delle risposte nell'epoca di Hold/Fixation.....75
3.6 Risposte neuronali nel compito di osservazione di video. 77
3.7 Mappa dei neuroni con risposte selettive nel compito di osservazione di video 79
3.8 Risposte neuronali nel compito di osservazione di immagini statiche 81
3.9 Mappa dei neuroni con risposte selettive nel compito di osservazione di immagini statiche 81
3.10 Clusterizzazione generale delle proprietà funzionali 83
4. Discussione 85
4.1 Ruolo funzionale dei neuroni registrati in diversi settori della corteccia prefrontale 85

4.2 Clusterizzazione delle risposte: limiti del metodo e potenzialità nel correlare funzione e anatomia 88

4.3 Mappatura delle risposte neuronali nella corteccia prefrontale ventrolaterale 89

4.4 Conclusioni: dal concetto di equipotenzialità a quello di specializzazione e adattatività della risposte dei neuroni prefrontali.....91

5. Bibliografia 93

1. La Corteccia Prefrontale

1.1 Filogenesi e ontogenesi

1.1.1 Filogenesi

Durante lo sviluppo filogenetico la corteccia prefrontale aumenta di dimensioni, come osservato in studi su cervelli animali. Il lobo frontale si presenta principalmente nei cervelli dei primati e costituisce, secondo calcoli basati sulla citoarchitettonica, il 29% del totale della corteccia egli umani, il 17% negli scimpanzé e l'11,5% nei macachi. La maggior grandezza dei lobi frontali nell'uomo rispetto agli altri primati indica che questa porzione di encefalo è il substrato per le funzioni cognitive di odine superiore, che sono diventate il tratto distintivo della nostra specie, maturato a seguito di una differenziazione filogenetica. È stato inoltre proposto che certe aree corticali, come l'area di Broca (area 44) si sono sviluppate per supportare funzioni unicamente umane, come il linguaggio in questo caso (Aboitiz & García V., 1997). Per determinare le omologie corticali tra varie specie gli studi neuroanatomici si avvalgono di criteri strutturali, anche se le comparazioni tra specie sono spesso speculative, in assenza di antenati comuni che rappresentino il collegamento tra le varie tappe evolutive della struttura anatomica del lobo frontale. I criteri principali che sono stati utilizzati per definire la corteccia prefrontale e stabilire le omologie tra specie sono la topologia, topografia, architettonica e le connessioni, sia intraprefrontali che con altre aree cerebrali. La neocortex dei mammiferi si sviluppa da due strutture primitive che costituiscono la maggior parte del cervello durante lo sviluppo; l'ippocampo e l'area piriforme, la superficie esterna della futura corteccia. Nel cervello dei rettili un semplice strato di corteccia collega queste due strutture, mentre nei mammiferi il collegamento è costituito da una complessa neocorteccia multistrato (Karten, Hodos, Nauta, & Revzin, 1973). Studi di architettura corticale nei mammiferi hanno gettato luce sul percorso di sviluppo del neocortex. La corteccia frontale emerge dallo sviluppo delle componenti ippocampali e piriformi che si sviluppano in direzioni opposte lungo l'emisfero e si incontro sulla faccia laterale. Entrambe vanno incontro ad una progressiva differenziazione che consiste in un inspessimento corticale e l'emergere delle cellule granulari.

Nei mammiferi superiori queste due strutture primordiali sono state spinte nelle loro attuali localizzazioni ventro-mediali dalle porzioni di corteccia circostanti in crescita. All'interno di un ordine di mammiferi le comparazioni possono essere tracciate considerando la

localizzazione dei solchi come landmark anatomici, ma le comparazioni tra ordini possono essere rischiose. Esistono tuttavia dei principi generali riguardo allo sviluppo del lobo frontale. Uno di questi principi è che durante lo sviluppo la corteccia frontale diventa non solo più grande ma anche più complessa, con più convoluzioni e successiva formazione di solchi. Nei primati il processo di formazione di una corteccia girificata raggiunge il suo apice nell'uomo. Sebbene la formazione di giri e solchi sia da attribuire principalmente a fattori meccanici, la localizzazione delle convoluzioni appare determinata in parte da differenze funzionali. Molte delle funzioni neuronali più differenziate possono essere trovate nelle porzioni di corteccia all'interno dei solchi (principale, temporale, intraparietale). L'ipotesi della formazione del neocortex nei mammiferi dalle due componenti primitive sembra essere valida anche per la formazione dei lobi frontali nei primati, ma con alcune aggiunte. Una terza componente emergerebbe successivamente nei primati. La corteccia motoria, altamente differenziata in questi animali, darebbe origine ad un trend citoarchitettonico che procederebbe in senso rostrale, congiungendosi con le altre due componenti, la ippocampale e quella piriforme, sulla superficie laterale della corteccia frontale. Questo andamento è suggerito da un gradiente anatomico dall'area 4 alla 6, e dalla 6 alla 9. Le zone di confine tra questi tre gradienti anatomici mostrano il massimo sviluppo dello strato IV delle cellule granulari, caratteristica peculiare delle cortecce prefrontali dell'uomo e di altri primati. Un altro tratto distintivo dell'evoluzione del cervello primatesco è l'esplosione nello sviluppo delle connessioni cortico-corticali (Adrianov, 1995).

La corteccia prefrontale umana presenta l'evoluzione maggiore del polo frontale (area 10 di Broadmann) rispetto agli altri primati (Semendeferi, Armstrong, Schleicher, Zilles, & Van Hoesen, 2001). Questa regione negli umani include una parte mediale ventrale e una laterale. Nelle scimmie è stato osservato che l'intero polo frontale corrisponde alla porzione ventro-mediale del lobo fronto-polare umano (Carmichael & Price, 1996). In un recente studio ettrofisiologico su scimmie è stata monitorata l'attività neurale nel polo frontale durante un compito di scelta tra due azioni alternative (Tsujimoto, Genovesio, & Wise, 2011). È risultato che i neuroni del polo frontale rispondevano solo dopo che veniva eseguita l'azione istruita dal cue all'inizio del compito. Questa risposta è stata interpretata come la codifica del risultato atteso del compito, in base a quanto segnalato dal cue iniziale. Il ruolo del lobo frontale delle scimmie potrebbe svolgere una funzione di monitoraggio sugli outcome associati a compiti, e in particolar modo prendere parte al processo decisionale sulla scelta di mantenere o cambiare la risposta. Questo studio mostra come le funzioni del polo frontale nelle scimmie siano l'analogo di quelle della corteccia frontale ventro-mediale nell'uomo. Si può pensare quindi

che il polo frontale umano non abbia una componente anatomo-funzionale corrispondente nelle scimmie. Il polo frontale sembra occupare nell'uomo un posto all'apice della gerarchia funzionale nel processamento di informazioni riguardanti la selezione di un insieme di istruzioni sull'esecuzione di un compito (Koechlin, Ody, & Kouneiher, 2003). Questo tipo di funzione dominio-generale, definita branching control (Koechlin & Summerfield, 2007), è alla base di comportamenti che richiedono un coinvolgimento simultaneo in più attività non organizzate secondo un piano precedentemente stabilito.

1.1.2 Ontogenesi

In tutte le specie di mammiferi l'istogenesi e la maturazione della corteccia prefrontale seguono caratteristici percorsi di espansione e migrazione. Questi trend sono geneticamente programmati e esiste evidenza che la migrazione cellulare e la differenziazione regionale avviene in concomitanza con lo sviluppo delle fibre talamocorticali (Ferguson & Gao, 2015; Sidman & Rakic, 1973). Nell'uomo la configurazione della corteccia adulta è già presente al settimo mese della vita fetale (vedi fig.1.1). Le fibre delle cellule della glia guidano la migrazione dei neuroni dalle zone germinali, adiacenti ai ventricoli, alla loro destinazione finale negli strati corticali. Dopo aver raggiunto gli strati corticali corrispondenti le cellule neurali iniziano a sviluppare l'arborizzazione dendritica. Sebbene la configurazione strutturale delle cellule neurali in utero sia pressoché simile a quella adulta, esistono delle differenze; l'arborizzazione dendritica durante il periodo pre-natale è rudimentale e il volume delle cellule è inferiore a quelle della corteccia nell'adulto. La densità dendritica e la ramificazione continuano a crescere rapidamente fino ai 24 mesi di vita, e ad un ritmo meno intenso successivamente.

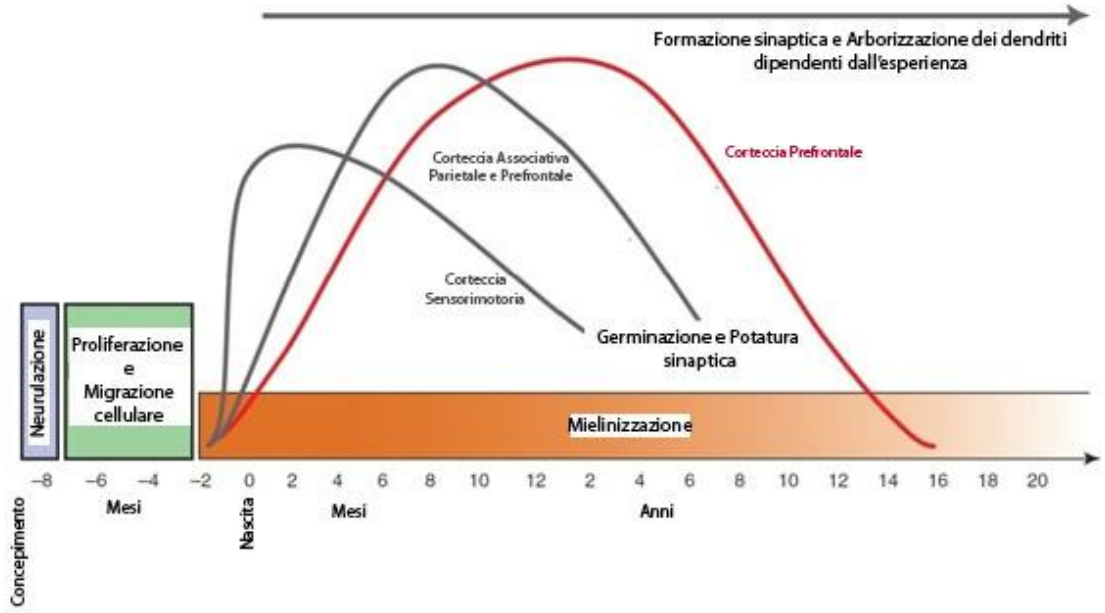

Figura 1.1 Processi di sviluppo del sistema nervoso centrale dal concepimento alla seconda decade di vita

Nella corteccia prefrontale laterale del neonato la massima crescita dendritica avviene tra i 7 e i 12 mesi, raggiungendo un plateau dopo il primo anno. La densità neurale è massima alla nascita e declina del 50% arrivati ai 7-10 anni, raggiungendo un livello simile a quello adulto. In questa regione corticale la modulazione e differenziazione dei neuroni piramidali nel terzo strato continua fino alla pubertà, e questo ha importanti implicazioni per la formazione di funzioni cognitive come l'apprendimento associativo (Fuster, 2000). Gli strati cellulari più profondi, IV, V, VI, si sviluppano ad un ritmo più rapido rispetto a quelli più superficiali, II e III (vedi fig 1.2). Per quanto riguarda la sinaptogenesi, la formazione di connessioni tra neuroni nel cervello dei primati avviene in contemporanea in tutte le regioni del neocortex, inclusa la corteccia prefrontale (Bourgeois, Eckenhoff, Zecevic, & Goldman-Rakic, 1986). Nella corteccia prefrontale la densità sinaptica aumenta rapidamente nel periodo perinatale, e dopo una sovraproduzione, decresce gradualmente fino a raggiungere il livello adulto. Ciò nonostante alla nascita la corteccia prefrontale è immatura rispetto ad altre aree e mostra un livello di funzionamento ridotto in rapporto alla densità neurale. Questo ipofunzionamento è dovuto al ritardo nella mielinizzazione delle fibre afferenti ed efferenti alle regioni frontali. La mielinizzazione delle aree corticali nel periodo perinatale avviene secondo una sequenza cronologica definita. Le ultime aree ad essere mielinate sono le aree associative, tra cui la corteccia prefrontale, in cui questo processo non raggiunge il suo completamento fino ai

trent'anni. Ricerche citoarchitettoniche sulla corteccia prefrontale in sviluppo evidenziano che le aree orbitali maturano prima rispetto alle aree laterali (Caviness, Takahashi, & Nowakowski, 1995). I neuroni nelle regioni orbitali completano prima di quelle laterali il loro ciclo di sviluppo. Lo sviluppo morfologico della corteccia prefrontale è accompagnato dallo sviluppo dei substrati di trasmissione chimica. Lo sviluppo della neurotrasmissione è, come nel caso della formazione dei corpi cellulari e delle sinapsi, soggetto a periodi di iniziale espansione e contenimento. Nel neonato umano i neuroni che attraverso monoamine, quali noradrenalina e dopamina, sono presenti in numero maggiore nella corteccia prefrontale rispetto alle altre cortecce associative posteriori, mentre i neuroni serotoninergici sono presenti ma non allo stesso livello. Dopo la nascita le monoamine nelle regioni corticali aumentano gradualmente fino a raggiungere un picco intorno ai tre anni. Successivamente declinano fino a stabilizzarsi ai livelli dell'adulto. Nel corso della vita adolescenziale e adulta la citoarchitettonica della corteccia umana appare piuttosto stabile, fino al raggiungimento dell'anzianità (Cragg, 1975). È stata osservata una certa quantità di degenerazione cellulare collegata all'avanzamento dell'età, in particolare nelle aree frontali e temporali (Lemaître et al., 2005). La corteccia prefrontale, nello specifico, è tra le regioni corticali che mostrano in modo più accentuato questa degenerazione, che si presenta in una diminuzione del volume, una diminuzione della densità e un assottigliamento delle cellule cerebrali (Salat et al., 2004; Tisserand et al., 2004; Van Petten et al., 2004). Nella settima e ottava decade di vita diverse manifestazioni di diminuzione del volume e della densità cellulare nella corteccia prefrontale sono imputabili ad un ridotto metabolismo proteico, come suggerito dai deficit nei livelli di RNA, oltre che di trascrizione ed espressione genica (Erraji-Benchekroun et al., 2005). A livello strutturale la diminuzione delle dimensioni delle cellule neurali è in gran parte dovuta alla riduzione e scomparsa dei dendriti, seguita dal decremento nella densità sinaptica (Peters, Sethares, & Luebke, 2008). I dendriti sia basali che apicali perdono le loro spine sinaptiche, mentre gli assoni delle cellule prefrontali presentano un ingrossamento del loro segmento prossimale. Questi cambiamenti morfologici sono stati descritti come precursori di deposito intracellulare di sostanze associate alla degenerazione neuronale, come la proteina precursore dell'amiloide (Härtig et al., 1997). Sulla base delle evidenze neuroanatomiche è possibile inferire che quelle parti del neocortex che si sviluppano per ultime, come la corteccia prefrontale, sono le prime che subiscono un'involuzione e le più sensibili agli effetti dei disordini neurodegenerativi.

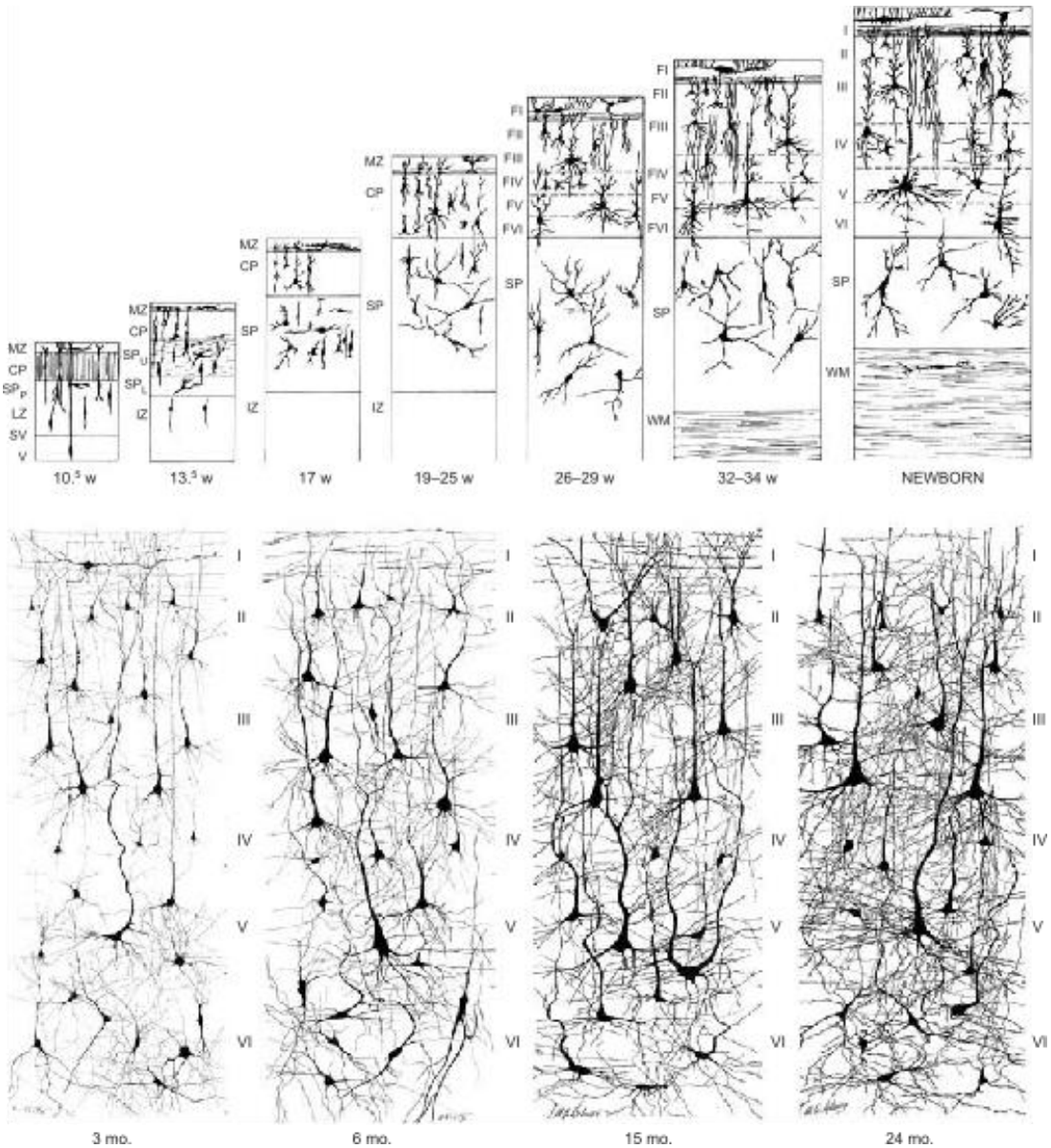

Figura 1.2 Sviluppo dell'architettura neurale nella corteccia prefrontale umana. In alto: il periodo prenatale da 10.5 settimane dal concepimento alla nascita. In basso: 3,6,15 e 24 mesi dopo la nascita.

1.2 Struttura architettonica della corteccia prefrontale laterale

La corteccia prefrontale (PFC) dei primati non è una singola area anatomica e funzionale dell'encefalo ma, come dimostrato ormai da tempo da diverse linee di ricerca è citoarchitettonicamente eterogenea e ogni suddivisione è specializzata in specifici compiti motori e cognitivi, le "funzioni superiori" o "esecutive". È una corteccia omotipica con uno strato granulare interno (IV) molto sviluppato, che la distingue dal resto della corteccia frontale (Walker, 1940). Tradizionalmente viene suddivisa in tre parti: laterale, mediale e ventrale (orbito-frontale). Nelle scimmie la corteccia prefrontale è delimitata dal solco arcuato nella superficie laterale e dalla parte anteriore del solco cingolato nella superficie mediale. Il solco principale è la caratteristica più facilmente identificabile e morfologicamente significativa della superficie mediale (Passingham, 1993). Grazie alla citoarchitettonica, è possibile identificare settori corticali diversi sulla scorta della loro struttura cellulare. Su tale base è possibile parcellare la corteccia cerebrale di una specie animale e tracciare analogie tra diverse specie.

In questo lavoro è stata considerata la porzione laterale della corteccia che include, sia nell'uomo che nei primati non umani, le aree 12/47, 45, 46 nella parte ventrale; mentre include le aree 8b e 9 nella porzione dorsale (vedi fig.1.3) (Petrides & Pandya, 1999, Petrides & Pandya, 2002), la numerazione segue la classificazione di Broadmann (Broadmann, 1909). In particolare queste aree sono suddivise nel macaco, di cui ci occuperemo in questo lavoro, secondo un ulteriore segmentazione della corteccia prefrontale laterale che identifica sei regioni, due ventrali e quattro dorsali: una regione dorsale posteriore che include l'area 8 A; una medio dorsale che include le aree 8 b, 9, 46,e 46d; una dorsale anteriore, aree 9 e 46; una ventrale posteriore, area 45a, 45b, e 8a; una ventrale anteriore, aree 12r e 46, e infine anche il polo frontale è incluso in queste suddivisioni e viene considerata parte di questa regione l'area frontale polare 10m (Petrides & Pandya, 1994). In questo lavoro verranno considerate nello specifico le aree della suddivisione ventrale ad esclusione dell'area 10m.

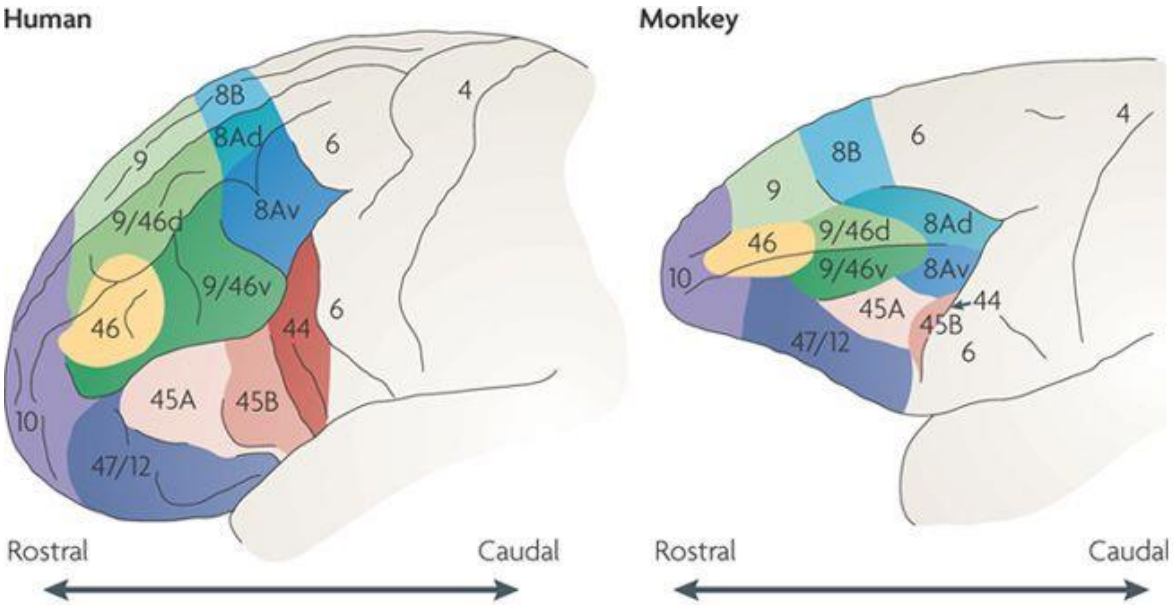

Figura 1.3 Mappa citoarchitettonica della superficie laterale e orbitale della corteccia prefrontale nell'uomo (sinistra) e nella scimmia (destra) (Petrides & Pandya, 2002). In posizione caudale rispetto al Solco arcuato e rostralmente al Solco Centrale si trova la corteccia motoria: l'area 4 di Brodmann, che è la corteccia motrice primaria, occupa la maggior parte del giro precentrale; l'area 6 di Brodmann, che è la corteccia premotoria, è posizionata rostralmente alla corteccia motoria primaria. Le aree frontali si trovano in posizione rostrale rispetto alla corteccia premotoria, area 6.

1.3 Funzioni della corteccia prefrontale

1.3.1 Memoria di lavoro

Le funzioni esecutive che saranno discusse in seguito operano all'interno di una vasta rete di circuiti ampiamente distribuita nella corteccia. Le funzioni esecutive di alto livello, quelle in cui sono rappresentati sequenze di azioni dirette ad uno scopo, sono implementate nella corteccia prefrontale. Quindi la corteccia prefrontale è uno snodo di network esecutivi che rappresentano azioni presenti, ma anche passate e future. Le funzioni esecutive non potrebbero esistere senza un substrato neurale che mantiene attiva la rappresentazione delle azioni pianificate, o un sotto-insieme di azioni che concatenate portano allo scopo specificato. Il modello teorico della "working memory" proposto da Baddeley e Hitch (Baddeley & Hitch, 1974) ipotizza l'esistenza di un sistema composto da più moduli in grado di mantenere e manipolare l'informazione. L'elemento fondamentale di questo sistema è "l'esecutivo centrale", un sistema supervisore che controlla il flusso di informazione da e per i sistemi subordinati; il "loop fonologico" e il "taccuino visuo-spaziale". L'insieme di queste componenti permette la formazione di un deposito di memoria a breve termine. In uno studio di Jacobsen per la prima volta fu osservato un deficit nella memoria a breve termine in primati con lesioni nella corteccia prefrontale (Jacobsen, 1935). Successivamente i deficit nella memoria a breve termine sono stati evocati in uno studio di inattivazione temporanea che ha coinvolto nello specifico porzioni della corteccia prefrontale dorsolaterale (Funahashi, Bruce, & Goldman-Rakic, 1993). Come i primati non umani con una lesione frontale il paziente frontale umano tipicamente esibisce un deficit nella memoria di lavoro, specialmente se la lesione è laterale. Studi elettrofisiologici sulle scimmie hanno fornito prove riguardo alla presenza di cellule nella corteccia prefrontale laterale che presentano attività sostenuta durante il periodo di latenza dopo la fine dei segnali istruttivi di tipo visivo (J. M. Fuster & Alexander, 1971; Pellegrino & Wise, 1993) e uditivo (Bodner, Kroger, & Fuster, 1996).). A tale proposito, sembra che la LPFC dorsale si occupi meno dei processi di ritenzione dell'informazione e più di quelli che entrano in gioco nella sua elaborazione ai fini della gestione del compito (Sligte, van Moorselaar, & Vandenbroucke, 2013). Il controllo dell'attenzione, la traduzione delle istruzioni conservate in memoria, la selezione della risposta opportuna, l'astrazione attraverso una serie di prove di un modello di risposta con cui guidare il comportamento e la modulazione delle interferenze, sono gli aspetti della memoria di lavoro nei quali la LPFC sembra essere determinante (Tanji & Hoshi, 2008).

1.3.2 Funzioni attentive

Prima di iniziare un'azione volontaria al fine di ottenere ciò che si vuole, il soggetto deve innanzitutto ricercare le informazioni per costruire lo schema dell'azione e il suo obiettivo. E' noto da molto tempo che i meccanismi neuronali che mediano la selettività percettiva richiesta in questo processo attentivo coinvolgono la LPFC (Boussaoud & Wise, 1993). Infatti, la presenza di numerose cellule prefrontali che rispondono, più o meno selettivamente, a stimoli sensoriali di varia natura è determinante nei processi attentivi e motivazionali necessari per la messa in atto di comportamenti coerenti con il contesto da cui le informazioni provengono. È come se attraverso l'elaborazione dei segnali sensoriali in entrata il nostro sistema prefrontale generasse istruzioni comportamentali funzionali ad ogni contesto (J M Fuster, 1973; Kojima, 1980; Thorpe, Rolls, & Maddison, 1983) grazie anche alla modulazione di tali informazioni sensoriali da parte di influenze neurali correlate ad esperienze precedenti, a motivazioni o a stati interni.

Recenti studi hanno provato che la PFC è critica per la funzione attentiva necessaria alla codifica dell'informazione di pertinenza specifica per il comportamento corrente, filtrando i segnali non desiderati (Desimone & Duncan, 1995; E. K. Miller & Cohen, 2001). Il fatto che l'attività cellulare nella LPFC esibisca una forte selezione dei segnali visivi dimostra il modo in cui l'attenzione focalizzata può portare alla scelta di comportamenti desiderati piuttosto che di quelli non desiderati (Everling, Tinsley, Gaffan, & Duncan, 2002). Questi risultati sono coerenti con la visione secondo cui l'attenzione che deriva dai segnali emanati dalla corteccia frontale influenza in un processo dall'alto al basso (processo *top-down*) le aree posteriori per favorire il flusso delle informazioni rilevanti per il comportamento previsto (B. T. Miller & D'Esposito, 2005). Il ruolo della LPFC nella selezione attenzionale dell'oggetto, piuttosto che il mantenimento dell'informazione sull'oggetto, è stata anche riportata in studi di fMRI in soggetti umani (Lau, Rogers, Haggard, & Passingham, 2004; James B. Rowe & Passingham, 2001) anche se è difficile localizzare i diversi aspetti del comportamento attentivo (Nagahama et al., 2001).

1.3.3 Inibizione delle risposte

Una caratteristica distintiva dei pazienti con lesioni frontali è la tendenza a perseverare nel commettere errori. Questa tendenza è generalmente spiegata come un fallimento nella funzione di inibizione di schemi comportamentali. Usando scimmie marmoset Dias e collaboratori hanno

scoperto che danni alla corteccia prefrontale laterale causa una perdita di controllo inibitorio sull'attenzione selettiva (Dias, Robbins, & Roberts, 1996). Mentre le lesioni nella corteccia orbito frontale portano ad una perdita di controllo inibitorio sul processamento dell'informazione affettiva. In soggetti umani danni alla corteccia prefrontale laterale sono associati ad un deficit nelle prestazioni al Wisconsin Card Sorting Test (WCST)(Milner, 1963; Passingham, Toni, & Rushworth, 2000). In studi di fMRI su umani è stata trovata un'attivazione transiente a livello della corteccia prefrontale laterale durante cambiamenti del set, cioè delle condizioni di risposta, nel WCST (Rushworth, Passingham, & Nobre, 2002; Sohn, Ursu, Anderson, Stenger, & Carter, 2000). È stato inoltre trovato che le aree attive durante un cambiamento del set coincidono con aree attive durante l'esecuzione di compiti go/no-go, suggerendo che la porzione ventrale della corteccia prefrontale è coinvolta nell'inibizione di diversi output motori, come la risposta di go durante un compito go/no-go e il cambiamento del set di risposta durante il compito WCST (Konishi et al., 1999). In uno studio successivo è stato mostrato invece che quando il compito WCST viene modificato in modo da isolare temporalmente i processi inibitori si attivano altre aree, ma non la porzione ventrale (Seiki Konishi, Jimura, Asari, & Miyashita, 2003). In queste condizioni è attiva l'area dorsale laterale della corteccia prefrontale. Questi risultati indicano la presenza di un meccanismo multi-area che processa le informazioni e guida il comportamento inibitorio nella corteccia prefrontale laterale.

1.3.4 Preparazione di risposte comportamentali

Prima dell'inizio dell'azione i network che coinvolgono la corteccia prefrontale provvedono la rappresentazione degli schemi della struttura comportamentale e i piani d'azione (Fuster, 1997). La preparazione della risposta è una funzione prospettica che specifica l'andamento di un'azione futura attraverso parametri spaziali e temporali. Ogni azione è strutturata in più sotto-azioni da svolgere correttamente e nell'ordine appropriato. All'avvio dell'azione, i circuiti coinvolgenti la corteccia prefrontale laterale fornirebbero le rappresentazioni degli schemi della struttura del comportamento, del piano dell'azione e del programma che delinea tale azione. La corteccia prefrontale laterale regola le relazioni temporali tra il verificarsi degli eventi e le azioni, ovvero, la regolazione delle contingenze cross-temporali (Fuster, Bodner, & Kroger, 2000). Questo sistema di regolazione è flessibile e sensibile al contesto del compito che si trova a svolgere. In uno studio di Fukushima si è osservato che l'attività nell'epoca che precede la selezione dell'obiettivo di una saccade può subire modifiche nel suo andamento temporale a

seguito del cambiamento dello stimolo target (Fukushima, Hasegawa, & Miyashita, 2004). Questo potrebbe indicare che il sistema che controlla la preparazione delle risposte si può aggiornare in funzione di istruzioni. Questi risultati indicano che la PFC riveste un ruolo centrale nella formazione delle relazioni temporali che intercorrono tra le azioni o in generale tra eventi rilevanti, in accordo con il contesto comportamentale corrente (Tanji & Hoshi, 2008). A seconda delle richieste del compito, i neuroni della PFC possono codificare e rappresentare un'ampia varietà di segnali attraverso domini sensoriali e motori in modo retrospettivo o in modo potenziale.

1.3.5 Selezione delle azioni e "decision making"

I processi di selezione delle azioni sono stati spesso associati ad attività nella corteccia prefrontale. Le evidenze derivano sia da studi su umani tramite PET (Frith, Friston, Liddle, & Frackowiak, 1991), che da studi su scimmie (Hasegawa, Matsumoto, & Mikami, 2000). Molti di questi studi hanno utilizzato compiti che presuppongono l'utilizzo della memoria di lavoro pertanto il ruolo dell'attivazione corticale potrebbe riflettere il mantenimento dell'informazione memorizzata piuttosto che la selezione di risposte manuali, verbali o oculomotorie. Per distinguere questi due aspetti e rilevare se l'attivazione sia dovuta alla selezione della risposta indipendentemente dall'utilizzo di processi di memoria di lavoro sono stati ideati compiti come quello di Rowe (James B. Rowe & Passingham, 2001) in cui la selezione, ma non il mantenimento, di item che guidano le risposte risulta attivare l'area 46. Inoltre la corteccia dorso-laterale frontale presenta un'attivazione differenziale in compiti in cui è richiesta l'esecuzione di un'azione spontanea rispetto a quando i movimenti sono causati da stimoli esterni. La selezione dell'azione può avvenire sotto specifiche condizioni che sono state studiate in diversi lavori che dimostrano come emerga attività neurale durante il processo di decisione riguardo l'azione da eseguire. In condizioni di assenza di istruzioni che specifichino l'obiettivo delle azioni il processo di decision making richiede tempo per essere generato. Hoshi e collaboratori hanno quantificato il tempo necessario a generare l'informazione per la scelta del target dell'azione, quando questo non era specificato direttamente (E Hoshi, Shima, & Tanji, 2000). L'attività neurale emergeva nella corteccia prefrontale laterale 300 ms dopo l'apparizione dei cue istruttivi che segnalavano la regola da applicare per selezionare il target dell'azione. La selezione di azioni viene eseguita anche in condizioni di ambiguità dell'informazione contestuale, ovvero quando esistono informazioni limitate riguardo le potenziali conseguenze delle decisioni. È stato osservato che soggetti impegnati in un compito

in cui la selezione dell'azione dipende dall'utilizzo di informazioni che cambia in maniera dinamica in un breve lasso di tempo presentano un aumento dell'attività nelle aree prefrontali dorso-laterali e intraparietali correlato all'aumento dell'ambiguità nella sequenza di informazioni (Huettel, 2005). Quando l'informazione ambigua si accumula in un breve periodo di tempo precedente alla selezione di un'azione risulta critico il ruolo della corteccia prefrontale laterale per disambiguare la scelta. Mentre quando l'ambiguità dipende da precedenti associazioni apprese tra stimolo e risposta risulta modulata l'attività della corteccia frontale mediale. La differenza tra queste diverse attivazioni sarebbe determinata dalla durata dell'intervallo temporale tra la raccolta di informazioni e la scelta sull'azione da eseguire.

1.4 Connessioni cortico-corticali della corteccia prefrontale

A seguito di analisi citoarchitettoniche e mieloarchitettoniche condotte da diversi autori sui macachi (Barbas & Pandya, 1989, Carmichael & Price 1994) sono stati trovati gradienti citoarchitettonici che strutturano due diversi network di aree adiacenti che condividono gran parte delle connessioni cortico-corticali. Un gradiente si origina dalle aree orbitofrontali caudali e coinvolge le aree 11, 12, 14 e 10 per poi raggiungere le parti rostrali e caudali dell'area 46 e dell'area 8, nella suddivisione ventrale della corteccia prefrontale laterale (LPFC). L'altro network ha una direzione medio-dorsale, partendo dalla porzione rostrale del corpo calloso (aree 24, 25 e 32), interessa le aree mediali 9, 10 e 14 e termina nella porzione dorsale delle aree 46 e 8. Sebbene i gradienti trovati nei diversi studi non combacino perfettamente si può comunque considerare consistente l'ipotesi dell'esistenza di due macro-network nella corteccia prefrontale laterale, che originano dalla corteccia mediale l'uno e da quella orbitale l'altro. In riferimento al solco principale, la parte dorsale dell'LPFC appartiene al network medio-dorsale, mentre la parte ventrale dell'LPFC appartiene al network orbito-ventrale, o baso-ventrale. Le aree all'interno di ogni network si trovano fortemente connesse tra di loro, inoltre anche le connessioni con altre regioni corticali e sub-corticali mantengono un certo grado di segregazione, come evidenziato da uno studio comparativo tra ratti, scimmie e uomo (Ongur & Price, 2000). In particolare, il network orbito-ventrale riceve afferenze da diverse cortecce sensoriali, incluse quella gustativa, olfattiva, uditiva, la corteccia sensoriale secondaria (SII), cortecce visive di ordine superiore come l'infero-temporale, ed è connesso con aree di

integrazione multisensoriale nella LPFC ventrale e con la corteccia peririnale. Gli input alle aree medio-dorsali derivano dall'ippocampo, dalla corteccia entorinale e da aree temporali che codificano l'informazione in maniera multimodale, o aree uditive del giro temporale superiore. Sono le aree medio dorsali ad avere il numero maggiore di connessioni in uscita verso le cortecce motorie (corteccia premotoria, cervelletto, gangli della base, area pre-supplementare motoria), e strutture coinvolte nella coordinazione di risposte viscero-motorie come l'ipotalamo e i nuclei del tronco dell'encefalo, oltre che connessioni a feedback con il giro temporale superiore, l'ippocampo, la corteccia entorinale e paraippocampale posteriore.

Da un'analisi dei pattern di connessioni risulta che il network orbito-ventrale, collegato in larga parte con aree di tipo somato-sensoriale, sia coinvolto nell'integrazione dell'informazione sensoriale multimodale, specialmente riferita al cibo e ai comportamenti di ricerca di nutrimento in funzione di valutazioni degli stimoli in termini di ricompensa. Il network medio-dorsale ha meno afferenze sensoriali se paragonato all'orbito-ventrale ma considerando le regioni di provenienza delle connessioni risulta che le informazioni in entrata nel network dorsale sono già processate e sono in formato multimodale. Sembra quindi che i due network processino informazioni basandosi su differenti tipi di input. L'estesa rete di connessioni intrinseche consente alla corteccia prefrontale di integrare informazione a differenti livelli di processamento.

In uno studio neuroanatomico più recente sul macaco (Saleem, Miller, & Price, 2014) sono stati utilizzati traccianti anatomici retrogradi iniettati in aree della corteccia prefrontale laterale e traccianti anterogradi nella corteccia temporale inferiore e superiore per studiare i distinti percorsi delle fibre afferenti ed efferenti alla corteccia prefrontale. I risultati indicano che esistano almeno tre network distinti all'interno della LPFC (fig. 1.4), nello specifico le regioni dorso-laterali (DPFC), ventro-laterali (VLPFC) e caudo-laterali (CLPFC). Ulteriori analisi sulle connessioni, nello stesso studio, hanno dimostrato che questi tre network hanno distinti pattern di connessioni con aree corticali, sia all'interno della corteccia prefrontale che con altre aree, e sub-corticali che li rendono funzionalmente differenti. I network ventro-laterale e dorso-laterale risultano molto simili nelle loro connessioni all'orbito-ventrale e medio-dorsale, mentre l'area 45a situata nella parte caudale della corteccia prefrontale farebbe parte di una rete di connessioni a sé stante con la corteccia parietale posteriore, osservazione già avanzata da studi precedenti sempre effettuati su scimmie rhesus (Petrides & Pandya, 1984, Borra et al. 2011). Le connessioni estrinseche al di fuori della corteccia prefrontale collegano ogni network in più grandi circuiti corticali anatomicamente distinti. Il VLPFC è connesso principalmente con

l'insula disgranulare, aree somato-sensoriali, corteccia parietale inferiore, aree visive della corteccia inferotemporale e il cingolo anteriore. Il DPFC è connesso con la parte rostrale del giro temporale superiore e la porzione dorsale del solco temporale superiore, la corteccia paraippocampale e il cingolo anteriore e posteriore.

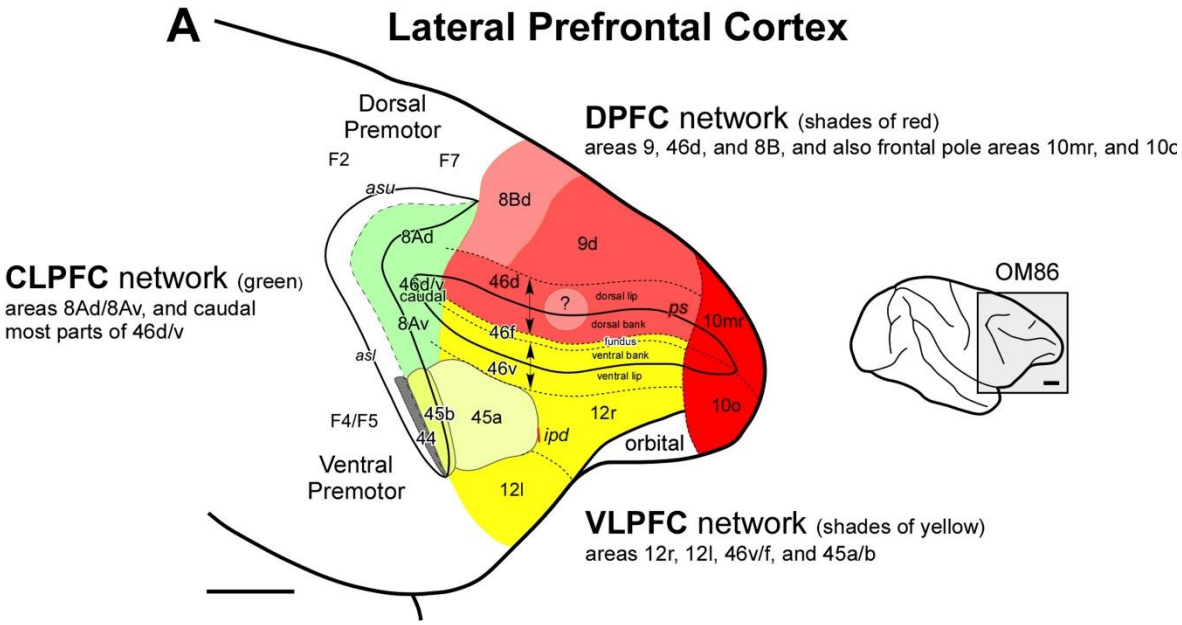

Figura 1.4 Suddivisioni della corteccia prefrontale laterale (LPFC). Sono evidenziati tre network distinti in base alle connessioni intrinseche ed estrinseche. In giallo il network ventrolaterale (VLPFC) che comprende le aree 12l, 46v, 12r, 45a, 45b. In rosso il network dorsolaterale (DPFC) che comprende le aree 9, 46d,8b e le aree fronto-polari 10o e 10mr. In verde il network caudolaterale (CLPFC), aree 8Ad, 8Av, e la parte più caudale dell'area 46, 46d/v. L'area indicata da un punto di domanda nella regione dorsolaterale è stata indicata dagli autori come un'area avente un pattern di connessioni diverso da quello delle altre aree del network dorsale (Saleem et al., 2014).

1.5 Differenze anatomo-funzionali dei network dorso-laterale e ventro-laterale

Alla luce degli studi anatomici considerati risulta che esistano due macro-aree anatomiche che compongono la corteccia prefrontale laterale. Sebbene ci siano delle discrepanze tra i vari studi nella definizione dei confini di tali network emerge con consistenza una differenza tra aree dorsali e ventrali, rispetto al solco principale. Illustrerò brevemente le connessioni e, in base a queste, le ipotesi sulle caratteristiche funzionali delle aree dorso-laterali (DPFC) per poi concentrarmi sull'anatomia del network ventro-laterale (VLFC). Questa suddivisione della corteccia prefrontale è costituita da numerose aree, suddivise in diverso modo a seconda delle parcellazioni considerate. In particolare, nel presente studio verranno considerate nel dettaglio le aree che sono state oggetto della registrazione durante i compiti sperimentali, ovvero le aree 12r, 45a e 45b, e 46v e 8.

1.5.1 Network dorso-laterale

Il network dorso-laterale include la corteccia prefrontale posta sulla parte dorsale della superficie emisferica laterale, inclusa la porzione dorsale del solco principale. Secondo le mappe citoarchitettoniche classiche della corteccia cerebrale umana sono due le aree incluse in questa regione: l'area 9 e 46. L'area 46 occupa il giro frontale medio mentre l'area 9 si trova tra il giro frontale medio e il giro frontale superiore. Inoltre, nella parte posteriore della corteccia dorsolaterale è presente l'area 8.

La corteccia prefrontale dorsolaterale risulta coinvolta nel processamento spaziale degli stimoli, nella manipolazione, monitoraggio o processamento di informazioni di tipo relazionale rilevanti per l'esecuzione di un task (D'Esposito, Postle, Ballard, & Lease, 1999; Petrides, 2000). Questo tipo di processamento viene eseguito su informazioni presenti nella memoria di lavoro (Working Memory), che vengono elaborate e organizzate tramite un rafforzamento delle associazioni inter-item e la creazione di "chunk", raggruppamenti di sequenze di singoli item secondo un criterio specifico, per costruire raggruppamenti di alto livello con gli item presenti nella memoria di lavoro. Esperimenti di fMRI (R. S. Blumenfeld, 2006) dimostrano l'attivazione del network DPFC durante compiti che richiedono l'organizzazione o il mantenimento di item in compiti di risposta ritardata. I risultati dimostrano anche che l'attività del DPFC è predittiva della formazione di una traccia di memoria a lungo termine per gli item

usati nel compito. È stato osservato che a seguito di lesioni della corteccia dorsolaterale nei macachi, specificamente le aree adiacenti al solco principale, la prestazione in compiti di risposta ritardata è deficitaria (Goldman, Rosvold, Vest, & Galkin, 1971) , in particolare nei compiti che coinvolgono informazioni spaziali sugli item, indipendentemente dalla modalità di senso in cui vengono presentati. La corteccia prefrontale dorsolaterale risulta coinvolta nel mantenimento e nella manipolazione on-line dell'informazione, ma studi di neuroimaging rivelano come l'attività di questa regione non compaia necessariamente durante l'intervallo di tempo tra stimolo e risposta ritardata, ma compare invece al momento della selezione della risposta (Rowe, Toni, Josephs, Frackowiak, & Passingham, 2000). Basandosi su queste osservazioni è stato proposto da diversi autori (Egner & Hirsch, 2005; Mars & Grol, 2007; Pochon, 2001) che il ruolo della DLPFC sia quello di selezionare le rappresentazioni di azioni future, per preparare le aree motorie alla risposta, piuttosto che quello di buffer temporaneo per il mantenimento dell'informazione sensoriale.

1.5.2 Network ventro-laterale

La corteccia ventro-laterale nell'uomo è localizzata nel giro frontale inferiore, limitata dorsalmente dal solco frontale inferiore e ventralmente dal solco laterale, si trova anteriormente rispetto alla corteccia premotoria (area 6 di Broadmann) e posteriormente rispetto al polo frontale (area 10). Comprende le aree 8, 45A e 45B, 46v e 47/12 (Petrides & Pandya, 2002). L'area 47/12 è stata denominata in questo modo da Petrides & Pandya (2002) in quanto nella corteccia prefrontale dell'uomo rostralmente all'area 45 giace un'estesa regione corticale denominata area 47 da Broadmann. La parte ventrolaterale di questa area, che si estende lateralmente fino al solco orbitale ha caratteristiche architettoniche simili a quelle dell'area 12 della corteccia prefrontale del macaco, denominata cosi da Walker (1940). Quindi l'area 47 nell'uomo ha lo stesso pattern architettonico dell'area 12 nel macaco, ma ci si riferirà qui ad essa come area 12. Di seguito verranno esaminate nel dettaglio le aree 45a e 45b, 8, 12r e 46v in riferimento alla corteccia del macaco.

Area 8

Walker (1940) suddivise la porzione anteriore della corteccia prearcuata in due settori differenti: 8A dorsale e 45 ventrale; Barbas e Pandya (1989), invece, in 8 dorsale e 8 ventrale. Stanton et al., (1989), tramite microstimolazione elettrica identificarono un settore nel banco anteriore del solco arcuato, posto tra la parte ventrale della 8A e quella dorsale della 45b, in cui è possibile evocare con stimoli a bassa soglia movimenti oculari di tipo saccadico e, riprendendo la definizione di Bruce (Bruce et al., 1985), definirono tale area Campi Oculari Frontali (Frontal Eye Fields, FEF).

In uno studio anatomico con uso di traccianti (Gerbella et al. 2010) nella corteccia prefrontale sono state individuate connessioni dell'area 8/FEF con le aree prefrontali 8r e 45b, 45a e 12r. Connessioni estese sono state osservate anche con diverse aree del solco temporale superiore e la convessità inferotemporale. Nel solco temporale ci sono connessioni con le aree TEa/m, Ipa e TEO. Più caudalmente nel solco temporale sono state trovate modeste connessioni con il

fondo temporale superiore (FST) e aree medio temporali (MT) e medio temporali superiori. Un alto numero di cellule tracciate sono state trovate nelle aree visive della corteccia occipitale, area V4, V3 e V2. Tutte queste connessioni mostrano una configurazione a feedback con le aree prefrontali. Nella corteccia parietale posteriore sono state osservate dense connessioni con l'area LIP e AIP. L'area 8r mostra un pattern di connessioni chiaramente differente dall'area 8/FEF. La connettività con le aree frontali è risultata molto più alta nell'area 8r rispetto all'area FEF, coinvolgendo le aree 45 a e 45b, l'area 46 e gli stetti FEF. Al di fuori della corteccia frontale le uniche connessioni significative dell'area 8r sono con l'area LIP, sia la suddivisione ventrale che quella dorsale. Nella corteccia temporale sono state osservate cellule marcate con tracciante nelle aree FST, medio temporale (MT) e aree visive extra striate V4t e V4.

Area 45

Nel macaco la parte caudale della corteccia ventrolaterale è situata ventralmente al solco principale e confina caudalmente con la parte inferiore del solco arcuato. La parte ventro - caudale di questa regione corrisponde all'area 45, formata da due suddivisioni architettoniche differenti: una caudale, 45b, situata ventralmente nel banco anteriore del solco arcuato, e una rostrale, 45a, che si estende fino alla convessità frontale inferiore (inferior prefrontal dimple IPD). Studi di diversi autori hanno esteso i confini dell'area 45 in direzione rostrale, in un settore precedentemente attribuito ad altre aree, 46 e 12 secondo Walker (1940), 12 secondo Preuss e Goldman-Rakic (2001). Recenti studi multiarchitettonici (Gerbella, Belmalih, Borra, Rozzi, & Luppino, 2007) hanno riconosciuto criteri per distinguere i due settori dell'area 45, architettonicamente differenti l'uno dall'altro e dalle aree confinanti (vedi fig 1.5). È stato scoperto tramite metodi di tracciatura anatomica che tali suddivisioni appartengono a due network di connessioni distinte (Gerbella et al., 2010). Le aree 45a e 45b differiscono nella loro connettività con regioni frontali, temporali e parietali. Nel lobo frontale l'area 45 a mostra connessioni reciproche con le aree 12l e 12r, l'area 10, con le aree 46 e 8b situate dorsalmente e con l'area 12 orbitale. Altre connessioni frontali coinvolgono l'area 8/FEF (Frontal Eye Field) e la 44. L'area 45b mostra connessioni reciproche con le aree 12l e 12r caudale, ma a differenza

della 45a, è densamente connessa con l'area 12r rostrale e l'area 46 caudale, mentre presenta scarse connessioni con l'area 8 b e non risulta connessa con le aree 46 e 10. Anche le connessioni con le regioni orbitofrontali risultano scarse, ma sono comunque più numerose rispetto a quelle dell'area 45a, andando a coinvolgere le aree 12o, 13m, 12m e 11. Le connessioni con l'area 8r e i FEF, soprattutto ventrali, sono più numerose sempre rispetto alla 45a. Riguardo alle connessioni temporali, sebbene entrambe le aree 45a e 45 b mostrino connessioni reciproche con il solco temporale anteriore e aree della convessità inferotemporale vi sono connessioni più dense tra l'area 45b e l'area TEa/m che non risultano con l'area 45 a. Quest'ultima presenta in particolare connessioni significative con l'area del giro temporale superiore (STG) e l'area STP del solco temporale superiore (Saleem, Kondo, & Price, 2008). Nella corteccia parietale connessioni reciproche con le aree LIP e Opt distinguono l'area 45b dall'area 45a (Blatt, Andersen, & Stoner, 1990), che presenta solo deboli connessioni con l'area PFG (Borra, Gerbella, Rozzi, & Luppino, 2011).

Alla luce di queste prove anatomiche si possono tracciare le differenze funzionali delle due aree 45a e 45b. L'area 45a sembra svolgere un ruolo di processamento delle informazioni visive e audiovisive. Le connessioni che l'area 45a presenta con il solco temporale possono rappresentare il substrato anatomico che permette questa funzione di codifica di stimoli visivi. Le aree temporali come la STP contengono neuroni visivi che codificano differenti tipi di movimento biologico e sono attivati dall'osservazione di azioni (Barraclough, Xiao, Baker, Oram, & Perrett, 2005). Le connessioni frontali dell'area 45a con l'area 46, 12 o, 8/FEF coinvolgono l'area 45 in un network collegato ad aree uditive del giro temporale superiore. Questo pattern di connessioni traccia un substrato anatomico tale da poter ipotizzare il coinvolgimento dell'area 45a nella codifica dei movimenti biologici, come i movimenti oculari, e dei segnali uditivi, che sono gli stimoli rilevanti in una condizione sociale.

Le connessioni più rilevanti dell'area 45b sono quelle con l'area 8/FEF e 8r. Questi dati suggeriscono un coinvolgimento dell'area 45b nel sistema oculomotorio frontale. Le connessioni con aree prefrontali rostrali e orbitali e la mancanza di connessioni con aree coinvolte in fasi precoci del processamento dell'informazione visiva suggeriscono che l'area 45b potrebbe avere un ruolo nel sistema oculomotorio. L'area 45b avrebbe un ruolo di processamento di informazione altamente integrata, proveniente dalle aree frontali, diretta al sistema di movimento oculare. Tale informazione sarebbe di carattere motivazionale, legata al valore di uno stimolo su cui andrebbe diretto lo sguardo.

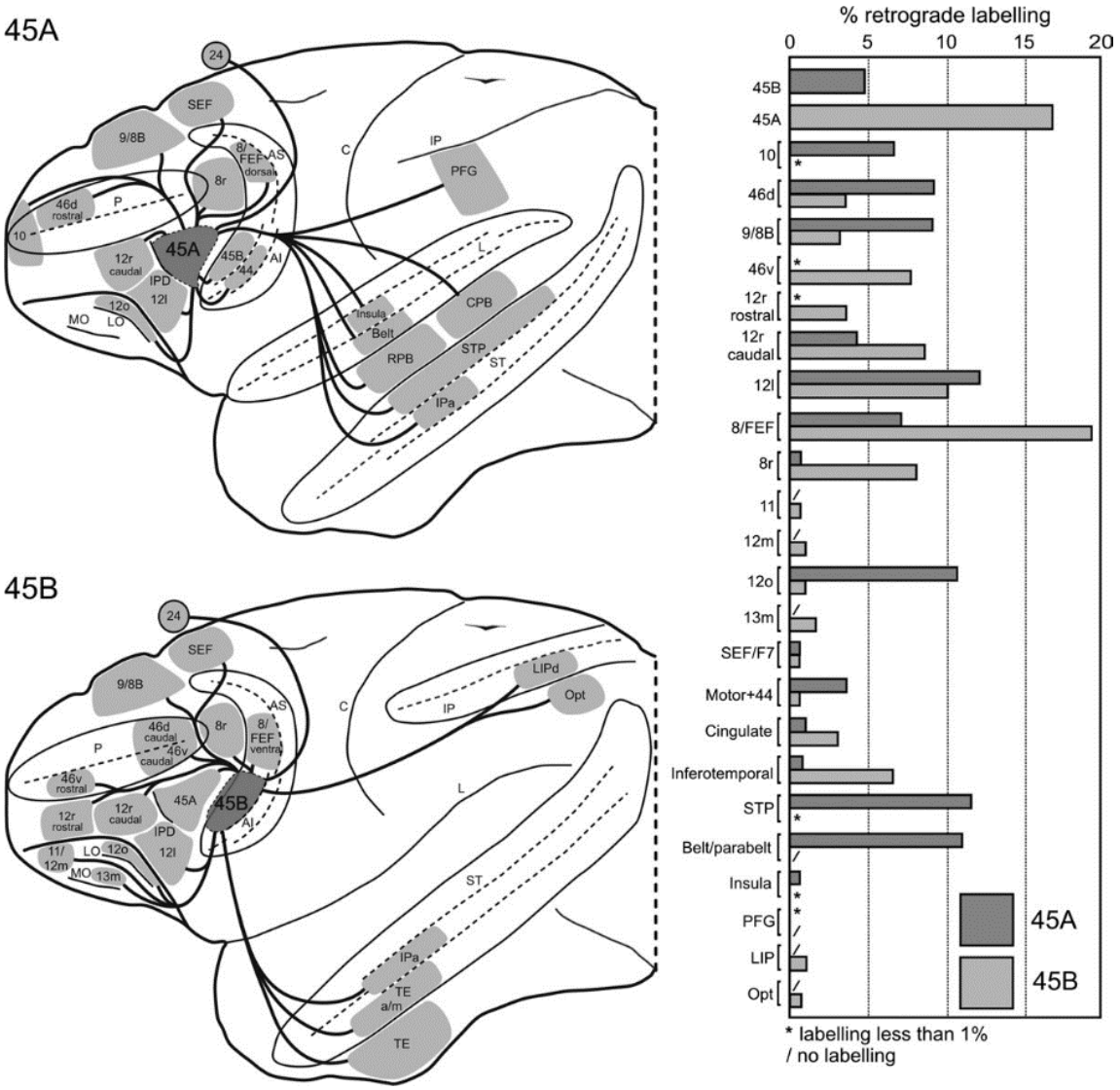

Figura 1.5 Illustrazione riassuntiva delle maggiori connessioni ipsilaterali delle aree 45a e 45b. Nella tabella di destra sono illustrate in percentuale le distribuzioni medie della marcatura retrograda osseravate a seguito delle iniezioni di tracciante nelle aree 45a e 45b. Nel grafico sono mostrate solo le distribuzioni con valori >1%. Tratto da Gerbella et al (2010).

Area 12r

L’area 12 del macaco è situata ventralmente all’area 46, rostralmente all’area 45 e caudalmente all’area frontopolare 10. Carmichael e Price suddivisero l’area 12 in: 12l (laterale) posta lateralmente alla 45A, che si estende ventralmente fino alla riflessione orbitale e rostralmente fino all'IPD (Carmichael & Price, 1994); 12r (rostrale), posta rostralmente alla 45A, caudalmente alla 10 e ventralmente alla 46v; 12m (mediale) posizionata sulla superficie orbitale. Nello studio di Borra (Borra et al., 2011) è stato iniettato un tracciante nell’area 12r a differenti livelli rostro caudali e i risultati hanno mostrato pattern di connessione diversi in base al sito. La parte caudale dell’area 12r (Fig. 1.6, pannello in basso a sinistra) è connessa fortemente con la parte caudale della VLPF nelle aree 45A, 45B e 12l ma meno con l’area 8/FEF e la parte caudale dell’area 46v. Nella corteccia orbito frontale maggiori connessioni sono con l’area 12o e meno dense con la 12m e la 13. Al di là della corteccia prefrontale, ci sono connessioni con la parte dorsale della corteccia premotoria e con la corteccia infero temporale in particolare nelle parti rostrale e intermedie dell’area TEa/m, area IPa e aree TEad e TEpd.

La parte intermedia è connessa nella corteccia prefrontale con la parte ventrale dell’area 46 (46v). Connessioni più deboli sono state trovate con l’area 12l, l’area 45A, 45B e 9m. Connessioni con la corteccia orbito frontale sono state riscontrate nell’area 11, 12m, 12o e nelle suddivisioni mediali e laterali dell’area 13. Al di fuori della corteccia prefrontale l’area 12r è connessa densamente con la corteccia premotoria ventrale, in particolare con l’area F5a con l’area frontale disgranulare opercolare (PrCO) e con l’area parietale AIP. Nella corteccia parietale dense connessioni sono localizzate nell’operculum parietale, maggiormente nella regione SII. Nella corteccia temporale invece sono state visualizzate nel banco inferiore del STS, nell’are TEa/m.

Per quanto riguarda la parte rostrale dell’area 12r quasi tutte le connessioni sono state riscontrate nella corteccia prefrontale. Connessioni molto forti sono state descritte rostralmente nell’area 10, nella parte rostrale dell’area 46v adiacente dorsalmente e caudalmente con l’area 12l; più deboli con l’area 45B e con l’area 45A. Nella corteccia orbito frontale dense connessioni sono state osservate con le aree 11, 12m e 12o, 14 e le parti mediali e laterali dell’area 13. Oltre alla corteccia prefrontale connessioni relativamente deboli sono state notate con la parte rostrale del banco superiore della STS e il fondo dell’area IPa; infine sono presenti anche deboli connessioni con l’area cingolata 24a.

La parte della corteccia ventrolaterale che include l'area 12r contiene un gran numero di neuroni sintonizzati sulle caratteristiche visive di uno stimolo e risulta coinvolta in compiti comportamentali in cui l'informazione riguardo all'identità di un oggetto è importante. È stato proposto che questo tipo di informazione costituisca il contenuto della memoria di lavoro di tipo non spaziale, coinvolta in compiti di comparazione e categorizzazione basati sulle caratteristiche come forma e identità (Passingham et al., 2000). I dati sulle connessioni dell'area 12r, in particolare la sua suddivisione intermedia, suggeriscono un ruolo nel processamento di informazione legata alle caratteristiche fisiche dello stimolo, al fine di controllare risposte scheleto-motorie di mano e bocca rivolte ad esso. In particolare, la parte intermedia dell'area 12r potrebbe contribuire all'esecuzione di azioni provvedendo informazioni riguardo alle proprietà fisiche dell'oggetto target, come il suo peso, centro di massa, configurazione, materiale di cui è composto. Quest'informazione potrebbe essere utilizzata per selezionare un tipo di afferramento e anticipare il programma motorio da mettere in atto a seconda dell'oggetto considerato. Inoltre, potrebbe contribuire al riconoscimento tattile di un oggetto rievocando informazioni memorizzate riguardo alla sua forma e altre caratteristiche fisiche.

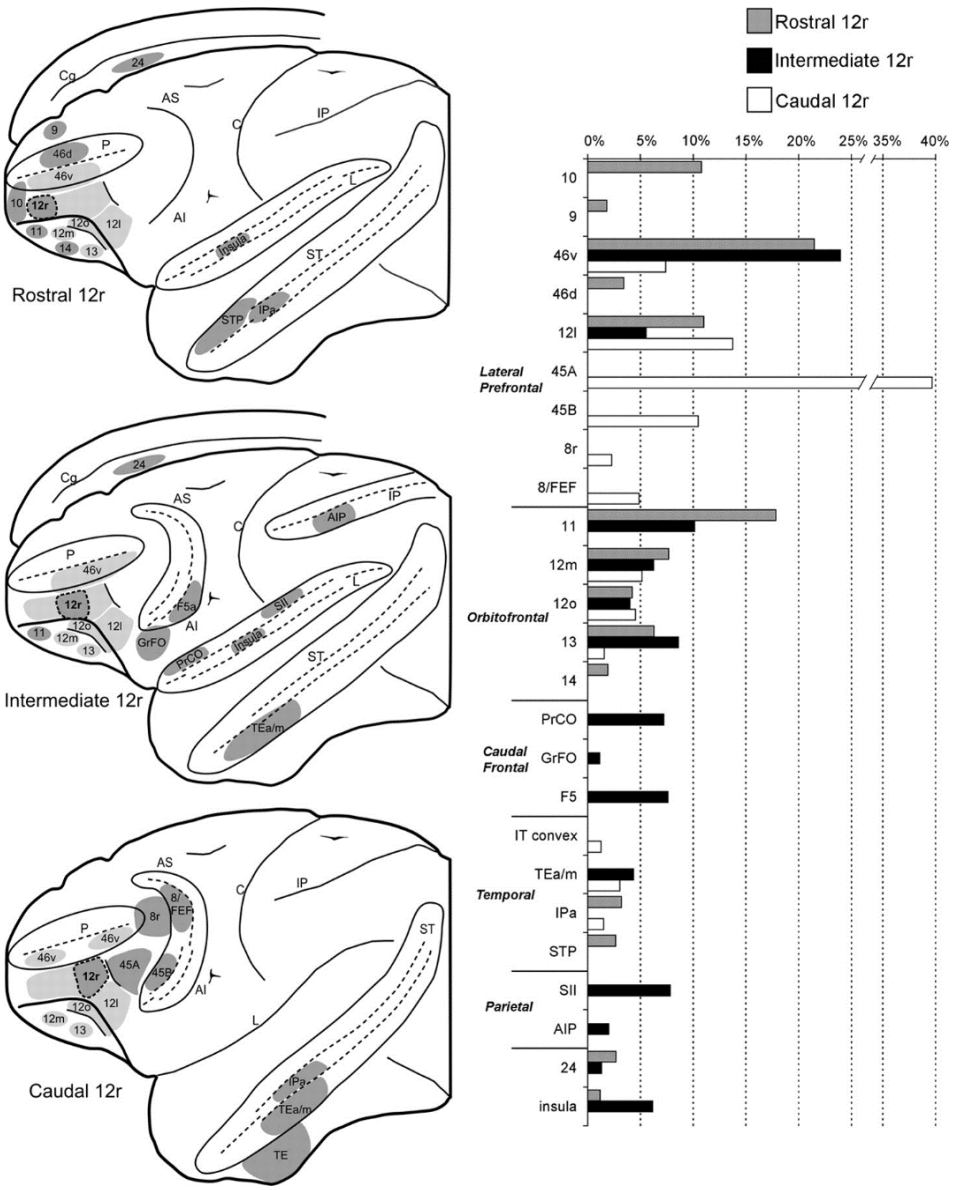

Figura 1.6 Illustrazione riassuntiva delle principali connessioni corticali ipsilaterali delle suddivisioni rostrale, intermedia e caudale dell'area 12r. Nel grafico a destra è rappresentata la distribuzione media della marcatura retrograda nelle varie regioni corticali. Nell'illustrazione le aree connesse con uno o due settori dell'area 12r sono mostrate in grigio scuro, mentre le aree connesse con tutti i settori dell'area 12r sono colorate in grigio chiaro. Nel grafico sono mostrate solo le connessioni con valore di distribuzione media > 1%. (Tratto da Borra et al., 2011)

Area 46

L'area 46 (nelle mappe di Brodmann (Brodmann, 1909) e Walker (Walker, 1940)) occupa la superficie attorno al solco principale per tutta la sua estensione rostro-caudale . Questa confina dorsalmente con l'area 9, caudalmente con la corteccia pre-arcuata, ventralmente con l'area 12

e rostralmente con l'area 10. Quest'area viene suddivisa in una porzione dorsale al solco principale (46d) ed una ventrale (46v) sulla base delle differenti connessioni corticali e proprietà funzionali dei neuroni contenuti nei due settori. In uno studio di Gerbella e collaboratori (Gerbella, Borra, Tonelli, Rozzi, & Luppino, 2013) viene presa in considerazione la parte ventrale dell'area 46 del macaco (46v), e viene dimostrato come esista una eterogeneità nelle connessioni di quest'area rispetto alle suddivisioni rostro-caudali (fig. 1.7).

La suddivisione rostrale dell'area 46v, la 46vr, presenta un pattern di connessioni molto forte con altre aree prefrontali, sia all'interno della VLPF che con la DLPF e le aree orbito-frontali. Connessioni con aree extra-prefrontali coinvolgono le regioni infero-temporali, il solco temporale superiore (STS) e l'area 24. Questo insieme di connessioni è sostanzialmente differente rispetto a quelle dell'area 46vc, la parte caudale dell'area 46v, che in generale mostra deboli connessioni con la DLPF e le aree orbito-frontali, ancora più scarse con le aree infero-temporali, ma presenta invece forti connessioni con aree parietali e premotorie ventrali (PMv).

Questi dati portano ulteriori prove al fatto che l'area 46vc sia coinvolta nel controllo motorio di differenti tipi di azioni. In particolare, la parte caudale della 46vc è principalmente collegata con aree parietali (LIP) e frontali (8/FEF, 8r, 45b) e suggeriscono come quest'area sia uno snodo del network parieto-prefrontale coinvolto nel controllo dei movimenti oculomotori. La parte rostrale della 46vc è connessa fortemente con il lobo parietale inferiore (AIP, PG, PFG, PF, la corteccia somatosensoriale SII) e con il lobo frontale (F5, 44), tali aree formano un altro circuito parieto-prefrontale coinvolto nel controllo di movimenti di mano, bocca e braccio, oltre che nel riconoscimento di azioni compiute con questi effettori (Fogassi & Luppino, 2005). Il settore rostrale della 46vc mostra connessioni con le aree parietali che sono a loro volta collegate ad aree fontali premotorie (F5 e PMv), in cui sono presenti neuroni che codificano il tipo di afferramento eseguito a seconda dell'obiettivo dell'azione e lo scopo finale, l'intenzione, di azioni complesse a differenti livelli di astrazione (Bonini et al., 2010).

Studi precedenti che hanno mostrato un coinvolgimento dell'area 46v nella memoria di lavoro, nella codifica di sequenze temporali di eventi, nel controllo in termini temporali di azioni complesse e delle intenzioni sottostanti (Ninokura, 2003, Mushiake et al. 2006) sarebbero quindi in accordo con gli studi anatomici. L'area 46v sarebbe coinvolta in maniera sostanziale nella selezione, monitoraggio e verifica delle sequenze di azioni dirette ad un oggetto secondo precise intenzioni, basate su obiettivi, regole che guidano il comportamento o informazioni immagazzinate in memoria. In questo caso è a notare che la parte rostrale dell'area 46vc è l'unico settore dell'area 46 che mostra connessioni con la corteccia insulare, l'area 24 e la

corteccia orbito-frontale. Questo tipo di connessioni può configurarsi come il substrato anatomico che fornisce informazioni riguardo agli stati interni motivazionali e al valore dello stimolo durante l'esecuzione dell'azione.

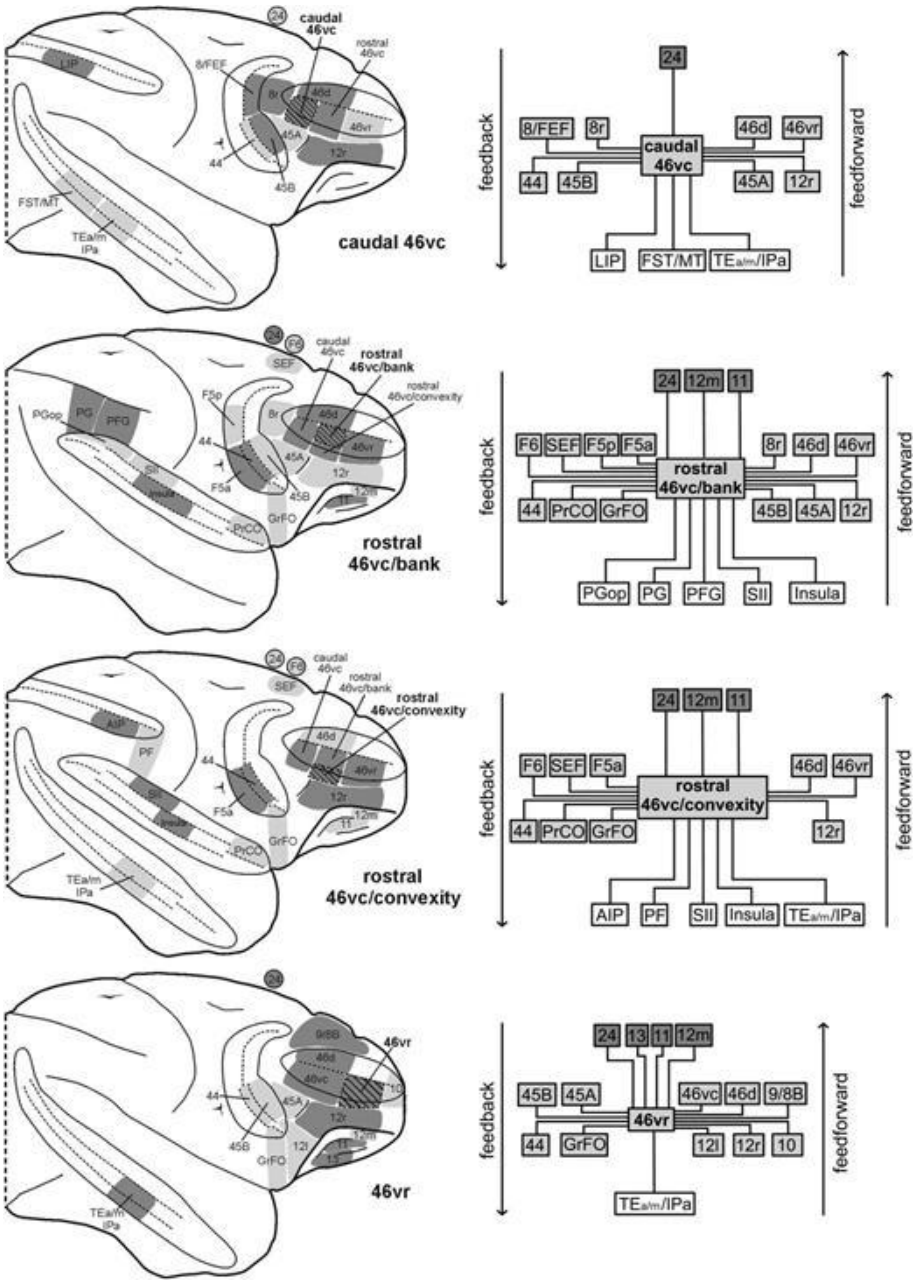

Figura 1.7 Illustrazione riassuntiva delle connessioni corticali ipsilaterali delle principali suddivisioni dell'area 46v, in particolare sono state considerate le suddivisioni: 46vc caudale, 46vc rostrale, banco e convessità, 46vr. I settori di iniezione sono mostrati come aree tratteggiate. Le aree con marcatura retrograda osservata maggiore del >5% sono mostrate in grigio scuro, le aree con marcatura osservata compresa tra 1-5% sono indicate in grigio chiaro. Nella colonna di destra, i diagrammi sintetizzano le relazioni gerarchiche per ogni settore che possono essere inferite dai pattern di connessioni. In ogni diagramma le aree che mandano proiezioni a feedforward e ricevono proiezioni a feedback da un dato settore sono indicate con rettangoli bianchi nella parte inferiore del

diagramma. Le aree che mostrano connessioni laterali sono indicate dentro rettangoli grigio chiaro nella parte intermedia. Le aree che ricevono proiezioni a feedforward e mandano proiezioni a feedback da un dato settore sono indicate con rettangoli grigio scuro nella parte alta. (Tratto da Gerbella et al., 2013)

L'esame di questi dati derivanti da studi anatomici ci indicano che nella corteccia prefrontale ventro-laterale, specialmente nella parte caudale che comprende le aree 8/FEF, 45 a e 45b, 46 e 12, esista un frazionamento in sotto-aree identificabile tramite i diversi pattern di connessione, sia con aree intra-prefrontali, come la corteccia orbito-ventrale, che con regioni temporali e parietali principalmente, ma anche con aree visive extra-striate. All'interno delle stesse suddivisioni anatomiche è stato inoltre osservato un gradiente di connessioni che si posiziona lungo un asse rostro-caudale e coinvolge diverse aree. Considerando le aree 46, 45 e 12r studiate in diversi lavori (Borra et al., 2011; Gerbella et al., 2007, 2013) si osserva come, sebbene differiscano in termini di connessioni orbito-frontali e temporali, le parti caudali dell'area 46vc, l'area 45A e la parte caudale dell'area 12r mostrano dense connessioni con aree deputate al controllo oculomotorio, nella regione pre-arcuata. Inoltre, sia le parti rostrali dell'area 46vc e la parte intermedia dell'area 12r sono connesse con aree parietali e frontali coinvolte nel controllo di azioni di mano. Le parti più rostrali delle aree 46vr e 12r mostrano in maniera quasi esclusiva connessioni con aree prefrontali. Questi dati mostrano come esista un tipo di organizzazione di connessioni lungo un asse rostro-caudale nella corteccia ventro-laterale prefrontale del macaco. Le aree più caudali risultano collegate con aree coinvolte nel controllo dei movimenti sia oculo che scheleto-motori, basati su stimoli interni ed esterni. Le aree rostrali di questo gradiente invece mostrano connessioni quasi solo prefrontali, prefigurando un ruolo nell'esecuzione di funzioni di livello più astratto, di tipo cognitivo. Ci si chiede se queste differenze anatomiche corrispondano a differenza funzionali sempre secondo un asse rostro-caudale all'interno della VLPF. Recenti modelli di funzionamento dei processi cognitivi nella corteccia prefrontale (Badre, 2008; Koechlin & Summerfield, 2007) hanno evidenziato un'organizzazione gerarchica rostro-caudale delle funzioni esecutive in cui le regioni anteriori sono coinvolte in compiti che richiedono un tipo di processamento più astratto.

1.6 Differenze funzionali all'interno della corteccia prefrontale laterale

1.6.1 Differenze funzionali lungo l'asse dorso-ventrale: l'ipotesi dei domini

I pattern di connessioni anatomiche all'intero della corteccia prefrontale ventro-laterale suggeriscono un'organizzazione funzionale dominio-specifica lungo una dimensione dorso-ventrale, in cui la parte dorsale è specializzata nell'analisi di informazioni spaziali, e la porzione ventrale nell'analisi dell'informazione delle caratteristiche fisiche necessarie per il riconoscimento degli oggetti (Cavada & Goldman- Rakic, 1989; Petrides & Pandya, 1984; Petrides & Pandya, 2002). I risultati di studi funzionali confermano questa ipotesi, per esempio nella corteccia prefrontale ventro-laterale della scimmia sono presenti neuroni che si attivano specificamente durante l'osservazione di facce (Ó Scalaidhe, Wilson, & Goldman-Rakic, 1997) e nella selezione, mantenimento e recupero di tali informazioni attraverso un buffer di memoria di lavoro (Ó Scalaidhe, Wilson, & Goldman-Rakic, 1997). Altri studi hanno rilevato la presenza di neuroni selettivi per la localizzazione spaziale, il colore e la forma degli stimoli nella corteccia dorso-laterale (Qi, Meyer, Stanford, & Constantinidis, 2011), queste evidenze si vanno a sommare ai risultati di lavori che, sebbene non abbiano indagato specifiche specializzazioni regionali, hanno individuato una segregazione relativa delle proprietà spaziali e non spaziali tra le aree dorsali e ventrali (Ninokura, 2003). Sebbene esistano differenze anatomiche e dati funzionali che suggeriscono una segregazione nell'elaborazione di informazione sensoriale e nel loro utilizzo per formare tracce di memoria di lavoro tra le regioni dorsali e quelle ventrali, alcuni studi hanno messo in dubbio il fatto che i due network siano completamente indipendenti, e cioè che non partecipino entrambi alla gestione di informazione sia spaziale che non spaziale, soprattutto quando richieste cognitive di ordine superiore siano necessarie (Blumenfeld, Nomura, Gratton, & D'Esposito, 2013; Qi & Constantinidis, 2013). Evidenze ottenute con studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) (Amiez & Petrides, 2007; R. S. Blumenfeld, 2006) suggeriscono infatti che i network dorsolaterale e ventrolaterale presentano attivazioni non significativamente differenti durante compiti che richiedono processi di controllo cognitivo "di secondo ordine", come manipolare, monitorare o collegare tra loro informazioni rilevanti per lo scopo del compito. In quest'ipotesi, le risposte neurali sarebbero modulate dal carico cognitivo richiesto dal task piuttosto che dalla tipologia di informazione (spaziale o non spaziale) veicolata dallo stimolo osservato. Per investigare meglio questa questione, in uno studio recente, Riley e collaboratori hanno richiesto a 6 scimmie di osservare degli stimoli proiettati su un monitor, in assenza di qualsiasi richiesta di memorizzare o utilizzare tale informazione come guida per il comportamento, e registrato le proprietà di singoli neuroni della corteccia prefrontale, sia dorsale che ventrale in un'ampia regione estesa

in senso rostro-caudale (Riley, Qi, & Constantinidis, 2017). L'analisi delle risposte degli oltre duemila neuroni registrati ha confermato l'idea di una distinzione dorso-ventrale, con i neuroni dorsali più legati alla codifica di aspetti spaziali e quelli ventrali alle caratteristiche degli oggetti visivi stessi, e in particolare del loro colore. Il punto più interessante del loro lavoro, però, risiede nella descrizione di sistematiche differenze tra le regioni anteriori e quelle posteriori della corteccia prefrontale sia dorsale che ventrale. Le regioni dorsali anteriori sono risultate caratterizzate da frequenze di scarica generalmente basse, lunghe latenze nella risposta e larghi campi recettivi, oltre che dalla più bassa selettività agli stimoli rispetto ai neuroni posti nella regione intermedia o in quella più posteriore. Anche nella corteccia ventrolaterale è stata identificata una maggior selettività per gli stimoli nella porzione caudale rispetto a quella anteriore, in accordo con una maggior specializzazione di queste aree per l'analisi delle caratteristiche visive costitutive degli stimoli. La selettività agli stimoli è risultata quindi decrescere sistematicamente a partire dalle aree posteriori verso le aree anteriori sia nella porzione dorsale che in quella ventrale della corteccia prefrontale laterale. Questo dato riflette in maniera precisa l'asse di specializzazione delle proprietà funzionali misurate nella corteccia prefrontale laterale, evidenziando come vi sia una differenza nella complessità delle risposte che segue un gradiente rostro-caudale.

Una limitazione di questo studio (Riley et al., 2017) risulta dal fatto che non dimostra se le differenze rostro caudali siano presenti anche durante compiti di crescente difficoltà cognitiva. Il compito consisteva nell'osservazione passiva di stimoli da parte di scimmie non precedentemente addestrate in questo paradigma. Le risposte di scarica dei neuroni in questo caso consideravano soltanto le caratteristiche fisiche degli stimoli, non effetti di informazioni derivanti da regole che guidino l'utilizzo di tali informazioni per qualche scopo comportamentale. Per chiarire questo punto è necessario esaminare i risultati di altri studi di registrazione elettrofisiologica o di valutazione dell'esito di lesioni neurologiche in cui siano utilizzati compiti più complessi, che richiedano di emettere comportamenti diversi a seconda degli stimoli osservati.

Studi su pazienti con lesioni frontali (Azuar et al., 2014; Badre, Hoffman, Cooney, & D'Esposito, 2009) mostrano come pazienti con lesioni più posteriori esibiscano deficit in compiti che richiedono livelli di astrazione inferiori, mentre pazienti con lesioni più rostrali non mostrano difficoltà in compiti semplici, ma falliscono in compiti di maggiore complessità. Questo indica chiaramente che, anche nell'uomo, processi di elevato livello di controllo coinvolgono regioni prefrontali più anteriori, la cui funzione, però, dipende dall'integrità dei

processi di basso livello di controllo cognitivo, implementati dalle regioni più posteriori. I processi che richiedono un livello di controllo "basso" possono operare anche indipendentemente dall'integrità delle aree più anteriori. Questa asimmetria suggerisce un controllo cognitivo gerarchico in cui le regioni frontali più posteriori svolgono funzioni più elementari, e il risultato della loro elaborazione può essere inviato alle regioni più anteriori che ne utilizzano l'elaborazione per compiti di ordine superiore. Questi dati inoltre ci suggeriscono che i controlli di alto livello implementati nelle regioni anteriori sono ingaggiati solo quando i controlli di basso livello non riescono a definire un input, cioè a selezionare un'azione adeguata allo scopo del compito. Nel complesso i risultati di studi su pazienti lesionati sono in accordo con dati anatomici in primati non umani che mostrano asimmetrie nelle connessioni cortico-corticali tra le regioni rostrali e caudali (Barbas & Pandya, 1989; Petrides & Pandya, 2002), oltre che essere in linea con studi di lesione su primati in cui il danneggiamento della corteccia anteriore prefrontale risultava in una prestazione deficitaria nell'apprendimento di regole astratte (Boschin, Piekema, & Buckley, 2015).

Gli studi su pazienti lesionati forniscono una cornice anatomica in cui le differenze funzionali rilevate nelle diverse aree corrispondono a differenze nell'esecuzione delle funzioni cognitive. Il ciclo percezione-azione (J. Fuster, 2001; Holmes, 1989) è stata una delle prime ipotesi che ha collegato una teoria gerarchica dell'azione all'organizzazione anatomica del cervello. Secondo Fuster esiste una serie di loop funzionali che intercorrono tra la neocorteccia posteriore e le regioni lungo l'asse rostro-caudale dei lobi frontali. Secondo questa teoria quando le azioni sono specificate in una direzione che va dalla pianificazione astratta dell'atto motorio alla selezione della risposta, le regioni posteriori della corteccia frontale laterale sono sempre più coinvolte e sono responsabili dell'integrazione dei piani motori con l'informazione contestuale, questa integrazione avviene considerando intervalli temporali tra stimolo e risposta sempre più vicini più ci si sposta verso le regioni caudali. Il ciclo percezione-azione descrive come la struttura gerarchica dell'azione possa essere rappresentata nell'organizzazione delle aree corticali. Questa idea si è integrata con i modelli più moderni delle funzioni esecutive della corteccia frontale laterale. Molte delle evidenze sull'organizzazione rostro-caudale della corteccia frontale vengono da studi che esaminano il controllo cognitivo gerarchico. Il modello gerarchico spiega come il controllo top-down modula il segnale di risposta a stimoli contestuali. Il controllo gerarchico si applica a regole poste su più livelli di astrazione che seguiamo in ogni contesto di vita quotidiana.

1.6.2 Modelli gerarchici di controllo cognitivo del comportamento

Un modello cognitivo recente (Badre, 2008; Badre et al., 2009) suggerisce che la gerarchia rostro-caudale può essere compresa in termini di differenze nella quantità di controllo richiesto dal task, definito in base alla forma delle rappresentazioni che competono durante la selezione dell'azione. La rappresentazione dell'azione può essere organizzata gerarchicamente di modo che rappresentazioni di azioni più astratte designano un insieme di rappresentazioni più specifiche di livello sub-ordinato. Un compito può essere definito astratto perché generalizza un insieme di specifiche associazioni stimolo-risposta, per esempio a seconda del tipo di cue istruttivo che compare all'inizio di un task cambierà la modalità di risposta da mettere in atto in presenza di uno stimolo. Più rappresentazioni a livelli progressivi di astrazione competono fra di loro, più ci si aspetta che settori anteriori della corteccia prefrontale laterale risolvano la competizione. In uno studio di risonanza magnetica sull'uomo (Badre & D'Esposito, 2007) è stato testato se un gradiente frontale rostro-caudale sia gerarchicamente organizzato a seconda del livello di astrazione a cui competono le rappresentazioni delle azioni. Sono stati individuati quattro compiti che i soggetti dovevano eseguire in risonanza. I compiti testavano il carico cognitivo aumentando il numero di alternative in competizione attraverso quattro livelli di astrazione. Nell'esperimento definito di "risposta" (response) il soggetto vede un quadrato colorato alla volta e seleziona quindi la risposta basandosi su un'associazione colore-risposta precedentemente appresa. L'associazione è tra il colore del quadrato e il dito con cui rispondere. Il numero di risposte possibili può andare da uno a quattro, quindi fino a quattro dita con cui rispondere. Nell'esperimento di "caratteristiche" (feature) il soggetto vede degli oggetti presentati dentro quadrati colorati. Il soggetto deve dare una risposta affermativa quando si presenta una particolare caratteristica dell'oggetto, come una specifica forma, e dare una risposta negativa quando si presentano altre caratteristiche. Nella prova la caratteristica che richiede una risposta affermativa dipende dal colore del quadrato. Il numero di risposte possibili va da uno a quattro, con quattro forme diverse che possono apparire, una alla volta, nel confronto con lo stimolo campione. Nell'esperimento di "dimensione" il soggetto vede due oggetti dentro un quadrato colorato, quattro dimensioni dell'oggetto variano da prova a prova (texture, forma, grandezza, orientamento). Il soggetto deve decidere se i due oggetti sono simili in una delle quattro dimensioni. La dimensione rilevante da considerare per la comparazione dei due oggetti è data dal colore del quadrato. Aumentando il numero di dimensioni potenzialmente rilevanti (da uno a quattro) aumenta anche la competizione tra rappresentazioni. Infine, nella quarta prova, quella di "contesto", il compito è identico a quello della prova di "dimensione" ma ci sono due dimensioni rispetto alle quali scegliere invece di una e le dimensioni considerate dipendono sempre dal colore del quadrato.

I risultati di questo esperimento supportano un gradiente rostro-caudale di attivazione differenziata in base al carico cognitivo richiesto. Una chiara progressione si evidenzia nelle aree PMd, pre PMd, solco frontale inferiore/DPFC e corteccia fronto-polare (FPC) basandosi sulla manipolazione delle alternative in competizione nei compiti di risposta, caratteristiche, dimensioni e contesto. L'esperimento di contesto risulta nell'attivazione dell'FPC e della parte rostrale del DPFC. Diversamente l'esperimento di dimensione attiva la parte anteriore/intermedia del DPFC. I compiti di risposta e caratteristica risultano nell'attivazione delle aree premotorie, rispettivamente premotoria dorsale (PMd) e pre-premotoria dorsale (pre-PMd).

Gli studi che hanno distinto differenze regionali lungo l'asse rostro-caudale del lobo frontale si sono basati su diverse definizioni di astrazione. Queste definizioni non sono mutualmente esclusive. Un tipo di astrazione è quella temporale. In generale, quando gli obiettivi di un'azione diventano più astratti l'intervallo di tempo dell'azione che questi controllano diventa maggiore. Quindi l'intervallo di tempo è una variabile importante in un sistema che mantiene gli obiettivi dell'azione a differenti livelli di astrazione. Mantenere gli obiettivi di un'azione lungo intervalli temporali estesi viene definita astrazione temporale. Ma esistono anche altri tipi di astrazione. La policy abstraction è la relazione tra uno stato di un sistema, un'azione e un outcome anticipato. La policy abstraction si riferisce al grado in cui una rappresentazione di un obiettivo forma una generalizzazione su rappresentazioni di sotto-obiettivi. In questo senso la policy abstraction si riferisce direttamente alla complessità delle regole. Un semplice collegamento di uno stimolo a una risposta è una regola di primo ordine. Per esempio, imparare che ad un cue verde corrisponde l'azione di premere un bottone 1 e ad un cue blu corrisponde l'azione di premere il bottone 2 rappresenta una regola di primo ordine di astrazione. Ad uno stimolo è collegata direttamente un'azione. Allo stesso tempo però il task viene manipolato e il soggetto sperimentale impara che l'apparire di un cerchio stabilisce che venga premuto il bottone 1 mentre un quadrato significa premere il bottone 2. Se si presentassero le due regole, colore e forma, in maniera sovrapposta, come per esempio un cerchio verde, quale bottone dovrebbe premere il soggetto? In questo caso serve specificare un ulteriore regola per determinare se ha importanza il colore o la forma nel compito corrente. Questa meta-regola che collega il contesto all'insieme di stimoli rilevanti, è definita regola di secondo ordine.

Queste due dimensioni di astrazione, temporale e di definizione di stimoli rilevanti, sono combinate insieme in un recente modello, definito del "controllo a cascata" (vedi figura 1.8) (Koechlin et al., 2003; Koechlin & Summerfield, 2007). Questo modello divide il controllo

cognitivo in livelli gerarchici dipendenti dall'ammontare di informazioni richieste per la selezione di un'azione e dall'astrazione temporale necessaria alla corretta esecuzione del compito. Più specificamente ipotizza che il controllo cognitivo coinvolge almeno tre livelli di processamento. Il primo, il controllo sensoriale è coinvolto nella selezione di azioni motorie in risposta a stimoli ed è implementato dalle regioni premotorie laterali. Il secondo, il controllo contestuale dipende dalle aree caudali della LPFC, aree 44, 9, 45 ed è coinvolto nel selezionare rappresentazioni premotorie, associazioni stimolo-risposta, secondo segnali esterni contestuali che accompagnano la comparsa dello stimolo. Il terzo, il controllo episodico ha come base anatomica le aree rostrali della regione LPFC ed è coinvolto nel selezionare rappresentazioni di insiemi di regole che comprendono diverse associazioni stimolo risposta a seconda del frangente temporale in cui si presenta lo stimolo a cui si deve rispondere. In quest'ultimo stadio proposto dal modello il controllo episodico può essere ulteriormente suddiviso in due parti, due termini di controllo (Koechlin & Summerfield, 2007), il controllo episodico e il controllo ramificato. Secondo gli autori il nostro comportamento corrente è composto da una serie di episodi temporali successivi, ognuno dei quali contiene un insieme differente di regole per governare il comportamento. Sebbene un'istruzione segnali l'inizio di un nuovo episodio, aggiungendo importanti informazioni riguardo la selezione dell'azione appropriata all'interno di quell'episodio, informazioni derivanti da episodi precedenti a quello attualmente in svolgimento possono fornire segnali che prendono il controllo sul comportamento corrente. Questo tipo di controllo ramificato (branching) è alla base di tutti quei comportamenti che richiedono un coinvolgimento in più compiti ed è uno dei modi in cui riusciamo a concentrarci su un compito per volta. In questo senso il branching permette di interrompere un compito e mantenerlo in uno stato di sospensione mentre un altro compito viene eseguito.

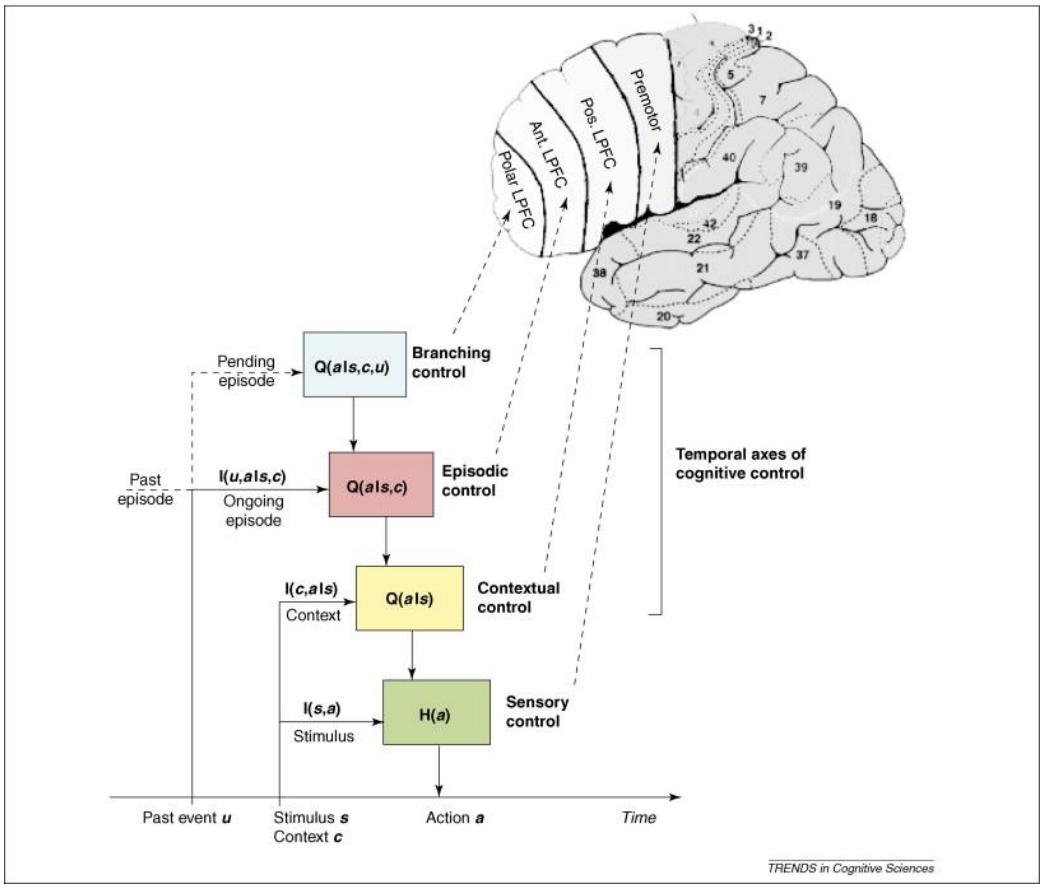

Figura 1.8 Schematizzazione del modello di Koechlin. Il controllo cognitivo opera secondo tre livelli di processi di controllo; contestuale, episodico, e ramificato. I livelli di controllo sono implementati in maniera gerarchica a partire dalle aree posteriori fino alle regioni prefrontali polari. Il controllo sensoriale è un processo di controllo non cognitivo, guidato dalla stimolazione esterna. Tratto da (Koechlin & Summerfield, 2007)

Koechlin ha testato questo modello in compiti di fMRI (Koechlin et al. 2007). Il modello della cascata ipotizza che richieste crescenti di controllo sensoriale, contestuale ed episodico hanno effetti additivi sui tempi di reazione comportamentali. Inoltre, prevede che, assumendo che l'attivazione cerebrale locale misurata tramite fMRI varia a seconda dell'ammontare dell'informazione processata localmente, crescenti richieste di controllo sensoriale, contestuale e episodico abbiano un effetto cumulativo additivo sull'attivazione locale rilevata all' fMRI, Nel compito eseguito dai soggetti per testare queste ipotesi veniva richiesto di fare semplici giudizi su stimoli visivi colorati (lettere e dischi) organizzati in blocchi. I soggetti dovevano dare risposte manuali sulla base di un cue istruttivo presentato all'inizio di ogni blocco. Le condizioni istruttive del compito potevano rimanere costanti lungo tutta a durata dell'esperimento, cambiare da blocco a blocco o cambiare da prova a prova a seconda del cue istruttivo che appariva. In ogni prova era presente un cue istruttivo che andava ignorato. Nel compito sensoriale i partecipanti dovevano premere un bottone con la mano destra o sinistra a seconda del colore del cue che appariva. Nella condizione contestuale i partecipanti dovevano

distinguere tra la grandezza della lettera (compito 1) o il fatto che fosse una consonante o una vocale (compito 2). La regola secondo cui eseguire il compito era data dal colore della lettera. Nel compito di controllo episodico i soggetti dovevano eseguire lo stesso compito della situazione contestuale eccetto per il fatto che l'associazione tra colore e compito variava a seconda del cue istruttivo. Cosi in un blocco le lettere azzurre erano associate al compito 1 mentre quelle blu al compito 2, mentre in un altro blocco i colori dei compiti si invertivano.

I risultati dell'analisi fMRI illustrano come questi processi di controllo cognitivo siano ordinati secondo un ordine gerarchico lungo l'asse antero-posteriore della corteccia prefrontale laterale. L'attività nelle regioni più anteriori della corteccia prefrontale dorsolaterale (area 46) variava in correlazione all'ammontare di informazione "episodica" richiesta per selezionare la risposta corretta; l'attività nella corteccia dorsolaterale posteriore (area 44/45) variava con la somma dell'informazione contestuale e episodica richiesta. L'attività nella corteccia premotoria variava in correlazione alla somma di informazione sensoriale, contestuale ed episodica richiesta. L'analisi delle serie temporali dell'fMRI mostra come solo il controllo episodico è associato ad una maggior attivazione tra aree anteriori e posteriori della corteccia prefrontale, mentre la connettività tra la prefrontale posteriore e le aree premotorie aumenta sia nella condizione episodica che in quella contestuale; il controllo sensoriale non influisce sulla trasmissione di informazioni tra aree frontali anteriori. Inoltre, sempre in accordo con le ipotesi, i dati comportamentali suggeriscono che aumentano i tempi di reazione quanto più controllo cognitivo è richiesto dal compito. All'apice della gerarchia funzionale stanno le porzioni rostrali della corteccia frontale laterale, che ricoprono il ruolo decisionale nei confronti di diverse informazioni raccolte in un lungo periodo di tempo, che influenzano la scelta dell'azione durante l'esecuzione di compiti. Il livello più alto della gerarchia, il polo frontale, codifica informazioni che non sono richieste nell'immediato ma che possono diventare rilevanti in uno scenario futuro. Nelle regioni anteriori dorsolaterali della corteccia prefrontale viene implementato il controllo episodico. Nelle regioni posteriori dorsali vengono considerati i segnali contestuali dall'ambiente per guidare la scelta dell'azione. Alla base della gerarchia stanno le aree premotorie che integrano tutti questi segnali con quelli delle caratteristiche dello stimolo stesso per decidere come agire. L'informazione fluisce quindi come una cascata da regioni anteriori a posteriori (fig. 1.9)

1.6.3 L'ipotesi del principio di sussidiarietà

Il modello cognitivo di Koechlin e collaboratori incorpora concetti delineati in teorie sulle funzioni esecutive come quella di Grafman (Grafman, 2009). Il principio di "sussidiarietà"

ipotizza che alti livelli della gerarchia sono reclutati solo quando livelli più bassi non provvedono un adeguata quantità di informazione per risolvere la selezione della risposta. Allo stesso modo quando emerge un conflitto tra più associazioni sensorimotorie incongruenti interviene il controllo delle regioni di alto livello, che con i segnali di tipo top-down sovrascrivono le associazioni stimolo risposta conflittuali e assegnano una risposta al compito. Il modello è stato testato in studi su pazienti umani con lesioni frontali focali (Azuar et al., 2014) e gli autori si sono chiesti se le regioni frontali anteriori di alto livello possono operare indipendentemente dall'integrità dei livelli di controllo inferiori e posteriori. Sono stati riproposti gli stessi compiti usati da Koechlin (Koechlin & Summerfield, 2007) ai pazienti lesionati mentre si sottoponevano ad un fMRI. È stata fatta una comparazione tra regioni lesionate misurate in voxel e comportamento nei task eseguiti. È risultato che i deficit nella condizione sensoriale erano associati a danni alla corteccia premotoria laterale, deficit nella condizione contestuale erano associati a danno al giro frontale inferiore (area 45) o alla corteccia premotoria, e deficit nel controllo episodico erano associati a danni alle regioni prefrontali anteriori (aree 46 e 47) oltre che al giro frontale inferiore (area 45). Questo studio quindi dimostra come il deficit ad ogni livello di controllo cognitivo è associato al danno a diverse aree della corteccia frontale laterale, specifiche per ogni livello. In riferimento all'ipotesi testata è risultato che esiste un'asimmetria nel flusso di informazione cognitiva tra un livello e l'altro, di modo che i livelli più alti necessitano dell'integrità dei livelli più bassi per eseguire compiti di tipo "episodico". I processi che richiedono basso controllo possono invece essere eseguiti anche quando le regioni prefrontali anteriori risultano danneggiate.

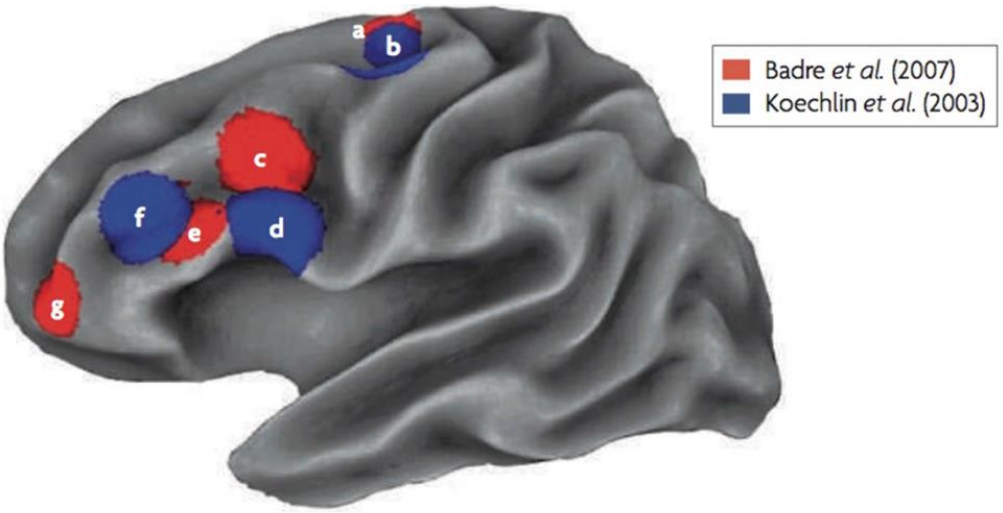

Figura 1.9 Risultati da studi di fMRI di Koechlin et al., (2003) e Badre & D'Esposito, (2007). Le regioni etichettate con "a" e "b" corrispondono ai livelli di astrazione più inferiori (controllo sensoriale), le etichette "c" e "d" corrispondono al secondo livello di astrazione (controllo contestuale), le etichette "e" e "f" corrispondono al terzo livello di astrazione (controllo episodico) e l'etichetta "g" corrisponde all'attivazione di un'area individuata solo nel compito contestuale di (Badre & D'Esposito, 2007).

Simili risultati sull'esistenza di un gradiente di astrazione sono stati trovati in altri studi (Bahlmann, Blumenfeld, & D'Esposito, 2015; Nee, Jahn, & Brown, 2014) anche se nessuna tipologia di astrazione considerata ha definito l'ordine nella gerarchia cognitiva in maniera indipendente dal task. In questi studi il cambiamento del task veniva accompagnato da un cambiamento delle associazioni tra regioni frontali e livelli di astrazione. Molte aree della corteccia prefrontale si attivavano in ogni condizione indipendentemente dalla manipolazione del tipo di astrazione. In un altro studio in cui è stata utilizzata la metodologia del dynamic causal modeling (Nee & D'Esposito, 2016), un metodo per l'interpretazione dei dati di imaging funzionale, sono state osservate le interazioni tra le regioni frontali durante una serie di compiti simili a quelli dello studio di Koechlin (Koechlin et al., 2003). I risultati di questo studio differiscono dalle ipotesi precedenti riguardo l'organizzazione gerarchica che propone la corteccia fronto-polare come apice della catena di controllo cognitivo (Ramnani & Owen, 2004). Al contrario l'analisi del dynamic causal modeling ha rivelato che la porzione intermedia della corteccia frontale laterale presenta le maggiori asimmetrie nella connettività con le altre regioni frontali. Inoltre, influenze top-down dalla corteccia frontale rostrale alla intermedia, e influenze bottom-up dalla corteccia caudale pongono la porzione intermedia al centro di un network in cui converge l'informazione necessaria per condizionare la scelta di un corso

d’azione. Questa differente concettualizzazione della gerarchia frontale risulta da una diversa definizione di “apice”. La corteccia frontale laterale intermedia sarebbe l’apice di una gerarchia di controllo, che si definisce in base alla quantità di connessioni efferenti. La corteccia frontale anteriore, il polo frontale che corrisponde all’area 10 di Broadmann, invece rappresenta l’informazione maggiormente astratta rispetto alle regioni caudali, per questo è posta al vertice di una gerarchia rappresentazionale. La presenza di un gradiente univoco è messa in discussione anche da studi anatomici su scimmie focalizzati sulle connessioni intra-prefrontali (Goulas, Uylings, & Stiers, 2014), il modello gerarchico non è ben definito da un'asimmetria riguardo alla quantità di connessioni efferenti tra aree prefrontali.

1.6.4 Modelli dell’attivazione diffusa: una spiegazione alternativa

Il controllo sui processi di memoria di lavoro è un tipo di compito che modula in maniera significativa i pattern di attivazione regionale collegati ai compiti di astrazione. La memoria di lavoro è di importanza centrale per il controllo cognitivo in quanto permette di mantenere attive le informazioni contestuali rilevanti in un compito nel corso del tempo. Richieste cognitive su questi processi di memoria di lavoro influenzano l’attivazione dei network frontali. Questa influenza della memoria di lavoro è stata studiata sperimentalmente (Reynolds, O’Reilly, Cohen, & Braver, 2012). Sono state testate le due ipotesi riguardanti il funzionamento della corteccia prefrontale laterale: il modello del controllo a cascata e il modello dei livelli di astrazione. Sono state identificate diverse aree della corteccia prefrontale laterale che secondo i due modelli si sarebbero dovute attivare in determinati compiti. Ma il pattern di attivazioni riscontrate è risultato inconsistente con le due tipologie di ipotesi. È stato quindi proposto da questi autori un diverso modello in grado di spiegare questo pattern di attivazioni. Il modello del mantenimento adattivo postula che sia regioni anteriori che posteriori della corteccia prefrontale sono reclutate in condizioni di compiti che richiedono un mantenimento attivo dell’informazione contestuale, e le dinamiche temporali di attività in queste regioni gestiscono flessibilmente le richieste di mantenimento. Le regioni laterali della corteccia prefrontale mostrano un’attivazione transitoria quando l’informazione contestuale deve essere aggiornata e mantenuta solo per la durata di singole prove. Mentre le stesse regioni, indifferentemente dalla loro localizzazione rostro caudale, mostrano un’attività sostenuta quando l’informazione contestuale deve essere mantenuta durante una serie di prove in maniera costante. Questo studio evidenzia come le attivazioni non si differenzino a seconda del tipo di informazione contestuale, che sia alto o basso il livello di astrazione, ma che il pattern di attività dipende dal fatto che l’informazione debba essere mantenuta a lungo o aggiornata dopo un breve periodo.

Un importante alternativa ai modelli dell'astrazione è l'ipotesi del controllo della difficoltà (Crittenden & Duncan, 2014). Secondo questa prospettiva le regioni più rostrali della corteccia frontale sono attivate quando il task aumenta di difficoltà. La difficoltà del task può essere dissociata dall'astrattezza delle rappresentazioni di azioni o dal controllo di informazioni per lunghi periodo di tempo. L'ipotesi è stata testata in uno studio in cui ai partecipanti venivano sottoposti tre compiti di difficoltà crescente per osservare se l'attivazione delle aree cerebrali in fMRI corrispondesse al gradiente rostro-caudale. L'idea, derivante da studi precedenti (Jiang & Kanwisher, 2003), è che anche semplici manipolazioni nella difficoltà di un compito di discriminazione percettiva, quindi riguardante le caratteristiche fisiche di uno stimolo, possono attivare regioni anteriori della corteccia prefrontale. Secondo la teoria dell'astrazione delle regole (Badre et al., 2009) una semplice manipolazione delle apparenze percettive dello stimolo non dovrebbe coinvolgere livelli di processamento anteriori per dare la risposta appropriata. Non viene manipolata una rappresentazione astratta dello stimolo, per cui i livelli superiori di controllo non dovrebbero intervenire. Allo stesso modo il modello del controllo temporale, o del controllo a cascata, postula che tutta l'informazione necessaria per selezionare un outcome è già presente nello stimolo stesso, pertanto è sufficiente una codifica da parte delle aree più caudali che ricevono afferenze direttamente da cortecce visive per risolvere il problema percettivo. Entrambe i modelli sono d'accordo nel predire che l'attivazione del lobo frontale dovrebbe essere limitata, o almeno più marcata, nelle regioni frontali posteriori, nello specifico la premotoria dorsale. Nello studio di Duncan e collaboratori (Crittenden & Duncan, 2014) è stata manipolata la difficoltà nel percepire uno stimolo semplice, una linea orientata presentata a schermo ai partecipanti, secondo tre modalità: Aumentando il numero di linee presenti insieme alla linea da considerare, diminuendo la differenza nella lunghezza tra le linee, cambiando la modalità di risposta al task (modificando la localizzazione del bottone da premere per indicare la linea scelta; nelle condizioni precedenti per scegliere una linea era sufficiente premere il bottone corrispondente sotto di essa) tramite l'apparizione di un cue che indicava la modalità di risposta adeguata per ogni compito. I partecipanti dovevano discriminare la linea più corta. Le predizioni dei modelli cognitivi dell'astrazione delle regole e del controllo a cascata si sono dimostrate inconsistenti con i dati ottenuti. In tutti e tre i compiti le attivazioni erano localizzate in regioni anteriori rispetto alla corteccia premotoria. I risultati mostrano come complesse richieste cognitive, come regole di decisione e mantenimento di informazioni relative ad eventi distanti nel tempo, possono essere sufficienti ma non sono necessarie nell'attivare le regioni più anteriori della corteccia frontale laterale. L'ipotesi del processamento

della difficoltà del task trova supporto in una serie di evidenze empiriche (Dosenbach et al., 2006; Duncan & Owen, 2000) che hanno mostrato come un insieme di regioni frontali, parietali e insulari presentano un aumento di attività quando il soggetto si trova ad eseguire un compito, in una condizione generica di "on-task", indipendentemente dalle richieste cognitive poste dal compito. Questo network è stato definito "multiple demand system" (Duncan, 2010), o "sistema di controllo fronto-parietale" (Vincent, Kahn, Snyder, Raichle, & Buckner, 2008) e sembra cruciale nello strutturare il controllo mentale per eseguire comportamenti diretti ad uno scopo. Nello specifico il sistema include parte della corteccia frontale laterale, regioni del solco frontale inferiore, corteccia frontale anteriore e cingolo dorsale, oltre che l'area pre-supplementare motoria (pre-SMA) e regioni dell'insula anteriore.

1.7 Scopo dello studio

Sulla base degli studi considerati risulta che esista un grado di eterogeneità funzionale all'interno della corteccia prefrontale laterale. In particolare gli studi di fMRI di Koechlin et al., (2003) e Badre & D'Esposito, (2007) hanno provato che, nell'uomo, esistono dei gradienti di specializzazione antero-posteriore della funzione frontale. In particolare, come risulta anche da studi di lesione, la parte posteriore della corteccia prefrontale laterale è coinvolta nel processamento delle proprietà degli stimoli sensoriali mentre le aree anteriori sono specializzate nell'elaborazione di ordine superiore di tali stimoli (Badre et al., 2009; Baird, Smallwood, Gorgolewski, & Margulies, 2013; Koechlin et al., 2003). Questi studi mostrano un gradiente funzionale a livello macroscopico, ma non sono in grado di descrivere la circuiteria che sottende tale specializzazione funzionale. A tal fine è necessario lo studio delle proprietà dei singoli neuroni.

Secondo questa linea di pensiero Duncan (Duncan, 2001) conduce una meta-analisi di studi di fMRI nell'uomo e di registrazione di singoli neuroni nella scimmia, tenendo anche presente le connessioni sottostanti, e propone un modello di spiegazione della specializzazione delle funzioni della corteccia prefrontale basata su entrambi i set di dati, osservando che quando vengono utilizzati paradigmi sperimentali *semplici* emergono differenze funzionali topografiche, mentre l'utilizzo di compiti *complessi*, mostra attivazioni distribuite omogeneamente lungo tutto il prefrontale. Quindi propone che afferenze specifiche a diversi settori prefrontali sottenderebbero tipi di analisi distinte (per esempio informazioni relative alla posizione spaziale o alle caratteristiche pittoriche di un oggetto), e quindi funzioni distinguibili.

A livello di tutti i settori della corteccia prefrontale, però, c'è una grande convergenza di afferenze sia da aree sensoriali di ordine superiore, sia da altre aree prefrontali. Quando si utilizzano compiti complessi, queste ultime sarebbero in grado di enfatizzare input minoritari, determinando l'attivazione di una area anche per stimoli provenienti da afferenze minoritarie. Per esempio, neuroni della corteccia ventrale elaborano prevalentemente afferenze inferotemporali relative alla forma degli oggetti, e ricevano solo deboli input relativi alla loro posizione spaziale (Cavada & Goldman- Rakic, 1989; Selemon & Goldman-Rakic, 1988). Le connessioni più forti, per tutte le aree prefrontali, però, sono intrinseche prefrontali (Gerbella et al., 2007, 2013). Quindi, in un compito che richieda una elaborata analisi dell'informazione spaziale, che richiede un reclutamento massivo della circuiteria prefrontale, le afferenze intrinseche sarebbero in grado enfatizzare l'input spaziale, e il neurone risulterebbe pertanto codificare anche questo tipo di informazione. Questo spiega come mai alcuni lavori, che utilizzano semplici compiti di working memory, permetterebbero di identificare specializzazioni funzionali, mentre studi basati su paradigmi più complessi di manipolazione dell'informazione mnemonica, falliscano nell'osservare differenze topografiche. Duncan, quindi sottolinea che adattabilità non significa equipotenzialità tra tutte le aree, e propone che la specializzazione regionale all'interno della corteccia prefrontale sia relativa piuttosto che assoluta.

Nel loro insieme questi studi indicano la presenza di una specializzazione funzionale di all'interno della corteccia prefrontale, ma 1) non ne identificano i margini funzionali; 2) non descrivono a livello neuronale il tipo di codifica dei diversi settori funzionali; 3) non propongono correlazioni di tipo anatomo-funzionale.

Per far luce su questi tre punti abbiamo condotto uno studio elettrofisiologico di registrazione da singoli neuroni, mappando sistematicamente le proprietà funzionali della corteccia prefrontale ventrolaterale di due scimmie, per mezzo di semplici paradigmi di osservazione di stimoli visivi e un compito lievemente più complesso di "Go-NoGo" visuo-motorio. La scelta di tali paradigmi era volta a tenere basso, medio/basso il carico cognitivo, e identificare potenziali differenze tra le regioni connesse da vie anatomiche particolarmente forti con la corteccia inferotemporale, con aree del sistema oculomotorio, o con i circuiti parieto-premotori per la guida del sistema scheletomotorio.

2 Materiali e metodi

Tutti i protocolli chirurgici, farmacologici, di sperimentazione e stabulazione rispettano le leggi europee sul benessere animale (European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC), e direttiva del 22 settembre 2010 (2010/63/EU)), rispettano le leggi italiane in vigore rispetto alla cura e all'utilizzo di animali da laboratorio, sono stati approvati dal Servizio Veterinario dell'Università di Parma (Prot. 78/12 17/07/2012) ed autorizzati dal Ministero della Sanità (legge italiana D.M. 294/2012-C, 11/12/2012).

2.1 Addestramento

La fase di registrazione è stata preceduta da un periodo di training comportamentale in cui è stato insegnato ai macachi a sedere su una sedia per primati e a rimanervi a lungo, mentre interagivano con il setting sperimentale ed eseguivano i compiti richiesti dal paradigma. Sono stati addestrati inoltre alla presenza e al contatto con gli sperimentatori anche in condizioni di mobilità limitata.

2.2 Procedure chirurgiche

Dopo la fase preliminare di addestramento, le scimmie sono state sottoposte ad intervento chirurgico per l'impianto del sistema di fissaggio della testa e della camera di registrazione. Tali interventi sono stati eseguiti sulla base di una preliminare risonanza magnetica dell'encefalo che ha consentito di identificare, in coordinate stereotassiche, particolari marcatori anatomici. In seguito all'identificazione di questi riferimenti anatomici è stato deciso di volta in volta dove inserire la camera di registrazione e l'impianto di fissaggio. Gli interventi sono stati eseguiti in condizione di asepsi e di anestesia generale mediante iniezioni intramuscolari ripetute di Ketamina (6.4 ml/kg i.m.) e Medetomidina (0.08 ml/kg i.m.). I parametri vitali quali temperatura corporea, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria ed ossigenazione del sangue sono stati monitorati continuamente durante gli interventi. Inoltre, gli interventi sono stati preceduti e seguiti da un appropriato trattamento antiedema (desametasone 1g/2volte die), antibiotico (rifampicina, 60 mg/kg/die) ed antidolorifico (ketoprofene, 10 mg/kg/die). La camera di registrazione è stata posta nell'emisfero sinistro in modo da permettere

l'accesso alla corteccia prefrontale ventrolaterale. In particolare, essa include i tre quarti posteriori del solco principale e la parte anteriore del solco arcuato inferiore, e si estende lateralmente fino al rivolgimento orbitale. La camera di registrazione, costituita da una struttura in titanio di 31 mm x 18 mm, è stata ancorata all'osso circostante mediante viti autofilettanti in titanio e resina acrilica antibioticata (tobramicina). Tra una sessione di registrazione e l'altra la camera, riempita di soluzioni acquose antibioticate, veniva sigillata con un tappo di alluminio.

Precedentemente all'impianto della camera di registrazione è stato applicato un sistema di fissaggio del cranio a tutti i macachi. Il sistema di fissaggio della testa è costituito da una struttura in titanio con una base a forma di kappa ed un cilindro perpendicolare alla base che presenta tre fori disposti in verticale che permettono l'aggancio della struttura ad un reggitesta a sua volta fissato sulla sedia per primati con un sistema di viti. La base a forma di kappa è stata ancorata con viti in titanio alla calotta cranica.

2.3 Acquisizione e calibrazione della posizione oculare

All'inizio di ogni sessione di addestramento e di registrazione per quanto riguarda i compiti di osservazione video e immagini statiche, tramite il sistema di monitoraggio dei movimenti oculari (ISCAN eye tracker) ed un software di calibrazione appositamente programmato in ambiente LabView, veniva effettuata la calibrazione dei parametri oculari necessaria per il corretto calcolo e monitoraggio della posizione degli occhi durante lo svolgimento delle diverse fasi dei compiti. Per effettuare la calibrazione venivano presentati, uno alla volta, 5 punti luminosi ai quattro angoli ed il centro di un monitor per computer, collocato di fronte alla scimmia, a 54 cm dagli occhi, predisposto con una risoluzione di 1680 X 1050 pixel. I punti si configuravano come cerchi rossi di eccentricità sottesa ad un arco di 0.5°. Alla presentazione di ogni punto la scimmia spostava lo sguardo in direzione del punto presentato e veniva registrata la posizione sugli assi X e Y della pupilla. Grazie al programma, nota la distanza dello schermo dall'occhio della scimmia e le distanze relative dei 5 punti presentati sul monitor, era possibile trasformare un qualunque punto dello spazio nelle coordinate angolari che l'occhio dell'animale doveva percorrere per portarsi su tale posizione. In questo modo veniva definito un piano di calibrazione ed una finestra quadrata di 6°x 6° attorno al punto centrale (punto di fissazione) all'interno della quale il primate aveva il compito di mantenere lo sguardo quando gli veniva richiesto di fissare.

2.4 Protocollo di registrazione e isolamento del segnale

Preliminarmente alla registrazione dei dati neuronali sono state condotte delle penetrazioni esplorative nelle due scimmie per identificare i principali landmark anatomici che definiscono la localizzazione della corteccia prefrontale. Sono state individuate le regioni di convessità corticale come quelle porzioni di corteccia di spessore non superiore ai 4 mm. Siti corticali localizzati a più di 4 mm di profondità sono stati identificati per descrivere le posizioni dei solchi principale e arcuato e identificare i loro banchi. Questa identificazione è stata supportata da una ulteriore analisi funzionale delle proprietà neuronali. In particolare, il solco arcuato è stato definito come il confine tra risposte scheletomotorie legate a movimenti della mano e della bocca, caudalmente, e oculomotorie, rostralmente. questa definizione è stata ulteriormente suffragata dagli esiti di stimolazioni intracorticali (stimolazione monopolare con i seguenti parametri: durata totale del treno di stimolazione: 50 ms; durate del singolo impulso: 0,2 ms; frequenza; 330 Hz). Il range di intensità della corrente utilizzato variava da 3 a 40 µA ed era controllato da un oscilloscopio misurando il calo di voltaggio attraverso una resistenza a 10 KΩ, posto in serie con l'elettrodo stimolante. Durante l'esecuzione delle stimolazioni rostrali al bordo del solco arcuato sono state identificate risposte oculomotorie. Dalle stimolazioni poste caudalmente al solco arcuato sono state prodotte risposte scheletomotorie, in particolare movimenti di braccio, mano e bocca.

A seguito della mappatura preliminare della corteccia ventro-laterale è iniziata la fase di studio. In tale fase si è cercato di mappare l'intera regione coperta dalla camera di registrazione con una griglia di penetrazioni spaziate l'una dall'altra di 1 mm sia in direzione antero-posteriore che medio-laterale. Ad ogni sessione sperimentale gli elettrodi venivano spinti in profondità attraverso la dura intatta fino alla detezione della prima attività neurale. In seguito, l'elettrodo veniva spinto in profondità per step di 500 µm, fino a che non veniva raggiunto il confine tra sostanza grigia e sostanza bianca. Dopo un periodo di assestamento dell'attività, per ogni elettrodo inserito in corteccia, venivano isolate le forme d'onda prodotte dai potenziali d'azione dei singoli neuroni, e si procedeva con l'acquisizione dell'attività neuronale durante l'esecuzione della batteria dei compiti sperimentali. Ogni sito in cui veniva eseguita una penetrazione veniva identificato con due coordinate XY relative al micromanipolatore. Successivamente le proprietà funzionali raccolte e le forme d'onda dei potenziali d'azione sono stati inseriti in un database insieme alle coordinate del sito di penetrazione, il giorno in cui è stata eseguita la penetrazione e un numero identificativo del neurone.

La registrazione dell'attività neurale è stata effettuata per mezzo di un dispositivo multi-elettrodo (AlphaOmega Eng., Nazareth, Israele) collegato alla camera di registrazione. Il dispositivo è composto da una base che contiene otto micro-elettrodi (diametro del corpo: 250 mm) rivestiti in vetro (impedenza 0.5-1 MΩ), disposti su due file da quattro, con uno spazio tra gli elettrodi di 2 mm. La distanza inter-elettrodo è stata scelta tenendo in considerazione la possibilità di registrare e comparare le proprietà di cellule distanti pochi millimetri. Gli elettrodi sono collegati ad un micro-posizionatore (MT, Microdriving Terminal, AlphaOmega) controllato da un computer attraverso un software dedicato (EPS, electrode positioning system, Alpha Omega) che permette il controllo indipendente di ogni singolo elettrodo nell'esecuzione di movimenti sull'asse verticale. La definizione dei parametri di registrazione, la visualizzazione della profondità di penetrazione e l'acquisizione dell'attività cellulare dagli elettrodi è stata realizzata tramite l'utilizzo di un software dedicato (MCP plus, multi channel processor, AlphaOmega). Il segnale di ogni elettrodo è stato quindi filtrato, amplificato e inviato ad un computer. Attraverso il software Off-line Sorter (Plexon Inc, Dallas TX, USA) è stato possibile effettuare un campionamento degli input provenienti dagli elettrodi; le forme d'onda risultanti dai potenziali d'azione sono state isolate dal segnale complessivo e identificate. Questo software utilizzava un algoritmo tramite il quale il segnale registrato dall'elettrodo veniva comparato continuamente con un "template" precedentemente definito dallo sperimentatore. Lo stesso software aveva il compito di controllare che le due onde soddisfacevano i criteri definiti dall'algoritmo durante tutto il tempo dell'acquisizione. Gli spike così isolati sono stati registrati e utilizzati per le analisi successive, consistenti nel confronto tra l'attività di scarica dei neuroni e i comportamenti dell'animale. Un circuito di detezione del contatto è stato usato insieme ai segnali provenienti dall'accensione e spegnimento dei led e dalla cannula per allineare l'attività neurale con le fasi del compito da eseguire.

2.5 Apparati sperimentali

2.5.1 Apparato per il compito visuo-motorio

Nelle fasi di addestramento comportamentale e durante le registrazioni elettrofisiologiche, la scimmia sedeva su una sedia per primati. Dopo aver ancorato il sistema di fissaggio della testa del primate al reggitesta, è stata posizionata una cannula in prossimità della bocca della scimmia. Quest'ultima permetteva l'erogazione di succo di frutta e acqua, utilizzati come rinforzo positivo durante l'addestramento e le sessioni sperimentali.

Una volta in sedia, la scimmia è stata posizionata di fronte ad un ripiano orizzontale posto all'altezza dell'addome dell'animale (profondo 80 cm e largo 60 cm) sul quale era presente, ad una distanza di circa 6 cm, un cilindro di alluminio (punto di partenza) collegato ad un apposito circuito elettrico per il rilevamento di contatto. Su di esso la scimmia doveva tenere la mano controlaterale all'emisfero di registrazione che rappresentava, pertanto, il punto di partenza. Il ripiano, inoltre, presentava un'apertura che permetteva la comparsa o la scomparsa, dal basso verso l'alto, di una scatola nera (33 cm X 17 cm X 18 cm) posta ad una distanza di 16 cm dal cilindro di alluminio, in modo tale da poter esser raggiunta dalla mano della scimmia (all'interno dello spazio peri personale). Nella faccia della scatola, sita davanti all'animale, era presente in posizione centrale un'apertura (7 cm x 7 cm) con una porticina a scomparsa, il cui meccanismo di apertura era controllato da un apposito software (programmato in ambiente LabView). All'interno della scatola erano posizionati tre oggetti diversi: una sfera (diametro 5 mm), un cilindro orizzontale (diametro base 10 mm; altezza 40 mm) ed un cubo (lato 25 mm). Tali oggetti sono stati montati, l'uno di fianco all'atro, su di un sistema mobile a cuscinetti che ne permetteva lo spostamento lungo l'asse orizzontale. L'apertura della porticina consentiva di presentare alla scimmia uno dei tre oggetti alla volta. Ciascun oggetto, inoltre, era collegato ad un circuito di rilevazione che permetteva di valutare con precisione il tempo di contatto della mano della scimmia con l'oggetto durante i compiti motori di afferramento.

Il tipo di prensione dell'oggetto da parte della scimmia era dettato dalla diversa forma e dimensione dello stesso: presa di precisione, con opposizione della superficie pulpare di indice e pollice (sfera); presa di potenza, con tutta la mano e pollice in opposizione (cubo); prensione con le dita, in assenza di opposizione del pollice (cilindro). La presenza di due laser posizionati dietro alla scimmia consentiva di proiettare punti colorati (verde o rosso) sulla scatola prima e sugli oggetti poi, con duplice funzione di istruzione del compito e punto di fissazione. Sulla superficie superiore della scatola erano posizionate due superfici metalliche distanti 15 cm tra di loro e poste a 31 cm dall'animale, al di fuori dello spazio raggiungibile (nello spazio extra personale). La prima era posta nello spazio controlaterale rispetto alla camera di registrazione, l'altra sulla linea mediana della scimmia.

2.5.2 Apparato per il compito di osservazione di video e immagini statiche

A differenza dei compiti visuo motori in cui era presente una scatola posizionata su un ripiano di fronte alla scimmia, nei compiti di sola osservazione di fronte alla scimmia era posizionato un monitor di computer collocato a 54 cm dagli occhi della scimmia, avente una risoluzione di 1680 X 1050 pixel ed utilizzato per la presentazione di stimoli visivi. Il centro geometrico dello schermo era posto all'altezza degli occhi della scimmia, mentre all'angolo era collocato un fototransistor (ates medica device s.r.l.) che permetteva di calcolare con precisione i tempi di somministrazione degli stimoli presentati sul monitor.

Al di sopra del monitor venivano poste una videocamera, sensibile alle lunghezze d'onda ricadenti nello spettro del visibile e dell'infrarosso, e un emettitore di luce infrarossa. Tali strumenti erano connessi a un computer dedicato (sistema integrato I-SCAN ETL200 con frequenza di rilevamento di 120 Hz) che permetteva di monitorare la posizione dell'occhio durante i compiti sperimentali. Le tracce della posizione X-Y dell'occhio venivano trasformate in differenze di potenziali e acquisite dal sistema di registrazione.

2.6 Paradigmi sperimentali

Le proprietà dei neuroni sono state studiate nei seguenti compiti sperimentali:

- Compito visuo-motorio di osservazione oggetti e afferramento
- Compito visivo di osservazione di immagini statiche
- Compito visivo di osservazione di azioni in video

I compiti sono stati eseguiti dalle due scimmie separatamente, senza intervallare le condizioni visive di osservazione e visuo-motorie. All'interno di ogni compito, stimoli e condizioni erano presentati secondo un ordine randomizzato. Le prove non accettate venivano accodate alla fine della sequenza e ripetute in modo tale da ottenere un numero di prove corrette sufficiente per ogni stimolo/condizione, fissato a 30, numerosità necessaria per un valido confronto statistico. All'interno di ogni compito un programma informatico, sviluppato ad hoc attraverso LabView (l'ambiente di sviluppo integrato per il linguaggio di programmazione visuale di National Instruments), si occupava di gestire e coordinare l'ordine randomizzato delle prove, controllare gli eventi (stato laser on-off, apertura porta, output monitor, emissione rinforzo), temporizzare le diverse fasi delle prove oltre a monitorare la posizione degli occhi e della mano durante tutto il tempo delle prove.

Tutti questi segnali venivano anche trasmessi in "tempo reale" al sistema di acquisizione insieme al segnale analogico e digitale neuronale

2.6.1 Compito Visuo-motorio

L'attività neurale è stata valutata in diversi compiti in cui alla scimmia è stato chiesto di eseguire azioni di afferramento in diverse condizioni. La condizione considerata in questo lavoro consisteva in un compito Go/No-go diviso in una prova visiva e una motoria. Ogni prova iniziava con la scimmia in posizione di partenza, con la mano su un manipolandum. Davanti a sé aveva una scatola con una porta sopra cui veniva proiettato un punto luminoso; la proiezione indicava l'inizio della prova. Il colore del punto dava il segnale istruttivo alla scimmia: verde per la condizione motoria e rosso per la condizione visiva. In entrambe le condizioni alla scimmia veniva richiesto di mantenere la fissazione all'interno di una finestra 6x6 gradi centrata sul punto luminoso.

Nella condizione motoria alla scimmia veniva richiesto di fissare il cue verde per un intervallo di tempo randomizzato (tra i 500 e i 1100 ms), a seguito di questo periodo la porta della scatola veniva aperta mostrando alla scimmia uno solo dei tre oggetti contenuti all'interno, illuminato

per mezzo di una luce all'interno della scatola. Durante la presentazione dell'oggetto il cue verde rimaneva sempre acceso, andando a proiettarsi sull'oggetto e la scimmia doveva mantenere la fissazione. Dopo un periodo di tempo randomizzato di 700-1100 ms il cue verde veniva spento, segnalando il Go. La scimmia in questa condizione era istruita ad eseguire un movimento di raggiungimento e afferramento verso l'oggetto, tenendolo tirato per almeno 600 ms. Se la scimmia eseguiva correttamente il compito veniva rinforzata con una goccia di succo alla fine della prova.

Nella condizione visiva lo stimolo istruttivo per l'inizio della prova di No-go era il cue rosso proiettato sulla scatola. La fissazione richiesta era la stessa della condizione motoria, e in seguito, se mantenuta, si apriva la porta della scatola con un oggetto dei tre illuminato, su cui puntava il cue rosso. Allo spegnimento del cue la scimmia doveva fissare l'oggetto per 600 ms senza eseguire un afferramento. Il compito corretto veniva rinforzato sempre con del liquido come nella condizione motoria.

Le prove venivano considerate non corrette e quindi scartate quando la scimmia non manteneva la fissazione per il periodo di tempo stabilito e fino alla fine della prova; quando rilasciava la mano per eseguire qualsiasi movimento nella condizione visiva, o quando la rilasciava prima del segnale di Go nella condizione motoria; quando non raggiungeva e afferrava l'oggetto in maniera corretta o quando non lo manteneva tirato per il tempo richiesto. Le prove scartate venivano ripetute per raccogliere almeno 30 prove corrette per ogni condizione.

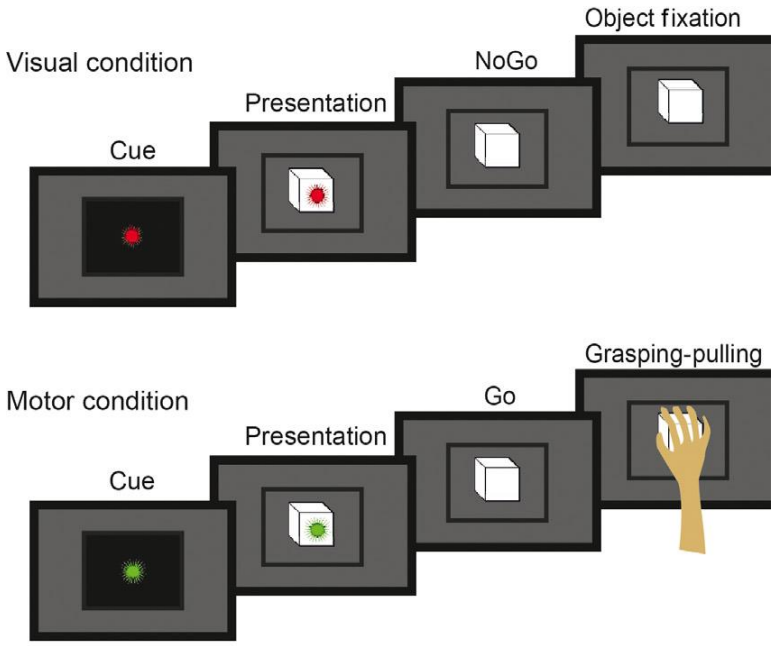

Figura 2.1 Illustrazione del compito visuo-motorio. Nella fase iniziale un punto luminoso, verde per la condizione Motoria e rosso per la condizione Visiva, veniva proiettato sulla porta chiusa (500-700 ms). Nella fase di presentazione quest si apriva mostrando uno di tre oggetti su cui rimaneva proiettato il punto luminoso (500-700 ms). Nella fase finale a seguito dello spegnimento del laser la scimmia doveva, nella condizione motoria, raggiungere e afferrare l'oggetto, mentre nella condizione visiva doveva limitarsi a mantenere la fissazione su di esso (600 ms).

2.6.2 Compito di osservazione di video

Per valutare la risposta dei neuroni della corteccia ventrolaterale all'osservazione di stimoli sono stati proiettati video della grandezza di 12°x12° che mostravano diversi stimoli biologici e oggetti in movimento. La finestra di fissazione all'interno della quale la scimmia doveva mantenere la fissazione era di 6°x6°, centrata sui video. Durante l'esecuzione di questo compito, il punto di fissazione rosso veniva proiettato al centro del monitor. Ogni singola presentazione consisteva di tre fasi. Una fase di Prima Fissazione durante la quale il laser proiettava un puntino rosso al centro dello schermo. Tale presentazione aveva una durata randomizzata compresa tra 500 e 750 ms a partire da quando la scimmia inizia a fissare il punto stesso. Al temine di questa fase, se la scimmia manteneva lo sguardo all'interno della finestra di fissazione per almeno il 90% del tempo, iniziava la seconda fase, in cui il punto di fissazione scompariva e sul monitor iniziava un filmato della durata di circa 1800 ms (fase di Stimolo). Dopo questo tempo, il video scompariva e veniva ripresentato il punto di fissazione rosso al

centro del monitor per un tempo randomizzato come il precedente (fase di Seconda Fissazione). I criteri per far sì che la prova venisse considerata corretta erano i seguenti:

- la fissazione (all'interno della finestra di 6° x 6°) doveva essere mantenuta per almeno il 90% del tempo in ogni fase,

- la mano della scimmia doveva restare ferma sul punto di partenza per tutta la durata della prova.

Solo nel caso in cui questi criteri venivano soddisfatti, la prova era considerata corretta e seguita da una ricompensa per la scimmia ed inclusa in un database. Le prove sbagliate, invece, venivano ripresentate successivamente. I video-clip che sono stati riprodotti sono i seguenti: azione di afferramento compiuta da scimmia secondo una prospettiva in prima persona; azione di afferramento compiuta da scimmia vista secondo una prospettiva in terza persona; azione di afferramento compiuta da uomo visto in prospettiva laterale; pantomima dell'afferramento (stessa scena del video-clip precedente in cui però era assente l'oggetto da afferrare); movimento biologico, rappresentato da un'estensione del braccio dello sperimentatore a mano aperta in prospettiva laterale; oggetto in movimento, rappresentato da una pallina che si muove seguendo la stessa traiettoria effettuata dall'oggetto sollevato dallo sperimentatore ma in assenza di agenti visibili.

In tutti i video non è stato ripreso il volto dell'agente che compie l'azione né la parte inferiore del corpo.

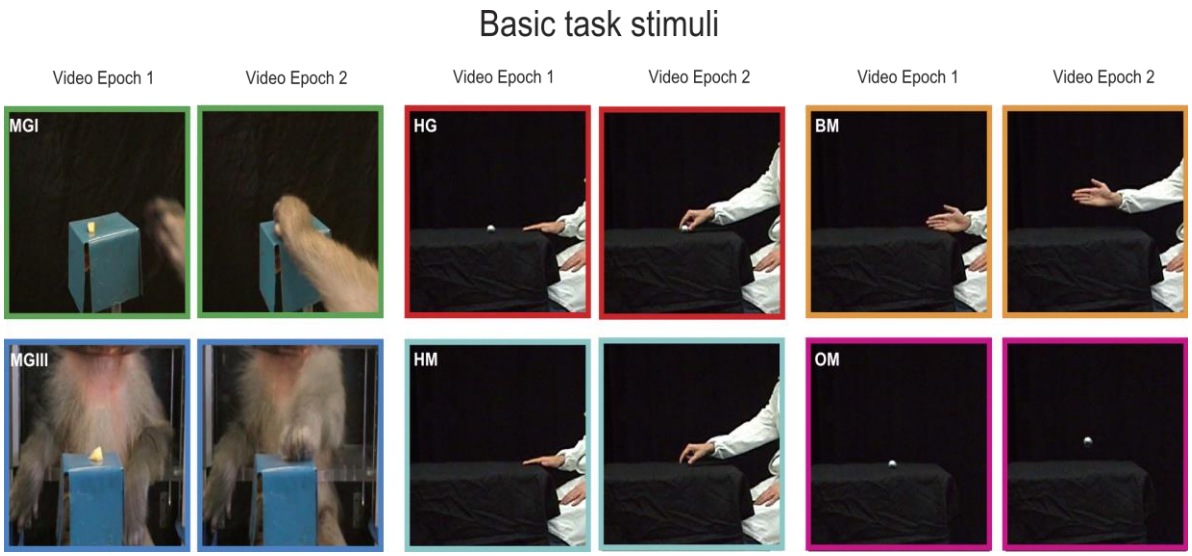

Figura 2.2 Illustrazione dei frame utilizzati durante il compito di osservazione di video clip. I frame corrispondono alle epoche 1 e 2 della fase di presentazione dei video (l'epoca 1 considera i primi 700 ms del video, l'epoca 2 considera i successivi 700 ms; l'epoca 1 include l'inizio del movimento dell'arto, tranne che nella condizione di object motion, mentre l'epoca 2 l'interazione mano oggetto e la fine dell'azione). MGI: Scimmia che afferra in prospettiva egocentrica. MGIII: Scimmia che afferra in prospettiva di terza persona. HG: Uomo che afferra. HM: Uomo che simula un afferamento. BM: Movimento biologico. OM: Movimento di un oggetto.

2.6.3 Compito di osservazione di immagini statiche

Durante l'esecuzione di questo compito, il punto di fissazione rosso veniva proiettato al centro del monitor. Ogni singola presentazione consisteva di 3 fasi. Durante la prima il punto di fissazione veniva proiettato sul monitor per un tempo randomizzato tra 500 e 750 ms (fase di Prima Fissazione). Se la scimmia manteneva lo sguardo per il 90% del tempo si procedeva alla seconda fase in cui il punto di fissazione scompariva e sul monitor veniva presentata un'immagine per un tempo di 600 ms (fase di Stimolo). Dopo questo tempo l'immagine scompariva e veniva ripresentato il punto di fissazione rosso per un tempo randomizzato come il precedente (fase di Seconda Fissazione). I criteri necessari per far sì che la prova fosse considerata corretta erano i seguenti:

- la fissazione doveva essere mantenuta per almeno il 90% del tempo di ognuna delle tre fasi;

- lo sguardo della scimmia doveva essere mantenuto all'interno della finestra di fissazione;

- la mano doveva restare sul punto di partenza per tutta la durata della prova.

Nel caso in cui tali criteri non fossero stati soddisfatti la prova veniva esclusa dall'analisi, la scimmia non riceveva la ricompensa e la prova veniva ripresentata successivamente. Lo stimolo consisteva in una di 12 immagini, organizzate in 4 categorie:

1) Volti: immagine reale di una faccia di una scimmia, immagine reale di un viso d'uomo e un disegno di una faccia di scimmia;

2) Oggetti afferrabili noti e commestibili: mela, banana e nocciolina;

3) Oggetti afferrabili noti e non commestibili: rappresentazioni bidimensionali degli oggetti utilizzati nel compito motorio (sfera, cubo e cilindro);

4) Oggetti non afferrabili: mobiletto, orologio e schermo di computer.

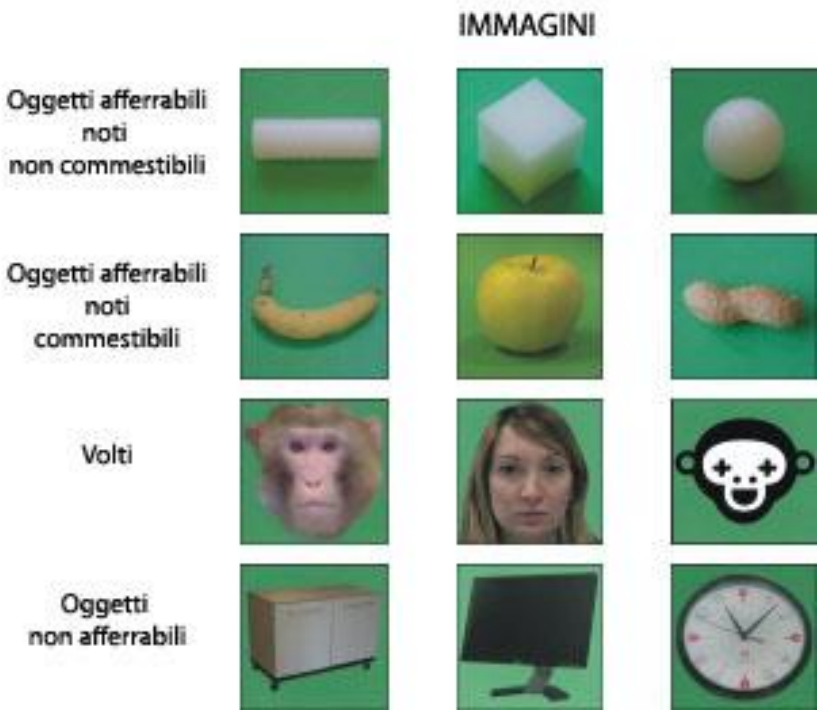

Figura 2.3 Immagini statiche presentate durante il compito di osservazione di immagini.

2.7 Elaborazione dei dati e analisi statistica

Il sistema di acquisizione dati ha permesso di co-registrare nel tempo le informazioni provenienti dall'attività neurale con i segnali analogici e digitali esterni, provenienti dai

componenti dell'apparato sperimentale. I segnali esterni sono necessari per l'allineamento dell'attività neuronale a specifici eventi comportamentali. L'allineamento consente l'analisi della risposta dell'attività neuronale attraverso la visualizzazione di istogrammi in cui sono riportate le registrazioni di tutte le prove per singolo neurone.

2.7.1 Analisi delle risposte nel compito motorio

Nel compito visuo-motorio, sia nella condizione di osservazione che in quella di azione l'attività neuronale è stata registrata per almeno 60 prove con esito favorevole: 30 prove per condizione, 10 prove per ogni oggetto presentato. L'analisi del segnale neuronale prende in considerazione l'attività della cellula espressa come la media del suo profilo di scarica misurato in spike/s.

Sulla base dei segnali digitali sono state definite 9 epoche nella seguente maniera: 1) Baseline o attività neuronale di base: 750-250 ms prima dell'accensione dello stimolo istruttivo; 2) Pre-stimolo: 250 ms precedenti l'accensione dello stimolo istruttivo; 3) Stimolo istruttivo o Cue: 250 ms seguenti all'accensione dello stimolo istruttivo; 4) Pre-presentazione dell'oggetto: 500 ms precedenti l'apertura della porta della scatola; 5) Presentazione dell'oggetto: 500 ms successivi l'apertura della porta; 6) Set: 250 ms precedenti lo spegnimento dello stimolo luminoso; 7) Go/NoGo: nella condizione motoria, dal segnale di Go al rilascio da parte della scimmia della posizione di partenza, mentre nella condizione visiva, 250 ms successivi il segnale di NoGo; 8) Hold/fix (Afferramento/ Fissazione) dell'oggetto: nella condizione motoria, 250 ms prima a 250 ms dopo l'inizio della trazione sull'oggetto; nella condizione visiva, il tempo compreso tra 250-500 ms dopo lo spegnimento dello stimolo; 9) Rinforzo: 500 ms successivi alla somministrazione del rinforzo).

Nel compito visuo-motorio le risposte dei singoli neuroni sono state analizzate mediante un ANOVA 9 x 2 a misure ripetute (fattori: Epoca e Condizione, $p < 0.01$) seguita da test *post hoc* di Student-Newman-Keuls. Sono stati utilizzati criteri di esclusione dall'analisi che hanno portato a scartare certi neuroni. Le prove sono state presentate in maniera randomizzata rispetto alle condizioni visiva e motoria. Un criterio da rispettare per classificare come valida la risposta di una cellula era quello di non trovare differenze significative tra il segnale neuronale nelle epoche di baseline delle varie prove. I neuroni con differenze significative tra epoche di baseline sono stati pertanto esclusi. I neuroni inclusi nel lavoro sono quelli la cui analisi statistica ha rivelato un effetto Interazione significativo (Condizione x Epoca, $P<0.01$) e in cui il successivo test *post hoc* di Student-Newman-Keuls ha evidenziato una differenza significativa dell'attività

registrata in una o più epoche di una condizione rispetto sia all'attività neuronale di base nella stessa condizione che a quella delle epoche corrispondenti dell'altra condizione.

2.7.2 Analisi delle risposte nei compiti di osservazione di stimoli statici e videoclip

Nei compiti di Osservazione di Immagini e di Video-clip sono state registrate almeno 60 prove per compito eseguite con successo. Nel compito di osservazione di video sono state definite le seguenti epoche: 1) Baseline: 500 ms prima dell'inizio dei video, durante i quali la scimmia guardava al punto di fissazione; 2) Epoca Video 1: i primi 700 ms dall'inizio del video; 3) Epoca Video 2: i seguenti 700 ms. le risposte dei singoli neuroni sono state valutate statisticamente con un ANOVA 6x3 a misure ripetute (fattori: Epoche, Video, $p<0.01$) seguita da un test *post-hoc* di Student-Newman-Keuls. Dal momento che, come nel compito motorio, le prove erano randomizzate cambiamenti significativi dell'attività di baseline tra le varie prove hanno portato ad escludere dei neuroni. I criteri di inclusione per un neurone erano: 1) un main effect Epoca significativo e, nel test post-hoc, una differenza significativa tra almeno una delle epoche di osservazione video e la baseline. 2) un effetto Interazione (epoca x video) significativo, che nel post-hoc rivelasse una differenza significativa tra almeno un'epoca di osservazione di un altro stimolo e una differenza significativa con la propria epoca di baseline. Questi ultimi neuroni sono stati categorizzati come neuroni con risposte specifiche per l'osservazione di uno o alcuni specifici video.

Nel compito di osservazione di immagini statiche sono state definite due epoche temporali, ognuna della durata di 500 ms: la prima epoca (epoca di Prima Fissazione) corrispondeva ala fase di fissazione precedente la presentazione dello stimolo, la seconda epoca (epoca Stimolo) coincideva con la fase di presentazione dello stimolo. Per l'analisi statistica è stata utilizzata un ANOVA 12x2 a misure ripetute (fattori: Epoche, Immagini, $p<0.01$), seguita da un test post-hoc di Student-Newman-Keuls. I criteri di inclusione per un neurone erano: 1) un main effect Epoca significativo e, nel test post-hoc, una differenza significativa tra l'epoca di osservazione di stimoli visivi statici e la baseline. 2) un effetto Interazione (epoca x immagine) significativo, che nel post-hoc rivelasse una differenza significativa tra almeno un'epoca di osservazione di un altro stimolo e una differenza significativa con la propria epoca di baseline. Questi ultimi neuroni sono stati categorizzati come neuroni con risposte specifiche per l'osservazione di uno o alcuni stimoli visivi. I neuroni che presentavano una differenza significativa tra le epoche di prima fissazione nelle varie condizioni stimolo sono stati scartati.

2.7 Metodi di costruzione mappe

Le mappe funzionali sono state costruite su un piano cartesiano definito dalle coordinate identificate durante le penetrazioni. Sono state indicate tutte le localizzazioni in cui sono state eseguite delle penetrazioni, prescindendo dal fatto che i neuroni rispondessero o meno nei diversi compiti sperimentali. In seguito, sulla base delle analisi statistiche sopra descritte sono stati identificati i neuroni con risposte significative in diverse epoche dei paradigmi utilizzati. Ai fini della costruzione delle mappe presentate in questo lavoro di tesi si sono considerate: per i compiti motori le risposte specifiche (come definito nel paragrafo 3.7.1) dei neuroni sono nelle Epoche Cue, Presentazione, Go-No Go, Afferramento-Fissazione. Per i compiti di osservazione sono state considerate le risposte dei neuroni selettivi per gli stimoli visivi presentati, statici e video (vedi paragrafo 3.7.2). Nella costruzione delle mappe funzionali ogni localizzazione è stata etichettata con un cerchio. Sulla griglia delle penetrazioni sono stati riportati i solchi principale ed arcuato insieme alla riflessione orbitale. Le posizioni dei solchi sono state ricostruite dalla mappatura preliminare delle regioni corticali delle due scimmie. Le localizzazioni in cui sono state identificate proprietà funzionali sono state indicate con cerchi di diverso colore a seconda della proprietà e di diverse dimensioni. Le dimensioni variano in funzione del rapporto tra numero di neuroni registrati ed il numero di penetrazioni effettuate in quella posizione. Questo criterio è stato scelto per avere una maggior chiarezza sulla quantità di proprietà presente in un dato sito. Considerando che sono state effettuate più penetrazioni in giorni diversi in alcuni siti ma non in altri le risposte degli stessi neuroni potrebbero essere state registrate più volte. Per evitare questo bias, abbiamo normalizzato le risposte registrata ad una particolare coordinata sul numero di penetrazioni condotte in quella posizione, per rendere una descrizione più equilibrata della distribuzione delle proprietà rappresentate in ogni porzione di corteccia.

2.8 Clusterizzazione delle risposte funzionali

Si è voluto indagare se le proprietà fossero distribuiite spazialmente in gruppi distinti e quale fosse il livello di separazione tra questi aggregati neuronali. Per fare questo sono, per ogni scimmia, abbiamo considerato le coordinate X-Y di tutti i neuroni con proprietà specifiche individuati dall'analisi statistica nei vari compiti (vedi par. 3.7). Su queste coordinate è stato applicato l'algoritmo di clusterizzazione standard k-Means (Matlab). Il k-means è un metodo di partizionamento dei dati che divide il numero delle osservazioni in un numero definito di cluster mutualmente esclusivi. Si noti che questo algoritmo richiede la definizione *a priori* del numero di cluster. Per superare la potenziale debolezza teorico-metodologica di tale limite, la definizione del numero ideale di cluster utilizzato per questa analisi è stata individuata tramite una metodica oggettiva: il metodo delle "silhouette". Questa funzione fornisce una visualizzazione grafica e una misura numerica della separazione dei cluster. I valori delle "silhouette" variano da +1 a -1, dove +1 denota una chiara assegnazione di un osservato a un dato al cluster, e -1 indica le osservazioni che hanno il maggior grado di incertezza nell'assegnazione. Un clustering ottimale ha valori medi di "silhouette" maggiori di 0.6. Nella nostra analisi è stato tenuto conto di questo valore per scegliere il numero di cluster da applicare nell'analisi con la funzione k-means. In particolare abbiamo fatto girare l'algoritmo per il calcolo delle silhouette per valori numerici compresi tra 2 e 5, quindi abbiamo utilizzato il numero di cluster con valore di silhouette maggiore, scartando le soluzioni con cluster troppo poco numerosi (< 2 neuroni). Stabilito il numero k di cluster l'algoritmo individua una serie di partizioni in cui le osservazioni all'interno del cluster sono più vicine possibile l'una all'altra, e più lontane possibile dalle osservazioni raggruppate negli altri cluster. Ogni cluster è definito dalle osservazioni incluse in esso e da un centroide. Il centroide è il punto in cui la somma delle distanze di tutti gli oggetti interni al cluster è minima. La metrica utilizzata per individuare la distanza dei punti dai centroidi è la distanza euclidea bi-dimensionale. Sono stati eseguite delle analisi di cluster separatamente sui gruppi di neuroni che presentavano una risposta funzionale selettiva per il tipo di stimolo per i compiti di osservazione degli stimoli, e per le risposte specifiche per condizione nelle epoche di Cue, Presentazione, Go/NoGo e Afferramento/Fissazione, nel compito visuo-motorio.

In seguito, sono state ricavate le coordinate dei centroidi dei cluster prodotti per ogni condizione. Le coordinate così raccolte sono state organizzate in un nuovo dataset utilizzata per clusterizzare tali centroidi. La valutazione di questi "meta-cluster" era volta a definire una eventuale distinzione topografica relativa a un vasto numero di risposte funzionali analizzate.

Anche tale analisi è stata condotta con il metodo del k-means, separatamente per le due scimmie.

3. Risultati

Sono state eseguite 231 penetrazioni (126 in M1 e 105 in M2) nella corteccia prefrontale laterale. In 46 di esse (21 in M1 e 25 in M2) sono stati registrati neuroni che rispondevano durante l'osservazione dei video, in 43 (20 in M1 e 23 in M2) di esse sono stati trovati neuroni che rispondevano durante l'osservazione degli stimoli statici, in 51 di esse (25 in M1 e 26 in M2) sono state trovate risposte nel compito visuo-motorio.

La figura 3.1 mostra la griglia delle penetrazioni, rapportata ai solchi, così come identificati sulla base delle profondità e delle risposte (si veda Materiali e Metodi). Nei paragrafi successivi saranno riportate le mappe delle proprietà funzionali identificate con i tre compiti utilizzati.

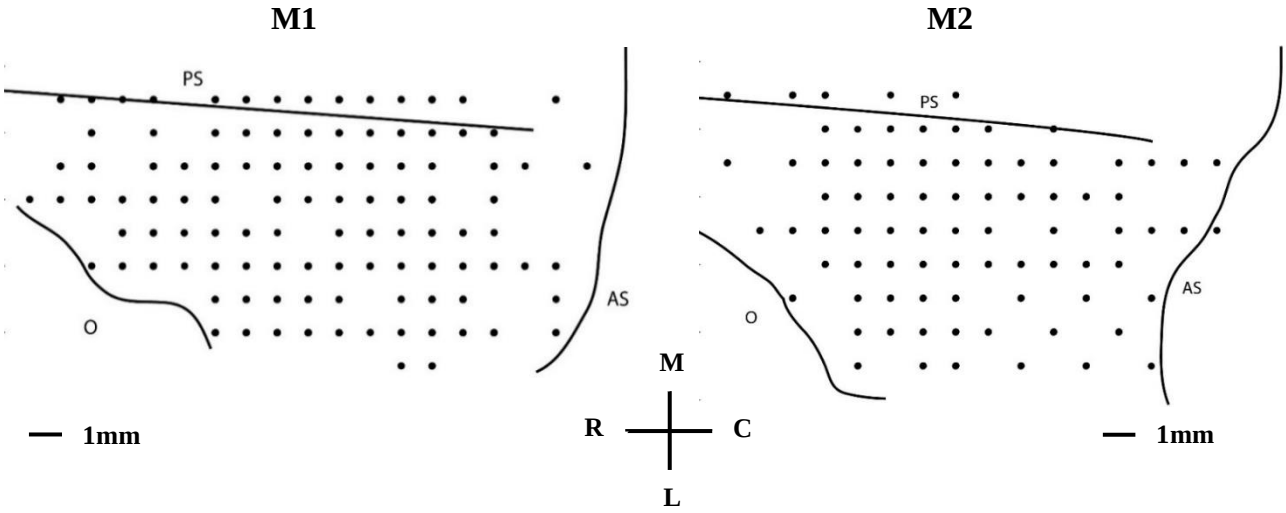

Figura 3.1 Griglie in cui sono rappresentati i siti di penetrazione nelle due scimmie eseguite durante i tre compiti sperimentali (visuo-motorio, osservazione di immagini e video, vedi Materiali e Metodi). I cerchi neri rappresentano un sito di penetrazione. La distanza tra un sito e il successivo in tutte le direzioni è di 1 mm. A sinistra: M1; a destra: M2. O: riflessione orbitale, AS: solco arcuato (porzione inferiore), PS: solco principale.

3.1 Risposte neuronali nel compito visuo-motorio

Le risposte dei singoli neuroni registrate durante il compito visuo-motorio sono state statisticamente valutate attraverso una ANOVA 9x2 per misure ripetute (fattori: Epoca e Condizione, $P< 0.01$) seguita da test post hoc di Newman-Keuls (vedi Materiali e metodi).

Sono stati inclusi nel lavoro tutti i neuroni per cui l'analisi statistica dimostrava valido almeno uno dei successivi criteri: 1) effetto principale Epoca significativo ($p<0.01$) seguito da un post hoc test che evidenziasse una differenza significativa dell'attività registrata in una o più epoche rispetto all'attività neuronale registrata nell'epoca di Baseline; 2) effetto Interazione

significativo (Condizione x Epoca, P<0.01) in cui il successivo test post hoc evidenziava una differenza significativa dell'attività registrata in una o più epoche di una delle due condizioni rispetto sia all'attività neuronale della Baseline della stessa condizione che a quella della/e epoca/epoche corrispondente/i dell'altra condizione.

Di tutti i neuroni registrati, 1390 hanno soddisfatto questi criteri (neuroni task related). In particolare 960 neuroni hanno mostrato un effetto principale Epoca, rispondendo diversamente in almeno un'epoca rispetto alla propria baseline, in assenza di significatività statistica per quanto riguarda l'effetto Interazione. I restanti 430 neuroni hanno mostrato un effetto Interazione significativo, rispondendo in almeno un'epoca in maniera differente nelle due condizioni (visiva e motoria). Il grafico mostrato in figura 3.2 mostra le risposte di neuroni che codificano preferenzialmente la condizione motoria o visiva in rapporto al numero di neuroni con risposta differenziale in quattro delle epoche totali considerate.

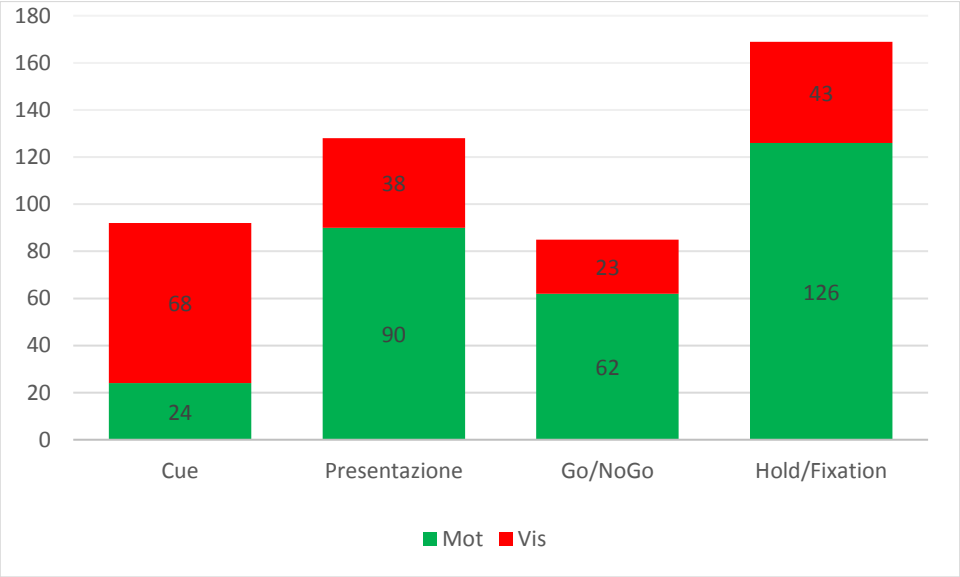

Figura 3.2 Numero di neuroni che presentano una risposta differenziale nelle diverse epoche. Verde condizione motoria, Rosso: condizione visiva.

L''analisi statistica che è stata condotta su singoli neuroni ha considerato tutte le 9 epoche descritte nella sezione Materiali e Metodi ma per questo lavoro di mappatura sono state considerate solo quattro epoche: Cue, Presentazione, Go/NoGo, Hold/Fixation. In seguito, verranno esaminati i risultati separatamente per queste quattro epoche.

3.2 Mappa dei neuroni con risposte selettive nell'epoca di Cue

Nell' epoca di Cue sono attivi 451 neuroni, di cui circa un terzo (n=155) si attiva in maniera preferenziale in quest'epoca, mentre i restanti due terzi (n=296) si attivano in almeno un'altra epoca. Se si considerano i neuroni con risposta differenziale (effetto Interazione significativo) nell'epoca di Cue (n=92), si nota che in questa epoca la maggioranza dei neuroni risponde meglio nella condizione visiva (73.9%). Due esempi di neuroni sono mostrati nella figura 3.3

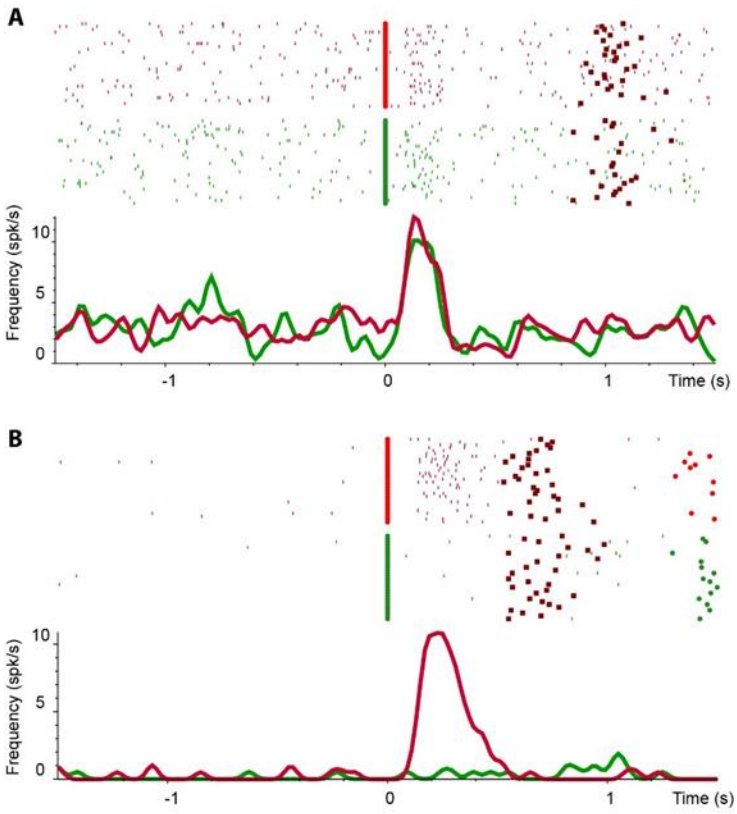

Figura 3.3 Neuroni con risposta nell'epoca di Cue. Il neurone A si attiva sia nella condizione visiva (rosso) che nella condizione motoria (verde). Il neurone B si attiva esclusivamente nella condizione visiva. Raster e istogrammi sono allineati con la comparsa del cue. Cerchi rossi=accensione del cue rosso (condizione visiva). Cerchi verdi=accensione del cue verde (condizione motoria). Quadrati rossi=apertura della porta (epoca di Presentazione dell'oggetto). Ascisse=tempo (s). Ordinate=frequenza di scarica dei neuroni (spike/s)

La figura 3.4 mostra le posizioni in cui, nelle due scimmie, sono stati registrati neuroni con risposte di interazione nell'epoca di Cue: In rosso sono mappate le risposte dei neuroni che rispondono selettivamente nella condizione Visiva, in verde sono mostrati i neuroni con risposte preferenziali per la condizione Motoria. In M2 risulta prevalere la risposta allo stimolo istruttivo della condizione visiva, mentre in M1 la differenza tra le risposte alle due condizioni risulta meno evidente. In M1 si osserva un addensamento delle risposte nella porzione dorsale della

camera di registrazione a ridosso del solco principale, mentre un altro gruppo di cellule con risposte differenziali si trovano nella porzione ventrale intermedia. In M2 si nota una presenza quasi esclusiva di neuroni rispondenti lungo tutta l'estensione rostro-caudale della porzione ventrale dell'area registrata.

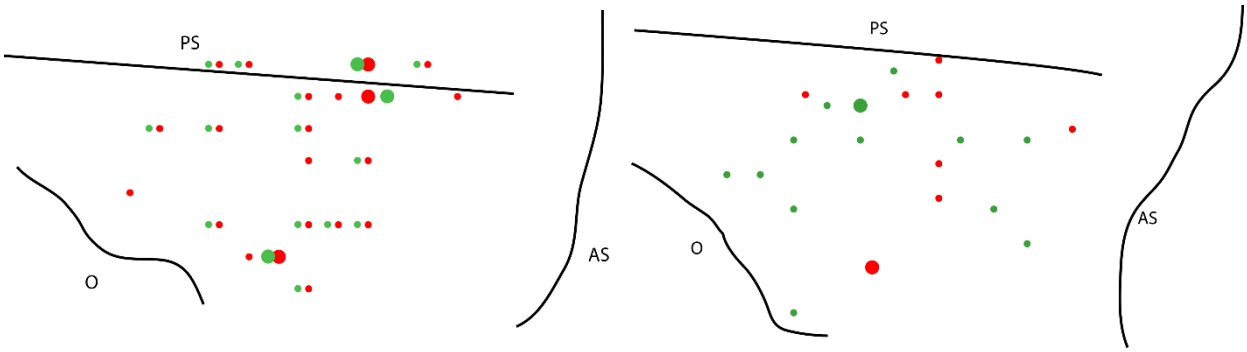

Figura 3.4 In questa figura è mostrata una ricostruzione funzionale della regione registrata. Sono rappresentate sotto forma di cerchi colorati le penetrazioni che hanno individuato neuroni con risposte differenziali nell'epoca di Cue sovrapposte alle due griglie di registrazione. Cerchi neri= siti di penetrazione senza risposte nell'epoca considerata. Cerchi verdi=risposte differenziali alla condizione motoria. Cerchi rossi=risposte differenziali alla condizione visiva. Per facilità di visualizzazione i cerchi colorati, che rappresentano le risposte dei neuroni, sono posti a fianco di quelli neri, che rappresentano i siti di penetrazione. Le dimensioni dei cerchi rappresentano il rapporto tra numero di neuroni registrati in un sito e penetrazioni eseguite (neuroni/penetrazioni). Cerchi grandi=rapporto neuroni/penetrazioni >3. Cerchi piccoli=rapporto neuroni/penetrazioni<3. A sinistra M1, a destra M2. Il resto delle convenzioni come in fig.3.1

La Fig.3.5 mostra l'esito dell'analisi di clusterizzazione nelle due scimmie. In questo caso il metodo delle silhouette ha individuato come ideale un numero di cluster differente per le due scimmie (n=4 cluster per M1; n=3 cluster per M2). Si noti che nonostante le differenze sottolineate nell'osservazione delle mappe delle due scimmie l'analisi di cluster evidenzia una notevole somiglianza nella distribuzione delle risposte. In particolare si nota la sovrapposizione nelle due scimmie dei cluster ventrali, uno in posizione caudale, l'altro in posizione intermedia, e del cluster dorsale in posizione intermedia. In M1 è presente un quarto cluster situato in posizione dorso-caudale che non risulta in M2, anche se si osserva come una risposta in M2, posta ventralmente al solco principale e assegnata al cluster ventrale posteriore, potrebbe essere stata assegnata con un elevato grado di incertezza dall'algoritmo. Questa osservazione potrebbe rappresentare un sotto-elemento di un cluster corrispondente a quello di M1.

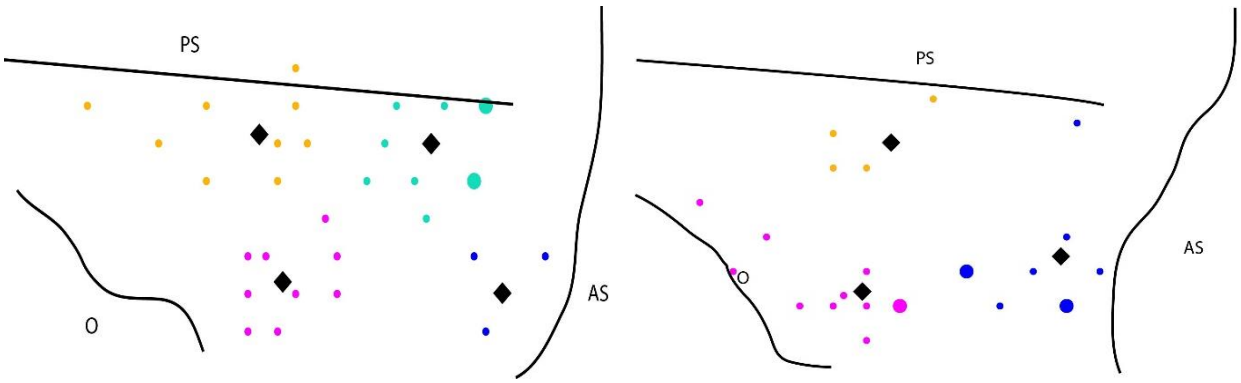

Figura 3.5 Nella figura è illustrato il risultato dell'analisi di cluster con il metodo k-mean (vedi Materiali e Metodi) per i neuroni con effetto interazione significativo nell'epoca di Cue. Si noti che la griglia sottostante è stata rimossa per facilità di visualizzazione. Cerchi con colorazione differenti appartengono a cluster diversi. Il rombo nero in ogni cluster rappresenta la posizione del centroide individuato dall'algoritmo.

3.3 Mappatura delle risposte nell'epoca di Presentazione

Di tutti i neuroni task related (n=1390) circa la metà risulta attiva nell'epoca di Presentazione dell'oggetto (n=648). In quest'epoca la maggioranza dei neuroni mostra significatività statistica solo per l'effetto epoca (n=664), mentre 128 neuroni mostrano anche l'effetto interazione. Di questi ultimi la maggioranza (70,3%) risponde meglio nella condizione motoria rispetto alla condizione visiva. La figura 3.6 mostra la risposta di un neurone che si attiva nell'epoca di Presentazione in maniera preferenziale durante la condizione motori ($p<0,01$, post hoc Newman-Keuls).

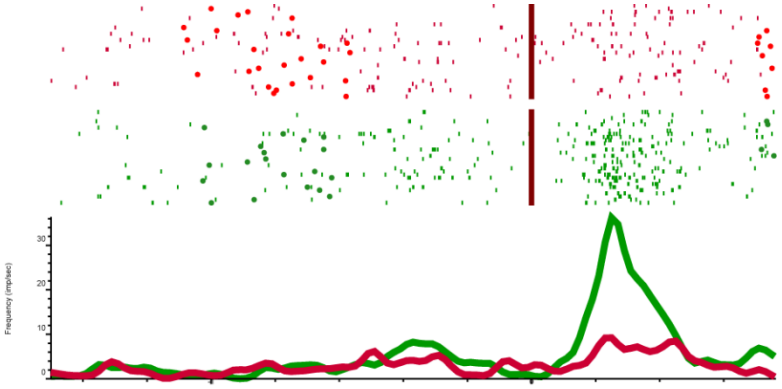

Figura 3.6 Nel diagramma è illustrata la risposta di neurone con effetto interazione significativo nell'epoca di Presentazione. Il neurone manifesta una risposta differenziale per la condizione Motoria (linea verde), rispetto alla condizione visiva (linea rossa). Si noti che la linea rossa corrisponde all'inizio dell'epoca di Presentazione identificata con l'apertura della porta. Convenzioni come in fig 3.3.

La figura 3.7 mostra le posizioni in cui, nelle due scimmie, sono stati registrati neuroni con risposte di interazione nell'epoca di Presentazione: in rosso sono mappate le risposte dei neuroni che rispondono selettivamente nella condizione Visiva, in verde sono mostrati i neuroni con risposte preferenziali per la condizione Motoria. Nelle due mappe le risposte di presentazione risultano occupare una grossa porzione centrale della camera di registrazione per tutta la sua l'estensione dorso-ventrale, con un addensamento nella porzione posteriore del solco principale in M1. Non si osservano particolari raggruppamenti di risposte nelle porzioni posteriori; mentre è presente un addensamento di risposte nel terzo anteriore della camera, ma solo nel caso di M2. Le risposte alla condizione Visiva e alla condizione Motoria risultano spesso presenti nello stesso sito di registrazione o comunque adiacenti.

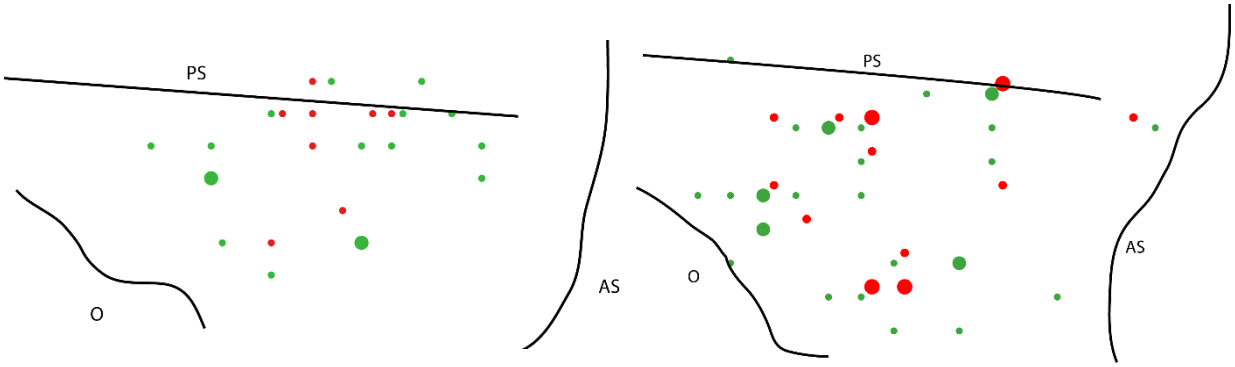

Figura 3.7 Distribuzione delle penetrazioni che rilevano risposte differenziali di neuroni con un effetto Interazione nell'epoca di Presentazione (ANOVA 9x2, post hoc Newman-Keuls p<0,01). Le risposte differenziali per la condizione visiva sono in rosso, le risposte differenziali per la condizione motoria in verde Convenzioni come in figura 3.4

La Figura 3.8 mostra l'esito dell'analisi di clusterizzazione nelle due scimmie. Si noti come in M1 siano risultati ideali quattro cluster per descrivere la distribuzione delle risposte, mentre solo tre in M2. La distribuzione dei raggruppamenti risulta piuttosto simile per i due cluster anteriori, comunque più estesi in M2 in direzione della riflessione orbitale. Il cluster caudale in M2 raccoglie osservazioni molto disperse.

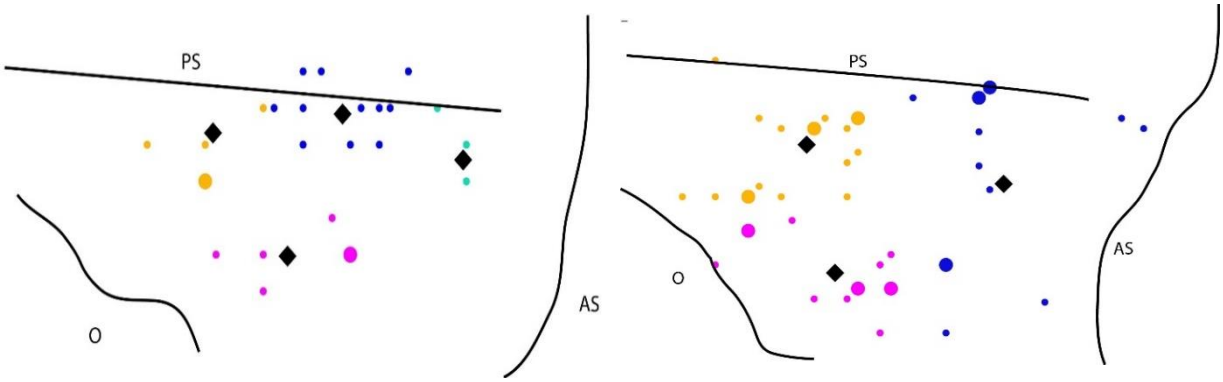

Figura 3.8 Risultato dall'analisi di cluster sulle risposte neuronali nell'epoca di Presentazione. In M1 è stato inserito un quarto cluster come indicato dal metodo delle silhouette (vedi Materiali e Metodi). Convenzioni come in fig. 3.5

3.4 Mappatura delle risposte nell'epoca di Go/No Go

Dei 514 neuroni attivi nell'epoca di Go/NoGo, 57 si attivano esclusivamente in quest'epoca, mentre i restanti la grande maggioranza (88.9%) si attivano in almeno un'altra epoca oltre ad essa. La maggior parte dei neuroni con effetto interazione in questa epoca (n=85) presentano una risposta preferenziale per la condizione motoria (73,8%). Nella figura 3.9 viene mostrato un neurone selettivo per la condizione motoria nell'epoca di Go (presenta effetto Interazione, $p<0,01$, seguito da test post hoc di Newman-Keuls) , inoltre lo stesso neurone mantiene una risposta differenziale sempre per la condizione motoria anche nell'epoca successiva, quella di Hold.

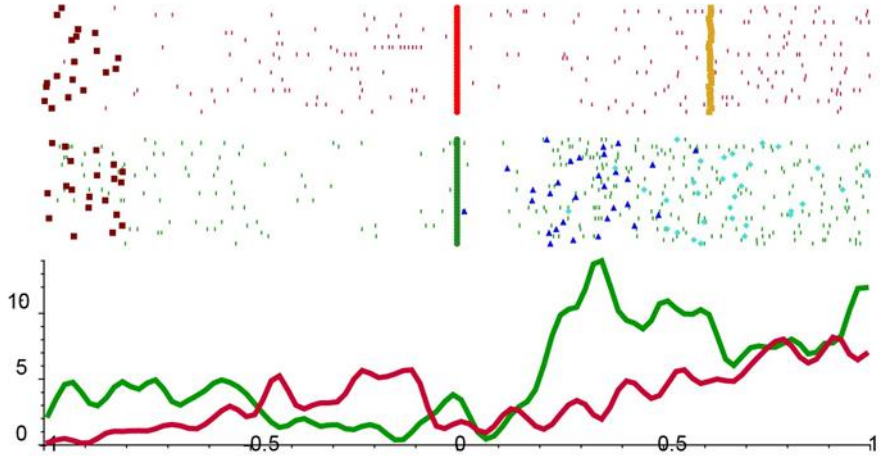

Figura 3.9 Neurone attivo nell'epoca di Go/No go con risposta differenziale maggiore al segnale di Go (verde) rispetto a quella di No go (rosso). I raster sono allineati con lo spegnimento della luce istruttiva. Triangoli blu=rilascio della posizione di partenza, quadrati gialli=erogazione rinforzo. Convenzioni come in fig. 3.3

La figura 3.10 mostra le posizioni in cui, nelle due scimmie, sono stati registrati neuroni con risposte di interazione nell'epoca di Go/No go: In rosso sono mappate le risposte dei neuroni che rispondono selettivamente nella condizione di No Go, in verde sono mostrati i neuroni con risposte preferenziali per la condizione di Go. In M1 si nota una prevalenza di risposte sia alla condizione rossa che verde per metà della lunghezza totale considerata del solco principale, un raggruppamento simile si nota in M2 posto più ventralmente al solco. È presente, seppur in maniera minore in M2, un blocco di risposte nella parte ventrale anteriore. In M1 le risposte differenziali occupano nella maggior parte dei casi considerati gli stessi siti di penetrazione. Pertanto, in questa scimmia risultano poco segregati i neuroni con risposte agli stimoli istruttivi di Go e No go. Al contrario in M2 dove le risposte differenziali alle due condizioni non risultano in nessun caso occupare lo stesso sito di registrazione. Non si notano risposte differenziali registrate nella parte caudale ventrale della camera di registrazione in nessuna delle due scimmie.

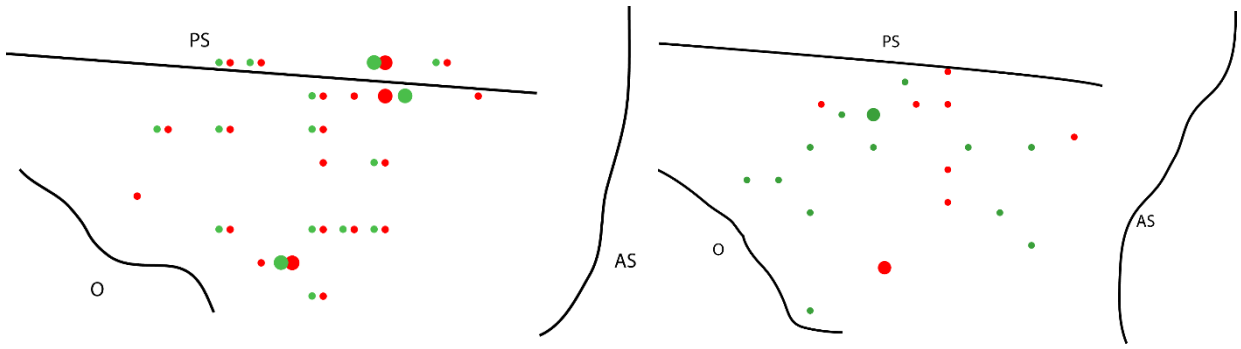

Figura 3.10 Distribuzione delle penetrazioni che rilevano risposte differenziali di neuroni con un effetto Interazione nell'epoca di Go/No go (ANOVA 9x2, post hoc Newman-Keuls p<0,01). Le risposte differenziali per la condizione visiva sono in rosso, le risposte differenziali per la condizione motoria in verde. Convenzioni come in figura 3.4

L'analisi con l'algoritmo delle silhouette ha indicato come ottimale il numero di 3 cluster in entrambe le registrazioni (vedi figura 3.11). La numerosità di risposte nella parte dorsale, a ridosso del solco principale, in M2 ha influenzato probabilmente la formazione di un cluster caudale posto più dorsalmente rispetto a quello di M1. In entrambe i casi si nota comunque una suddivisione delle risposte dorsali in due cluster, anteriore e posteriore, e un blocco di minor estensione presente in posizione ventrale.

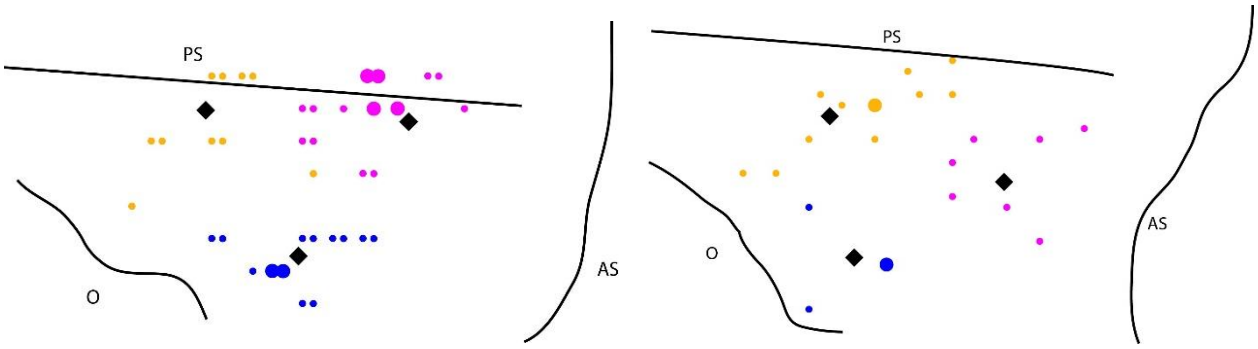

Figura 3.11 Risultato dall'analisi di cluster sulle risposte neuronali nell'epoca di Go/No go. Convenzioni come in figura 3.5

3.5 Mappatura delle risposte nell'epoca di Hold/Fixation

Nell'epoca di Hold/Fixation sono attivi 537 neuroni. Di essi l'86% non è esclusivamente attivo in quest'epoca ma presenta attività in distribuita in più fasi del compito. Se si considerano i neuroni con risposta differenziale (effetto interazione significativo), nell'epoca di Hold/Fixation (n=169) circa 3/4 dei neuroni mostrano risposta preferenziale per la condizione motoria (74.6%). L'analisi statistica mostra un effetto Interazione significativo ($p<0,01$) e il successivo post-hoc (vedi Materiali e metodi) indica che l'attività registrata durante la condizione motoria (hold) di afferramento in quest'epoca è maggiore di quella dell'epoca omologa nella condizione visiva (fixation). Nella figura 3.12 È mostrato un neurone che si attiva esclusivamente nell'epoca di Hold/Fixation per la condizione di afferramento (il neurone rispetta i criteri di inclusione nel dataset; dall'analisi con ANOVA risulta avere effetto Interazione $p<0,01$, inoltre è stato eseguito il test post hoc di Newman-Keuls per capire con quali epoche e condizioni dimostrasse una differenza significativa) Si noti come la risposta (linea verde in figura) crolli subito dopo l'epoca di rinforzo e la fine del compito sperimentale.

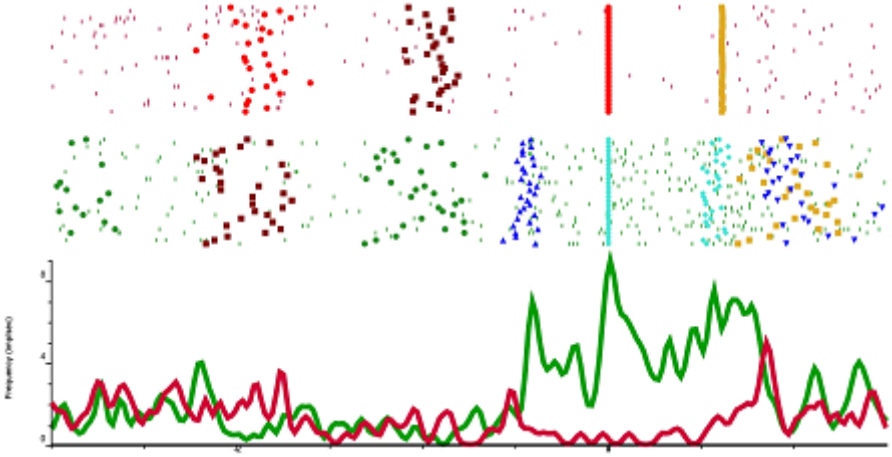

Figura 3.12 Neurone attivo esclusivamente nell' epoca di Afferramento/Fissazione con risposta preferenziale per la condizione motoria (post hoc di Newman-Keuls, $p<0,01$). La linea azzurra in alto sulla sinistra indica il momento in cui avviene il contatto tra la mano e l'oggetto, la linea gialla in alto sulla destra la somministrazione del rinforzo. Gli istogrammi e i raster sono allineati con la fase di spegnimento della luce istruttiva. Altre convenzioni come in figura 3.3

La figura 3.13 mostra le posizioni in cui, nelle due scimmie, sono stati registrati neuroni con risposte di interazione nell'epoca di Hold/Fixation: In rosso sono mappate le risposte dei neuroni che rispondono selettivamente nella condizione di Fixation, in verde sono mostrati i neuroni con risposte preferenziali per la condizione di Hold. Si noti come in entrambe le scimmie prevalgono le risposte alla condizione motoria (cerchi verdi), anche se con

distribuzioni difformi. In M1 si delinea una regione di attivazione quasi esclusiva alla condizione motoria adiacente al solco principale, per circa 10 mm di estensione rostro-caudale. In M2 l'addensamento principale delle risposte alla condizione motoria si trova nella regione intermedia ventrale, come nel caso di M1 seppur con un numero minore di osservazioni. Come nel caso dell'epoca di Go/No go le risposte alla condizione motoria in M2 presentano una regione di attivazione dorsale che risulta comunque ventrale al solco principale, a differenza di M1. Questo potrebbe essere dovuto ad una mancanza di penetrazioni in questa zona dorsale di M1. In entrambe le scimmie è evidente una zona di riposte non selettive per le condizioni di Hold/Fixation situata nella parte ventrale caudale della camera di registrazione. Anche nel terzo più rostrale mancano risposte selettive

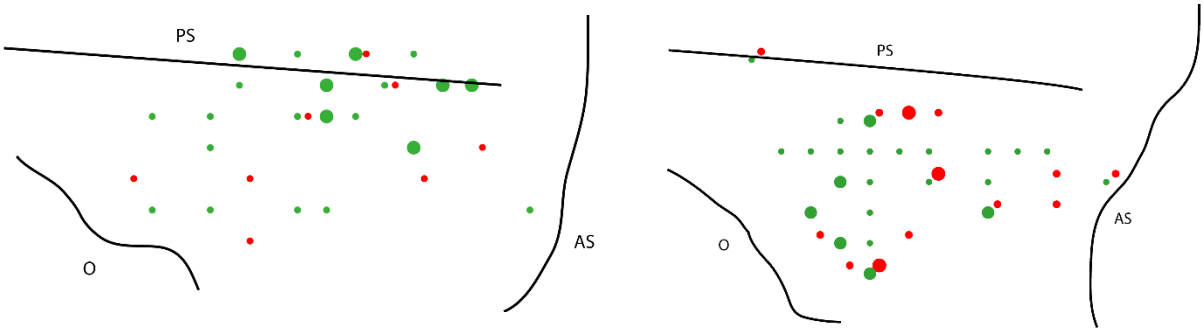

Figura 3.13 Distribuzione delle penetrazioni che rilevano risposte differenziali di neuroni con un effetto Interazione nell'epoca di Hold/Fixation (ANOVA 9x2, post hoc Newman-Keuls p<0,01). Le risposte differenziali per la condizione visiva sono in rosso, le risposte differenziali per la condizione motoria in verde. Convenzioni come in figura 3.4

Nei due casi inoltre esiste un certo grado di sovrapposizione dei siti con risposte differenziali alle due condizioni. Nelle stesse penetrazioni sono stati trovati neuroni selettivi sia per la condizione motoria che per la condizione visiva.

La figura 3.14 mostra il risultato dell'analisi di cluster. In entrambe i casi il metodo della silhouette ha raccomandato come ottimale il numero di 3 cluster per descrivere la distribuzione delle risposte. Si noti che sono presenti due distinti blocchi di osservazioni nelle due scimmie; È presente in entrambe i casi un cluster di risposte ventrali ben distinte dai raggruppamenti dorsali e anche meno numerose. È presente una serie di risposte dorsali che distingue due cluster

in M1; uno più rostrale e l'altro caudale. In M2 è presente sono presenti due cluster oltre a quello ventrale, un cluster dorsale e uno caudale.

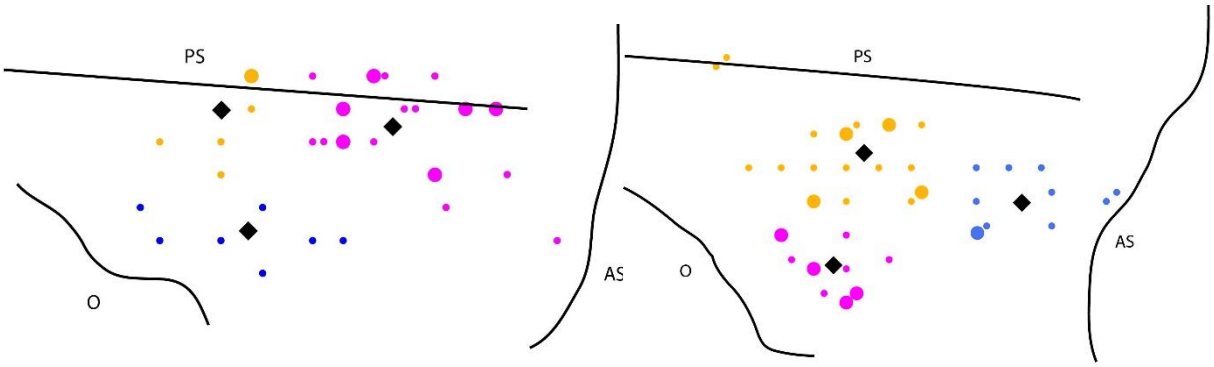

Figura 3.14 Risultato dall'analisi di cluster sulle risposte neuronali nell'epoca di Hold/Fixation. Convenzioni come in figura 3.5

3.6 Risposte neuronali nel compito di osservazione di video.

Per valutare statisticamente la risposta dei neuroni nel compito di osservazione di video è stata utilizzata un'analisi della varianza (ANOVA 3X6 per misure ripetute, vedi Materiali e Metodi). Sono stati presi in considerazione quei neuroni che mostravano una significativa modulazione della scarica durante almeno una delle epoche (Video Epoca 1 e/o 2) di almeno uno dei video rispetto alla propria baseline (v. Materiali e metodi per criteri di inclusione).

La maggior parte dei 584 neuroni che soddisfacevano i criteri di inclusione nel database (n=482, 82.5%) rispondeva in maniera significativa durante la presentazione dei video senza dimostrare però alcuna selettività per la tipologia di stimolo osservato (main effect Epoca seguito da Newman-Keuls post-hoc test, $p<0.01$). I 102 neuroni rimanenti (17.5%) mostravano qualche tipo di selettività per i video osservati (main effect interazione, seguito da Newman-Keuls post-hoc test, $p<0.01$).

Dei 102 neuroni con risposta selettiva nel compito, 77 (75.5%) si attivano in maniera esclusiva durante l'osservazione di uno specifico stimolo (neuroni altamente selettivi, HS), rispondono, cioè in maniera significativamente diversa durante una o entrambe le epoche di osservazione di un video rispetto a quella di tutti gli altri e rispetto alla propria epoca di baseline (post hoc Newman Keuls, $p<0.01$).

I rimanenti neuroni (n=25, 24.5%) sono stati definiti non-HS, cioè si attivano durante l'osservazione degli stimoli, ma nessun video evoca una risposta significativamente diversa da quella evocata dall'osservazione degli altri video, seppur abbiano una risposta significativamente diversa dalla propria baseline.

La figura 3.15 mostra la risposta di un neurone HS, registrato in M1, selettivo per l'osservazione di azioni di afferramento svolte da una scimmia in terza persona (MGIII). Il neurone inizia a scaricare nella prima epoca, circa 200 ms dopo l'inizio del video, in corrispondenza della partenza del movimento, la sua attività aumenta durante l'avvicinamento della mano all'oggetto fino ad avere un picco nella fase di chiusura delle dita, cala appena prima della presa di possesso dell'oggetto, ma rimane comunque sostenuta durante tutta la seconda epoca, in corrispondenza del sollevamento dell'oggetto, fino alla fine del video. Alla fine della presentazione del video, l'attività torna a livello della baseline. Lo stesso neurone non risponde in maniera significativa durante l'osservazione di nessuno degli altri stimoli. La risposta del neurone nelle due epoche dello stimolo MGIII risulta significativamente diversa dalla sua baseline e da tutte le altre epoche degli altri video, e per questo è stato definito HS (ANOVA 6X3 seguita da post – hoc Newman Keuls, $p<0.01$).

Una descrizione dettagliata delle risposte dei neuroni prefrontali in questo compito è fornita da Simone et al. 2017.

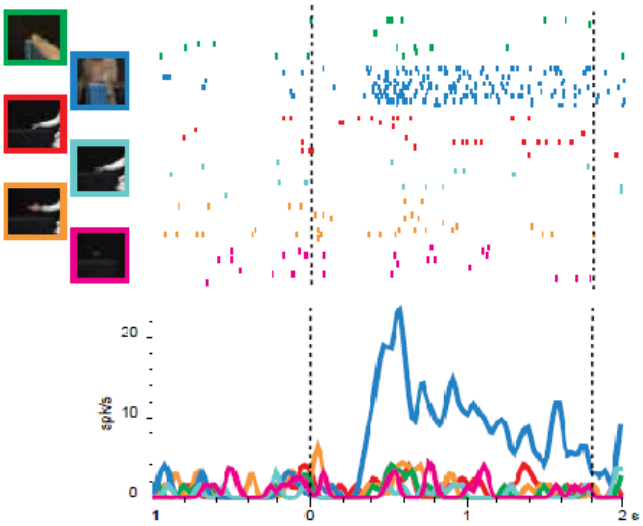

Figura 3.15 Esempio di neurone della corteccia prefrontale ventro-laterale che risponde durante l'osservazione di video. In questo caso il neurone è di tipo altamente selettivo (HS) e risponde in maniera esclusiva durante l'osservazione di una scimmia che afferra un pezzo di cibo da una prospettiva di terza persona (MGIII). L'attività di questo neurone è descritta dalla linea in blu nell'istogramma. Le linee verticali tratteggiate indicano l'inizio e la fine dell'epoca di presentazione del video. L'attività è allineata all'inizio della presentazione del video. I box

colorati in alto a sinistra indicano il codice colore assegnato ai raster e agli istogrammi in base al tipo di video. In ascissa il tempo (s). In ordinata la frequenza di scarica (spikes/s).Tratto da (Simone et al., 2017).

3.7 Mappa dei neuroni con risposte selettive nel compito di osservazione di video

La figura 3.16 mostra la posizione in cui sono stati registrati neuroni con risposte selettive per gli stimoli nel compito di osservazione dei video. In rosso sono mappate le risposte dei neuroni HS, in Verde quelle dei neuroni LS. Dalla figura è evidente che la regione dorsale della griglia di registrazione, posta in prossimità del solco principale, è priva di risposte neuronali selettive durante l'osservazione dei video, infatti solo nel 3 millimetri più posteriori del suo decorso sono state registrate alcune di tali risposte. La maggior parte dei neuroni selettivi per l'osservazione di video sono stati registrati in entrambe le scimmie nella porzione ventrale della corteccia prefrontale. Un altro settore che contiene neuroni selettivi è posto nel terzo caudale della regione registrata. Tale settore risulta più ricco di neuroni in M2 rispetto a M1. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta a un minor campionamento di questa regione in M1. Infatti, sono state condotte meno penetrazioni a ridosso del solco arcuato, nella posizione dei FEF. Tale area funzionale era definita precedentemente sulla base di microstimolazioni intracorticali, non mostrate in questo lavoro di tesi.

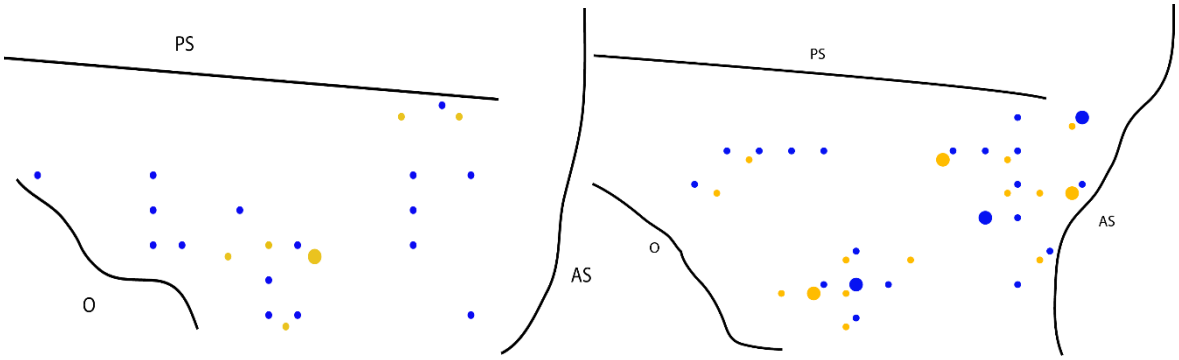

Figura 3.16 Distribuzione delle penetrazioni che hanno individuato risposte di neuroni selettivi agli stimoli video. I cerchi blu mostrano la localizzazione delle risposte di neuroni altamente selettivi (HS), cioè i neuroni che presentano un effetto interazione solo per un tipo di video (ANOVA 6X3 rivela effetto interazione, $p<0.01$, seguita da post hoc Newman Keuls). I cerchi gialli mostrano la localizzazione delle risposte dei neuroni non selettivi (non HS), cioè neuroni che rispondono in maniera non significativamente diversa nell'epoca video di più di uno stimolo. Convenzioni come in figura 3.4.

Non risulta evidente una segregazione tra i neuroni HS e quelli LS, che risultano presenti nelle stesse penetrazioni o in penetrazioni adiacenti.

La Fig 3.17 mostra l'esito dell'analisi di clusterizzazione nelle due scimmie. In entrambi i casi il metodo delle silhouette ha indicato come ottimale la clusterizzazione in 3 gruppi neuronali.

Si nota che in entrambe le scimmie si distingue un cluster di risposte caudali, piuttosto esteso in senso dorso-ventrale, e due blocchi di minor estensione nella regione ventrale, uno posto più caudalmente e ventralmente, l'altro più dorsale e rostrale.

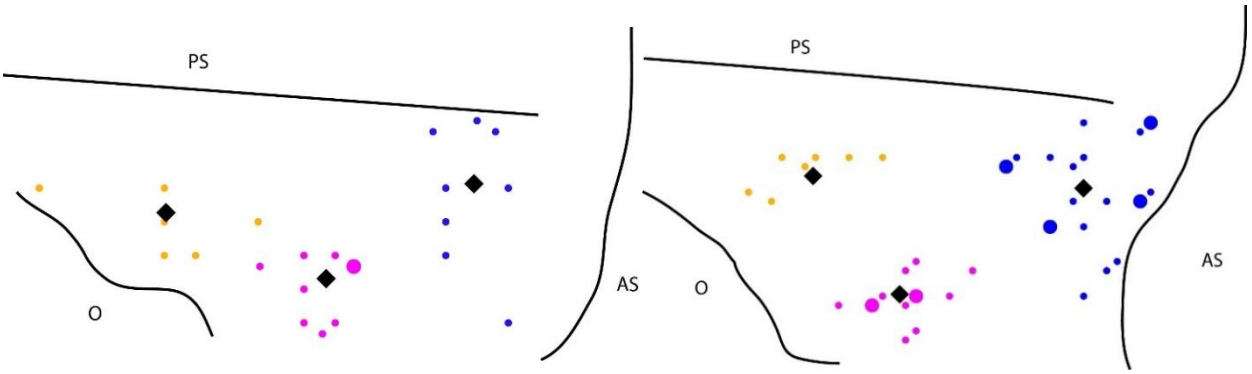

Figura 3.17 Risultato dall'analisi di cluster sulle risposte neuronali nel compito di osservazione di videoclip. Convenzioni come in figura 3.5

3.8 Risposte neuronali nel compito di osservazione di immagini statiche

La risposta dei neuroni singoli è stata valutata nel compito di osservazione di immagini statiche mediante un'analisi della varianza ANOVA 12x2 a misure ripetute (fattori: Stimoli, Epoche, $p<0,01$), che è stata seguita da un test post hoc di Student-Newman-Keuls (vedi Materiali e Metodi). I criteri per l'inclusione dei neuroni in questo lavoro sono i seguenti: presentare una risposta task related, presentare o un Main Effect Epoca significativo o un effetto Interazione significativo, inoltre tramite il post hoc l'epoca di presentazione di uno stimolo doveva risultare significativamente diversa sia dalla propria baseline (epoca di fissazione nella prova con lo stesso stimolo) sia dalla stessa epoca di presentazione di almeno un altro stimolo.

Sono stati registrati 1607 neuroni, dei quali 863 soddisfacevano i criteri per essere inclusi nel dataset. È stato osservato che di questi 863 neuroni la maggioranza (n=771, 89,3%) rispondevano in maniera significativa nell'epoca di presentazione degli stimoli quindi presentando un Main Effect Epoca, ma non dimostravano alcun tipo di risposta selettiva per il tipo di stimolo presentato (post hoc di Newman-Keuls, $p<0,01$). I restanti 92 neuroni (10,7%) mostravano una selettività per almeno uno dei dodici stimoli osservati. Sono risultati avere un main effect Interazione per cui sono stati categorizzati come neuroni con risposte specifiche.

3.9 Mappa dei neuroni con risposte selettive nel compito di osservazione di immagini statiche

La figura 3.18 mostra la posizione in cui sono stati registrati neuroni con risposte selettive per almeno uno degli stimoli nel compito di osservazione di immagini statiche. In M1 è presente un raggruppamento di neuroni selettivi nella porzione centrale della camera di registrazione piuttosto esteso in senso antero-posteriore, anche se nel terzo anteriore della camera non sono state registrate risposte. Le porzioni caudali e ventrali presentano distribuzioni scarse e molto poco concentrate. In M2 la distribuzione delle risposte risulta piuttosto diversa rispetto a quella in M1, con un maggior addensamento delle risposte nella porzione caudale superiore a ridosso della metà dorsale del solco arcuato, e un altro blocco nella porzione ventrale anteriore. In entrambi i casi risultano limitate le risposte lungo il decorso del solco principale, più caudali quelle in M1, più rostrali quelle in M2.

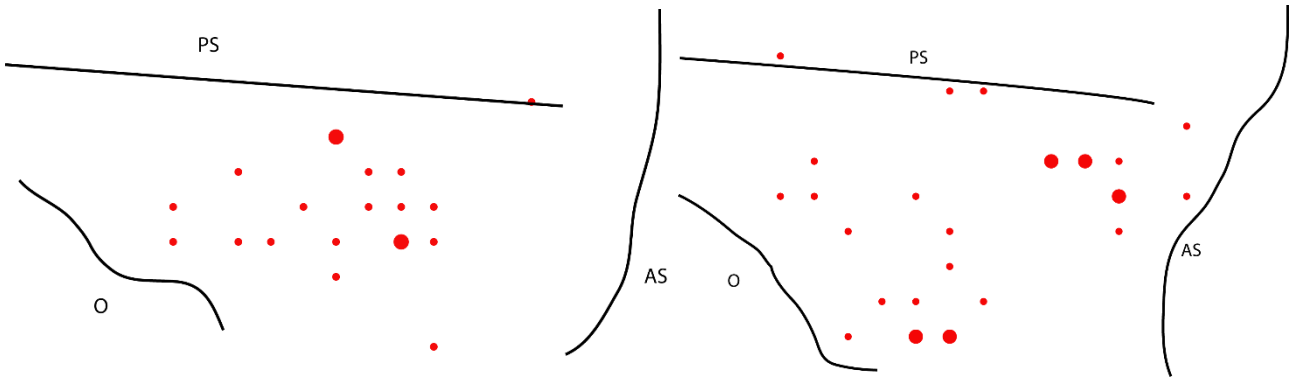

Figura 3.18 Distribuzione delle penetrazioni che hanno individuato risposte di neuroni che mostravano selettività per almeno uno dei dodici stimoli statici osservati (ANOVA 12x2 a misure ripetute, fattori: Stimoli, Epoche, post hoc di Newman-Keuls p<0,01). Le dimensioni dei cerchi rappresentano il rapporto tra numero di neuroni registrati in un sito e penetrazioni eseguite (neuroni/penetrazioni). Cerchi grandi=rapporto neuroni/penetrazioni >3. Cerchi piccoli=rapporto neuroni/penetrazioni<3. Convenzioni come in figura 3.4.

In figura 3.19 È mostrato il risultato dell'analisi delle osservazioni per mezzo dell'algoritmo di clusterizzazione. In questo caso il metodo di identificazione del numero ideale dei cluster ha dato come risultato 3 cluster in entrambe i casi. In entrambe le scimmie è presente un cluster caudale localizzato in prossimità della tip del solco principale. Si noti come in M1 le risposte raggruppate nel cluster dorsale caudale potrebbero individuare un blocco con coordinate simili al cluster dorsale in M2 seppur sottorappresentato in M1 per mancanza di osservazioni in questa regione. In entrambi i casi risultano presenti due cluster più ventrali a diversi livelli antero-posteriori. Nel caso del cluster più anteriore questo è presente con osservazioni più concentrate in M1, e maggiormente disperse in M2, con i due elementi più dorsali adiacenti al solco principale. Il cluster centrale risulta più ventrale in M2 rispetto a M1.

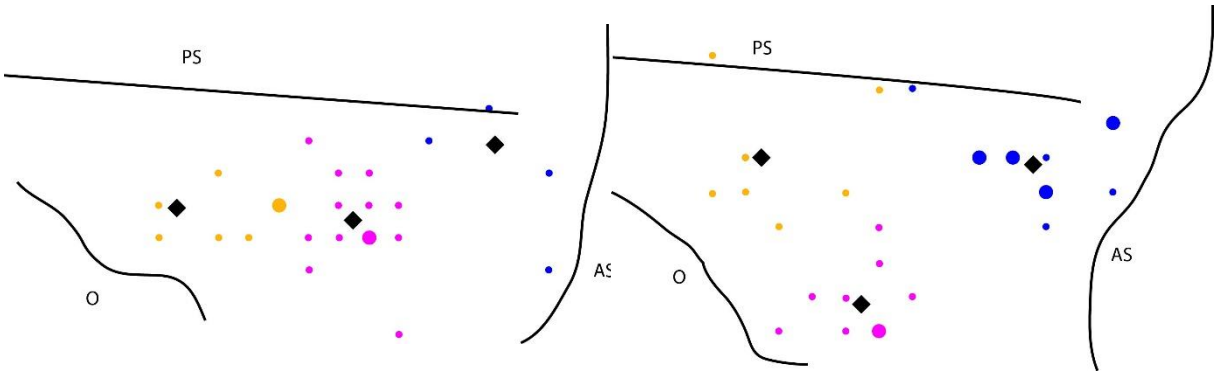

Figura 3.19 Risultato dall'analisi di cluster sulle risposte neuronali nel compito di osservazione di immagini statiche. Convenzioni come in figura 3.5

3.10 Clusterizzazione generale delle proprietà funzionali

Per valutare se le proprietà funzionali registrate risultano segregate è stata fatta un'analisi di cluster ulteriore che ha considerato i dataset composti dalle coordinate dei centroidi individuati nelle analisi di clusrterizzazione precedenti. Per M1 sono stati considerati 4 centroidi ricavati dalla mappatura delle risposte nei nell'epoca di Cue del compito visuo-motoiro, 4 centroidi dall'analisi di cluster nell'epoca di Presentazione del compito visuo-motoiro, e 3 nelle altre epoche considerate nel compito visuo-motorio (Go/NoGo e Hold/Fixation) e per i compiti di osservazione di stimoli statici e video. In totale per M1 sono stati considerati 20 centroidi. Per M2 sono stati considerati 3 centroidi per ogni analisi di cluster effettuata sulle risposte nelle epoche/compiti sperimentali sopra descritti. In totale per M2 sono stati considerati 18 centroidi. L'analisi preliminare eseguita con il metodo delle silhouette ha indicato come 3 il numero di cluster ideali per descrivere la distribuzione delle osservazioni in esame.

La figura 3.20 mostra la distribuzione dei centroidi e il risultato di questa analisi per le due scimmie. Risulta evidente che in entrambe i casi viene individuato un cluster caudale (blu), che in M1 risulta più prossimo al solco principale, ed è costituito da un gruppo più disperso di centroidi. In M2 il cluster caudale è posto in posizione lievemente più ventrale rispetto al cluster individuato in M1 prendendo a riferimento il solco principale, e risulta meno disperso attorno al suo punto centrale. In entrambe le scimmie questo cluster sembra distribuirsi nella regione che gli studi architettonici definiscono come il settore più caudale dell'area 46v, espandendosi alle adiacenti aree 8 e 45. Per quanto riguarda i cluster anteriori, nelle due scimmie la distanza antero-posteriore tra i centroidi dei due cluster anteriori risulta molto minore rispetto a quella di ognuno di essi dal centroide del cluster posteriore, evidenziando una segregazione tra le

risposte raccolte nei due cluster rostrali rispetto alle risposte riunite nel cluster caudale. Il cluster più anteriore sembra occupare una regione al confine tra le aree 46v e 12r, mentre il cluster posto in posizione intermedia e ventrale ricadrebbe all'interno dell'area 12r.

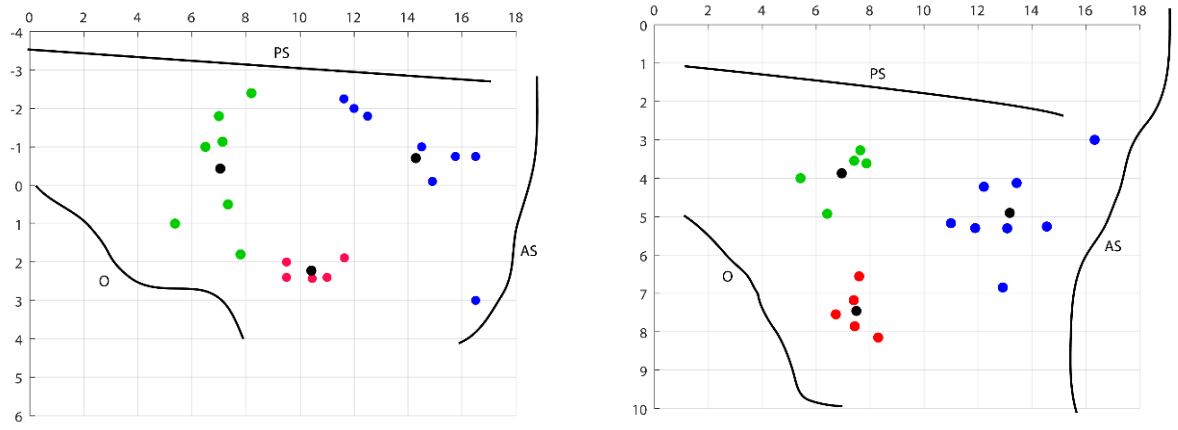

Figura 3.20 Risultati dell'analisi di meta-clustering.

4. Discussione

In questa tesi sono descritte le risposte dei neuroni della corteccia prefrontale ventrolaterale in diversi compiti sperimentali. In particolare, si è valutata la risposta neuronale in compititi di osservazione passiva di stimoli statici e dinamici, e in un compito visuo-motorio di osservazione e raggiungimento-afferramento di oggetti tridimensionali. Lo scopo precipuo di questo studio era di valutare la distribuzione topografica delle risposte neuronali, per evidenziare eventuali differenze funzionali all'interno del settore ventrolaterale della corteccia prefrontale. Il primo risultato evidente è che, considerando tutti i compiti utilizzati, dall'osservazione delle risposte nei due compiti di osservazione di stimoli visivi, si evidenzia una loro localizzazione nel settore ventrale, e solo raramente nel settore più dorsale. Il compito visuo-motorio, invece, sembra attivare neuroni posti in tutto il settore intermedio della corteccia prefrontale ventrolaterale, sia dorsalmente che ventralmente. Un altro settore in cui sono state registrate risposte in tutti e tre compiti utilizzati è quello più caudale posto in prossimità della punta posteriore del solco principale. E' da notare infine che sono state identificate solo pochissime risposte nel settore più rostrale.

Le analisi di cluster condotte sulle risposte registrate in ognuna delle due scimmie nei singoli compiti/epoche e sui centroidi derivati da questo primo set di analisi, confermano che esistono 3 regioni funzionali: una caudale, in una posizione compatibile con il settore caudale dell'area 46 e, in parte le aree 45 e 8, uno intermedio ventrale, ad un livello identificabile con l'area 12r e, uno dorsale a livello della porzione intermedia dell'area 46v.

4.1 Ruolo funzionale dei neuroni registrati in diversi settori della corteccia prefrontale

I risultati di questo studio evidenziano come sia presente attività neuronale nella corteccia ventrolaterale anche a seguito della semplice presentazione di stimoli visivi, senza che sia richiesto alla scimmia di utilizzare l'informazione da questi veicolata per guidare il comportamento. Questo rappresenta una parziale novità, visto che la maggior parte degli studi funzionali sulla corteccia prefrontale sono stati condotti per valutare proprio l'utilizzo dell'informazione visiva ai fini della categorizzazione percettiva o della definizione di regole comportamentali (Fuster, 2001; Miller & Cohen, 2001; Tanji & Hoshi, 2008). In particolare, dai risultati ottenuti nei compiti di osservazione di stimoli statici e video risultano emergere attivazioni da parte dei neuroni posti nella porzione ventrale della regione registrata, a livello dell'area 12. Questo risultato è in accordo con i risultati degli studi anatomici relativi alle

connessioni cortico-corticali che evidenziano come gli input preponderanti al settore ventrale della corteccia prefrontale, in particolare all'area 12r, arrivino dalla corteccia inferotemporale (Borra et al., 2011; Saleem et al., 2014), coinvolte nella codifica delle caratteristiche pittoriche degli stimoli (cfr. Tanaka & Simon, 1996) e nella descrizione dei movimenti altrui (Nelissen et al.2005; Perrett, Rolls, & Caan, 1982). I risultati del nostro esperimento sono anche in accordo con studi neurofisiologici precedenti che avevano attribuito ai settori ventrali una specializzazione relativa alla codifica dell'informazione pittorica degli "oggetti visivi". In particolare vi sono evidenze di neuroni, localizzati in questo settore corticale, che si attivano durante l'osservazione di particolari stimoli visivi come le facce (Ó Scalaidhe et al., 1997; Selemon & Goldman-Rakic, 1988). Vi sono anche evidenze che la componente dinamica della scena visiva sia importante. Vari autori, infatti, hanno dimostrato la presenza di risposte neuronali in area 45 e 12 provocate dall'osservazione di video di scimmie coinvolte in comportamenti sociali quali il "grooming" o la monta (Tsunada & Sawaguchi, 2012), di conspecifici intenti a vocalizzare (Diehl & Romanski, 2014; Diehl & Romanski, 2013), o mentre afferrano del cibo (Simone et al., 2017). Vi sono evidenze che i neuroni visivi della corteccia prefrontale hanno un ruolo nella categorizzazione percettiva (Freedman et al., 2003), ma, al di là della categorizzazione, possono anche codificare un solo stimolo, in chiave pittorica (Ó Scalaidhe et al., 1997), o in termini di predizione dell'outcome dell'azione osservata (Simone et al., 2017).

Quest'ultima prerogativa avvicina molto i neuroni visivi a neuroni visuo-motori (neuroni specchio) descritti nella corteccia parietale e premotoria. Non stupisce quindi che, anche nel compito visuo-motorio siano state registrate risposte in corrispondenza dell'area 12. Oltre a tale posizione, però, risultano presenti neuroni attivati in varie epoche di questo compito anche più dorsalmente, in una regione dove le risposte nei compiti di osservazione passiva sono rare o assenti. Questo è in linea con la letteratura funzionale che mostra risposte neuronali in questa regione legate al mantenimento di informazione visiva in memoria di lavoro e all'utilizzo di tale informazione per la guida dei movimenti (Fuster & Alexander, 1971; Hoshi, Shima, & Tanji, 1998; Tanji & Hoshi, 2008). La localizzazione di queste risposte si concentra lungo l'estensione del solco principale, ricadendo in una posizione compatibile con l'area architettonica 46v. Particolarmente interessante a questo riguardo è la presenza di risposte motorie nella corteccia prefrontale, non molto dissimili da quelle riportate in studi sulle aree parietali e premotorie (Hoshi, Shima, & Tanji, 1998; si veda Rozzi & Fogassi, 2017; Simone et al., 2015). Tali neuroni si attivano durante l'esecuzione di atti motori finalizzati di afferramento, in maniera anche indipendente dal compito in cui sono inclusi. Di nuovo questi risultati trovano

coerenza con gli studi anatomici di connessione da cui emerge che l'area 46v è connessa in via bidirezionale con aree parietali e premotorie (Gerbella et al., 2013; Petrides & Pandya, 1984) implicate nelle trasformazioni visuo-motorie per l'afferramento e nella codifica su base intenzionale degli scopi degli atti motori (Fogassi & Luppino, 2005; Fogassi et al., 2005 Maranesi et al., 2012; Rozzi et al.,2008). Questo elemento può portarci ad ipotizzare che le risposte visive specifiche per la condizione motoria o quella visiva del compito visuomotorio registrate nell'area 46v e 12r possano rappresentare una parte del processo decisionale nella scelta delle azioni da eseguire (condizione motoria) o trattenere (condizione visiva), nell'ambito di un compito istruito, oltre che un sistema di monitoraggio delle stesse.

La differenza nella localizzazione delle risposte nei compiti puramente visivi e nel compito visuo-motorio è interpretabile ipotizzando una diversa distribuzione delle specializzazioni funzionali nelle aree prefrontali. Questa differente distribuzione di attività può dipendere dal tipo di compito in cui il soggetto è coinvolto (Duncan 2010). I risultati ottenuti concordano con questa idea, e aggiungono un grado ulteriore di precisione alla distinzione tra le aree specializzate per un certo tipo di codifica.

In tutte le analisi di distribuzione funzionale che abbiamo eseguito è stata riscontrata la presenza di un raggruppamento di risposte in un settore dorso-caudale, situato in prossimità della punta posteriore del solco principale. Questo settore cade a cavallo tra la parte posteriore dell'are 46, la parte dorsale dell'area 45, l'area 8r e parte ventrale dell'area 8/FEF, cioè in un settore coinvolto nella programmazione e nell'esecuzione dei movimenti oculari. La presenza di tali risposte, in tutti i compiti studiati, in questa regione può risultare contro intuitiva dal momento che le risposte sono state registrate in tutti i compiti mentre le scimmie mantenevano fisso lo sguardo. Una possibile spiegazione può essere trovata nel fatto che le scimmie dovevano mantenere la fissazione in una ristretta finestra spaziale centrata sugli stimoli visivi (punti luminosi, immagini, video o oggetti tridimensionali). I neuroni di questo settore potrebbero essere attivati non solo dalla programmazione e dall'esecuzione di movimenti oculari, ma anche dal processo di inibizione dei movimenti che sarebbero eseguiti durante l'osservazione naturale degli stessi stimoli visivi. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che nei compiti puramente osservativi in cui vi è una minor variabilità del comportamento, le risposte registrate nel settore caudale sono maggiormente aggregate e più facilmente definibili in termini topografici, mentre nel compito visuo-motorio le risposte in questo settore risultano notevolmente più disperse. Questo potrebbe dipendere dall'organizzazione topografica dei neuroni che codificano i movimenti oculari. In particolare è ben descritta in letteratura una rappresentazione in senso dorsoventrale di movimenti saccadici di grande ampiezza, di minore ampiezza e di micro-

saccadi e movimenti di inseguimento. Nel compito di osservazione passiva gli stimoli hanno una piccola eccentricità, si trovano sempre nella stessa posizione e alla scimmia è richiesto quindi di inibire piccoli movimenti di foveazione. Quindi viene reclutata una popolazione di neuroni più ristretta. Nel compito motorio invece intervengono altri stimoli oltre a quelli a monitor. I movimenti saccadici della scimmia possono essere rivolti anche verso la mano che sta per eseguire l'afferramento, o alternarsi tra la mano ed il bersaglio dell'azione. Pertanto ci si aspetterebbe che se presentiamo stimoli visivi meno costanti, come nel compito motorio, per codificarli venga reclutata una popolazione neuronale maggiormente dispersa.

Bisogna inoltre notare che, in due analisi, nella stessa scimmia, la regione caudale risulta caratterizzata dalla presenza di due cluster. Il fatto di avere individuato in due epoche del compito visuo-motorio un numero di cluster superiore rispetto alle altre analisi indica che queste risposte sono molto disperse nei compiti motori. Infine, in nessuna mappatura funzionale si evidenziano attivazioni nelle regioni più rostrali delle aree registrate. Questo dato è in accordo con i modelli teorici del processamento dell'informazione nella corteccia prefrontale per cui regioni anteriori non vengono coinvolte in compiti semplici di osservazione di stimoli o compiti motori elementari come quelli di Go/NoGo. A ulteriore supporto di questa conclusione vi sono le evidenze provenienti da studi anatomici che mostrano che i settori più rostrali della corteccia prefrontale hanno deboli connessioni extra-prefrontali, mentre sono ampiamente connessi con altre aree prefrontali (Borra et al., 2011; Gerbella et al., 2013) .

4.2 Clusterizzazione delle risposte: limiti del metodo e potenzialità nel correlare funzione e anatomia

L'analisi di cluster mostra che le risposte funzionali registrate nei diversi compiti si aggregano intorno a diversi punti della griglia di registrazione. I cluster individuati in tutti i compiti risultano congruenti nel confermare i settori funzionalmente distinti sopra descritti, e mostrano una chiara somiglianza nelle due scimmie. Gli studi presenti in letteratura volti a identificare disomogeneità funzionali nella corteccia prefrontale mostrano differenze funzionali distribuite *in continuo* lungo gli assi dorso-ventrale e rostro-caudale (Badre & D'Esposito, 2009; Koechlin et al., 2003; Ó Scalaidhe et al., 1997), ma le regioni considerate risultano molto ampie, senza apparenti differenze al loro interno nel tipo di processamento dell'informazione implementato, e non risultano avere un correlato anatomico plausibile. Il risultato delle nostre analisi di cluster indica che, all'interno dei grossi gradienti funzionali descritti in letteratura, vi è una suddivisione più fine, che rende possibile un confronto con il corrispondente substrato anatomico. L'analisi di cluster eseguita sulla distribuzione di risposte registrate risulta pertanto

molto promettente dal punto di vista euristico, ma presenta anche dei limiti tecnici e teorici. Infatti non in tutti i casi è stato utilizzato lo stesso numero di cluster per descrivere al meglio la distribuzione delle risposte. In due casi in una scimmia il numero di cluster ottimale è risultato maggiore rispetto all'altra scimmia. Questo può dipendere dalla variabilità intersoggettiva nella distribuzione delle proprietà funzionali, o derivare da una numerosità delle risposte o del campione non sufficiente in un soggetto. Per risolvere questa questione sarebbe necessario mappare le risposte in un numero maggiore di soggetti, o riportare le risposte su un template anatomico unico. Inoltre, gli algoritmi di clustering si basano sull'assunzione a priori del numero di cluster in cui ripartire gli osservati. Per rendere l'analisi il meno soggettiva possibile, abbiamo usato un metodo ampiamente accettato in letteratura, quello delle "silhouette". In realtà un altro modo di valutare la distribuzione anatomica delle risposte, più preciso e biologicamente plausibile nelle sue assunzioni, sarebbe di identificare in tutte le scimmie le caratteristiche architettoniche delle aree studiate, e riportare le risposte neuronali in tale sistema di riferimento. Questo sarebbe l'unico modo oggettivo di dimostrare eventuali differenze areali nella distribuzione delle proprietà. Il primo sviluppo del lavoro descritto in questa tesi sarà proprio quello di identificare le aree architettoniche e confrontare statisticamente le numerosità delle risposte nelle diverse aree anatomiche.

4.3 Mappatura delle risposte neuronali nella corteccia prefrontale ventrolaterale

Lo studio della letteratura, ed in particolare dei modelli cognitivi gerarchici proposti per spiegare la funzione della corteccia prefrontale laterale, porta a considerare questo settore corticale come un'ampia regione che ignora la codifica *semplice* dell'informazione sensoriale, occupandosi invece di associare stimoli sensoriali di per sé neutri a scopi comportamentali (Fuster, 2010; Miller & Cohen, 2001) appresi. Questo ha indotto molti ricercatori a studiare le proprietà dei neuroni prefrontali con compiti molto complessi, che richiedevano una manipolazione di alto ordine dell'informazione sensoriale (Freedman et al., 2003). Questo approccio ha portato molti frutti, ma ha fallito nel tentativo di identificare specificità funzionali all'interno della corteccia prefrontale. La semplicità del tipo di compito utilizzato, infatti, sembra estremamente rilevante, come dimostrato dal fatto che l'aumento della complessità dei compiti e delle richieste statistiche implicate dalle analisi relative non permette di identificare specializzazioni funzionali nella corteccia prefrontale di scimmia e uomo (Duncan & Owen, 2000).

Al meglio delle nostre conoscenze solo due studi elettrofisiologici hanno tentato di mappare la corteccia prefrontale con compiti di tipo semplice. Il primo è il lavoro pionieristico di Tanila e collaboratori (Tanila, Carlson, Linnankoski, & Kahila, 1993). Questi autori hanno identificato elettrofisiologicamente neuroni con risposte visive, uditive e somatosensoriali, e descritto come queste risposte correlino anche con movimenti spontanei di braccia e occhi. La loro metodica di indagine era estremamente naturalistica, non richiedendo alle scimmie di fissare punti nello spazio o di adottare regole apprese. Le loro registrazioni si sono concentrate però prevalentemente sulle aree della corteccia prefrontale dorsolaterale (aree 9 e 46d), spingendosi ventralmente fino all'area 46v adiacente al solco principale. Nel loro studio, quindi, i settori più ventrali della corteccia prefrontale laterale sono stati toccati solo marginalmente. Il risultato più innovativo di questo studio è stata la descrizione di risposte motorie in neuroni prefrontali, nell'area 46 dorsale e ventrale. La mancanza di dati sulle risposte motorie e in compiti "semplici" dei neuroni delle regioni più ventrali della corteccia prefrontale è una mancanza rilevante, visto che l'anatomia ci suggerisce che le regioni ventrali presentano importanti connessioni cortico-corticali con le aree parieto-premotorie da un lato e con quelle inferotemporali dall'altro, e potrebbero essere quindi un centro importante di integrazione tra l'informazione semantica e pragmatica relativa agli stimoli visivi. Questo pattern di connessioni porta ad ipotizzare un ruolo della corteccia ventro-laterale nella pianificazione ed esecuzione di azioni intenzionali anche sulla base del significato degli oggetti target di azione. L'altro studio che ha tentato di identificare funzionalmente aree di specializzazione nelle regioni prefrontali laterali è quello di Riley e collaboratori (Riley et al., 2017).. In questo studio sono state considerate anche le regioni più ventrali. Il paradigma sperimentale utilizzato consisteva nella presentazione di stimoli visivi semplici che le scimmie dovevano limitarsi ad osservare passivamente. I risultati dello studio dimostrano che esiste una differenza nel tipo di informazione processata nelle aree dorsali e ventrali della corteccia prefrontale laterale. L'informazione spaziale risulta codificata preferenzialmente nelle aree dorsali, mentre quella pittorica, riferita alle caratteristiche strutturali dell'oggetto, è codificata preferenzialmente nelle aree ventrali. Ma in questo studio tratta la corteccia prefrontale laterale come un sistema di input dominio specifico tralasciando il fatto che esistano massicce connessioni intraprefrontali afferenti sia alle aree dorsali che ventrali, rendendo la codifica dell'informazione in entrambe le aree più adattabile al contesto considerato, piuttosto che incapsulata in specifici settori, ognuno selettivo solo per un tipo di informazione o una modalità di input. Il nostro studio ha identificato per la prima volta regioni funzionali distinte all'interno della corteccia prefrontale ventrolaterale. Questo è stato possibile tramite il ricorso a paradigmi sperimentali ben

controllati, che hanno unito la sistematicità nella costruzione della griglia di penetrazioni all'utilizzo di compiti semplici, sia sensoriali che motori.

4.4 Conclusioni: dal concetto di equipotenzialità a quello di specializzazione e adattabilità della risposte dei neuroni prefrontali

Il nostro studio mostra come all'interno della corteccia prefrontale ventro-laterale esistano distribuzioni funzionali con un certo grado di segregazione, superando un concetto spesso usato in letteratura di equipotenzialità delle aree prefrontali. Si può infatti ipotizzare che la segregazione funzionale evidenziata dalla nostra analisi di cluster dipenda dai differenti pattern di connessioni anatomiche delle diverse aree. In altre parole, proponiamo che le connessioni anatomiche determinino la *funzione di base* di ogni area. Questo non esclude la possibile modulazione di tale funzione sulla base di ulteriori afferenze legate al compito in cui si è coinvolti, e quindi la capacità dei neuroni di adattare la loro risposta a nuove situazioni, permettendo quindi lo sviluppo di nuovi tipi di codifica (*funzione superiore*). L'equipotenzialità sarebbe allora un "effetto collaterale" della ricchezza di connessioni delle aree prefrontali. Alla base dell'attività della corteccia prefrontale laterale ci sarebbero cellule con un certo potenziale per l'adattamento della codifica al tipo informazione rappresentata. Come descritto nel modello della codifica adattiva (Duncan, 2001) adattabilità non significa però equipotenzialità. In contesti che richiedono elevato carico cognitivo ampi settori della corteccia prefrontale presentano attivazione diffusa. Ma quando le richieste cognitive sono minime emerge la funzione "primitiva" per cui ogni area è stata cablata. Il nostro lavoro è stato mirato ad identificare proprio queste funzioni "primitive".

Per dare ulteriore consistenza ai nostri risultati sarebbe auspicabile correlare la mappatura funzionale con i dati anatomici delle due scimmie per valutare se le ipotesi di localizzazione delle risposte funzionali siano adeguate. In particolare, abbiamo in previsione di identificare le aree architettoniche, e confrontare statisticamente la rappresentazione delle diverse risposte registrate tra aree diverse.

Un altro studio per approfondire le conoscenze sulla distribuzione delle funzioni nella corteccia prefrontale potrebbe consistere nel modificare il compito visuo-motorio utilizzando come effettore per la risposta comportamentale gli occhi invece degli arti superiori. Questo permetterebbe di investigare direttamente le funzioni delle aree più caudali della zona di registrazione considerata.

Infine, dopo aver studiato la distribuzione delle funzioni “di base”, l’ovvio sviluppo di questo studio sarebbe quello di indagare come le funzioni “superiori” possano emergere. Infatti, la scelta di compiti sensoriali passivi e di un compito visuomotorio semplice non ha permesso di rilevare significative risposte neuronali nel settore più rostrale della camera di registrazione, i cui neuroni sarebbero coinvolti in un tipo di codifica dell’informazione che considera anche le caratteristiche rappresentazionali di uno stimolo (la sede del controllo episodico proposto da (Koechlin et al., 2003))Pertanto, un compito adeguato a rilevare una risposta in questo settore, per ora individuata come area “silenziosa”, dovrebbe considerare l’utilizzo di informazione sensoriale da cui estrarre regole per guidare il comportamento in un determinato compito.

5. Bibliografia

Aboitiz, F., & García V., R. (1997). The evolutionary origin of the language areas in the human brain. A neuroanatomical perspective. *Brain Research Reviews*. http://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00053-2

Adrianov, O. S. (1995). [The organized brain (an essay on the structure of functional brain organization). II]. *Usp Fiziol Nauk.*

Amiez, C., & Petrides, M. (2007). Selective involvement of the mid-dorsolateral prefrontal cortex in the coding of the serial order of visual stimuli in working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. http://doi.org/10.1073/pnas.0706220104

Azuar, C., Reyes, P., Slachevsky, A., Volle, E., Kinkingnehun, S., Kouneiher, F., … Levy, R. (2014). Testing the model of caudo-rostral organization of cognitive control in the human with frontal lesions. *NeuroImage*. http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.09.031

Baddeley, A. D., & Hitch, G. (1974). Working memory. *The Psychology of Learning and Motivation Advances in Research and Theory*. http://doi.org/10.1016/S0079-7421(08)60452-1

Badre, D. (2008). Cognitive control, hierarchy, and the rostro-caudal organization of the frontal lobes. *Trends in Cognitive Sciences*. http://doi.org/10.1016/j.tics.2008.02.004

Badre, D., & D'Esposito, M. (2007). Functional magnetic resonance imaging evidence for a hierarchical organization of the prefrontal cortex. *Journal of Cognitive Neuroscience*. http://doi.org/10.1162/jocn.2007.19.12.2082

Badre, D., & D'Esposito, M. (2009). Is the rostro-caudal axis of the frontal lobe hierarchical? *Nature Reviews Neuroscience*. http://doi.org/10.1038/nrn2667

Badre, D., Hoffman, J., Cooney, J. W., & D'Esposito, M. (2009). Hierarchical cognitive control deficits following damage to the human frontal lobe. *Nature Neuroscience*. http://doi.org/10.1038/nn.2277

Bahlmann, J., Blumenfeld, R. S., & D'Esposito, M. (2015). The Rostro-Caudal Axis of Frontal Cortex is Sensitive to the Domain of Stimulus Information. *Cerebral Cortex*.

http://doi.org/10.1093/cercor/bht419

Baird, B., Smallwood, J., Gorgolewski, K. J., & Margulies, D. S. (2013). Medial and Lateral Networks in Anterior Prefrontal Cortex Support Metacognitive Ability for Memory and Perception. *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0786-13.2013

Barbas, H., & Pandya, D. N. (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.902860306

Barbey, A. K., Krueger, F., & Grafman, J. (2009). Structured event complexes in the medial prefrontal cortex support counterfactual representations for future planning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0315

Barraclough, N. E., Xiao, D., Baker, C. I., Oram, M. W., & Perrett, D. I. (2005). Integration of visual and auditory information by superior temporal sulcus neurons responsive to the sight of actions. *Journal of Cognitive Neuroscience*. http://doi.org/10.1162/0898929053279586

Blatt, G. J., Andersen, R. A., & Stoner, G. R. (1990). Visual receptive field organization and cortico- cortical connections of the lateral intraparietal area (area LIP) in the macaque. *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.902990404

Blumenfeld, R. S. (2006). Dorsolateral Prefrontal Cortex Promotes Long-Term Memory Formation through Its Role in Working Memory Organization. *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2353-05.2006

Blumenfeld, R. S., Nomura, E. M., Gratton, C., & D'Esposito, M. (2013). Lateral prefrontal cortex is organized into parallel dorsal and ventral streams along the rostro-caudal axis. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhs223

Bodner, M., Kroger, J., & Fuster, J. M. (1996). Auditory memory cells in dorsolateral prefrontal cortex. *Neuroreport*. http://doi.org/10.1097/00001756-199608120-00006

Bonini, L., Rozzi, S., Serventi, F. U., Simone, L., Ferrari, P. F., & Fogassi, L. (2010). Ventral premotor and inferior parietal cortices make distinct contribution to action organization and intention understanding. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhp200

Borra, E., Gerbella, M., Rozzi, S., & Luppino, G. (2011). Anatomical Evidence for the Involvement of the Macaque Ventrolateral Prefrontal Area 12r in Controlling Goal-Directed Actions. *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1745-

11.2011

Boschin, E. A., Piekema, C., & Buckley, M. J. (2015). Essential functions of primate frontopolar cortex in cognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. http://doi.org/10.1073/pnas.1419649112

Boussaoud, D., & Wise, S. P. (1993). Primate frontal cortex: neuronal activity following attentional versus intentional cues. *Experimental Brain Research*. http://doi.org/10.1007/BF00229650

Brodmann, K. (1909). *Vergleichende Lokalisationslehre der Gro{ß}hirnrinde*. Leipzig: Barth.

Carmichael, S. T., & Price, J. L. (1994). Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.903460305

Carmichael, S. T., & Price, J. L. (1996). Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960722)371:2<179::AID-CNE1>3.0.CO;2-#

Cavada, C., & Goldman- Rakic, P. S. (1989). Posterior parietal cortex in rhesus monkey: II. Evidence for segregated corticocortical networks linking sensory and limbic areas with the frontal lobe. *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.902870403

Caviness, V. S., Takahashi, T., & Nowakowski, R. S. (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends in Neurosciences*. http://doi.org/10.1016/0166-2236(95)93933-O

Contini, M., Baccarini, M., Borra, E., Gerbella, M., Rozzi, S., & Luppino, G. (2010). Thalamic projections to the macaque caudal ventrolateral prefrontal areas 45A and 45B. *European Journal of Neuroscience*, *32*(8), 1337–1353. http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07390.x

Cragg, B. G. (1975). The density of synapses and neurons in normal, mentally defective and ageing human brains. *Brain*. http://doi.org/10.1093/brain/98.1.81

Crittenden, B. M., & Duncan, J. (2014). Task difficulty manipulation reveals multiple demand activity but no frontal lobe hierarchy. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhs333

D'Esposito, M., Postle, B. R., Ballard, D., & Lease, J. (1999). Maintenance versus manipulation of information held in working memory: An event-related fMRI study. *Brain and*

Cognition. http://doi.org/10.1006/brcg.1999.1096

Desimone, R., & Duncan, J. (1995). Neural mechanisms of selective visual attention. *Annual Review of Neuroscience*. http://doi.org/10.1146/annurev.ne.18.030195.001205

Dias, R., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (1996). Dissociation in prefrontal cortex of affective and attentional shifts. *Nature*. http://doi.org/10.1038/380069a0

Diehl, M. M., & Romanski, L. M. (2013). Representation and integration of faces and vocalizations in the primate ventral prefrontal cortex. In *Integrating Face and Voice in Person Perception*. http://doi.org/10.1007/978-1-4614-3585-3_3

Diehl, M. M., & Romanski, L. M. (2014). Responses of Prefrontal Multisensory Neurons to Mismatching Faces and Vocalizations. *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5168-13.2014

Dosenbach, N. U. F., Visscher, K. M., Palmer, E. D., Miezin, F. M., Wenger, K. K., Kang, H. C., … Petersen, S. E. (2006). A Core System for the Implementation of Task Sets. *Neuron*. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.031

Duncan, J. (2001). An adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci*. http://doi.org/10.1038/35097575

Duncan, J. (2010). The multiple-demand (MD) system of the primate brain: mental programs for intelligent behaviour. *Trends in Cognitive Sciences*. http://doi.org/10.1016/j.tics.2010.01.004

Duncan, J., & Owen, A. M. (2000). Common regions of the human frontal lobe recruited by diverse cognitive demands. *Trends in Neurosciences*. http://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01633-7

Egner, T., & Hirsch, J. (2005). Cognitive control mechanisms resolve conflict through cortical amplification of task-relevant information. *Nature Neuroscience*. http://doi.org/10.1038/nn1594

Erraji-Benchekroun, L., Underwood, M. D., Arango, V., Galfalvy, H., Pavlidis, P., Smyrniotopoulos, P., … Sibille, E. (2005). Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life. *Biological Psychiatry*. http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.10.034

Everling, S., Tinsley, C. J., Gaffan, D., & Duncan, J. (2002). Filtering of neural signals by focused attention in the monkey prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*. http://doi.org/10.1038/nn874

Ferguson, B. R., & Gao, W.-J. (2015). Development of thalamocortical connections between the mediodorsal thalamus and the prefrontal cortex and its implication in cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*. http://doi.org/10.3389/fnhum.2014.01027

Fogassi, L., & Luppino, G. (2005). Motor functions of the parietal lobe. *Current Opinion in Neurobiology*. http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.015

Freedman, D. J., Riesenhuber, M., Poggio, T., & Miller, E. K. (2003). A Comparison of Primate Prefrontal and Inferior Temporal Cortices during Visual Categorization. *J. Neurosci.* http://doi.org/23/12/5235 [pii]

Frith, C. D., Friston, K., Liddle, P. F., & Frackowiak, R. S. J. (1991). Willed action and the prefrontal cortex in man: A study with PET. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. http://doi.org/10.1098/rspb.1991.0077

Fukushima, T., Hasegawa, I., & Miyashita, Y. (2004). Prefrontal Neuronal Activity Encodes Spatial Target Representations Sequentially Updated After Nonspatial Target-Shift Cues. *Journal of Neurophysiology*. http://doi.org/10.1152/jn.00306.2003

Funahashi, S., Bruce, C. J., & Goldman-Rakic, P. S. (1993). Dorsolateral prefrontal lesions and oculomotor delayed-response performance: evidence for mnemonic “scotomas”. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. http://doi.org/0270-6474/93/131479-19$05.00/O

Fuster, J. (2001). The prefrontal Cortex—An updatetime is of the essence. *Neuron*. http://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00285-9

Fuster, J. M. (1973). Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *Journal of Neurophysiology*. http://doi.org/10.1152/jn.1973.36.1.61

Fuster, J. M. (1997). Network memory. *Trends in Neurosciences*. http://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01128-4

Fuster, J. M. (2000). Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*. http://doi.org/10.1007/s002210000401

Fuster, J. M. (2010). Prefrontal Cortex. In *Encyclopedia of Neuroscience*. http://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01118-9

Fuster, J. M., & Alexander, G. E. (1971). Neuron Activity Related to Short-Term Memory. *Science*. http://doi.org/10.1126/science.173.3997.652

Fuster, J. M., Bodner, M., & Kroger, J. K. (2000). Cross-modal and cross-temporal association

in neurons of frontal cortex. *Nature*. http://doi.org/10.1038/35012613

Gerbella, M., Belmalih, A., Borra, E., Rozzi, S., & Luppino, G. (2007). Multimodal architectonic subdivision of the caudal ventrolateral prefrontal cortex of the macaque monkey. *Brain Structure and Function*. http://doi.org/10.1007/s00429-007-0158-9

Gerbella, M., Borra, E., Tonelli, S., Rozzi, S., & Luppino, G. (2013). Connectional Heterogeneity of the Ventral Part of the Macaque Area 46. *Cerebral Cortex*, *23*(4), 967–987. http://doi.org/10.1093/cercor/bhs096

Goldman, P. S., Rosvold, H. E., Vest, B., & Galkin, T. W. (1971). Analysis of the delayed-alternation deficit produced by dorsolateral prefrontal lesions in the rhesus monkey. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. http://doi.org/10.1037/h0031649

Goulas, A., Uylings, H. B. M., & Stiers, P. (2014). Mapping the hierarchical layout of the structural network of the macaque prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhs399

Härtig, W., Brückner, G., Schmidt, C., Brauer, K., Bodewitz, G., Turner, J. D., & Bigl, V. (1997). Co-localization of β-amyloid peptides, apolipoprotein E and glial markers in senile plaques in the prefrontal cortex of old rhesus monkeys. *Brain Research*. http://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01423-0

Hasegawa, R. P., Matsumoto, M., & Mikami, a. (2000). Search target selection in monkey prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*.

Holmes, G. L. (1989). The prefrontal cortex: Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe. *Journal of Epilepsy*. http://doi.org/10.1016/0896-6974(89)90035-2

Hoshi, E., Shima, K., & Tanji, J. (1998). Task-dependent selectivity of movement-related neuronal activity in the primate prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. http://doi.org/10.1111/j.1468-0254.2009.00273.x

Hoshi, E., Shima, K., & Tanji, J. (2000). Neuronal activity in the primate prefrontal cortex in the process of motor selection based on two behavioral rules. *Journal of Neurophysiology*.

Huettel, S. A. (2005). Decisions under Uncertainty: Probabilistic Context Influences Activation of Prefrontal and Parietal Cortices. *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5070-04.2005

Jacobsen, C. F. (1935). Functions of frontal association area in primates. *Archives of Neurology And Psychiatry*. http://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1935.02250150108009

Jiang, Y., & Kanwisher, N. (2003). Common Neural Mechanisms for Response Selection and

Perceptual Processing. *Journal of Cognitive Neuroscience*. http://doi.org/10.1162/089892903322598076

Karten, H. J., Hodos, W., Nauta, W. J. H., & Revzin, A. M. (1973). Neural connections of the "visual wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (Columba livia) and owl (Speotyto cunicularia). *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.901500303

Koechlin, E., Ody, C., & Kouneiher, F. (2003). The architecture of cognitive control in the human prefrontal cortex. *Science (New York, N.Y.)*. http://doi.org/10.1126/science.1088545

Koechlin, E., & Summerfield, C. (2007). An information theoretical approach to prefrontal executive function. *Trends in Cognitive Sciences*. http://doi.org/10.1016/j.tics.2007.04.005

Kojima, S. (1980). Prefrontal unit activity in the monkey: Relation to visual stimuli and movements. *Experimental Neurology*. http://doi.org/10.1016/0014-4886(80)90147-8

Konishi, S., Jimura, K., Asari, T., & Miyashita, Y. (2003). Transient activation of superior prefrontal cortex during inhibition of cognitive set. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. http://doi.org/23/21/7776 [pii]

Konishi, S., Nakajima, K., Uchida, I., Kikyo, H., Kameyama, M., & Miyashita, Y. (1999). Common inhibitory mechanism in human inferior prefrontal cortex revealed by event-related functional MRI. *Brain : A Journal of Neurology*. http://doi.org/10.1093/brain/122.5.981

Lau, H. C., Rogers, R. D., Haggard, P., & Passingham, R. E. (2004). Attention to Intention. *Science*. http://doi.org/10.1126/science.1090973

Lemaître, H., Crivello, F., Grassiot, B., Alpérovitch, A., Tzourio, C., & Mazoyer, B. (2005). Age- and sex-related effects on the neuroanatomy of healthy elderly. *NeuroImage*. http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.02.042

Maranesi, M., Rodà, F., Bonini, L., Rozzi, S., Ferrari, P. F., Fogassi, L., & Coudé, G. (2012). Anatomo-functional organization of the ventral primary motor and premotor cortex in the macaque monkey. *European Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08252.x

Mars, R. B., & Grol, M. J. (2007). Dorsolateral Prefrontal Cortex, Working Memory, and Prospective Coding for Action. *Journal of Neuroscience*.

http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5344-06.2007

Miller, B. T., & D'Esposito, M. (2005). Searching for "the top" in top-down control. *Neuron*. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.11.002

Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience*. http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167

MILNER, B. (1963). Effects of Different Brain Lesions on Card Sorting. *Archives of Neurology*. http://doi.org/10.1001/archneur.1963.00460070100010

Mushiake, H., Saito, N., Sakamoto, K., Itoyama, Y., & Tanji, J. (2006). Activity in the Lateral Prefrontal Cortex Reflects Multiple Steps of Future Events in Action Plans. *Neuron*. http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.045

Nagahama, Y., Okada, T., Katsumi, Y., Hayashi, T., Yamauchi, H., Oyanagi, C., … Shibasaki, H. (2001). Dissociable Mechanisms of Attentional Control within the Human Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/11.1.85

Nee, D. E., & D'Esposito, M. (2016). The hierarchical organization of the lateral prefrontal cortex. *ELife*. http://doi.org/10.7554/eLife.12112

Nee, D. E., Jahn, A., & Brown, J. W. (2014). Prefrontal cortex organization: Dissociating effects of temporal abstraction, relational abstraction, and integration with fMRI. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bht091

Nelissen, K., Luppino, G., Vanduffel, W., Rizzolatti, G., & Orban, G. A. (2005). Neuroscience: Observing others: Multiple action representation in the frontal lobe. *Science*. http://doi.org/10.1126/science.1115593

Ninokura, Y. (2003). Integration of Temporal Order and Object Information in the Monkey Lateral Prefrontal Cortex. *Journal of Neurophysiology*. http://doi.org/10.1152/jn.00694.2003

Ó Scalaidhe, S. P., Wilson, F. A. W., & Goldman-Rakic, P. S. (1997). Areal segregation of face-processing neurons in prefrontal cortex. *Science*. http://doi.org/10.1126/science.278.5340.1135

Passingham, R. E., Toni, I., & Rushworth, M. F. S. (2000). Specialisation within the prefrontal cortex: The ventral prefrontal cortex and associative learning. *Experimental Brain Research*. http://doi.org/10.1007/s002210000405

Pellegrino, G. Di, & Wise, S. P. (1993). Effects of attention on visuomotor activity in the premotor and prefrontal cortex of a primate. *Somatosensory & Motor Research*.

http://doi.org/10.3109/08990229309028835

Perrett, D. I., Rolls, E. T., & Caan, W. (1982). Visual neurones responsive to faces in the monkey temporal cortex. *Experimental Brain Research*. http://doi.org/10.1007/BF00239352

Peters, A., Sethares, C., & Luebke, J. I. (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*. http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.014

Petrides, M. (2000). Dissociable roles of mid-dorsolateral prefrontal and anterior inferotemporal cortex in visual working memory. *The Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-19-07496.2000

Petrides, M., & Pandya, D. N. (1984). Projections to the frontal cortex from the posterior parietal region in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.902280110

Petrides, M., & Pandya, D. N. (2002). Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey. *European Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2001.02090.x

Pochon, J.-B. (2001). The Role of Dorsolateral Prefrontal Cortex in the Preparation of Forthcoming Actions: an fMRI Study. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/11.3.260

Qi, X.-L., Meyer, T., Stanford, T. R., & Constantinidis, C. (2011). Changes in prefrontal neuronal activity after learning to perform a spatial working memory task. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhr058

Qi, X. L., & Constantinidis, C. (2013). Neural changes after training to perform cognitive tasks. *Behavioural Brain Research*. http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.017

Rakic, P., Bourgeois, J. P., Eckenhoff, M. F., Zecevic, N., & Goldman-Rakic, P. S. (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*, *232*(4747), 232–235. http://doi.org/10.1126/science.3952506

Ramnani, N., & Owen, A. M. (2004). Anterior prefrontal cortex: Insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nature Reviews Neuroscience*. http://doi.org/10.1038/nrn1343

Reynolds, J. R., O'Reilly, R. C., Cohen, J. D., & Braver, T. S. (2012). The function and organization of lateral prefrontal cortex: A test of competing hypotheses. *PLoS ONE*.

http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030284

Richard E. Passingham. (1993). *The Frontal Lobes and Voluntary Action*. *The Frontal Lobes and Voluntary Action*. http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06864.x

Riley, M. R., Qi, X. L., & Constantinidis, C. (2017). Functional specialization of areas along the anterior-posterior axis of the primate prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhw190

Rowe, J. B., & Passingham, R. E. (2001). Working memory for location and time: Activity in prefrontal area 46 relates to selection rather than maintenance in memory. *NeuroImage*. http://doi.org/10.1006/nimg.2001.0784

Rowe, J. B., Toni, I., Josephs, O., Frackowiak, R. S., & Passingham, R. E. (2000). The prefrontal cortex: response selection or maintenance within working memory? *Science (New York, N.Y.)*. http://doi.org/10.1126/science.288.5471.1656

Rozzi, S., Ferrari, P. F., Bonini, L., Rizzolatti, G., & Fogassi, L. (2008). Functional organization of inferior parietal lobule convexity in the macaque monkey: Electrophysiological characterization of motor, sensory and mirror responses and their correlation with cytoarchitectonic areas. *European Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06395.x

Rozzi, S., & Fogassi, L. (2017). Neural coding for action execution and action observation in the prefrontal cortex and its role in the organization of socially driven behavior. *Frontiers in Neuroscience*. http://doi.org/10.3389/fnins.2017.00492

Rushworth, M. F. S., Passingham, R. E., & Nobre, A. C. (2002). Components of switching intentional set. *Journal of Cognitive Neuroscience*. http://doi.org/10.1162/089892902760807159

Salat, D. H., Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Greve, D. N., Desikan, R. S. R., Busa, E., … Fischl, B. (2004). Thinning of the cerebral cortex in aging. *Cerebral Cortex*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhh032

Saleem, K. S., Kondo, H., & Price, J. L. (2008). Complementary circuits connecting the orbital and medial prefrontal networks with the temporal, insular, and opercular cortex in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*. http://doi.org/10.1002/cne.21577

Saleem, K. S., Miller, B., & Price, J. L. (2014). Subdivisions and connectional networks of the lateral prefrontal cortex in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(7), 1641–1690. http://doi.org/10.1002/cne.23498

Selemon, L. D., & Goldman-Rakic, P. S. (1988). Common cortical and subcortical targets of the dorsolateral prefrontal and posterior parietal cortices in the rhesus monkey: evidence for a distributed neural network subserving spatially guided behavior. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/jneurosci.3408-06.2006

Semendeferi, K., Armstrong, E., Schleicher, A., Zilles, K., & Van Hoesen, G. W. (2001). Prefrontal cortex in humans and apes: A comparative study of area 10. *American Journal of Physical Anthropology*. http://doi.org/10.1002/1096-8644(200103)114:3<224::AID-AJPA1022>3.0.CO;2-I

Sidman, R. L., & Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Research*. http://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90617-3

Simone, L., Bimbi, M., Rodà, F., Fogassi, L., & Rozzi, S. (2017). Action observation activates neurons of the monkey ventrolateral prefrontal cortex. *Scientific Reports*. http://doi.org/10.1038/srep44378

Sligte, I. G., van Moorselaar, D., & Vandenbroucke, A. R. E. (2013). Decoding the Contents of Visual Working Memory: Evidence for Process-Based and Content-Based Working Memory Areas? *Journal of Neuroscience*. http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4860-12.2013

Sohn, M. H., Ursu, S., Anderson, J. R., Stenger, V. A., & Carter, C. S. (2000). The role of prefrontal cortex and posterior parietal cortex in task switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. http://doi.org/10.1073/pnas.240460497

Tanaka, J. W., & Simon, V. B. (1996). Caricature recognition in a neural network. *Visual Cognition*. http://doi.org/10.1080/135062896395616

Tanila, H., Carlson, S., Linnankoski, I., & Kahila, H. (1993). Regional distribution of functions in dorsolateral prefrontal cortex of the monkey. *Behavioural Brain Research*. http://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80266-9

Tanji, J., & Hoshi, E. (2008). Role of the lateral prefrontal cortex in executive behavioral control. *Physiological Reviews*. http://doi.org/10.1152/physrev.00014.2007.

Thorpe, S. J., Rolls, E. T., & Maddison, S. (1983). The orbitofrontal cortex: Neuronal activity in the behaving monkey. *Experimental Brain Research*. http://doi.org/10.1007/BF00235545

Tisserand, D. J., van Boxtel, M. P. J., Pruessner, J. C., Hofman, P., Evans, A. C., & Jolles, J. (2004). A voxel-based morphometric study to determine individual differences in gray matter density associated with age and cognitive change over time. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*. http://doi.org/10.1093/cercor/bhh057

Tsujimoto, S., Genovesio, A., & Wise, S. P. (2011). Frontal pole cortex: Encoding ends at the end of the endbrain. *Trends in Cognitive Sciences*. http://doi.org/10.1016/j.tics.2011.02.001

Tsunada, J., & Sawaguchi, T. (2012). Neuronal Categorization and Discrimination of Social Behaviors in Primate Prefrontal Cortex. *PLoS ONE*. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052610

Van Petten, C., Plante, E., Davidson, P. S. R., Kuo, T. Y., Bajuscak, L., & Glisky, E. L. (2004). Memory and executive function in older adults: Relationships with temporal and prefrontal gray matter volumes and white matter hyperintensities. *Neuropsychologia*. http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2004.02.009

Vincent, J. L., Kahn, I., Snyder, A. Z., Raichle, M. E., & Buckner, R. L. (2008). Evidence for a Frontoparietal Control System Revealed by Intrinsic Functional Connectivity. *Journal of Neurophysiology*. http://doi.org/10.1152/jn.90355.2008

Walker, A. (1940). A cytoarchitectural study of the prefrontal areas of the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, *73*, 59–86.