



UNIVERSITÀ DI PADOVA

Dipartimento di Psicologia Generale

Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione

Corso di laurea Magistrale in Neuroscienze e Riabilitazione Neuropsicologica

Tesi di laurea Magistrale

**Correlazione tra Stati Comportamentali Osservabili e Stati Neurali Nascosti
nella Corteccia Frontale del Macaco Rhesus Durante Comportamenti
Naturalistici e Interazioni Sociali: un Approccio Basato su Hidden Markov
Models**

**Correlation Between Observable Behavioral States and Hidden Neural States in
the Frontal Cortex of the Rhesus Macaque During Naturalistic Behaviors and
Social Interactions: A Hidden Markov Model-Based Approach**

Relatrice

Prof.ssa Sessa Paola

Correlatori esterni

Prof. Pier Francesco Ferrari

Dott. Baldi Jacopo

Laureando: Spada Nicolò

Matricola: 2114716

Anno Accademico 2025-2026

Indice

<i>Abstract</i>	5
<i>Capitolo 1 - Introduzione</i>	7
1.1 Basi neurali, contesto sociale e stati discreti di popolazione nel comportamento naturalistico.....	7
1.2 Studio dell'attività neurale in macachi freely moving	9
1.2.1 Il macaco come modello per il comportamento naturalistico	9
1.2.2 Il passaggio da head fixation a registrazioni wireless.	10
1.2.3 Evidenze empiriche ottenute dai paradigmi freely moving	12
1.3 Dal comportamento sociale dei primati alle origini della comunicazione.....	13
1.3.1 La complessità della vita sociale nei primati.....	13
1.3.2 Comportamenti affiliativi: funzioni, meccanismi e parallelismi con l'uomo	14
1.3.3 Il grooming come comportamento sociale fondamentale	15
1.3.4 Le origini del linguaggio	16
1.4 Il substrato neurale del controllo dell'azione.....	17
1.4.1 L'organizzazione anatomica e funzionale del sistema motorio corticale	17
1.4.2 Integrazione sensori-motoria: organizzazione del circuito fronto-parietale	19
1.4.3 Codifica goal-directed, sequenze e intenzionalità.....	21
1.5 Evidenze funzionali della stimolazione e dell'elettrofisiologia	22
1.5.1 Stimolazione, lesioni e inibizione corticale come evidenze per la trasformazione sensori-motoria.....	23
1.6 Multimodalità, neuroni specchio e integrazione sociale.....	24
1.6.1 Integrazione multimodale e rappresentazione dello spazio peripersonale (circuiti VIP-F4)	24
1.6.2 Dalle affordance agli atti motori goal-directed: i neuroni canonici in F5 e il circuito per il grasping	24
1.6.3 Neuroni specchio, contesto e significato sociale	25
1.7 Dinamica neurale di popolazione durante comportamento libero	26
1.7.1 L'importanza della dinamica di popolazione.....	26
1.7.2 Neural manifolds e le traiettorie di popolazione.....	27
1.8 Stati neurali discreti	28
1.8.1 Evidenze elettrofisiologiche e dal neuroimaging	28
1.8.2 La necessità di modelli probabilistici.....	30
1.9 Hidden Markov Model.....	30
1.9.1 Dalle Markov Chains agli Hidden Markov Model.....	30
1.9.2 Gli Hidden Markov Model nelle Neuroscienze.....	31
1.10 Conclusioni.....	33
<i>Capitolo 2 - Materiali e Metodi</i>	35
2.1 Obiettivi e ipotesi di ricerca.....	35
2.2 Soggetti	35

2.3 Procedure Chirurgiche e Impianti Neurali.....	37
2.3.1 Pianificazione pre-chirurgica e localizzazione guidata da risonanza magnetica.....	37
2.3.2 Procedure chirurgiche.....	37
2.3.3 Impianti neurali e aree corticali target.....	37
2.4 Sistema di Registrazione Neurale.....	39
2.4.1 Architettura hardware e caratteristiche del dispositivo	39
2.4.2 Amplificazione, filtraggio e digitalizzazione del segnale.....	39
2.4.3 Archiviazione dei dati e controllo software.....	40
2.4.4 Sincronizzazione neurale-comportamentale	40
2.5 Ambiente Sperimentale e Setup in Movimento Libero.....	41
2.6 Annotazione Comportamentale e Definizione dell'Etogramma	42
2.7 Preprocessing dei Dati Neurali.....	44
2.7.1 Recupero dei dati e condizionamento del segnale	44
2.7.2 Rilevazione e sorting degli spike	45
2.7.3 Selezione delle single unit ed esportazione dei dati	45
2.8 HMM Applicato al Dataset.....	46
2.8.1 Introduzione.....	46
2.8.2 Organizzazione del Dataset e Matrici Analitiche	46
2.8.3 Preparazione dei Dati Neurali.....	47
2.8.4 Codifica dei Dati Comportamentali.....	47
2.8.5 Addestramento del Gaussian HMM e Selezione del Modello	48
2.8.6 Validazioni Post Hoc	49
Capitolo 3 - Risultati	51
3.1 Selezione del modello e stabilità del numero degli stati latenti	51
3.2 Matrici di corrispondenza tra stati e comportamento	51
3.3 Analisi sui clustering degli stati con distanza euclidea.....	55
3.4 Analisi sulla divergenza di Kullback-Leibler.....	58
Capitolo 4 - Discussione.....	63
4.1 Le correlazioni tra stato comportamentale e stato latente	64
4.2 Limiti dello studio e prospettive future	68
4.3 Conclusioni.....	69
Appendice A.....	71
Appendice B.....	77
Bibliografia.....	89

Abstract

Rispetto ai classici studi di elettrofisiologia sui macachi, condotti quasi esclusivamente in condizioni di restrizione fisica dell'animale, il nuovo paradigma *freely moving* presenta l'opportunità di studiare comportamenti naturalistici altrimenti impossibili da osservare, insieme ad una maggiore validità ecologica dei dati raccolti. Il controllo delle variabili contestuali è sempre stato cruciale per confrontare l'attività cerebrale durante diverse condizioni sperimentali, e questo nuovo paradigma presenta la sfida metodologica di non poter controllare tali variabili. È necessario identificare nuovi metodi e modelli matematici che siano adatti all'analisi di questo nuovo tipo di dati. Il presente lavoro propone l'applicazione di Hidden Markov Models (HMMs) per la modellizzazione degli stati neurali durante lunghe sessioni di registrazione di comportamento naturalistico spontaneo dei macachi.

Lo studio è stato condotto su due diadi sociali di femmine adulte di *macaca mulatta*, dove un membro di ciascuna diade era stato impiantato con due *floating multielectrode arrays* (FMAs) nell'area premotoria ventrale (PMv, area F5) e due nella corteccia prefrontale ventrolaterale (vIPFC, aree 45a e 46v/12r). Queste aree sono state scelte per via della loro ben documentata implicazione nei comportamenti *goal-directed*, nella manipolazione di oggetti con gli arti, e nelle interazioni sociali. Il segnale neurale è stato acquisito tramite il *NeuroLogger*, un dispositivo di registrazione wireless che consente all'animale di muoversi liberamente durante la sessione, mentre il comportamento è stato registrato da un sistema di telecamere sincronizzato con la registrazione neurale e in seguito annotato manualmente tramite la piattaforma BORIS, basandosi su tredici categorie comportamentali.

I risultati mostrano che un *gaussian* HMM addestrato sui dati neurali, agnostico alle sequenze di comportamenti, è in grado di identificare stati neurali latenti che correlano con sequenze e caratteristiche di comportamenti naturalistici. Tra le osservazioni più rilevanti, sono stati identificati nel primo soggetto stati che rappresentano comportamenti con effettore comune, *eating* e *mouthng*, e nel secondo soggetto un gruppo di stati che rappresentano *presenting*, *received grooming* e *lying*, comportamenti legati dalla funzione sociale ma privi di output motori simili. Per entrambi i soggetti sono stati trovati stati condivisi tra sottocategorie di *locomotion* e stati rappresentativi selettivamente per

grooming o *eating* . Analisi di *clustering* basate sulla similarità tra gli stati latenti hanno confermato la coerenza tra la struttura interna del modello e quella dei comportamenti che rappresentano.

Questi risultati forniscono evidenze a livello di popolazione neurale che PMv e vIPFC codificano aspetti del comportamento che vanno oltre alla rappresentazione motoria delle azioni, includendo anche proprietà funzionali e di significato sociale dei vari comportamenti. Per quanto noto, questo lavoro rappresenta la prima applicazione di un *framework* HMM a registrazioni in macachi *freely moving*, e convalida l'utilizzo di questo approccio matematico per modellizzare questa nuova tipologia di dati e ottenere risultati interpretabili.

La ricerca è stata condotta nel team *Laboratory of Social Neuroscience and Comparative Development* presso *l'Institut des Sciences Cognitives Marc Jeannerod* a Lione, sotto la direzione del Professor Pier Francesco Ferrari (HDR) e la supervisione del Dottor Jacopo Baldi (PhD).

Capitolo 1 - Introduzione

1.1 Basi neurali, contesto sociale e stati discreti di popolazione nel comportamento naturalistico

Uno degli aspetti più sfidanti nelle neuroscienze comportamentali è comprendere come l'attività cerebrale dia origine a comportamenti naturalistici, in un contesto sperimentale che sia al tempo stesso ecologicamente valido, sufficientemente controllato e riproducibile. Il comportamento non emerge da una singola area cerebrale né da una sequenza lineare di attivazioni locali, ma è il prodotto dell'interazione dinamica di reti neurali distribuite che operano su scale temporali diverse e si integrano in maniera continua.

Il comportamento spontaneo è un fenomeno complesso e multidimensionale, che emerge dall'interazione simultanea di obiettivi, stati motivazionali, vincoli ambientali, presenza di altri soggetti e oggetti, memoria delle azioni precedenti e aspettative sulle possibili conseguenze. Per queste ragioni, ogni individuo alterna continuamente azioni esplorative, sociali, di vigilanza o di manipolazione di oggetti orientata a uno scopo, spesso senza che ci sia una netta distinzione tra processi consapevoli e automatici.

Dal punto di vista neurale, tale complessità implica che l'attività cerebrale non possa essere interpretata come la semplice codifica di un parametro motorio o come la risposta isolata a uno stimolo. Essa riflette piuttosto l'integrazione dinamica di componenti sensoriali, motorie, cognitive, emotive e motivazionali distribuite su larga scala. Comprendere come questa attività coordinata si traduca nella generazione di comportamenti rappresenta quindi una delle questioni fondamentali per la comprensione del funzionamento del cervello, e costituisce il punto di partenza del presente lavoro.

La maggior parte degli studi di neurofisiologia su animali ha indagato funzioni motorie e cognitive in ambienti altamente controllati, nei quali lo sperimentatore manteneva il controllo diretto su variabili quali la direzione del movimento, il momento di inizio dell'azione o la presentazione di stimoli visivi. Nonostante questo approccio garantisca rigore sperimentale, riduce il comportamento a sequenze ripetitive, semplificate e temporalmente allineate a eventi esterni, perdendo così proprio quella complessità che caratterizza il comportamento naturalistico. Lo sviluppo degli studi su animali *freely*

moving rappresenta in questo senso un passaggio fondamentale: l'attività neurale registrata in queste condizioni riflette variabili contestuali, sociali e motorie altrimenti difficilmente esprimibili.

Date queste premesse, la domanda che sorge spontanea è: come sono rappresentati a livello di dinamica corticale i diversi stati comportamentali? Per rispondere bisogna tener conto di tre livelli di complessità: il repertorio comportamentale, la natura distribuita delle reti corticali e la dinamica temporale dell'attività di popolazione.

Un problema fondamentale riguarda la natura della dinamica temporale dell'attività neurale: non è evidente se l'attività di popolazione debba essere descritta come un processo continuo o come una successione di stati relativamente stabili che si alternano nel tempo. Evidenze provenienti dall'analisi delle traiettorie neurali in spazi a dimensionalità ridotta (Churchland et al., 2012; Gallego et al., 2017; Cunningham & Yu, 2014), che mostrano come l'attività di popolazione occupi regioni limitate e strutturate dello spazio neurale e studi che documentano transizioni rapide tra *pattern* di attività corticale (Abeles et al., 1995; Seidemann et al., 1996; Lehmann et al., 1987; Michel & Koenig, 2018), suggeriscono che questa struttura possa essere catturata da stati discreti latenti che si succedono nel tempo. La questione centrale diventa allora comprendere quali inferenze siano possibili stabilire tra questi stati e il comportamento effettivamente osservato; in altre parole, significa comprendere in che misura stati identificati dell'attività corticale riflettono o si allineano con i comportamenti realmente in atto, eseguiti spontaneamente e senza allineamento temporale imposto dall'esterno. Il modello degli Hidden Markov Model rappresenta per questa ragione l'approccio analitico più adatto per codificare l'evoluzione temporale dell'attività di popolazione e valutarne la corrispondenza con il comportamento osservato.

Date queste premesse, il presente capitolo fornisce il quadro teorico dello studio. Dopo aver discusso i limiti dei paradigmi sperimentali tradizionali, le motivazioni alla base degli studi in *freely moving* e la natura del comportamento sociale nei primati, verrà descritta l'organizzazione dei circuiti fronto-parietali e le principali evidenze neurofisiologiche ottenute tramite stimolazione elettrica e registrazioni *single-unit*, incluse le ricerche sui neuroni specchio e sul loro ruolo nell'integrazione tra azione e cognizione sociale. Infine, l'attenzione sarà rivolta alla dinamica di popolazione, alla

possibile organizzazione dell'attività neurale in stati discreti e al modello matematico degli Hidden Markov Model.

1.2 Studio dell'attività neurale in macachi freely moving

1.2.1 Il macaco come modello per il comportamento naturalistico

Il macaco rappresenta un modello particolarmente adatto per questa tipologia di studi per diverse ragioni: possiede un repertorio motorio ampio, capacità cognitive e sociali complesse e interagisce con un contesto ambientale ricco. Dal punto di vista etologico, i macachi vivono in gruppi gerarchicamente strutturati, partecipano a interazioni complesse come *grooming*, gestione dei conflitti e la loro risoluzione, utilizzano strumenti e possiedono un repertorio comunicativo gestuale e vocale che mostra parallelismi con il linguaggio umano (Dunbar, 2016; Fogassi & Ferrari, 2007; Rizzolatti et al., 2014); per queste ragioni si differenzia da altri animali che abitualmente vengono studiati in ricerca.

Anche dal punto di vista strutturale e funzionale, la corteccia e i circuiti neurali del macaco presentano un'organizzazione strutturale strettamente omologa a quella umana (Petrides et al., 2012). Evidenze provenienti da neuroanatomia comparata, neuroimaging funzionale e stimolazione magnetica transcranica indicano che la corteccia premotoria ventrale del macaco, l'area F5, può essere considerata una regione omologa del giro frontale inferiore umano, che comprende le aree di Brodmann 44 e 45 (Caspers et al., 2010; Rizzolatti et al., 2014)

Numerosi studi hanno mostrato che nei macachi reti di neuroni in aree prefrontali, premotorie e parietali, oltre a codificare azioni auto-generate, rispondono anche all'osservazione delle medesime azioni compiute da altri individui, con una sensibilità che riflette l'obiettivo e il significato dell'azione oltre che la sua cinematica (Gallese et al., 1996; Rizzolatti et al., 1996; Fogassi et al., 2005; Rizzolatti & Luppino, 2001). Un'evidenza dell'omologia tra il sistema fronto-parietale del macaco e quello umano deriva dagli studi sulla connettività: coerentemente con l'organizzazione anatomica appena descritta, una meta-analisi su studi di osservazione delle azioni ha identificato una rete neurale ricorrente, costituita dal giro frontale inferiore, aree 44/45 di Brodmann, dall'area premotoria ventrale, area 6 di Brodmann, e dalle regioni parietali inferiori, PF/PFG, che risulta coinvolta sia durante l'esecuzione sia durante l'osservazione di azioni

finalizzate (Molenberghs et al., 2012). Nel macaco, le aree F5 e IPL sono strettamente interconnesse, mentre nell'uomo una connettività analoga è stata dimostrata mediante trattografia DTI, che ha identificato il fascicolo arcuato come una delle principali vie di collegamento tra il giro frontale inferiore e il lobulo parietale inferiore (Rilling et al., 2008; Thiebaut de Schotten et al., 2012).

La corrispondenza funzionale è stata anche confermata da studi di stimolazione neurale: nel macaco, la stimolazione intracorticale di F5 evoca movimenti specifici della mano e della bocca secondo una mappa somatotopica precisa (Graziano et al., 2002). Nell'uomo, la stimolazione magnetica transcranica (TMS) dell'area 44 può produrre attivazione muscolare nella mano in maniera analoga (Uozumi et al., 2004).

Le aree 44 e 45 di Brodmann costituiscono nell'emisfero sinistro dell'essere umano l'area di Broca, la regione associata alla produzione del linguaggio; data questa considerazione, il parallelismo tra le due specie assume un significato interessante. Studi di neuroimaging funzionale hanno dimostrato che l'area di Broca e la sua controparte nell'emisfero destro si attivano anche durante l'osservazione e l'esecuzione di azioni manuali e facciali, suggerendo l'ipotesi che i circuiti neurali originalmente coinvolti nel controllo motorio delle azioni *goal-directed* si siano sviluppati anche per la comunicazione simbolica (Pulvermüller, 2013; Fogassi & Ferrari, 2007; Rizzolatti et al., 2014).

I risultati delle evidenze anatomiche, di connessione e fisiologiche confermano che il macaco è un ottimo modello comparato per comprendere i meccanismi neurali della cognizione motoria e sociale nell'uomo.

1.2.2 Il passaggio da head fixation a registrazioni wireless.

Storicamente, lo studio dell'attività neurale nei primati si è basato su compiti con restrizione dei movimenti del capo, ovvero *l'head fixation*. I primi impianti cronici sono stati sviluppati negli anni Sessanta e Settanta e hanno permesso di registrare l'attività di singoli neuroni in animali seduti su sedie. In questo contesto, Evarts (1966; 1968) dimostrò per la prima volta che la scarica corticale nella corteccia motoria e nelle aree di controllo del movimento di ordine superiore poteva essere correlata direttamente al movimento volontario e alla sua modulazione. Diversi studi successivi (Evarts, 1969; Fetz, 1969; Fetz & Finocchio, 1971) hanno poi consolidato questo approccio, rendendo

il macaco in stato di veglia con testa fissata, lo standard metodologico dello studio dell'attività neurale per compiti motori e cognitivi, poiché garantiva stabilità del segnale e controllo sperimentale. Nonostante ciò, la *head-fixation* elimina segnali vestibolari, propriocettivi e posturali che modulano l'attività neurale degli animali, limitando così la dinamica del comportamento naturalistico. Inoltre, l'utilizzo della sedia impedisce l'esecuzione di azioni che coinvolgono interamente il corpo, restringendo drasticamente il repertorio motorio e limitando le interazioni sociali spontanee (Gilja et al., 2010; Fernandez-Leon et al., 2015).

L'evoluzione delle tecnologie di registrazione neurale ha permesso il superamento dei limiti delle condizioni restrittive. I primi tentativi di acquisire segnali elettrofisiologici in condizioni con soggetti in movimento erano basati sui sistemi *tethered*, nei quali l'animale era collegato tramite cavi al sistema di registrazione. Questo passaggio permise un avanzamento significativo verso condizioni non restrittive; tuttavia, i cavi rappresentavano ancora una grande limitazione per i movimenti dell'animale e rendevano praticamente impossibili gli studi durante l'esecuzione di comportamenti spontanei. Inoltre, i movimenti dei cavi potevano generare artefatti nei segnali, compromettendo così la qualità delle registrazioni.

Gilja et al. (2010) hanno fornito una revisione sistematica dei sistemi autonomi di registrazione elettrofisiologica, mettendo in luce in modo dettagliato le principali sfide ingegneristiche dello sviluppo dei dispositivi *wireless*. In particolare, sono state evidenziate problematiche riguardanti l'alimentazione, la larghezza di banda necessaria per la trasmissione dei segnali multi-canale e la riduzione degli artefatti da movimento. Pur non introducendo direttamente una nuova interfaccia, il loro contributo ha chiarito i vincoli tecnici e progettuali fondamentali per lo sviluppo di sistemi *wireless* in grado di garantire una qualità del segnale affidabile.

Una svolta decisiva è avvenuta grazie al lavoro di Fernandez-Leon et al. (2015) i quali hanno sviluppato un sistema di interfacce neurali *wireless* capace di registrare simultaneamente da array elettrodi impiantati cronicamente in primati *freely moving*, dimostrando che è possibile mantenere una qualità del segnale stabile per periodi prolungati anche in condizioni di comportamento non vincolato. Questa scoperta ha

fornito una prova concreta della fattibilità tecnica e sperimentale delle registrazioni elettrofisiologiche in ambienti non restrittivi.

1.2.3 Evidenze empiriche ottenute dai paradigmi *freely moving*

Il passaggio da paradigmi restrittivi a paradigmi *freely moving* si osserva direttamente nelle proprietà dell'attività neurale. Lanza et al. (2025) hanno svolto uno studio con registrazioni wireless in area premotoria sia in condizioni restrittive sia in condizione libera. I risultati hanno mostrato che gli stessi neuroni possono codificare le medesime azioni in modo significativamente diverso nei due contesti. In condizioni di comportamento libero sono stati identificati neuroni che scaricano in maniera selettiva per azioni non testabili nei paradigmi restrittivi e neuroni con selettività mista per più azioni simultanee; questo studio ha evidenziato dunque come il cambio di paradigma abbia portato con sé più livelli di complessità. L'analisi ha inoltre dimostrato come l'attività di popolazione neurale in *freely moving* sia più ricca e generalizzabile, suggerendo che gli approcci senza restrizione siano più adatti a rivelare le basi neurali del comportamento.

L'importanza di questo cambiamento metodologico è stata sottolineata da Ferrari e Baldi (2024), i quali hanno argomentato che queste tecniche di registrazione rappresentano un considerevole sviluppo nello studio delle funzioni cerebrali perché permettono di osservare dimensioni nell'attività neurale che altrimenti non si sarebbero potute osservare. Gli autori evidenziano inoltre come questo approccio costituisca una fase di transizione degli studi sulla neurofisiologia sempre più orientati a contesti ecologici, dove il comportamento viene analizzato nella sua complessità socialmente integrata e non più scomposto in componenti semplici.

Anche studi recenti sulla codifica spaziale in primati *freely moving* (Zhu et al., 2023) hanno portato a conclusioni simili: l'attività della formazione ippocampale non riflette soltanto la posizione nello spazio, ma è fortemente modulata da variabili posturali, come l'orientamento della testa e i movimenti oculari. Questi risultati suggeriscono che la codifica spaziale dipende sia dalla posizione dell'animale nello spazio, sia dove esso dirige lo sguardo. Ciò indica che variabili corporee e contestuali, assenti o rigidamente controllate nei paradigmi head-fixed, contribuiscono in modo rilevante all'organizzazione dell'attività neurale.

Un ulteriore studio che sottolinea l'importanza del passaggio a registrazioni wireless è quello di Berger e colleghi (2020), i quali hanno osservato attraverso un compito di *reaching* che in condizioni non restrittive i neuroni nei circuiti fronto-parietali codificano obiettivi motori anche nello spazio extrapersonale, mostrando un'estensione della rappresentazione spaziale del raggio d'azione.

Recentemente, uno studio che segue questa linea è quello di Testard et al. (2024) che mostra come l'attività neurale a livello di popolazione è modulata in modo dinamico in funzione delle relazioni sociali in corso. In particolare, la popolazione neurale codifica in maniera flessibile diversi aspetti del contesto sociale, inclusi comportamenti di *grooming* reciproco e risposte a segnali di minaccia esterna.

Lo studio dell'attività neurale in condizioni più naturalistiche permette dunque di indagare la maggior parte del repertorio comportamentale disponibile. Per questa ragione è necessario descrivere il ruolo del comportamento sociale, parte integrata e di fondamentale importanza nella vita dei primati, e dei parallelismi che si possono osservare con l'uomo.

1.3 Dal comportamento sociale dei primati alle origini della comunicazione

1.3.1 La complessità della vita sociale nei primati

I primati rappresentano uno degli ordini di mammiferi con la vita sociale più elaborata. Tendenzialmente vivono in gruppi stabili e strutturati in cui gli individui intrattengono relazioni differenti e durature all'interno della comunità, basate su parentela, rango, interazioni passate e alleanze (Dunbar, 2016; Ferrari et al., 2017). Il repertorio comportamentale sociale comprende comportamenti affiliativi come il *grooming*, il contatto corporeo, la prossimità e i gesti comunicativi; comportamenti di dominanza come l'aggressione e la minaccia; comportamenti di sottomissione, di riconciliazione o riproduttivi come il corteggiamento, la monta e le cure parentali (Aureli et al., 2002; Silk et al., 2003).

Questi comportamenti possono avere funzioni differenti a seconda del contesto: un episodio di *grooming* può rafforzare un legame, ridurre la tensione dopo un conflitto e segnalare la disponibilità alla cooperazione. Allo stesso modo, la vicinanza spaziale tra due individui può riflettere affiliazione, ma anche vigilanza o preparazione a

un'interazione. Questa multifunzionalità rende il comportamento sociale dei primati particolarmente complesso da analizzare e simile al comportamento sociale dell'uomo ed è inoltre informativo per comprendere come il cervello rappresenta e coordina le azioni con obiettivi sociali.

Molte di queste caratteristiche trovano parallelismi nell'uomo, dove la qualità delle relazioni sociali è uno dei predittori più significativi della salute fisica e mentale (Dunbar, 2016).

Comprendere l'organizzazione e le funzioni di questi comportamenti è rilevante sia per l'etologia comparata che per le neuroscienze, al fine di comprendere quali comportamenti e quali aree potrebbero codificare interazioni sociali spontanee.

1.3.2 Comportamenti affiliativi: funzioni, meccanismi e parallelismi con l'uomo

Il contatto corporeo prolungato, come il sedersi a contatto, l'*huddle* o l'abbraccio, è tra i comportamenti affiliativi più diffusi e filogeneticamente antichi, con effetti fisiologici documentati tra cui riduzione della frequenza cardiaca e dei livelli di cortisolo (Dunbar, 2016). La prossimità spaziale preferenziale è uno degli indicatori più affidabili della forza del legame affiliativo (Silk et al., 2003). I gesti comunicativi affiliativi, come il lip-smacking, la presentazione della mano e le espressioni facciali rilassate, modulano l'interazione sociale e facilitano l'avvicinamento tra individui (Ferrari et al., 2003; Van Hooff, 1967).

Dopo episodi aggressivi, molte specie mostrano *pattern* di riconciliazione in cui gli individui ristabiliscono il rapporto attraverso la prossimità, il contatto corporeo o il *grooming* (Aureli et al., 2002). La probabilità e la rapidità della riconciliazione dipendono dalla qualità della relazione preesistente, dal rango sociale interno alla comunità e dal contesto del conflitto. Questa capacità svolge una funzione omeostatica, riducendo la tensione residua e ripristinando la prevedibilità delle interazioni (Sapolsky, 2005).

Un altro tratto comune con l'uomo è il coinvolgimento di meccanismi neuroendocrini. Il contatto fisico nei primati è associato al rilascio di ossitocina e beta-endorfine, neuropeptidi che promuovono la prosocialità, rinforzano i legami e attenuano lo stress (Keverne et al., 1989; Carter, 1998; Dunbar, 2010). Nell'uomo, il contatto fisico affiliativo attiva gli stessi circuiti ossitocinici e oppioidi, con effetti analoghi sulla

riduzione dello stress e sulla promozione della fiducia interpersonale (Dunbar, 2010; Feldman, 2012; Nummenmaa et al., 2016). L'analogia di questa attivazione neuroendocrina sostiene l'idea che i meccanismi della socialità abbiano radici evolutive profonde e condivise tra specie.

1.3.3 Il grooming come comportamento sociale fondamentale

Il *grooming* (*allogrooming*) occupa una posizione privilegiata tra i comportamenti affiliativi: è il più frequente nella maggior parte delle specie di primati, è facilmente osservabile, presenta un'organizzazione temporale strutturata e le sue funzioni sono state molto studiate negli anni (Grueter et al., 2013; Pereira et al., 2019).

La sua origine evolutiva proviene probabilmente dalla cura igienica, ovvero dalla rimozione di parassiti e di detriti dal pelo. Analisi comparative su 74 specie confermano che vivere a terra piuttosto che sugli alberi è uno dei principali predittori del tempo dedicato al grooming (Grueter et al., 2013). Nei primati il *grooming* ha acquisito funzioni sociali che vanno molto oltre l'igiene: rafforza relazioni a lungo termine e correla con la formazione di alleanze (Silk et al., 2003; Seyfarth & Cheney, 2012); riduce lo stress sia nel ricevente sia in chi lo effettua (Aureli et al., 1999; Shutt et al., 2007). Di fatto il grooming viene realizzato come se fosse una sorta di "valuta" comportamentale in un sistema di scambi reciproci (Schino, 2007; Schino & Aureli, 2008). Una meta-analisi su 48 gruppi sociali appartenenti a 22 specie ha confermato che il grooming viene diretto preferenzialmente verso individui che lo ricambiano, indipendentemente dalla parentela (Schino & Aureli, 2008).

Studi longitudinali hanno inoltre mostrato che la forza dei legami instaurati tramite *grooming* è predittiva di maggiore sopravvivenza infantile, longevità e successo riproduttivo (Silk et al., 2003; Silk et al., 2010; Archie et al., 2014). Questo indica che il *grooming* è, oltre ad una risposta alle condizioni sociali correnti, una strategia proattiva di costruzione della nicchia sociale. Dal punto di vista strutturale si organizza in sequenze tipiche di avvicinamento, posizionamento, ispezione manuale e *grooming* reciproco. È stato anche osservato che in gruppi gerarchici i *pattern* del *grooming* riflettono il rango sociale: macachi di rango medio dedicavano più tempo rispetto a quelli di rango elevato dello stesso gruppo (Xia et al., 2021).

1.3.4 Le origini del linguaggio

Un aspetto interessante da approfondire è il rapporto tra interazioni affiliative e la comunicazione. Secondo Van Hooff (1962, 1967), il *lip-smacking* ha origine dai movimenti di ingestione associati al *grooming*. All'inizio dell'interazione, le scimmie producono movimenti delle labbra simili all'azione di assaggiare, anche in assenza di cibo, prima che qualsiasi detrito possa essere portato alla bocca. Ciò sostiene l'ipotesi di una progressiva dissociazione dalla funzione di ingestione verso un significato comunicativo sociale.

Morrill e colleghi (2012) hanno dimostrato che il *lip-smacking* segue una traiettoria di sviluppo simile alla lallazione nei neonati umani. Infatti, con l'età i movimenti convergono verso una frequenza di circa 5 Hz, la stessa struttura temporale della lingua parlata, con una ritmicità distinta dalla masticazione. La teoria "*Frame/Content*" di MacNeilage (1998) propone in maniera coerente che i movimenti ciclici della mandibola, evoluti per la masticazione, abbiano fornito il precursore della struttura ritmica del parlato.

Coerentemente, Ferrari et al. (2003) hanno osservato in area F5 una popolazione di neuroni specchio che oltre a scaricare durante l'ingestione, rispondono in maniera preferenziale all'osservazione di gesti comunicativi orofacciali come il *lip-smacking*. Questa proprietà può indicare che l'area F5, considerata una regione omologa correlata all'area di Broca nell'uomo, sia coinvolta in questa teoria dell'evoluzione del linguaggio.

Questa ipotesi, nota come teoria gestuale dell'origine del linguaggio, propone che il sistema motorio, in particolare quello dei neuroni *mirror*, identificato in F5 del macaco, abbia fornito il substrato neurale per l'evoluzione della comunicazione intenzionale e del linguaggio nell'uomo (Fogassi & Ferrari, 2007).

Con una prospettiva più ampia, Dunbar (2016) ha teorizzato che i comportamenti affiliativi basati sul contatto fisico rappresentino la base evolutiva da cui si sono sviluppate forme di coesione sociale sempre più efficienti. Il *grooming* si basa su un'interazione diadica ed è dispendioso in termini di tempo; l'espansione dei gruppi sociali potrebbe aver creato la necessità di sviluppare altre forme di *bonding* capaci di raggiungere più individui simultaneamente. Questo processo avrebbe contribuito allo sviluppo del linguaggio, che insieme alla risata e al canto, rappresenta uno degli esiti

evolutivi più recenti dei sistemi di comunicazione. Queste tre forme condividono il coinvolgimento dei circuiti oppioidi endogeni.

I parallelismi con l'uomo a livello comportamentale, neurochimico e comunicativo, confermano dunque il macaco come modello appropriato per lo studio delle basi neurali del comportamento sociale. Questa prospettiva, unita alle ragioni dello studio dell'attività neurale in condizioni *freely moving*, richiede una comprensione approfondita dell'organizzazione anatomica e funzionale delle reti corticali coinvolte, a partire dal sistema motorio e dai circuiti fronto-parietali che costituiscono il substrato neurale del controllo dell'azione.

1.4 Il substrato neurale del controllo dell'azione

1.4.1 L'organizzazione anatomica e funzionale del sistema motorio corticale

Il controllo dell'azione nei primati è il risultato di un sistema corticale altamente organizzato che integra pianificazione, trasformazioni sensori-motorie ed esecuzione. Il sistema motorio corticale rappresenta una rete distribuita in grado di codificare obiettivi, regole contestuali e proprietà dell'ambiente in atti motori finalizzati e coerenti con il contesto comportamentale. Questa architettura, sviluppata nelle aree parieto-frontali, è alla base sia della pianificazione delle azioni finalizzate a un obiettivo sia della codifica delle azioni altrui (Rizzolatti et al., 2014).

Fritsch e Hitzig (1870) furono i primi a riportare delle evidenze sperimentali sulla relazione tra sistema motorio e corteccia, quando dimostrarono che la stimolazione elettrica della corteccia frontale del cane provocava contrazioni muscolari controlaterali. Questi risultati furono riscontrati anche nei primati da Ferrier (1876) e successivamente sistematizzati da Sherrington (1906), identificando il giro precentrale come principale sede del sistema motorio. Penfield e Boldrey (1937), attraverso stimolazioni intraoperatorie nell'uomo, tracciarono la mappa somatotopica della corteccia motoria primaria, dando così origine al modello dell'*homunculus* motorio.

Questa fase storica consolidò l'idea che la corteccia motoria fosse organizzata come una rappresentazione topografica del corpo, nella quale regioni corticali specifiche controllavano distretti muscolari specifici associati. In tale prospettiva, l'area 6 di Brodmann (PM) veniva interpretata come area adibita alla pianificazione, mentre l'area

4 di Brodmann (M1) all'atto esecutivo. Con l'avanzare delle ricerche anatomiche e neurofisiologiche, questa visione si rivelò insufficiente a spiegare la complessità del comportamento motorio.

Ad oggi l'avanzamento degli studi sul tracciamento anatomico e sulla citoarchitettura ha dimostrato che la corteccia frontale adibita al controllo motorio è costituita da almeno sei aree distinte, ciascuna caratterizzata da connettività, struttura e specializzazione funzionale specifiche. Dunque, il sistema motorio corticale appare organizzato lungo un gradiente funzionale che va dall'esecuzione motoria concreta alla rappresentazione astratta degli obiettivi e delle regole che governano l'azione (Matelli et al., 1985; Rizzolatti & Luppino, 2001; Rizzolatti et al., 2014).

In questo quadro, la corteccia motoria primaria (M1, area F1) rimane la principale area di output corticale per il movimento volontario. Localizzata nella parete anteriore del solco centrale, è caratterizzata dalla presenza di grandi neuroni piramidali nel V strato, tra cui le cellule di Betz, che inviano proiezioni corticospinali monosinaptiche ai motoneuroni spinali. Questa architettura consente un controllo di precisione nel movimento delle dita, una caratteristica distintiva della motricità dei primati (Lemon, 2008). La corteccia motoria primaria riceve diverse afferenze dalla corteccia somatosensoriale e dalle aree premotorie: integra informazioni relative alla posizione del corpo, al contesto e alla pianificazione dell'azione prima di trasmettere il comando motorio finale; riceve durante l'esecuzione del movimento feedback sensoriali e propriocettivi che consentono l'aggiornamento e la modulazione dell'output motorio. Rostralmente a M1 si estende la corteccia premotoria, che comprende diverse aree funzionalmente distinte. Le aree premotorie dorsali (F2 e F7) sono coinvolte nella selezione dei movimenti di *reaching* sulla base di informazioni spaziali e regole contestuali. Esse partecipano alla trasformazione delle coordinate visive in comandi motori appropriati, contribuendo alla preparazione dell'azione prima della sua esecuzione. Le aree ventrali (F4 e F5), invece, risultano maggiormente implicate nella codifica di azioni finalizzate, principalmente di mano e bocca, e nel monitoraggio dello spazio peripersonale, integrando informazioni tattili e visive rilevanti per l'interazione con oggetti o altri individui. Le aree mesiali, F3 (SMA) e F6 (pre-SMA), svolgono un ruolo complementare nell'organizzazione temporale dell'azione. Esse sono particolarmente coinvolte nell'iniziazione e durante la sequenza di movimenti controllati internamente, risultando cruciali quando il

comportamento non è direttamente causato da stimoli esterni ma richiede pianificazione (Rizzolatti & Luppino, 2001; Rizzolatti et al., 2014). Questa architettura suggerisce che il sistema motorio corticale sia anche organizzato secondo rappresentazioni di azioni goal-directed e schemi di esecuzione motoria integrati.

1.4.2 Integrazione sensori-motoria: organizzazione del circuito fronto-parietale

Il controllo dell'azione richiede una continua integrazione tra informazioni sensoriali e programmi motori in preparazione. Questa integrazione è resa possibile da un'organizzazione sistematica delle connessioni tra corteccia parietale posteriore e aree premotorie frontali. Studi di tracciamento anatomico nei macachi hanno dimostrato che le proiezioni parieto-frontali seguono una disposizione topografica ordinata: regioni parietali adiacenti sono connesse a regioni premotorie sempre adiacenti tra loro, AIP con l'area F5 e VIP con l'area F4, formando circuiti paralleli e parzialmente segregati. Questa architettura suggerisce l'esistenza di moduli sensori-motori specializzati, ciascuno deputato alla trasformazione di specifiche informazioni spaziali o di proprietà fisiche degli oggetti in programmi motori (Luppino et al., 1999; Borra et al., 2008).

La corteccia parietale posteriore è l'area di elaborazione sensoriale principale del sistema motorio. L'area MIP codifica la posizione dei target visivi e proietta verso l'area premotoria dorsale (PMd), contribuendo alla trasformazione visuo-motoria necessaria per la pianificazione del reaching e permettendo traiettorie motorie coerenti con la postura e con la configurazione dell'arto (Johnson et al., 1996).

Nel lobo parietale inferiore (IPL), l'area AIP svolge un ruolo chiave nella rappresentazione delle proprietà tridimensionali degli oggetti, ovvero forma, dimensione e orientamento, anche durante lo svolgimento di azioni *grasping* degli oggetti stessi (Murata et al., 2000). Tali rappresentazioni permettono al sistema motorio di pianificare azioni appropriate prima dell'interazione fisica con l'oggetto. L'area PFG, invece, integra segnali visivi e somatosensoriali durante la manipolazione dell'oggetto e contribuisce all'elaborazione delle componenti motorie dell'azione durante l'interazione con l'ambiente (Fogassi et al., 2005).

Un'ulteriore area molto rilevante è la VIP, che integra informazioni visive e tattili in maniera congiunta con l'area F4 nella rappresentazione dinamica dello spazio

peripersonale. Questa organizzazione consente di monitorare costantemente lo spazio immediatamente circostante al corpo, predisponendo risposte di orientamento o difensive in funzione degli stimoli che si muovono verso il corpo (Colby et al., 1993; Duhamel et al., 1998).

Le connessioni tra PPC e corteccia premotoria sono organizzate in circuiti bidirezionali. In ciascun circuito parieto-frontale, il lobo parietale fornisce informazioni sensoriali già elaborate, mentre le aree premotorie trasformano queste informazioni in programmi motori specifici. Le connessioni di ritorno contribuiscono a un'integrazione dinamica tra percezione e azione, permettendo un aggiornamento continuo della rappresentazione dell'azione (Fogassi & Luppino, 2005).

All'interno di questa architettura si distinguono due principali vie funzionali. La via dorso-dorsale collega le aree parietali superiori con la corteccia premotoria dorsale ed è principalmente coinvolta nella guida *online* del *reaching* e nel controllo della traiettoria dell'arto. La via ventro-dorsale collega invece le aree parietali inferiori con la corteccia premotoria ventrale ed è specializzata nell'elaborazione degli oggetti nelle loro dimensioni cognitive, come configurazione della presa e integrazione di informazioni del significato funzionale dell'azione. Inoltre, è implicata nelle azioni dirette verso gli oggetti stessi (Caminiti et al., 2017; Rizzolatti et al., 2014).

La corteccia prefrontale introduce nel circuito anche una dimensione decisionale e contestuale. Le aree ventrolaterali prefrontali 45 e 46v proiettano verso le regioni premotorie rostrali F5 e F7, modulando la selezione dell'azione in base a regole comportamentali, aspettative sul risultato e al contesto (Gerbella et al., 2013; Borra et al., 2017). L'attività sostenuta osservata in queste aree durante task con intervalli di ritardo tra stimolo e risposta riflette il mantenimento attivo di informazioni rilevanti per il compito, come lo scopo dell'azione e le regole contestuali, permettendo una pianificazione coerente con l'obiettivo (Hoshi & Tanji, 2007; Fuster, 2001).

Concludendo, l'organizzazione complessiva dei circuiti fronto-parietali può essere interpretata come una gerarchia funzionale distribuita. Le aree parietali posteriori contribuiscono alle trasformazioni visuomotorie codificando le proprietà degli oggetti rilevanti per l'azione e le relazioni spaziali necessarie per pianificare il movimento. Le aree premotorie integrano queste informazioni in rappresentazioni motorie, organizzando

le sequenze di azioni e specificando i parametri necessari all'esecuzione (Rizzolatti & Matelli, 2003; Fogassi et al., 2005).

1.4.3 Codifica goal-directed, sequenze e intenzionalità

Studi su registrazioni single-unit in macachi hanno fornito la dimostrazione diretta che molte aree premotorie oltre a codificare parametri motori, rappresentano anche azioni complesse e obiettivi. A partire dai lavori classici in area F5 (Rizzolatti et al., 1981, 1987), è emerso che molti neuroni scaricano selettivamente durante specifiche azioni finalizzate, come *grasping* o movimenti mano-bocca. Questa selettività sembra essere legata al tipo di atto motorio e alla sua finalità immediata, oltre che ai singoli parametri cinematici del movimento (Rizzolatti et al., 1987; Murata et al., 2000).

L'ipotesi che l'obiettivo sia parte integrante della codifica di queste aree riceve un supporto importante da studi con utilizzo di *tools*. Umiltà et al. (2008) hanno addestrato macachi a usare pinze "inverse", che richiedono una cinematica della mano opposta rispetto alla chiusura dello strumento; dopo l'apprendimento, molti neuroni in F5 mantenevano la selettività rispetto al momento in cui l'oggetto veniva afferrato, indipendentemente dal fatto che la mano si aprisse o si chiudesse.

Un altro aspetto fondamentale riguarda l'organizzazione temporale dell'azione. Fogassi et al. (2005) hanno dimostrato che neuroni dell'area IPL, attivi durante il *grasping*, possono differenziare lo stesso *grasp* a seconda che esso sia seguito da "portare alla bocca" o da "posare in un contenitore", nonostante la parte cinematica sia praticamente identica, osservando anche in questo caso una codifica neurale *goal-directed*. Queste evidenze sono state trovate anche in studi sull'organizzazione in sequenze di azione; l'obiettivo è risultato selettivo per l'attivazione di specifici neuroni premotori in F5 (Bonini et al., 2010). In modo complementare, neuroni nelle aree prefrontali e premotorie mantengono rappresentazioni degli step futuri di un piano motorio, contribuendo così alla coordinazione di sequenze comportamentali complesse (Mushiake et al., 2006; Gerbella et al., 2013).

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che una parte del sistema fronto-parietale rappresenti dunque l'azione come conseguenza dell'intenzione.

La corteccia prefrontale introduce dunque una dimensione di controllo cognitivo più astratto poiché modula la selezione e la pianificazione delle azioni in base a regole comportamentali, obiettivi a lungo termine e contesto sociale (Fuster, 2001). Questa architettura corticale è ulteriormente integrata con circuiti cortico-sottocorticali che coinvolgono talamo, gangli della base e cervelletto, organizzati in loop paralleli che contribuiscono alla selezione, al timing e alla regolazione fine del movimento (Middleton & Strick, 2000).

Riassumendo quindi possiamo definire una gerarchia funzionale in cui la corteccia motoria primaria è maggiormente legata all'esecuzione fine, mentre le aree premotorie e prefrontali partecipano alla rappresentazione di atti *goal-directed*, alla loro concatenazione temporale e alla modulazione del contesto (Rizzolatti et al., 2014; Graziano, 2006).

Nel loro insieme, queste connessioni compongono un sistema distribuito dove percezione, pianificazione ed esecuzione risultano funzionalmente integrate, costituendo il substrato neurale del controllo dell'azione nei primati.

1.5 Evidenze funzionali della stimolazione e dell'elettrofisiologia

Le conoscenze sull'organizzazione del sistema motorio corticale derivano, oltre che dall'anatomia e dalla connettività, anche da evidenze che permettono di collegare in modo diretto l'attività di specifiche regioni a componenti osservabili del comportamento. In questo senso, due linee di ricerca sono state le più significative: gli studi di stimolazione elettrica, che descrivono un nesso causale della relazione tra corteccia e output motorio, e studi sulle registrazioni elettrofisiologiche *single-unit* e di popolazione, che dimostrano come i neuroni della corteccia premotoria e prefrontale possano rappresentare azioni, obiettivi e contesto oltre alla cinematica del movimento.

Come discusso nel capitolo sull'organizzazione anatomica del sistema motorio (capitolo 1.4.1), gli studi di stimolazione elettrica hanno storicamente fondato il concetto di corteccia motoria, a partire dalle osservazioni di Fritsch e Hitzig (1870) fino alle mappe somatotopiche di Penfield e Boldrey (1937).

1.5.1 Stimolazione, lesioni e inibizione corticale come evidenze per la trasformazione sensori-motoria

È stato dimostrato che, con la microstimolazione a breve durata, M1 (F1) tende a produrre movimenti semplici riguardanti muscoli specifici, in linea con la sua funzione di output corticale e con la presenza di proiezioni discendenti dirette (Strick, 1986). La stimolazione di regioni più rostrali, in particolare nelle aree premotorie, evoca un output con una struttura differente, organizzata in configurazioni più complesse (Rizzolatti et al., 2014).

Uno sviluppo divenuto poi fondamentale è stato introdotto dal paradigma *long-train microstimulation*. Graziano e colleghi (2002; 2006) hanno mostrato che stimolazioni ripetute nella corteccia premotoria della durata di 300–500 ms, intervalli simili alla durata di un atto motorio, evocano sequenze di azioni naturali e finalizzate, come *reaching* verso un target, movimenti mano-verso-bocca o risposte difensive e *orienting* che coinvolgono diverse parti del corpo. La distribuzione corticale di queste sequenze indica un sistema più complesso rispetto all'organizzazione somatotopica classica poiché evidenzia l'esistenza di *cluster* funzionali organizzati per categorie di azione e per obiettivi comportamentali (Graziano, 2006; Rizzolatti et al., 2014). Questa evidenza causale è coerente con l'idea che, come esposto precedentemente (capitolo 1.4.2), la corteccia premotoria e prefrontale contengano delle rappresentazioni degli schemi motori.

Anche ricerche sull'inibizione corticale hanno permesso di testare in modo causale quali aree del circuito parieto-frontale siano necessarie per specifiche trasformazioni sensori-motorie. In particolare, l'inibizione di F5 o AIP compromette selettivamente il *reshaping* della mano e la configurazione della presa, lasciando però relativamente preservati aspetti più grossolani del *reaching*, indicando un ruolo critico del circuito AIP–F5 nella trasformazione tra le proprietà dell'oggetto e lo schema motorio di *grasp* (Fogassi et al., 2001).

Il passo successivo riguarda i meccanismi attraverso cui la corteccia premotoria costruisce rappresentazioni che vanno oltre l'esecuzione motoria: l'integrazione multimodale e i sistemi dei neuroni canonici e specchio collegano la percezione di oggetti e azioni altrui al repertorio motorio e sociale.

1.6 Multimodalità, neuroni specchio e integrazione sociale

1.6.1 Integrazione multimodale e rappresentazione dello spazio peripersonale (circuito VIP–F4)

Come precedentemente espresso, le aree frontali e parietali coinvolte nel controllo dell'azione integrano segnali sensoriali in rappresentazioni utili alla selezione e preparazione dell'azione. Questa proprietà è particolarmente evidente nell'area F4, dove sono stati descritti neuroni con campi recettivi visuo-tattili congruenti: questi neuroni rispondono sia alla stimolazione tattile di specifiche parti del corpo sia alla presenza o all'avvicinamento di stimoli visivi nello spazio vicino a quelle stesse parti, costruendo così una sorta di mappa operativa centrata sul corpo (Fogassi et al., 1996; Rizzolatti et al., 2014).

Questa organizzazione è possibile poiché F4 è strettamente collegata con l'area parietale VIP, la quale codifica anche le caratteristiche di integrazione multisensoriale in maniera simile (Colby et al., 1993; Duhamel et al., 1998). Le evidenze, dunque, sostengono l'interpretazione del circuito VIP–F4 come base neurale della rappresentazione dello spazio peripersonale, ovvero lo spazio entro cui gli stimoli diventano immediatamente rilevanti per l'interazione e per l'attivazione di risposte di orientamento o difesa (Rizzolatti et al., 2014). Coerentemente la stimolazione di regioni premotorie associate a tali mappe può evocare *pattern* d'azione coordinati, come ad esempio risposte protettive e di *orienting*, suggerendo un accoppiamento stretto tra rappresentazione multisensoriale e repertorio motorio disponibile (Graziano et al., 2002; Rizzolatti et al., 2014).

1.6.2 Dalle affordance agli atti motori goal-directed: i neuroni canonici in F5 e il circuito per il grasping

Oltre alla codifica multimodale dello spazio (F4/VIP), la corteccia premotoria ventrale include meccanismi coinvolti nella trasformazione delle informazioni sull'oggetto in programmi d'azione. In F5 è stata identificata una popolazione di neuroni visuomotori: i neuroni canonici, che scaricano sia durante l'esecuzione di azioni di grasping sia durante la semplice osservazione di oggetti afferrabili, in assenza di movimento. L'attivazione di questi neuroni è selettiva per le proprietà dell'oggetto, come forma, dimensione e pre-

shaping di una presa specifica, e viene interpretata come attivazione automatica di uno schema motorio potenziale indotto dalla percezione dell'oggetto (Rizzolatti et al., 1997; Rizzolatti et al., 2014).

Il costrutto di affordance proposto da Gibson (1979) è concettualmente legato a queste osservazioni: l'oggetto viene rappresentato sia per le sue proprietà percettive, sia per il suo possibile utilizzo in termini di azione, selezionando azioni orientate a uno scopo. Considerando il network parieto-frontale, la presenza di neuroni canonici in F5 si inserisce nel circuito specializzato per il grasping (AIP-F5), dove le proprietà tridimensionali dell'oggetto, elaborate principalmente nel lobo parietale, vengono tradotte in configurazioni di presa appropriate (Rizzolatti et al., 2014).

1.6.3 Neuroni specchio, contesto e significato sociale

La scoperta dei neuroni specchio ha enormemente ampliato il ruolo del sistema motorio nella cognizione sociale. I neuroni specchio, descritti inizialmente in F5, scaricano sia durante l'esecuzione sia durante l'osservazione di un'azione *goal-directed*. La selettività è legata allo scopo dell'azione: ad esempio, un neurone attivo per "*grasp-to-mouth*" può rispondere all'osservazione della stessa azione anche se la presa è differente (*precision* vs *whole-hand*), ma non risponde a movimenti simili privi di scopo, come il grasp mimato in assenza di oggetto (Di Pellegrino et al., 1992; Gallese et al., 1996; Rizzolatti et al., 2014). Inoltre, una parte del sistema può riguardare altre caratteristiche sensoriali: alcuni neuroni rispondono ai suoni associati a specifiche azioni oltre che alla loro esecuzione, questo indica che le rappresentazioni dell'azione sono relativamente indipendenti dal canale sensoriale sollecitato (Kohler et al., 2002; Keysers et al., 2003).

Altri studi hanno confermato l'importanza del circuito parieto-frontale in funzione del contesto e dall'organizzazione temporale dell'azione, in particolare, Fogassi et al. (2005) hanno mostrato che neuroni possono discriminare lo stesso *grasp* in funzione della sequenza d'azione successiva, ad esempio "afferrare per mangiare" vs "afferrare per porre", suggerendo una codifica che predice l'intenzione del comportamento. Coerentemente, in condizioni in cui la sequenza dell'azione è incompleta, alcuni neuroni mantengono la risposta anche quando una fase fondamentale dell'azione, la parte finale, è occlusa se l'osservatore può riuscire ad inferire che l'obiettivo venga raggiunto (Umiltà et al., 2001).

Queste proprietà sono particolarmente rilevanti per la dimensione sociale. In F5 sono state descritte risposte dei neuroni specchio anche per azioni orofacciali e gesti comunicativi, modulate dal significato sociale del comportamento osservato (Ferrari et al., 2003). Inoltre, l'integrazione tra rappresentazioni d'azione e componenti affettivo-motivazionali è resa possibile da connessioni tra aree premotorie e circuiti limbici sottocorticali (ad es. amigdala, insula anteriore, cingolo anteriore), che possono modulare la risposta motoria in funzione del valore sociale ed emotivo dell'interazione (Gerbella et al., 2011; Borra et al., 2017; Ferrari et al., 2017; Carrillo et al., 2019).

Nel complesso, l'insieme composto dalle multimodalità (F4/F5), dalle affordance (neuroni canonici) e dalla codifica contestuale condivisa (neuroni specchio) suggerisce che, durante comportamenti liberi, l'attività premotoria e prefrontale riflette una combinazione dinamica di componenti motorie, percettive e sociali (Rizzolatti et al., 2014). Se singoli neuroni integrano segnali motori, sensoriali e sociali, le configurazioni che emergono durante interazioni spontanee, come per esempio il *grooming*, saranno il prodotto di dinamiche distribuite su intere popolazioni neuronali, non riducibili all'analisi di *single-units*. Descrivere queste dinamiche richiede analisi capaci di descrivere l'evoluzione temporale dell'attività neurale.

1.7 Dinamica neurale di popolazione durante comportamento libero

1.7.1 L'importanza della dinamica di popolazione

Le evidenze discusse nei capitoli precedenti hanno identificato proprietà fondamentali sulla funzione del sistema motorio, dalle trasformazioni sensori-motorie nel circuito parieto-frontale alla codifica di obiettivi e del contesto nei neuroni canonici e specchio. Tuttavia, durante il comportamento spontaneo molteplici variabili come postura, obiettivi, fase dell'azione e contesto sociale, co-variano simultaneamente, e la loro reciproca influenza sull'attività corticale richiede di passare a una descrizione dell'attività come dinamica di popolazione (Churchland et al., 2012; Cunningham & Yu, 2014).

Come discusso precedentemente (capitolo 1.2.2), l'attività neurale in contesto *freely moving* è più ricca e complessa di quella osservata in condizioni ristrette, con neuroni che mostrano selettività mista per più azioni simultaneamente e codifiche non osservabili nei paradigmi tradizionali (Lanzarini et al., 2025). Questa complessità è resa accessibile dallo

sviluppo di sistemi di registrazione wireless capaci di mantenere segnali stabili (Fernandez-Leon et al., 2015); poiché senza di essi non sarebbe tecnicamente possibile fare analisi di popolazione in condizioni naturalistiche. Questi strumenti sono fondamentali per catturare la struttura e l'evoluzione nel tempo nelle dinamiche neurali.

Come descritto nel capitolo sull'integrazione sensori-motoria (capitolo 1.4.2), l'organizzazione del circuito fronto-parietale implica che le dinamiche di popolazione coinvolgano in modo coordinato più nodi del *network* (Rizzolatti et al., 2014). Questo rafforza l'idea che lo stato neurale rilevante per il comportamento non risieda nell'attività di singoli neuroni, ma nella configurazione congiunta della popolazione neurale attraverso il circuito. La generazione del comportamento *goal-directed* dipenderebbe dunque da una coordinazione temporale tra aree diverse, la cui struttura si riorganizza in funzione dello stato comportamentale. In questo senso, le proprietà precedentemente descritte a livello di singole classi neuronali, come la codifica *goal-directed* in F5 (Rizzolatti et al., 1987), la sensibilità al contesto sequenziale nelle catene d'azione (Fogassi et al., 2005) e la codifica condivisa tra azione eseguita e osservata nei neuroni specchio (Gallese et al., 1996), possono assumere un significato più completo quando vengono considerate in un contesto della dinamica di popolazione complessiva, in cui le proprietà dei singoli neuroni si riflettono nell'evoluzione coordinata dell'intero *network*.

1.7.2 Neural manifolds e le traiettorie di popolazione

A livello di analisi un contributo fondamentale per la comprensione della dinamica di popolazione proviene dallo sviluppo di metodi di riduzione della dimensionalità. Queste analisi permettono di proiettare l'attività simultanea di molti neuroni in un unico spazio a poche dimensioni, rendendo visibile una struttura che altrimenti risulterebbe nascosta dall'alta dimensionalità dei dati grezzi (Cunningham & Yu, 2014).

In particolare, Churchland et al. (2012) hanno mostrato che, durante il *reaching*, l'attività di popolazione in corteccia motoria e premotoria non evolve linearmente nella direzione del movimento ma percorre traiettorie rotazionali in uno spazio a bassa dimensionalità, ovvero, gruppi di neuroni si attivano in sequenza temporale generando dinamiche di attivazione oscillatorie. La struttura e la velocità di queste configurazioni si distinguono in condizioni di movimento e in fasi dell'azione diverse (preparazione vs esecuzione). Il

risultato è che l'informazione motoria è riconducibile ad un sottospazio ristretto le cui coordinate catturano le variabili comportamentali rilevanti.

Gallego et al. (2017) hanno definito questa caratteristica introducendo il concetto di *neural manifold*, ovvero uno spazio a bassa dimensionalità, limitato dalla connettività del circuito neurale, in cui l'attività di popolazione è vincolata a svilupparsi. I loro risultati mostrano che la struttura di questo sottospazio rimane relativamente stabile anche quando l'animale esegue compiti diversi: ciò che cambia sono le traiettorie che l'attività percorre al suo interno nel tempo, in base allo stato comportamentale eseguito. In altre parole, il *neural manifold* definisce il repertorio di configurazioni dell'attività di popolazione possibili del circuito, mentre le traiettorie riflettono quale configurazione viene effettivamente eseguita durante uno specifico comportamento.

Nel contesto del comportamento libero, tuttavia, le traiettorie di popolazione riflettono simultaneamente diverse componenti che si sovrappongono senza una divisione temporale predefinita. Date queste considerazioni, diventa importante verificare se all'interno di questa dinamica sia possibile identificare stati discreti ricorrenti direttamente dall'attività neurale e metterne in relazione la sequenza con l'organizzazione temporale del comportamento.

1.8 Stati neurali discreti

1.8.1 Evidenze elettrofisiologiche e dal neuroimaging

Gli approcci basati sulla riduzione di dimensionalità descritti nel capitolo precedente assumono che l'attività di popolazione evolva in maniera continua lungo traiettorie nello spazio neurale. Diverse evidenze elettrofisiologiche suggeriscono che la dinamica corticale possa organizzarsi in configurazioni relativamente stabili.

Una delle prime osservazioni in questa direzione proviene dal lavoro di Abeles et al. (1995), i quali registrando simultaneamente da più *single-units* nella corteccia prefrontale, scoprirono l'esistenza di stati di attività separati, all'interno dei quali i *firing rate* erano approssimativamente stazionari. Le transizioni tra uno stato e l'altro risultarono rapide. Inoltre, i risultati di questo studio evidenziarono che condizioni comportamentali e stimoli differenti vengono riflessi da stati diversi e che le correlazioni tra neuroni variavano

considerevolmente tra gli stati. Queste osservazioni suggeriscono che tali configurazioni emergano dall'attività a livello di popolazione neurale.

Un'evidenza più diretta è stata riportata da Seidemann et al. (1996), i quali registrando da neuroni prefrontali in macachi, osservarono che proprio l'attività di popolazione non evolve gradualmente tra una condizione e l'altra in maniera continua, ma alterna periodi relativamente stazionari a transizioni rapide verso configurazioni di attività diverse. Queste osservazioni sono coerenti con modelli teorici (Hopfield, 1982; Amit & Brunel, 1997), in cui la connettività del circuito definisce un insieme di configurazioni stabili, gli *attractors*, tra i quali l'attività può transitare in risposta a cambiamenti e stimoli sia interni che esterni.

L'ipotesi degli stati neurali discreti ha ricevuto un supporto anche dalla letteratura di neuroimaging nell'uomo. Biswal et al. (1995) hanno osservato che le fluttuazioni spontanee del segnale BOLD a riposo mostrano correlazioni spaziali corrispondenti a reti neurali funzionali definite, le cosiddette *resting-state networks*. Precedentemente si credeva che la connettività funzionale del cervello a riposo fosse principalmente stazionaria. Allen et al. (2014) hanno confermato questa scoperta attraverso un'analisi di correlazione *sliding-window* a dati fMRI in *resting-state* e mostrando che la connettività funzionale ha delle fluttuazioni considerevoli nel corso di una registrazione. Applicando metodi di *clustering* alle matrici di connettività estratte da ciascuna finestra temporale, gli autori hanno identificato un numero ristretto di configurazioni ricorrenti; questo suggerisce che il cervello a riposo transiti tra un repertorio discreto di stati.

Una prospettiva complementare proviene dall'analisi dei microstati EEG (Lehmann et al., 1987; Michel & Koenig, 2018). In questo approccio, la topografia istantanea del campo elettrico allo scalpo veniva assegnata, mediante un algoritmo di *clustering*, a una fra un numero ristretto di mappe prototipiche, le quali corrispondono a una determinata configurazione dominante del segnale corticale. Il segnale EEG viene così segmentato in epoche discrete, i microstati, la cui durata tipica è di 60–120 ms. Le statistiche dei microstati, ovvero la durata, la frequenza di occorrenza e la probabilità di transizione, mostrano una struttura temporale sistematica e con transizioni e alterazioni dipendenti dalle condizioni più probabili (Lehmann et al., 2005; Michel & Koenig, 2018). Questi

risultati rafforzano l'idea che la dinamica cerebrale, anche in assenza di stimoli o compiti, si organizzi in una successione di stati discreti con proprietà statistiche regolari.

1.8.2 La necessità di modelli probabilistici

Le evidenze provenienti dall'elettrofisiologia, dal neuroimaging funzionale e dall'elettroencefalografia suggeriscono che l'attività cerebrale possa essere organizzata in configurazioni discrete piuttosto che evolvere in maniera continua. Questi risultati rafforzano l'ipotesi che anche l'attività di popolazione registrata da aree premotorie e prefrontali durante il comportamento in *freely moving* possa essere descritta come una successione di stati, ciascuno caratterizzato da un *pattern* di attivazione relativamente stabile e separato dagli altri da transizioni rapide.

Tuttavia, i metodi fin qui descritti presentano limitazioni importanti. L'analisi *sliding-window* richiede la scelta arbitraria di una durata della finestra e il clustering ignora invece l'ordine temporale delle osservazioni trattando ogni finestra come se fosse indipendente. Analogamente, l'analisi dei microstati EEG segmenta il segnale mediante una regola di assegnazione deterministica e dunque non è in grado di calcolare la probabilità di osservare una determinata configurazione dato lo stato corrente, né di derivare le regole probabilistiche che governano le transizioni tra stati. Queste limitazioni motivano il passaggio a un modello che sia esplicitamente in grado di identificare stati latenti, le loro emissioni di probabilità e le probabilità di transizione tra stati. Per queste ragioni nel presente studio è stato utilizzato il modello matematico degli *Hidden Markov Models*.

1.9 Hidden Markov Model

1.9.1 Dalle Markov Chains agli Hidden Markov Model

Gli Hidden Markov Model (HMM) sono un modello matematico particolarmente adatto allo studio delle *time series*, ovvero sequenze di osservazioni ordinate nel tempo (Zucchini et al., 2017), poiché sono in grado di identificare stati latenti discreti, non direttamente osservabili, attraverso la probabilità di transizione tra i vari stati racchiusa intrinsecamente nelle dinamiche temporali dell'attività neurale (Seidemann et al., 1996; Cunningham & Yu, 2014). A differenza dei modelli deterministici, gli HMM operano su base probabilistica, poiché partendo dai dati osservati, ovvero le scariche neurali, il

modello è in grado di inferire uno stato ipotetico del sistema ("*hidden*") e le regole che governano il passaggio da uno stato all'altro. Per una descrizione più dettagliata della parte matematica, delle proprietà delle Catene di Markov e degli algoritmi di stima dei parametri, si rimanda all'Appendice A.

1.9.2 Gli Hidden Markov Model nelle Neuroscienze

L'applicazione degli HMM a dati neurofisiologici ha avuto inizio con lo studio precedentemente discusso di Seidemann et al. (1996), i quali applicarono un HMM a registrazioni *single-unit* dalla corteccia prefrontale del macaco. L'analisi mostrò che l'attività neurale poteva essere segmentata in stati discreti e ricorrenti, le cui transizioni risultavano allineate a eventi comportamentali. Questo lavoro fu il primo ad affermare che un modello a stati latenti potesse catturare l'organizzazione temporale dell'attività neurale in modo adeguato.

Kemere et al. (2008) estesero questa linea di ricerca applicando un HMM con emissioni di Poisson a treni di *spike* registrati dalla corteccia motoria grazie ad un'interfaccia cervello-macchina (*brain-machine interface*, BMI). Gli stati latenti trovati dal modello corrispondevano a epoche funzionalmente distinte per baseline, pianificazione e movimento, e le transizioni tra stati risultavano correlate con l'inizio del movimento. Un risultato rilevante fu che gli stati trovati dal modello potevano essere identificati automaticamente senza che i tempi di transizione tra le epoche fossero noti a priori al sistema, stabilendo un collegamento diretto tra stati latenti e output comportamentale.

Nel loro insieme, questi studi hanno stabilito due principi centrali nell'uso degli HMM nelle neuroscienze ovvero che gli stati nascosti inferiti dal modello possono corrispondere a epoche comportamentali o cognitive significative e che le transizioni tra stati possono rivelare cambiamenti nella configurazione neurale sottostante all'attivazione.

Oltre all'identificazione di epoche, gli Hidden Markov Model (HMM) sono stati utilizzati per catturare variazioni temporali tra stimolo e risposta neurale. Escola et al. (2011) introdussero un *framework* in cui l'attività neurale veniva modellata come un processo puntuale dipendente dallo stimolo e dalla storia degli *spike* all'interno di una struttura HMM. In questo contesto, ciascuno stato nascosto può essere interpretato come un

diverso modello di risposta mentre una catena di *Markov* governa le transizioni tra questi stati estendendo l'applicazione degli HMM all'analisi di modelli dinamici.

Successivamente gli HMM hanno iniziato a essere applicati all'attività di *ensemble* neuronali e a segnali di larga scala, grazie anche all'avanzamento delle tecnologie di registrazione multi-elettrodo. Linderman et al. (2016) impiegarono un HMM gerarchico per analizzare treni di *spike* ippocampali registrati da ratti in *freely moving*. L'approccio bayesiano non-parametrico permise di inferire il numero di stati latenti direttamente dai dati e consentì di trovare in modo adattivo la struttura dell'attività registrata.

Per quanto riguarda il neuroimaging umano, Vidaurre et al. (2017) applicarono un HMM a dati MEG *resting-state* e identificarono un insieme di stati cerebrali transitori e ricorrenti con durata dell'ordine di decine-centinaia millisecondi. Lavori successivi (Vidaurre et al., 2018) mostrarono che questi stati rappresentavano in modo affidabile le reti canoniche del *resting-state*, *default mode network*, rete sensorimotoria, visiva e fronto-parietale e che la dinamica delle transizioni prediceva differenze individuali nelle funzioni cognitive. In ambito clinico, grazie a dati raccolti con EEG, Jiang et al. (2023) hanno mostrato che gli stati HMM differiscono tra soggetti sani e pazienti con disturbo depressivo maggiore, mentre in ambito evolutivo, sempre con EEG, Toffoli et al. (2024) hanno dimostrato che metriche derivate dagli stati HMM in bambini in età prescolare predicono le valutazioni dei genitori sulla regolazione comportamentale ed emotiva.

Un aspetto rilevante per il presente lavoro riguarda l'applicazione degli HMM in contesti sperimentali progressivamente più naturalistici, includendo compiti non strutturati, animali in *freely moving* e con sessioni di registrazione prolungate. Kirchherr et al. (2023) hanno analizzato registrazioni longitudinali di popolazione neurale nell'arco di settimane-mesi, dimostrando che gli stati latenti inferiti tramite HMM rimanevano stabili nel tempo e associati a misure comportamentali. Bagi et al. (2022), in uno studio dove è stata analizzata l'attività neurale di roditori durante un paradigma di *hide-and-seek*, hanno dimostrato che gli HMM possono identificare stati latenti coerenti e ripetibili anche in comportamenti altamente variabili e non rigidamente organizzati e controllati in trial.

Ulteriori studi hanno affrontato in modo diretto il collegamento tra stati neurali e stati comportamentali. Dommanget-Kott et al. (2026) hanno mostrato che gli stati inferiti tramite HMM in larve di zebrafish risultano temporalmente allineati alle transizioni

locomotorie, trovando dunque un ponte diretto tra dinamica di popolazione e cambiamenti nello stato comportamentale dell'animale.

Queste evidenze indicano che gli HMM possono essere applicati efficacemente a dati comportamentali complessi, dinamici ed ecologicamente validi.

L'utilizzo degli HMM richiede però particolare attenzione ad alcuni assunti e ad alcuni vincoli imposti dal modello. Ezaki et al. (2021) hanno confrontato due modelli: un HMM e un *Gaussian Mixture Models* (GMM) applicati a dati fMRI *resting-state*. I risultati affermano che in condizioni di bassa frequenza di campionamento o di breve durata delle registrazioni, i GMM possono raggiungere prestazioni comparabili agli HMM, suggerendo che il vantaggio della regolarizzazione temporale offerta dagli HMM dipende principalmente dalla struttura del dataset. Più recentemente, Pieramico et al. (2025) hanno confrontato diverse varianti del modello HMM, mostrando che alcune formulazioni più avanzate possono migliorare la rilevazione di *pattern* di attività cerebrale in condizioni di basso rapporto segnale-rumore. Queste considerazioni metodologiche ricordano che le scelte nell'implementazione del modello, come il numero di stati, la durata minima di permanenza in ciascuno stato e la struttura delle transizioni, influenzano direttamente i risultati e la loro interpretabilità.

1.10 Conclusioni

Le evidenze sperimentali che sono state presentate in questo capitolo delineano un quadro che motiva le scelte e l'approccio analitico utilizzato nel presente studio, oltre che ad un inquadramento generale sull'argomento. Il sistema motorio corticale dei primati non è un semplice esecutore di comandi muscolari, ma una rete distribuita che codifica obiettivi, contesto e significato sociale delle azioni, con proprietà che emergono a livello di *single units*, di circuiti parieto-frontali e di dinamiche di popolazione distribuite attraverso *network*. Il comportamento sociale dei macachi rappresenta un campo ideale di studio poiché le sue proprietà possiedono un'elevata complessità e coinvolgono simultaneamente dimensioni motorie, percettive, affettive e relazionali in maniera relativamente parallela a quella dell'uomo. Altri parallelismi validano questa scelta poiché il livello anatomico, neurochimico e comunicativo dei primati confermano la rilevanza del modello animale per lo studio delle basi neurali del comportamento.

Lo studio dell'attività neurale in condizioni di *freely moving* è reso possibile dallo sviluppo di tecnologie di registrazione wireless e permette di osservare come le aree premotorie e prefrontali si attivino durante comportamenti spontanei e interazioni sociali reali. La complessità di questi dati richiede strumenti analitici adeguati che siano anche capaci di descriverne la dinamica temporale dell'attività. Le evidenze sull'esistenza di stati neurali discreti e ricorrenti motivano l'adozione di un *framework* probabilistico capace di identificare le configurazioni di popolazione e le transizioni tra di esse.

Il presente studio si basa sull'applicazione degli Hidden Markov Models all'attività di popolazione registrata in aree premotorie e prefrontali di macachi *rhesus* in condizione *freely moving*. Ha l'obiettivo di identificare stati neurali ricorrenti e di mettere in relazione la sequenza temporale di questi stati con le fasi del comportamento osservabile.

Capitolo 2 - Materiali e Metodi

2.1 Obiettivi e ipotesi di ricerca

Il presente studio si sviluppa in diverse fasi: una prima parte riguarda la raccolta di dati comportamentali e neurofisiologici da macachi *rhesus* in condizioni *freely moving*, e comprende la preparazione degli animali, la descrizione dell'ambiente sperimentale, il sistema di registrazione neurale e le procedure di annotazione comportamentale. La parte successiva consiste nello sviluppo e nell'applicazione di un *framework* computazionale in grado di analizzare la dinamica neurale e confrontarla con il comportamento dell'animale.

L'ipotesi centrale di questo studio consiste nel verificare se questo *framework* basato su *gaussian* Hidden Markov Model sia in grado di derivare dal segnale neurale stati latenti ricorrenti e interpretabili, e quantificare la loro corrispondenza con la dinamica del comportamento naturalistico. A differenza dei dati raccolti in protocolli *trial-based* dove i soggetti eseguono comportamenti standardizzati all'interno di una struttura regolare e ripetuta, il protocollo *freely moving* consente la registrazione di comportamenti spontanei, quindi più naturalistici e con una validità ecologica maggiore.

2.2 Soggetti

Lo studio è stato condotto su quattro femmine adulte di macaco *rhesus* (*Macaca mulatta*), organizzate in due diadi sociali stabili. In ciascuna coppia, un animale era impiantato cronicamente con *array* multielettrodo per le registrazioni neurali, mentre l'altro fungeva da partner sociale non impiantato. I due soggetti impiantati, indicati di seguito come M1 e M2, avevano rispettivamente 7 e 15 anni al momento della raccolta dati; i loro partner (pM1 e pM2) avevano 7 e 11 anni.

Entrambe le diadi convivevano nello stesso ambiente domestico da oltre due anni prima dell'inizio degli esperimenti, ciò aveva permesso lo stabilirsi di relazioni sociali solide e ben definite, con gerarchie chiare e *pattern* di interazione prevedibili. Le relazioni di dominanza sono state valutate sulla base di più indicatori comportamentali: asimmetrie negli scambi di *grooming*, priorità di accesso al cibo fornito dagli sperimentatori, e messa in atto di comportamenti dominanti come minacce, inseguimenti e monta. Sulla base di

questi criteri, M1 è stato classificato come individuo subordinato nella propria diade mentre M2 come dominante nella sua coppia.

Gli animali sono stati studiati in ambienti arricchiti, progettati per promuovere comportamenti naturalistici e garantire il benessere psicologico. L'arricchimento comprendeva strutture per arrampicarsi, oggetti con cui interagire e opportunità di fare *foraging*, rinnovate quotidianamente. Al di fuori delle sessioni sperimentali, gli animali erano sempre mantenuti in coppia, con pieno accesso a interazioni visive, uditive e fisiche con il partner. Non sono stati adottati protocolli di restrizione alimentare o idrica in nessuna fase dello studio; l'accesso a cibo e acqua era sempre garantito.

Per tutta la durata del progetto, il personale veterinario ha monitorato regolarmente lo stato di salute degli animali, il peso corporeo, il comportamento alimentare e le condizioni fisiche generali, intervenendo tempestivamente a fronte di qualsiasi segnale di disagio. Particolare attenzione è stata dedicata alla riduzione dello stress, specialmente in considerazione della natura del paradigma sperimentale che comporta sfide specifiche in termini di benessere animale.

Tutte le procedure sperimentali, stabulazione, gestione, interventi chirurgici, registrazioni comportamentali e acquisizione di dati neurali, sono state condotte nel rispetto della normativa europea sull'uso degli animali nella ricerca scientifica (Direttiva 2010/63/UE) e sono state autorizzate dalle competenti autorità nazionali. I protocolli sono stati approvati dai comitati etici istituzionali e governativi competenti. Prima dell'avvio delle registrazioni, gli animali sono stati sottoposti a procedure di abituação progressive all'ambiente sperimentale, alle apparecchiature e alle *routine* di gestione, affinché durante le sessioni potessero muoversi liberamente ed esprimere spontaneamente l'intero repertorio comportamentale.

La scelta del macaco *rhesus* come modello è motivata dalla ricchezza del suo repertorio sociale, che include *grooming*, strutture gerarchiche complesse e comunicazione gestuale, e dalla stretta analogia tra la sua organizzazione corticale frontale e quella umana, caratteristiche che lo rendono particolarmente adatto allo studio delle dinamiche neurali alla base del comportamento *goal-directed* e socialmente integrato.

2.3 Procedure Chirurgiche e Impianti Neurali

2.3.1 Pianificazione pre-chirurgica e localizzazione guidata da risonanza magnetica

La pianificazione chirurgica si è basata su informazioni anatomiche individuali acquisite prima di ciascun impianto. Per ogni soggetto sono state acquisite immagini di risonanza magnetica strutturale ad alta risoluzione tramite scanner a 3 Tesla; le sequenze pesate in T1 sono state utilizzate per ricostruire l'anatomia corticale individuale, rendendo possibile la visualizzazione precisa dei riferimenti dei solchi e della struttura vascolare. Su questa base sono state definite le coordinate stereotassiche per il posizionamento degli elettrodi, identificando le regioni bersaglio all'interno della corteccia frontale in relazione alla posizione del solco arcuato. L'approccio guidato da MRI ha consentito una localizzazione accurata e riproducibile tra i soggetti, limitando al contempo l'invasività chirurgica.

2.3.2 Procedure chirurgiche

Tutti gli interventi sono stati eseguiti in condizioni sterili, in conformità con la normativa europea vigente. L'anestesia è stata indotta e mantenuta con una combinazione di farmaci iniettabili e per inalazione; i parametri fisiologici vitali sono stati monitorati continuamente per tutta la durata dell'intervento.

Dopo il posizionamento dell'animale nel *frame* stereotassico, è stata eseguita una craniotomia sulle regioni bersaglio e la dura madre è stata aperta per consentire l'inserimento degli elettrodi. Gli *array* multi-elettrodo cronici sono stati impiantati nelle sedi selezionate e fissati al cranio con materiali biocompatibili. È stata quindi assemblata una struttura di supporto montata sulla testa, progettata per ancorare stabilmente i connettori e proteggere l'*hardware* da sollecitazioni meccaniche durante il movimento. Al termine dell'intervento, il sito chirurgico è stato chiuso e l'animale trasferito in un'area di recupero sotto sorveglianza veterinaria.

2.3.3 Impianti neurali e aree corticali target

Le registrazioni sono state ottenute tramite *floating multielectrode arrays* (FMA) progettati per l'impianto a lungo termine. Ciascun *array* era composto da 32 elettrodi in platino-iridio, con lunghezze comprese tra 1 e 6 mm e spaziatura inter-elettrodo di circa

400 μm . L'impedenza degli elettrodi era dell'ordine di 0,5 $\text{M}\Omega$ a 1 kHz, un valore compatibile con registrazioni extracellulari ottimizzate per l'isolamento dell'attività neuronale.

L'impianto è stato eseguito unilateralmente e differiva tra i due soggetti: in M1 sono stati inseriti sei FMA nell'emisfero destro, in M2 cinque nell'emisfero sinistro. La configurazione unilaterale ha permesso di campionare l'attività di popolazione in modo rappresentativo e limitando l'entità dell'intervento chirurgico.

Gli *array* sono stati distribuiti nelle aree frontali coinvolte nel controllo motorio (figura 2.1), nella pianificazione dell'azione e nel comportamento sociale: la corteccia motoria primaria (M1; area F1), la corteccia premotoria ventrale (PMv; area F5, nelle sue rappresentazioni manuali e orali), la corteccia premotoria dorsale (PMd; area F2) e porzioni della corteccia prefrontale ventrolaterale (vlPFC; aree 45a e 46v/12r). Le sedi di impianto sono state definite rispetto ai principali riferimenti dei solchi e verificate sull'anatomia della MRI individuale.

Ai fini delle analisi presentate in questa tesi, l'attenzione è focalizzata in particolare sull'attività neurale registrata dalla PMv (area F5) e dalla vlPFC, regioni centrali per lo studio delle dinamiche neurali associate al comportamento motorio spontaneo e alle interazioni sociali. Gli *array* interfacciavano con l'apparecchiatura di registrazione tramite connettori montati sulla testa, progettati per garantire una connessione stabile e per introdurre il minimo ingombro possibile.

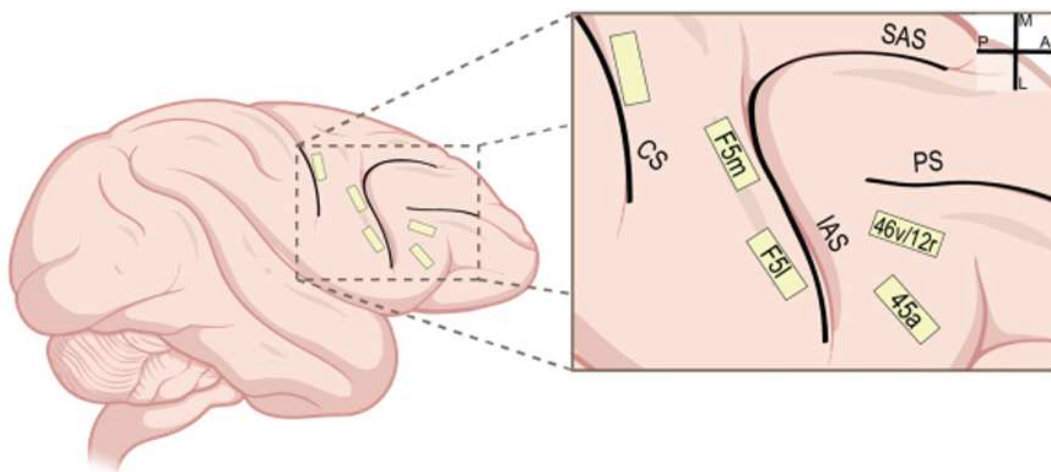


Figura 2.1. Ingrandimento schematico del sito di impianto nel lobo frontale, con indicazione del posizionamento delle matrici di registrazione nelle aree PMv e vlPFC (realizzato con BioRender.com; adattato da Baldi et al., preprint 2025).

2.3.4 Cure post-operatorie e recupero

Dopo l'intervento, gli animali hanno seguito un periodo di recupero dedicato prima della ripresa delle attività sperimentali. Durante questa fase sono stati mantenuti nelle normali condizioni di stabulazione e monitorati quotidianamente dal personale veterinario. Il protocollo post-operatorio prevedeva la somministrazione di analgesici e farmaci antiepilettici per circa un mese, al fine di garantire il benessere e la stabilizzazione dell'*hardware* impiantato. Il sito chirurgico veniva ispezionato regolarmente per verificare la guarigione e l'integrità dell'impianto. Solo dopo il pieno recupero e il ripristino di condizioni fisiologiche e comportamentali stabili, gli animali sono stati poi reintrodotti progressivamente alle routine sperimentali.

2.4 Sistema di Registrazione Neurale

2.4.1 Architettura hardware e caratteristiche del dispositivo

L'attività neurale extracellulare è stata acquisita con un sistema *NeuroLogger*, un data logger multicanale *wireless* progettato per registrazioni croniche in animali non vincolati. Ciascun soggetto impiantato disponeva di 128 canali di registrazione, derivati da quattro FMA a 32 canali collegati al dispositivo tramite connettori Omnetics integrati nell'assemblaggio cranico. Il *NeuroLogger* veniva montato sulla testa dell'animale all'inizio di ogni sessione e racchiuso in un alloggiamento protettivo personalizzato in PLA stampato in 3D, fissato saldamente all'impianto per proteggerlo durante il movimento e le interazioni sociali. L'alimentazione era garantita da una batteria al litio da 3,7 V (250–350 mAh), sufficiente per circa tre ore di registrazione continua.

2.4.2 Amplificazione, filtraggio e digitalizzazione del segnale

Il *NeuroLogger* amplificava e digitalizzava i segnali extracellulari acquisiti da ciascun canale, applicando un filtro passa-banda tra 2 e 6000 Hz prima dell'archiviazione. Questo intervallo di frequenze conserva sia le componenti a bassa frequenza che l'attività di *spiking* ad alta frequenza, rendendo possibile la successiva separazione *offline* degli spike dal rumore di fondo. Per le analisi *downstream*, i *timestamp* degli *spike* sono stati ricostruiti con una risoluzione temporale di 1 ms, coerentemente con la discretizzazione applicata in fase di *preprocessing*. Tutti i canali venivano registrati simultaneamente,

consentendo l'acquisizione parallela dell'attività di popolazione dalle aree premotorie e prefrontali.

2.4.3 Archiviazione dei dati e controllo software

I dati neurali venivano memorizzati localmente su una scheda SD rimovibile collegata al *NeuroLogger*. L'archiviazione locale eliminava la necessità di trasmissione *wireless* continua, riducendo il rischio di dropout durante il movimento non vincolato. All'inizio di ogni sessione, la comunicazione con il dispositivo veniva stabilita tramite il *software* proprietario *LoggerCommand3* (DeuteronTech), utilizzato per inizializzare la registrazione e sincronizzare il *clock* interno del *NeuroLogger* con il sistema di controllo sperimentale. Al termine della sessione, il *logger* veniva rimosso, la scheda SD estratta e i dati trasferiti su supporto permanente per l'elaborazione *offline*.

2.4.4 Sincronizzazione neurale-comportamentale

La sincronizzazione temporale tra registrazioni neurali e comportamentali è stata garantita tramite comunicazione inter-software tra il *NeuroLogger* e la piattaforma di acquisizione comportamentale *EthoLoop*. All'avvio della videoregistrazione, *EthoLoop* inviava un impulso di sincronizzazione TTL (*Transistor-Transistor Logic*) a un ricetrasmittitore in comunicazione con il *NeuroLogger*; tale segnale veniva salvato nell'*autolog* del dispositivo e successivamente utilizzato in fase di analisi per allineare i dati elettrofisiologici ai *timestamp* video, garantendo una corrispondenza temporale alla scala del millisecondo.

2.5 Ambiente Sperimentale e Setup in Movimento Libero

Tutte le sessioni si sono svolte nell'*EthoControl Room* (ECR) (figura 2.2), una piattaforma neuroetologia dedicata progettata per acquisire simultaneamente dati neurali e comportamentali in primati in movimento libero, superando i limiti spaziali e comportamentali dei paradigmi con soggetto seduto su sedia.



Figura 2.2. Illustrazione schematica dell'ECR che raffigura una scimmia dotata del dispositivo di registrazione wireless (Baldi et al., preprint 2025).

L'ECR è una stanza di circa $2,25 \times 1,94 \times 2,11$ m (lunghezza $\times$ larghezza $\times$ altezza), delimitata da pannelli di vetro trasparente anti-riflesso che consentono il monitoraggio visivo e la videoregistrazione, isolando al contempo l'ambiente dalle aree di stabulazione circostanti. Durante le sessioni, la porta dell'ECR rimaneva chiusa per evitare interazioni visive con altri animali e ridurre le stimolazioni sensoriali esterne non controllate.

La configurazione interna era pensata per favorire comportamenti naturalistici, poiché il pavimento era coperto da una lettiera in legno e l'ambiente era arricchito con corde e appoggi rialzati per favorire il movimento tridimensionale e la variabilità posturale. Piccoli pezzi di frutta fresca e frutta secca venivano distribuiti nell'area per stimolare l'esplorazione spontanea e il *foraging*, senza però imporre alcuna struttura di compito.

Gli sperimentatori non intervenivano durante le sessioni, se non per il monitoraggio di routine.

Ciascuna sessione seguiva una procedura standardizzata. Il dispositivo di registrazione *wireless* veniva montato sulla testa del macaco impiantato mentre l'animale era brevemente seduto su una sedia per primati; prima del rilascio, il corretto funzionamento del sistema veniva verificato. L'animale veniva quindi trasferito nell'ECR e rilasciato; la registrazione neurale era già in corso per garantire la cattura completa dall'inizio della sessione. Non appena il soggetto impiantato entrava nell'ECR, il partner non impiantato veniva introdotto nell'ambiente, dando avvio all'interazione sociale spontanea.

Il comportamento veniva monitorato con un sistema multi-camera composto da telecamere fisse e motorizzate posizionate attorno al recinto. Le telecamere fisse fornivano una copertura continua dell'intero spazio e permettevano il tracciamento in tempo reale delle posizioni degli animali; le telecamere motorizzate adeguavano dinamicamente il loro orientamento per mantenere la visione ad alta risoluzione di ciascun soggetto durante lo spostamento e le interazioni. Il sistema era controllato dal *software EthoLoop*, che eseguiva il tracciamento automatico basato su collari colorati indossati dai macachi. *EthoLoop* gestiva inoltre la sincronizzazione con il sistema di acquisizione neurale, inviando il segnale TTL al *software* del *NeuroLogger* per garantire l'allineamento temporale tra segnale elettrofisiologico e video.

I dati video venivano archiviati per l'annotazione comportamentale *offline* e la successiva integrazione con i dati neurali. La combinazione di acquisizione *wireless* e tracciamento multi-camera automatizzato ha permesso di registrare simultaneamente i segnali di popolazione neurale e un repertorio ricco di comportamenti non vincolati, fornendo i dati su cui si basano le analisi che verranno descritte nelle sezioni successive.

2.6 Annotazione Comportamentale e Definizione dell'Etogramma

I dati comportamentali sono stati annotati offline dalle videoregistrazioni sincronizzate acquisite durante ciascuna sessione, utilizzando BORIS (*Behavioral Observation Research Interactive Software*; versione 9.4.1), un *software open-source* per l'osservazione etologica sistematica (Friard e Gamba, 2016). BORIS consente

l'annotazione manuale *frame-accurate* di categorie comportamentali predefinite e la generazione di log temporali adatti all'analisi quantitativa.

Prima dell'avvio dell'annotazione su larga scala, è stato definito un etogramma adeguato a descrivere in modo strutturato e coerente il repertorio comportamentale spontaneo degli animali nel contesto sperimentale. Gli stati comportamentali erano concepiti come attività temporalmente estese, caratterizzate da un *pattern* motorio, esplorativo o sociale riconoscibile; ciascuno stato veniva annotato segnandone l'inizio e la fine con precisione al singolo *frame*, producendo una serie temporale continua per l'intera durata di ogni sessione.

L'etogramma comprendeva i seguenti stati:

- *Resting*: l'animale rimane seduto o fermo, senza impegnarsi in movimento evidente, manipolazione di oggetti o interazione diretta con il partner.
- *Locomotion*: sono state distinte due sottocategorie, *normal locomotion*, ovvero spostamento attivo nell'ambiente, inclusi camminata, arrampicata e movimenti prolungati, e *stereotyped locomotion*, caratterizzata da movimenti ripetitivi avanti e indietro privi di direzione apparente.
- *Foraging*: ricerca e recupero attivo di cibo, inclusa la manipolazione del materiale della lettiera per localizzare cibo nascosto.
- *Eating*: ingestione di cibo dopo il recupero, comprendente il portare il cibo alla bocca e masticarlo.
- *Mouthing*: manipolazione o esplorazione orale di oggetti o superfici non alimentari.
- *Exploration*: ispezione visiva o manuale di elementi dell'ambiente non correlata al recupero del cibo, tipicamente accompagnata da sguardo sostenuto, lievi aggiustamenti posturali e piccoli movimenti.
- *Grooming (allogrooming)*: manipolazione manuale o orale del pelo o della pelle del partner.
- *Received grooming*: periodi in cui l'animale riceveva grooming dal partner.
- *Self-grooming*: comportamento di *grooming* diretto verso il proprio corpo.

- *Scratching*: comportamento di grattarsi ripetutamente il proprio corpo
- *Lying partner*: postura parzialmente o completamente orizzontale, associata a ridotta attività motoria.
- *Presenting partner*: postura in cui l'individuo si dispone con il dorso o la regione posteriore rivolti verso il partner.
- *Lip-smacking*: rapidi movimenti ritmici delle labbra, tipicamente associati a comunicazione affiliativa o di apprezzamento.

Per ciascuno stato sono stati definiti criteri operativi espliciti, in modo da garantire un'identificazione coerente tra sessioni. L'inizio di uno stato veniva marcato al primo *frame* in cui le sue caratteristiche erano chiaramente osservabili; la fine corrispondeva all'avvio di un altro comportamento distinto. Movimenti transitori di breve durata non venivano codificati come stati indipendenti, a meno che non determinassero un contesto comportamentale qualitativamente diverso.

Il risultato dell'annotazione è una sequenza continua e mutuamente esclusiva di stati comportamentali, allineata alla base temporale della registrazione neurale. Questa rappresentazione preserva la continuità temporale naturale del comportamento spontaneo e costituisce il *framework* di riferimento per l'interpretazione delle dinamiche di popolazione neurale e della struttura degli stati latenti.

2.7 Preprocessing dei Dati Neurali

2.7.1 Recupero dei dati e condizionamento del segnale

Al termine di ciascuna sessione, i dati registrati sui 128 canali venivano scaricati dalla scheda SD del *NeuroLogger* e trasferiti su supporto permanente per l'elaborazione offline. Per garantire la coerenza nell'identificazione delle *units* tra le diverse giornate di registrazione, le sessioni dello stesso animale sono state concatenate e processate congiuntamente durante lo *spike sorting*, facilitando il riconoscimento stabile dei cluster neuronali nel tempo.

Prima della rilevazione degli spike, i segnali a banda larga, già filtrati tra 2 e 6000 Hz in acquisizione, sono stati sottoposti a ulteriori step di *preprocessing* per ottimizzare la qualità del segnale. È stato applicato un filtraggio in banda passante tra 300 e 6000 Hz

per isolare l'attività correlata agli *spike*; un filtro *notch* è stato utilizzato per attenuare il rumore di rete; infine, una sottrazione di riferimento comune globale ha ridotto le componenti di rumore condivise tra i canali.

2.7.2 Rilevazione e sorting degli spike

La rilevazione degli *spike* è stata eseguita in modo indipendente su ciascun canale mediante *thresholding* di ampiezza, con soglie impostate a 3,5 deviazioni standard dalla media del segnale del canale. Gli eventi che superavano questa soglia venivano estratti come forma d'onda analizzabile.

Lo *spike sorting* è stato effettuato *offline* con il *framework SpikeInterface* (versione 0.97.1), che offre un'interfaccia standardizzata per il *preprocessing* e l'integrazione con algoritmi di *clustering* esterni. Il *clustering* vero e proprio è stato eseguito con PyKilosort, che raggruppa le forme d'onda in unità neuronali putative sulla base della loro similarità e struttura nello spazio delle feature.

Dopo il *clustering* automatico, ciascun cluster è stato revisionato manualmente nell'ambiente Phy, valutando la morfologia delle forme d'onda, le proiezioni sulle componenti principali e le distribuzioni degli intervalli *inter-spike* (ISI). I *cluster* corrispondenti a rumore o artefatti sono stati rimossi; dove necessario, *cluster* adiacenti sono stati uniti o suddivisi per migliorare la qualità dell'isolamento.

2.7.3 Selezione delle single unit ed esportazione dei dati

Per selezionare le *single unit* ben isolate, sono stati applicati criteri di qualità quantitativi. L'*ISI violation ratio* è stato calcolato per stimare la contaminazione del periodo refrattario: sono state mantenute solo le *units* al di sotto della soglia di contaminazione predefinita. Il rapporto segnale-rumore (SNR), definito come il rapporto tra l'ampiezza di picco della forma d'onda media e il rumore di fondo sul medesimo canale, è stato utilizzato come ulteriore criterio di esclusione. Le *units* con *pattern* di *firing rate* instabili o con una presenza inconsistente tra le sessioni sono state scartate per garantire l'affidabilità del *dataset* finale.

Per ciascuna *unit* selezionata, i tempi di *spike* sono stati estratti come vettori riferiti alla linea temporale della sessione, costituendo *l'input* al modello HMM descritto nella sezione successiva.

2.8 HMM Applicato al Dataset

2.8.1 Introduzione

Il *dataset* neurofisiologico analizzato in questo studio può essere descritto come un sistema dinamico complesso: i segnali neuronali registrati simultaneamente catturano l'attività coordinata della popolazione durante un comportamento spontaneo e non vincolato, e i *pattern* di *firing* che si succedono nel tempo formano una serie temporale multivariata che riflette le dinamiche neurali in evoluzione. Nelle sezioni seguenti è descritta l'implementazione del *gaussian* HMM per l'analisi dell'attività registrata dalla corteccia premotoria ventrale (PMv) e dalla corteccia prefrontale ventrolaterale (vlPFC) in macachi in movimento non vincolato.

2.8.2 Organizzazione del Dataset e Matrici Analitiche

L'implementazione del *gaussian* HMM ha richiesto di strutturare i dati sperimentali in un formato adatto alla modellazione. Per ogni sessione sono stati costruiti due *dataset* allineati temporalmente: una matrice neurale, che descrive l'attività di popolazione, e una matrice comportamentale, che codifica le annotazioni etologiche.

La matrice neurale era organizzata con un'osservazione temporale per riga e una single *unit* per colonna. Solo l'attività *single-unit* è stata inclusa nelle analisi. Ciascuna sessione è stata trattata in modo indipendente, senza concatenare i dati tra giorni diversi, per preservare le proprietà statistiche specifiche di sessione ed evitare l'introduzione di transizioni artificiali non correlate alle dinamiche neurali reali.

Le annotazioni comportamentali sono state organizzate in una matrice con la stessa griglia temporale della matrice neurale, in cui ogni riga rappresenta la configurazione comportamentale dell'animale in un determinato istante e ogni colonna corrisponde a una categoria comportamentale. I dati comportamentali non sono stati utilizzati durante il *fitting* del modello, ma sono stati riservati esclusivamente alla validazione *post hoc* degli stati inferiti.

2.8.3 Preparazione dei Dati Neurali

A partire dai tempi di *spike* grezzi, è stata ricavata una rappresentazione continua del *firing rate* adatta all'analisi con *gaussian* HMM, seguendo una *pipeline* implementata in Python con *script* sviluppati ad *hoc*.

I tempi di *spike* sono stati prima mappati su una linea temporale comune di sessione e discretizzati a 1 ms di risoluzione. Gli *spike trains* risultanti sono stati poi convoluti con un kernel Gaussiano ($\sigma = 50$ ms) per ottenere stime continue del *firing rate*, attenuando le fluttuazioni ad alta frequenza e preservando la struttura temporale dell'attività di popolazione. Il segnale è stato infine campionato in *bin* non sovrapposti da 1 secondo, producendo una matrice di osservazioni neurali di dimensioni $T \times N$, dove T è il numero di *bin* e N il numero di *single unit*. Dove necessario, è stato applicato del *padding* per rendere la durata della sessione un multiplo esatto del bin.

La scelta della risoluzione di 1 secondo è stata motivata da due considerazioni complementari: da un lato, questa finestra ha prodotto il miglior adattamento ai dati rispetto alle risoluzioni alternative testate nelle analisi preliminari (50 ms, 250 ms e 500 ms); dall'altro, è coerente con la durata tipica degli stati comportamentali osservati nell'etogramma, rendendo il *binning* temporale compatibile con la scala dei fenomeni di interesse.

2.8.4 Codifica dei Dati Comportamentali

Le annotazioni comportamentali prodotte con BORIS (capitolo 2.6) sono state elaborate in Python per generare matrici comportamentali allineate alle registrazioni neurali. Ciascuna sessione è stata suddivisa in *bin* consecutivi da 1 secondo, coerentemente con la risoluzione adottata per i dati neurali.

Ogni categoria comportamentale è stata codificata come vettore binario indipendente: il valore 1 indica la presenza del comportamento in un dato *bin*, 0 la sua assenza. La procedura di codifica garantisce che anche gli eventi brevi non vengano persi durante la discretizzazione e che le annotazioni siano allineate al *bin* temporale più vicino. La matrice comportamentale risultante aveva dimensioni $T \times B$, dove T è la durata della sessione in secondi e B il numero di categorie comportamentali distinte.

Come già anticipato, i dati comportamentali non hanno preso parte al *fitting* del modello e sono stati utilizzati esclusivamente per la valutazione e l'interpretazione etologica degli *hidden state* inferiti.

2.8.5 Addestramento del Gaussian HMM e Selezione del Modello

I modelli sono stati implementati in *Python* con la libreria *HMMlearn*, addestrando un modello indipendente per ciascuna sessione. Prima del *fitting*, le matrici neurali sono state standardizzate con una trasformazione *z-score* applicata a ogni *units* separatamente, in modo che tutte le *units* contribuissero in misura comparabile alla stima dei parametri, indipendentemente dalla propria varianza assoluta.

L'addestramento è stato condotto con l'algoritmo *Expectation-Maximization* (EM), con un massimo di 500 iterazioni e una soglia di convergenza di 10^{-6} sul miglioramento del *log-likelihood*. Ciascun modello è stato addestrato più volte con inizializzazioni casuali diverse per ridurre la dipendenza dall'inizializzazione e quindi dal rischio di convergenza ai minimi locali.

Il numero di stati nascosti è stato esplorato nell'intervallo 15–40, in accordo con i risultati ottenuti dai test preliminari. La selezione del numero ottimale di stati è avvenuta tramite il Criterio di Informazione Bayesiano (BIC):

$$\text{BIC} = -2\log L + k\log(n),$$

dove $\log L$ è il *log-likelihood* del modello, k il numero di parametri liberi (calcolato assumendo emissioni gaussiane a covarianza diagonale) e n il numero di osservazioni. il modello finale selezionato corrisponde a quello con il BIC più basso, considerato la migliore approssimazione del minimo globale.

Per garantire la stabilità numerica in uno spazio ad alta dimensionalità, è stata adottata una struttura di covarianza diagonale, integrata da parametri di regolarizzazione per la stima della covarianza e degli aggiornamenti delle probabilità di transizione. I calcoli di probabilità sono stati eseguiti in *log-space* per ridurre il rischio di *underflow* numerico. Durante l'addestramento venivano salvati *checkpoint* intermedi, consentendo il recupero

dei risultati in caso di interruzione. Dopo la selezione del modello, la sequenza di stati più probabile per ciascuna sessione è stata decodificata con l'algoritmo di Viterbi, ottenendo un'etichetta di stato discreta per ogni *bin* da 1 secondo.

2.8.6 Validazioni Post Hoc

Dopo la decodifica con Viterbi, sono state condotte una serie di analisi post *hoc* per esaminare la struttura degli stati nascosti inferiti e valutarne la rilevanza comportamentale. In tutte le analisi, i *bin* corrispondenti a periodi *out-of-recording* sono stati esclusi per evitare *pattern* di co-occorrenza artificiali.

L'analisi ha riguardato la costruzione di una matrice di corrispondenza stato-comportamento. Per ciascun macaco, la matrice è stata calcolata sui comportamenti comuni a tutte le sessioni, esprimendo le probabilità condizionali $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in forma percentuale. La matrice è stata normalizzata per riga, in modo da evidenziare come ciascun comportamento si distribuisce tra i diversi stati nascosti. Successivamente, è stato applicato un filtro per escludere gli stati poco informativi: uno stato veniva mantenuto solo se almeno una categoria comportamentale presentava una probabilità condizionale superiore al 20%. Formalmente, uno stato s veniva escluso se:

$$\max_b P(s \mid b) \leq 20\%.$$

Successivamente, è stato applicato un *clustering* gerarchico basato sulla distanza euclidea per esplorare le relazioni strutturali tra gli stati mantenuti, condotto su una versione della matrice di corrispondenza normalizzata per colonna: ciascuna colonna, che rappresenta uno stato, è stata riscalata affinché i suoi valori sommassero al 100%, equalizzando l'*occupancy* complessiva degli stati e focalizzando l'analisi sulla loro composizione comportamentale. Le distanze euclidee tra i vettori di stato sono state calcolate e il *clustering* è stato eseguito con *average linkage*. L'ordine del dendrogramma è stato utilizzato per riorganizzare la *heatmap*, raggruppando visivamente gli stati con profili comportamentali simili.

In parallelo, la struttura interna del modello è stata valutata tramite divergenza di Kullback-Leibler (KL) tra le distribuzioni di emissione gaussiane associate a ciascuna coppia di stati. In un *gaussian* HMM a covarianza diagonale, ogni stato è descritto da un vettore medio μ_s e da un vettore di varianza σ_s^2 . Ogni componente di questi vettori corrisponde ai valori derivati dal *firing rate* di ciascun neurone registrato. Dunque, La divergenza KL è stata calcolata dal confronto dall'attività degli stessi neuroni in ogni coppia di stati (i, j), in maniera tale da quantificare la differenza delle rispettive distribuzioni di emissione in termini di attività media e di variabilità. Poiché la KL è asimmetrica, è stata adottata la seguente formula simmetrizzata:

$$D_{sym}(i, j) = \frac{1}{2} (D_{KL}(i \parallel j) + D_{KL}(j \parallel i)).$$

I risultati sono stati trasformati in una misura di similarità *bounded* tramite mappatura esponenziale, $\exp(-D_{sym})$, e organizzati in una matrice stato-stato su cui è stato eseguito un ulteriore *clustering* gerarchico. Questa analisi valuta il modello internamente in maniera indipendente dai dati comportamentali, permettendo così di verificare se gli stati inferiti corrispondano a configurazioni neurali effettivamente distinte o si sovrappongano nello spazio di attività.

Per confrontare direttamente i due riordinamenti, quello basato sulla similarità neurale (KL) e quello basato sull'associazione comportamentale (euclidea), è stata condotta un'analisi di cross-riordinamento: la matrice KL è stata riorganizzata secondo l'ordine euclideo, e viceversa. La concordanza tra i due riordinamenti indica che gli stati con profili neurali simili tendono a condividere profili comportamentali simili; eventuali differenze segnalano invece possibili dissociazioni funzionali di interesse biologico.

Capitolo 3 - Risultati

3.1 Selezione del modello e stabilità del numero degli stati latenti

Il primo livello di analisi necessario per poter applicare dati neurali al modello HMM è quello di individuare il numero ottimale degli stati latenti per ogni sessione. Come descritto nel capitolo 2.8.5, la selezione del modello è stata effettuata tramite il *Bayesian Information Criterion* (BIC). Questo criterio è stato utilizzato perché bilancia la complessità del modello con l'accuratezza della configurazione dei dati, permettendo di individuare la rappresentazione più efficiente. Il modello finale selezionato è quello caratterizzato dal valore di BIC più basso.

Nonostante la variabilità del repertorio comportamentale e della durata delle registrazioni tipica dei paradigmi *freely moving*, il numero di stati individuato dal BIC è risultato relativamente stabile tra le sessioni appartenenti allo stesso soggetto. Per M1 (individuo subordinato, 7 anni, impianto nell'emisfero destro), le tre sessioni hanno prodotto rispettivamente 30, 32 e 25 stati latenti. Per M2 (individuo dominante, 15 anni, impianto nell'emisfero sinistro), le tre sessioni hanno restituito 29, 29 e 25 stati. In nessun caso il modello ottimale ha richiesto meno di 25 o più di 32 stati latenti.

3.2 Matrici di corrispondenza tra stati e comportamento

Per indagare la correlazione tra stati inferiti dal modello HMM e gli stati comportamentali è stata costruita una matrice di corrispondenza. Come descritto nel capitolo 2.8.6, la matrice è stata costruita in tre passaggi diversi: inizialmente, a partire dai risultati del modello è stato assegnato ad ogni bin lo stato latente più probabile attraverso l'algoritmo di Viterbi; in seguito, sono state allineate le matrici neurali e le matrici comportamentali di uguale dimensione temporale ed è stata creata la matrice di corrispondenza tra stati comportamentali e stati latenti mediante la probabilità condizionata $P(\text{stato} | \text{comportamento})$; infine, per ottenere una rappresentazione interpretabile, la tabella è stata normalizzata per riga, in maniera tale da avere una percentuale del tempo in cui uno stato latente è presente durante l'esecuzione di un determinato comportamento. Successivamente, la tabella è stata visualizzata mediante una *heatmap* per facilitare un'iniziale esplorazione visiva dei risultati. L'aumento dell'intensità dei colori dei grafici riflette la forza della corrispondenza tra stati e comportamenti. Inoltre, è stato applicato

un filtro tale per cui venissero considerati soltanto gli stati rappresentativi di almeno il 20% del tempo totale di uno o più comportamenti così da semplificare l'analisi, concentrandosi su gli stati maggiormente interpretabili ed escludendo quelli temporalmente meno rilevanti.

Molte osservazioni risultano qualitativamente consistenti tra le diverse sessioni; per questa ragione, nella presentazione e nella discussione dei risultati verrà riportato un esempio rappresentativo per ciascuna scimmia. Per M2 sarà mostrata la sessione 2022_08_24 (Figura 3.1), nella quale il modello ha identificato 10 stati latenti dopo l'applicazione del *cut-off* del 20%. Per M1 è stata invece selezionata la sessione 2022_09_06 (Figura 3.2), caratterizzata dalla presenza di 8 stati latenti significativamente associati ai comportamenti dopo l'applicazione del filtro. Le matrici relative alle restanti sessioni sono riportate nell'Appendice B.

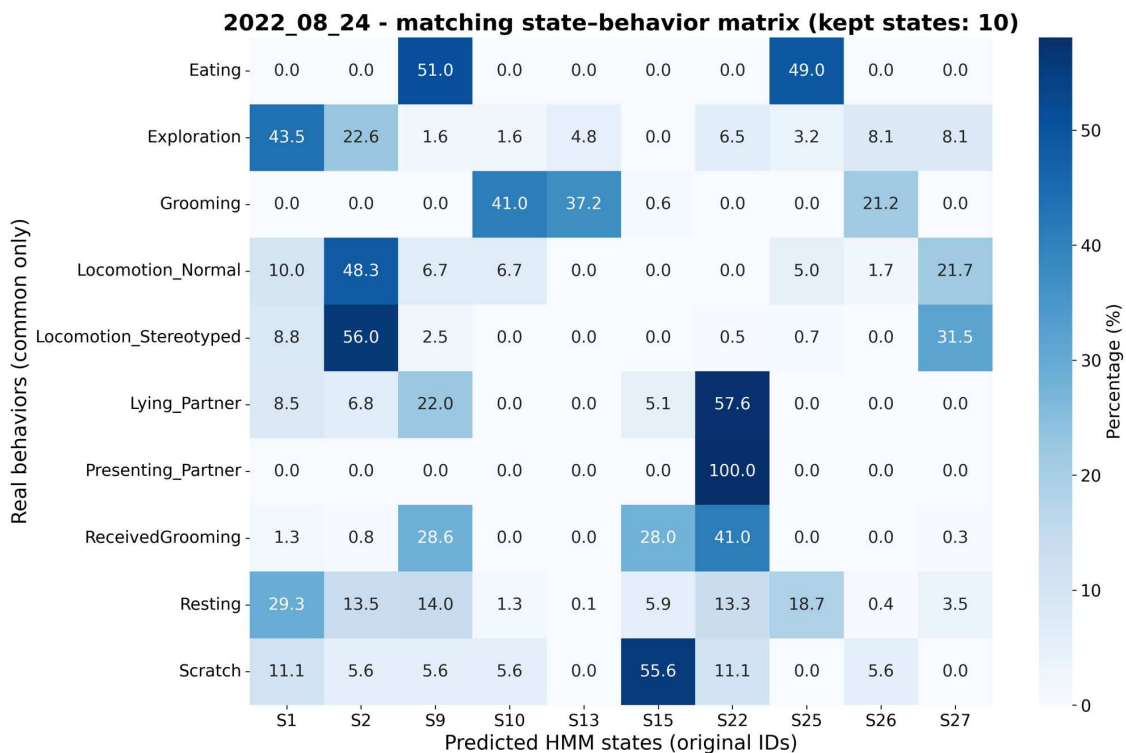


Figura 3.1- Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M2 (sessione 2022_08_24, stati trovati: 10). Ogni riga corrisponde a una categoria comportamentale comune a tutte le sessioni di M2; ogni colonna a uno stato dell'HMM. I valori nelle celle indicano $P(\text{stato}|\text{comportamento})$ (%). Sono mostrati solo gli stati per i quali almeno un comportamento supera la soglia del 20%. Gli identificativi degli stati corrispondono agli indici assegnati durante il training del modello.

Nel soggetto M2, sessione 2022_08_24, il comportamento di *grooming* risulta principalmente associato agli stati S10, S13 e S26, che rappresentano rispettivamente il 41.0%, il 37.2% e il 21.2% del tempo totale. Per tutti gli altri comportamenti le corrispondenze trovate con questi stati rimangono inferiori all'8.1%.

Un risultato tra i più rilevanti riguarda lo stato S22: questo stato latente rappresenta sia il 100.0% dei *time bin* classificati come *presenting partner*, sia il 41.0% di *received grooming* e il 57.6% di *lying partner*. Dunque, tre categorie comportamentali differenti vengono codificate dallo stesso stato.

Il *received grooming* mostra una distribuzione parzialmente distinta: questo comportamento risulta associato soprattutto agli stati S9, S15 e S22, che contribuiscono rispettivamente al 28.6%, al 28.0% e al 41.0% dei *time bin* corrispondenti.

In particolare, lo stato S15 rappresenta per il 55.6% il comportamento di *scratch*.

Nella stessa sessione, *exploration* e *resting* condividono parzialmente lo stato S1, che rappresenta rispettivamente il 43.5% e il 29.3% dei due comportamenti.

Exploration risulta inoltre associato allo stato S2 per il 22.6% del tempo totale, stato che rappresenta anche il 48.3% di *normal locomotion* e il 56.0% di *stereotyped locomotion*.

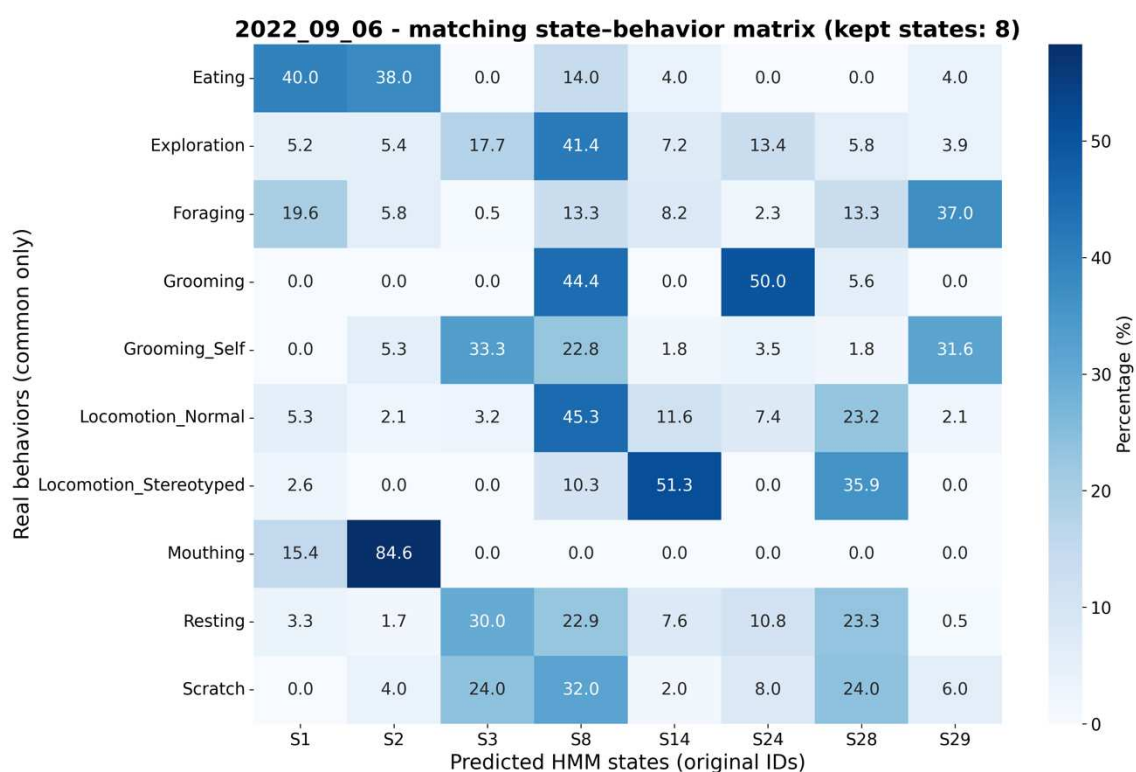


Figura 3.2- Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M1 (sessione 2022_09_06, stati trovati: 8). Ogni riga corrisponde a una categoria comportamentale comune a tutte le sessioni di M1; ogni colonna a uno stato dell'HMM. I valori nelle celle indicano $P(\text{stato}|\text{comportamento})$ (%). Sono mostrati solo gli stati per i quali almeno un comportamento supera la soglia del 20%. Gli identificativi degli stati corrispondono agli indici assegnati durante il training del modello.

Nel soggetto M1, sessione 2022_09_06, gli stati S1 e S2 rappresentano la maggior parte del comportamento di *eating*, contribuendo rispettivamente al 40.0% e al 38.0% del tempo totale associato a questo comportamento. In particolare, anche lo stato S2 risulta associato al comportamento di *mouthing*, con una corrispondenza pari all'84.6%.

Nella stessa sessione, *resting*, *scratch* e *self grooming* mostrano una parziale corrispondenza sullo stato S3, che rappresenta rispettivamente il 30.0%, il 24.0% e il 33.3% del tempo totale di questi comportamenti.

Self grooming risulta inoltre associato anche allo stato S29, che corrisponde al 31.6% del comportamento. Nel *foraging*, invece, lo stato S29 rappresenta il 37.0% del tempo totale.

Una differenza emerge confrontando *grooming* e *self grooming*. Lo stato S24 rappresenta il 50.0% del *grooming*, ma solo il 3.5% del *self Grooming*. Gli stati S3 e S29, invece, risultano associati a *self grooming*, rispettivamente con il 33.3% e il 31.6%, mentre codificano lo 0% del tempo totale di *grooming*.

Il comportamento di *locomotion normal* è associato agli stati S8 e S28 rispettivamente per il 45.3% e 23.2%, mentre il *locomotion stereotyped* è rappresentato dagli stati latenti S14 e S28 per il 51.3% e il 35.9%.

3.3 Analisi sui clustering degli stati con distanza euclidea

Per poter effettuare un confronto tra stati è necessario passare a un diverso livello di analisi. Per questo, secondo il metodo riportato nel paragrafo 2.8.6, è stato applicato un *clustering* gerarchico basato sulla distanza euclidea, calcolata tra stati latenti, confrontando i loro vettori di probabilità condizionate degli stati comportamentali. L'analisi è stata svolta sui vettori dei risultati normalizzati per colonna, in modo da ottenere un dendrogramma in grado di raggruppare gli stati in base alla similarità dei comportamenti che maggiormente rappresentano.

L'ordine del dendrogramma è stato poi utilizzato per riordinare le colonne della matrice di corrispondenza. Gli stati caratterizzati da *pattern* comportamentali simili sono stati riordinati in posizioni adiacenti, rendendo più immediata la visualizzazione dei gruppi di stati che rappresentano gli stessi comportamenti. Per mantenere consistenza con i risultati precedenti la riorganizzazione è stata applicata sulla matrice iniziale invece che sui dati normalizzati per colonna. La figura 3.3 e la figura 3.4 rappresentano rispettivamente il dendrogramma di M2 (sessione 2022_08_24) e la sua *heatmap* riordinata, mentre la figura 3.5 e 3.6 il dendrogramma e la matrice riordinata di M1 (sessione 2022_09_06). Per i dendrogrammi delle altre sessioni si rimanda all'appendice B.

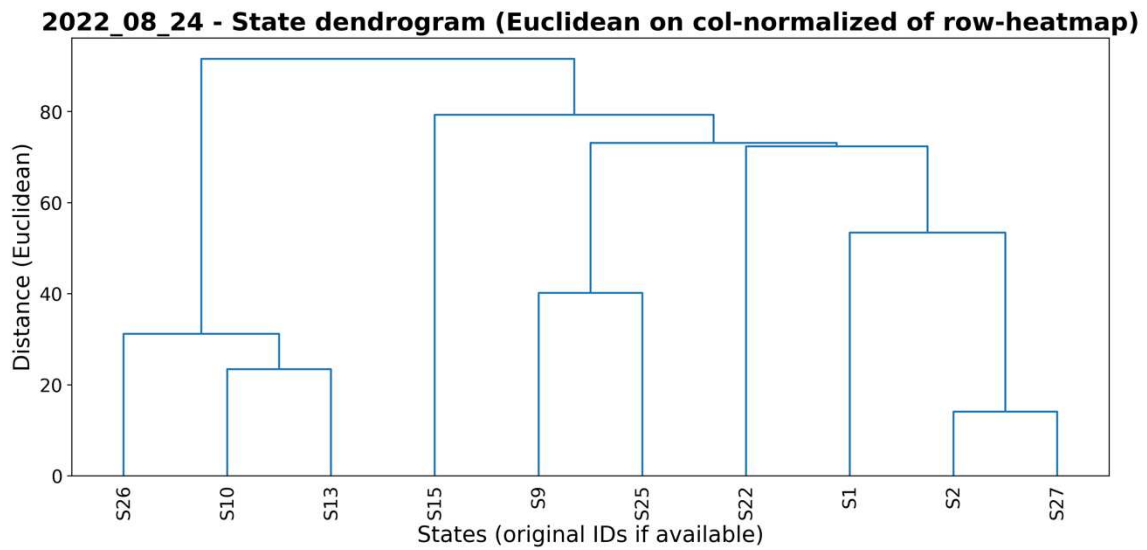


Figura 3.3. Dendrogramma del clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M2 (sessione 2022_08_24). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello

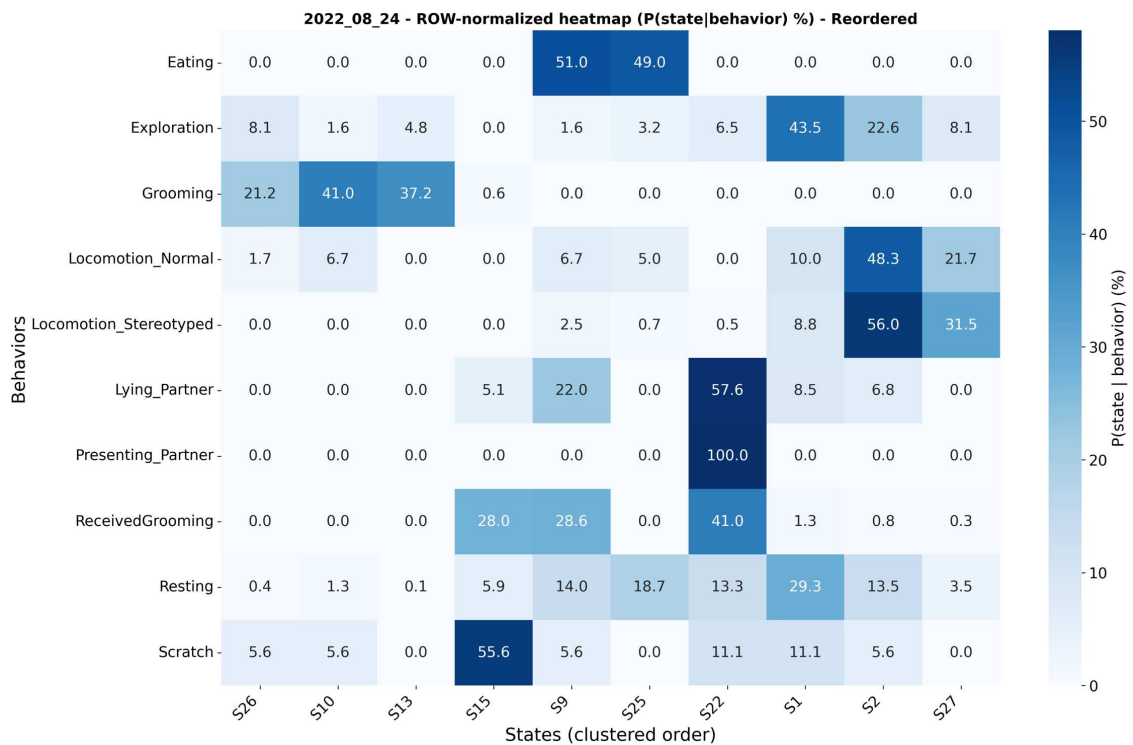


Figura 3.4. Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M2 (sessione 2022_08_24). Il dendrogramma corrispondente è rappresentato in Figura 3.3. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} | \text{comportamento})$ in percentuale.

Per il soggetto M2, sessione 2022_08_24, diversi *cluster* sono risultati rilevanti a partire dalla matrice riordinata: gli stati S26, S10 e S13, associati principalmente al comportamento di *grooming*; gli stati S2 e S27, associati rispettivamente a *normal locomotion* e *stereotyped locomotion*. Lo stato S22, rappresentativo di *lying partner*,

presenting partner e received grooming, risulta in vicinanza con gli stati S15 e S9, che rappresentano in maniera parziale gli stessi comportamenti.

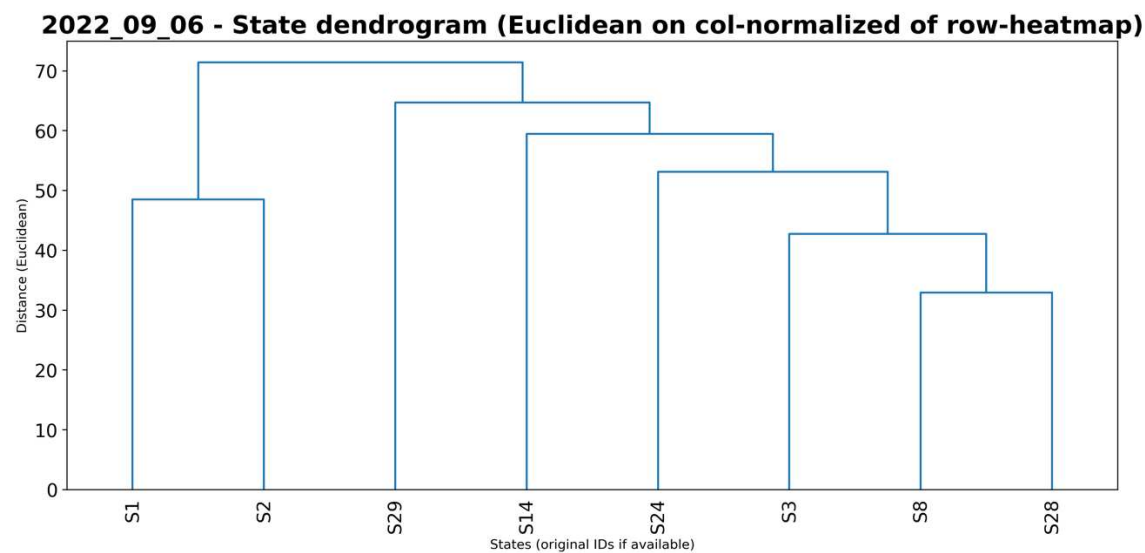


Figura 3.5. Dendrogramma relativo al clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_06). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello.

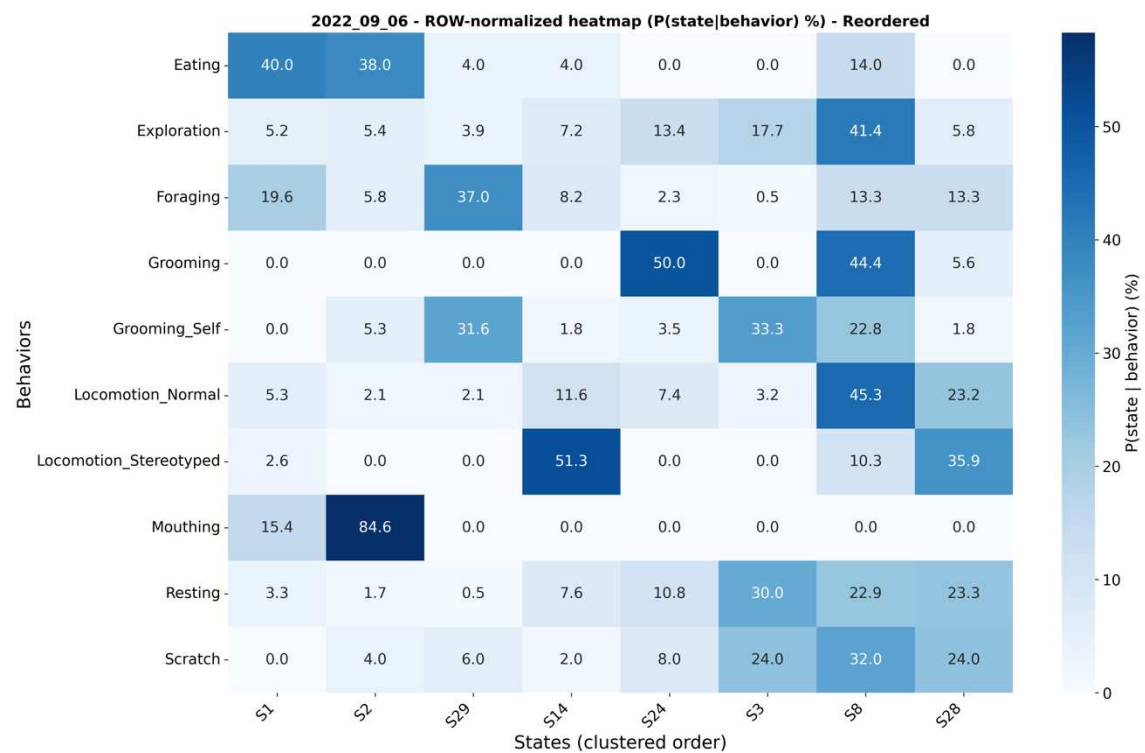


Figura 3.6. Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_06). Il dendrogramma corrispondente è rappresentato in Figura 3.5. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.

Per il soggetto M1, sessione 2022_09_06, i *cluster* trovati sono: gli stati S1 e S2, rappresentativi di *eating* e *mouthing*; gli stati S8 e S28, che descrivono parzialmente *normal locomotion* e *stereotyped locomotion*; e gli stati S3 e S24, rispettivamente rappresentativi di *grooming self* e *grooming* sono stati ricollocati vicini in base alla distanza euclidea.

3.4 Analisi sulla divergenza di Kullback-Leibler

Gli ultimi risultati, come descritto nel capitolo 2.8.6, sono stati trovati grazie a un'analisi di divergenza di Kullback-Leibler (KL). Per valutare le relazioni tra gli stati latenti identificati dal modello, sono state analizzate le rispettive distribuzioni gaussiane di emissione dell'attività neurale, che ne rappresentano le proprietà interne e distintive. Il *clustering* gerarchico basato sulla divergenza di KL permette di quantificare quanto siano distinguibili i profili di *firing rate* di due stati latenti, e di conseguenza di valutare se l'attività di popolazione neurale si trovi in una configurazione simile o comparabile tra i due stati. Come per la distanza euclidea, le matrici di corrispondenza stato-comportamento sono state riordinate in base ai risultati ottenuti dalla divergenza di KL.

La figura 3.7 e 3.8 rappresentano rispettivamente il dendrogramma derivato dall'analisi sulla divergenza di KL del soggetto M2, sessione 2022_08_24, e la corrispondente matrice di corrispondenza riordinata. La figura 3.9 e 3.10 rappresentano invece il dendrogramma e la matrice riordinata del soggetto M1, sessione 2022_09_06. Si rimanda all'Appendice B per visionare i dendrogrammi relativi alle altre sessioni.

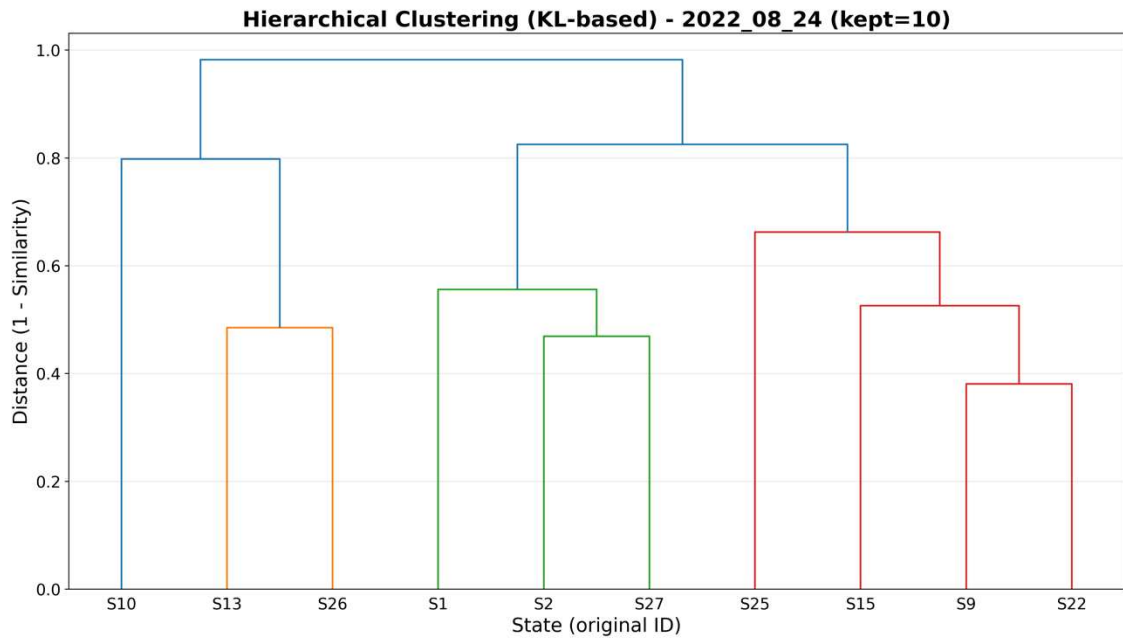


Figura 3.7. Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M2 (sessione 2022_08_24). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.

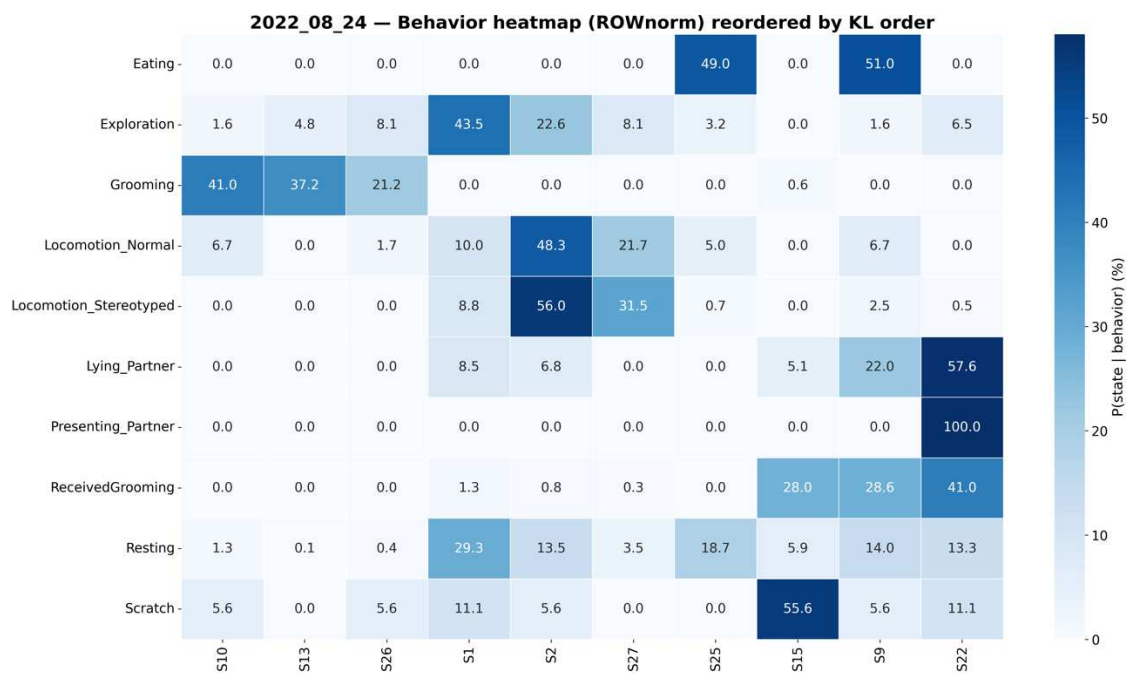


Figura 3.8. Matrice di corrispondenza stato -comportamento per M2 (sessione 2022_08_24), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{state} | \text{comportamento})$ in percentuale.

Per M2, sessione 2022_08_24, l'analisi sulla divergenza di KL ha portato ai seguenti risultati: gli stati S10, S13 e S26, principalmente rappresentativi del *grooming*, formano un *cluster*; gli stati S15, S9 e S22, associati principalmente a *received grooming*, *lying partner* e *presenting partner*, risultano raggruppati nella matrice riordinata tramite analisi KL; anche gli stati S1, S2 e S27, rappresentativi dei comportamenti di *locomotion* ed *exploration*, formano un cluster.

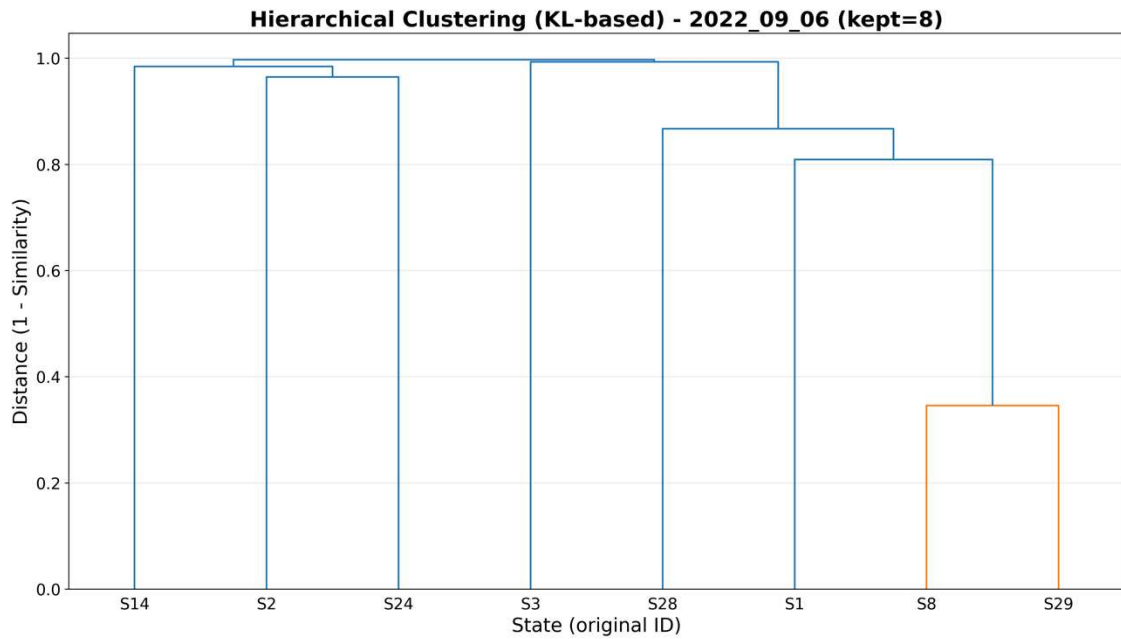


Figura 3.9. Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M1 (sessione 2022_09_06). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.

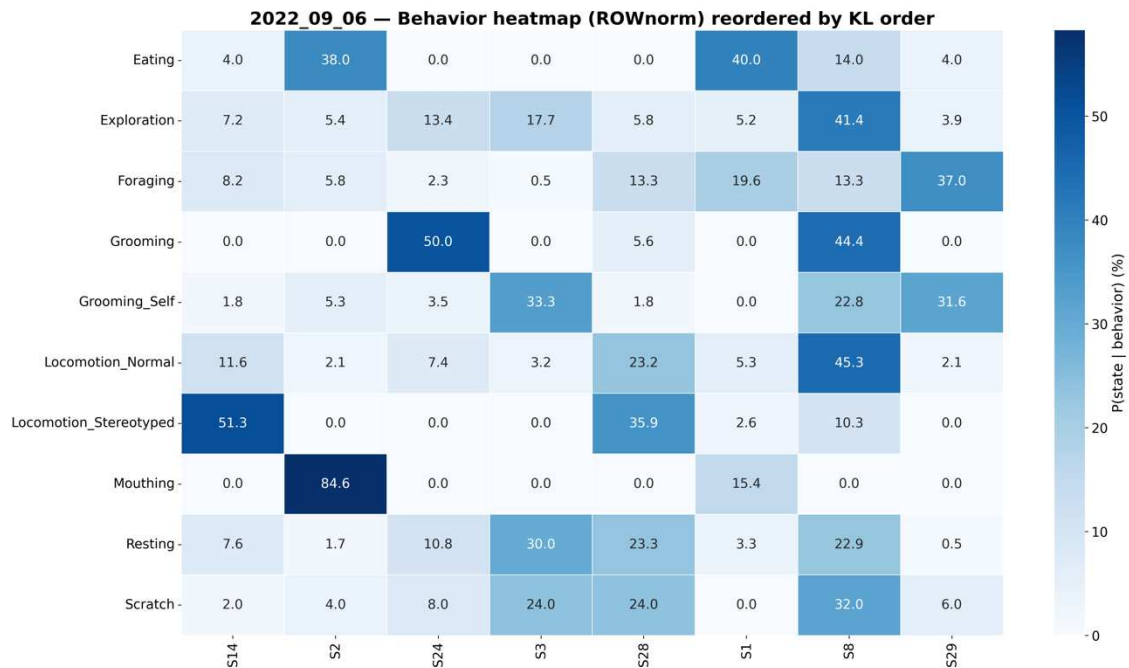


Figura 3.10. Matrice di corrispondenza stato-comportamento per M1 (sessione 2022_09_06), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{state} | \text{comportamento})$ in percentuale.

Per il soggetto M1, sessione 2022_09_06, risulta un singolo cluster composto dagli stati S8 e S29. Gli altri stati mostrano invece una struttura meno definita nella matrice riordinata.

Capitolo 4 - Discussione

Gli obiettivi principali di questo studio sono verificare se un *framework* basato su *gaussian* Hidden Markov Model sia in grado di identificare stati latenti discreti significativi a partire da dati neurali ottenuti da PMv e vIPFC, e di quantificare la loro corrispondenza con la dinamica del comportamento naturalistico in macachi *rhesus freely moving*. Questo modello è stato addestrato esclusivamente sull'attività neurale, senza accesso alle informazioni comportamentali durante l'addestramento. In particolare, l'ipotesi era che la struttura degli stati latenti estratta dal segnale neurale riflettesse *pattern* organizzati e non casuali del repertorio comportamentale dell'animale.

I risultati confermano questa ipotesi mostrando associazioni tra stati nascosti e comportamenti osservati; queste conclusioni costituiscono la scoperta principale dello studio. In entrambi i soggetti sperimentali, alcuni stati corrispondono in maniera predominante a specifiche categorie comportamentali, mentre altri vengono condivisi tra comportamenti differenti. Inoltre, diversi *pattern* osservati risultano ricorrenti tra sessioni e animali.

I risultati ottenuti dalla distanza euclidea e dalla divergenza di Kullback-Leibler, strumenti in grado di rilevare similarità tra stati neurali derivati dal modello, mostrano *cluster* rappresentativi di comportamenti che condividono caratteristiche comuni, tra cui aspetti motori, contestuali, sociali o legati ad obiettivi. Anche questi risultati sono coerenti con l'ipotesi iniziale, evidenziando la presenza di corrispondenze interpretabili e interessanti tra gli stati latenti e gli stati comportamentali osservati.

Poiché i dati sono stati acquisiti in condizioni *freely moving*, sono attese differenze inter-individuali sia nel repertorio che nella frequenza dei comportamenti.

L'associazione tra stati latenti e stati comportamentali mostra *pattern* diversi sotto il punto di vista qualitativo e quantitativo; queste differenze possono essere spiegate dalle disuguaglianze dei profili comportamentali. Il soggetto M2, l'individuo dominante nella propria diade, tende ad avere comportamenti più lenti e statici, anche perché più anziana; l'animale passa infatti buona parte delle sessioni in episodi prolungati di *resting* e di *received grooming*. La sua matrice di corrispondenza mostra stati latenti che rappresentano un numero ridotto di comportamenti, con alte e concentrate probabilità condizionali. Dopo l'applicazione della soglia del 20%, utilizzata per poter focalizzare

l'analisi sugli stati neurali più rappresentativi, M2 conserva una proporzione relativamente alta dei propri stati totali.

Per quanto riguarda il soggetto M1, l'individuo subordinato della propria diade, si osserva un *pattern* opposto: i suoi stati comportamentali sono più diversificati e brevi, mostrando una sequenza irregolare e varia. Nella sua matrice di corrispondenza, gli stati neurali conservati tendono a essere distribuiti su un maggior numero di categorie comportamentali, con probabilità più basse e maggiore sovrapposizione tra i comportamenti che rappresentano. Per questo la soglia del 20% esclude una proporzione più elevata degli stati totali di M1.

Considerando che l'obiettivo di questo studio è investigare se stati cerebrali possano riflettere stati o *pattern* comportamentali, queste differenze potrebbero causare variazioni nei risultati. L'utilizzo di una soglia fissa e arbitraria può quindi avere effetti diversi tra i soggetti.

4.1 Le correlazioni tra stato comportamentale e stato latente

I risultati presentati nel paragrafo precedente evidenziano variabilità nel modo in cui il modello codifica l'attività neurale associata ai diversi comportamenti. Tale variabilità è verosimilmente spiegata dalla coesistenza di molteplici variabili che influenzano le rappresentazioni neurali, tra cui l'utilizzo di diversi effettori, il contesto sociale, gli obiettivi delle azioni, la postura e la posizione spaziale dell'animale. A questi si aggiungono possibili stati emotivi e fisiologici interni, non identificabili però con gli strumenti di registrazione utilizzati in questo studio. Nel presente paragrafo verranno discusse le osservazioni più rilevanti emerse dall'analisi e le possibili interpretazioni dei risultati ottenuti. I due soggetti presentano sia caratteristiche individuali che *pattern* condivisi da entrambi. Inoltre, le corrispondenze osservate risultano relativamente stabili tra le diverse sessioni dello stesso soggetto; questo risultato suggerisce che le rappresentazioni neurali del comportamento presentino caratteristiche individuali stabili nel tempo.

In M2, sessione 2022_08_24, l'osservazione più rilevante riguarda lo stato S22, rappresentativo dei comportamenti di *lying*, *received grooming* e *presenting partner*, tutti e tre appartenenti alla sfera sociale. Questo risultato suggerisce che il modello sia in grado

di riconoscere l'esistenza di stati neurali che accomunano comportamenti visivamente diversi tra loro, ma che condividono una funzione comune: sia il *lying* che il *presenting*, ovvero quando l'animale si sdraia a fianco del partner o mostra la parte posteriore del corpo, sono etologicamente associati alla richiesta di *grooming*. L'aspetto particolarmente rilevante di questa osservazione è che lo stato è altamente rappresentativo di questi comportamenti nonostante essi non condividano aspetti cinematici, posturali o effettori comuni. In maniera coerente con quanto riportato in letteratura, questi risultati indicano che l'attività di popolazione nelle aree premotorie e prefrontali codifica caratteristiche legate all'obiettivo e al contesto sociale, evidenziando la multidimensionalità della codifica neurale osservabile in contesti *freely moving*. Le rappresentazioni neurali risultano più ricche e distribuite rispetto a quelle osservate nei paradigmi tradizionali e suggeriscono che l'area PMv integri la rilevanza sociale nel contesto della pianificazione motoria (Lanzarini et al., 2025; Rizzolatti et al., 2014; Borra & Luppino, 2017; Fogassi et al., 2005). Inoltre, le analisi sulla distanza euclidea mostrano un cluster tra gli stati S22 e S9 mentre quelle basate sulla divergenza KL mostrano un cluster di S22 con S9 e S15, stati che rappresentano parzialmente *lying* e *presenting partner*. Questi risultati confermano l'esistenza di una rappresentazione neurale associata a questi comportamenti e al contesto sociale relativo.

Sempre attraverso le analisi sulla distanza euclidea e sulla divergenza KL emerge un cluster definito e isolato degli stati S10, S13 e S26, rappresentativo della quasi totalità del comportamento di *grooming* a livello di configurazione neurale. Questo risultato mostra come l'attività neurale rifletta contesti e ruoli sociali diversi: il *grooming*, dove il soggetto agisce direttamente sul corpo del partner, si distingue dal *received grooming* in termini di cinematica, direzione dell'azione e asimmetria sociale (Silk et al., 2003; Schino & Aureli, 2008). Inoltre, la segregazione di questo *cluster* di stati neurali riflette la forte rilevanza del grooming all'interno del repertorio sociale dei macachi, essendo un comportamento affiliativo di fondamentale importanza per questa specie (Silk et al., 2003; Grueter et al., 2013).

Nuove considerazioni emergono dall'analisi di stati che rappresentano simultaneamente comportamenti diversi ma con caratteristiche posturali o contestuali simili: lo stato S15, con predominanza di *scratch* e *received grooming*, lo stato S1, rappresentativo di *resting* ed *exploration*, e lo stato S2, rappresentativo dei due tipi di *locomotion* e di *exploration*.

Analizzati nello specifico, la co-rappresentazione di *scratch* e *received grooming* è interpretabile dal fatto che i due comportamenti condividono caratteristiche posturali, un basso livello di attivazione, la presenza di stimolazione tattile su una parte del corpo e il luogo di esecuzione del comportamento, poiché entrambi venivano tendenzialmente eseguiti sul poggiole. Interessante anche il fatto che il comportamento di *exploration* venga rappresentato contemporaneamente sia da S1 che da S2: le analisi di divergenza KL e di distanza euclidea evidenziano la vicinanza di questi stati, mostrando come essi condividano *pattern* neurali simili. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che *l'exploration* sia un comportamento relativamente ampio ed eterogeneo. Esso comprende sottocategorie differenti caratterizzate da posture, livelli di attivazione e obiettivi spesso diversi: l'ispezione visiva condivide con il *resting* parametri posturali e di localizzazione di esecuzione, mentre la ricerca attiva, che include piccoli spostamenti, condivide con la *locomotion* caratteristiche motorie e di maggiore attivazione. Questa considerazione è coerente con le osservazioni riportate in Lanza et al. (2025), in cui si afferma che in condizioni *freely moving* emergono codifiche neurali più ricche e multidimensionali.

Anche per quanto riguarda il soggetto M1, sessione 2022_09_06, sono emerse delle osservazioni rilevanti. Il risultato più forte e consistente tra le sessioni riguarda la codifica dei comportamenti di *eating* e *mouthing*, i quali sono rappresentati quasi esclusivamente dagli stati S1 e S2 e raggruppati da un cluster specifico tramite distanza euclidea. In maniera coerente con la letteratura, questi risultati sono interpretabili sulla base del fatto che i due comportamenti condividono lo stesso effettore, la bocca; questa osservazione suggerisce l'esistenza di una rappresentazione neurale legata all'attivazione di questo effettore. Questi risultati sono coerenti con l'organizzazione sensorimotoria dell'area F5 e dei neuroni selettivi per azioni orofacciali e in generale con il ruolo della vIPFC nella modulazione del comportamento in funzione del contesto (Ferrari et al., 2003; Gerbella et al., 2013; Rizzolatti et al., 2014; Borra & Luppino, 2017).

Un singolo stato, S3, risulta rappresentativo dei comportamenti di *resting*, *scratch* e *self grooming*: questo risultato potrebbe essere dovuto alla condivisione di caratteristiche contestuali, come aspetti posturali, bassa attivazione motoria e cognitiva e posizione nello spazio in cui il comportamento viene svolto, in linea con quanto osservato per M2 e con i risultati ottenuti da Lanza et al. (2025) riguardo alla multidimensionalità riscontrata in condizione *freely moving*.

Un'ulteriore evidenza deducibile dai risultati riguarda i comportamenti di *self grooming*, *foraging* e *grooming*. Lo stato S29 codifica per una parte considerevole del tempo sia il *self grooming* che il *foraging*; questo risultato potrebbe essere spiegato da una componente cinematica comune: entrambi i comportamenti sono caratterizzati da sequenze di allungamento del braccio, *reaching* e *precision grip* diretti verso il proprio corpo o verso il cibo. Data questa considerazione, un risultato particolarmente interessante emerge dal confronto con il *grooming*: sebbene tutti e tre i comportamenti condividano una componente cinematica simile, i profili degli stati che li rappresentano sono molto diversi. Ciò che distingue sostanzialmente il *grooming* dagli altri due è il contesto e l'obiettivo, caratteristiche riferite alla sfera sociale; questa osservazione permette di ipotizzare la presenza di una configurazione neurale stabile e distinta per le azioni interattive verso il partner (Fuster, 2001; Borra & Luppino, 2017; Umiltà et al., 2008; Bonini et al., 2010; Dunbar 2016).

Un'ulteriore osservazione rilevante riguarda gli stati neurali rappresentativi di *foraging* ed *exploration*. Si potrebbe ipotizzare che i due comportamenti mostrino *pattern* simili perché condividono una componente di ricerca attiva nell'ambiente, caratterizzata da movimenti esplorativi e dall'ispezione di elementi del contesto. Nell'*exploration*, la ricerca è guidata da stimoli o situazioni salienti che catturano l'attenzione dell'animale, mentre nel *foraging* è finalizzata al recupero di cibo. Gli stati latenti del modello non mostrano una rappresentazione condivisa tra i due comportamenti. Questo risultato suggerisce che le rappresentazioni neurali delle azioni *goal-directed* vengano codificate in maniera differente, in accordo con la letteratura sulla distinzione neurale tra azioni cinematicamente simili con obiettivi diversi (Fogassi et al., 2005; Murata et al., 2000; Bonini et al., 2010).

Per quanto riguarda i comportamenti di *normal locomotion* e di *stereotyped locomotion*, si può notare che in cinque sessioni su sei analizzate (si veda l'Appendice B) entrambi i comportamenti risultano rappresentati da uno o pochi stati corrispondenti, sottolineando come, in questo caso, la componente cinematica sia preponderante nel determinare i *pattern* di attività neurale. Questi risultati suggeriscono la possibile presenza di una configurazione neurale stabile associata alla deambulazione, indipendentemente dalle sue sottocategorie.

L'analisi delle associazioni tra stati nascosti e comportamenti ha messo in evidenza *pattern* specifici e ricorrenti tra soggetti e sessioni. In particolar modo, comportamenti caratterizzati da una componente motoria definita e stereotipata, come *eating*, *grooming* e le due sottocategorie di *locomotion*, risultano rappresentati da uno o pochi stati latenti dedicati nella maggior parte delle sessioni analizzate, come osservabile nelle matrici riportate nell'Appendice B. La coerenza di questi *pattern* tra animali diversi e sessioni indipendenti costituisce un'ulteriore evidenza a supporto dei risultati presentati precedentemente.

4.2 Limiti dello studio e prospettive future

I risultati ottenuti da questo studio aprono a nuovi sviluppi sperimentali e metodologici; tuttavia, alcuni limiti, dovuti all'approccio adottato e alla recente diffusione dei paradigmi *freely moving*, potrebbero aver in parte limitato l'analisi e l'interpretazione dei dati raccolti.

Un primo limite riguarda la variabilità inter-osservatore dovuta alle annotazioni comportamentali effettuate manualmente tramite BORIS. Nonostante tale approccio garantisca un elevato livello di controllo nella definizione e classificazione delle categorie etologiche, la risoluzione temporale della capacità di identificare con precisione l'inizio e la fine dei comportamenti rimane limitata dalla soggettività e dall'esperienza dell'osservatore. Questo limite è stato accettato in quanto i modelli automatizzati di *pose estimation*, come DeepLabCut (Mathis et al., 2018), non sono ancora sufficientemente accurati nel trovare i punti di cambiamento tra gli stati comportamentali, nonostante siano in grado di quantificare variabili cinematiche come postura, orientamento e velocità dei movimenti. Una possibile prospettiva futura consiste nello sviluppo di modelli automatizzati addestrati su *dataset* più ampi, che potrebbero essere in grado di identificare una sequenza di stati comportamentali in maniera rigorosa e oggettiva a partire dalle registrazioni video.

Un secondo limite riguarda la scelta di addestrare modelli separati per ogni sessione. Questo approccio ha parzialmente limitato il confronto tra stati neurali di sessioni diverse e ha ridotto la quantità delle sequenze disponibili durante il *training* per i comportamenti meno frequenti. Un tentativo preliminare di addestramento su sessioni concatenate dello stesso soggetto ha evidenziato come uno o pochi stati tendessero a

essere predominanti in modo sproporzionato e non rappresentativo delle dinamiche comportamentali. Questo limite potrebbe essere dovuto a diverse variabili tecniche che possono influenzare la qualità e la stabilità della registrazione, come per esempio il *drift* degli elettrodi o la possibilità che l'addestramento del modello abbia portato ad un *overfitting* sui dati di alcuni periodi di registrazione piuttosto che altri. Questa ragione, unita all'assenza di un modello HMM in grado di gestire propriamente la variabilità tra sessioni diverse, ha reso necessario addestrare il modello separatamente per ogni sessione. Una prospettiva futura consiste nello sviluppo di modelli in grado di rilevare in maniera stabile nel tempo la complessità del comportamento naturalistico.

Infine, un'altra prospettiva rilevante sarebbe esaminare in che misura fattori come la prossimità spaziale, la direzione dell'attenzione reciproca e le azioni del partner si riflettono negli stati neurali del soggetto registrato e verificare in che maniera la gerarchia tra gli animali, di dominanza o di sottomissione, modula l'attivazione neurale durante i vari comportamenti. Nel presente studio il comportamento del partner non è stato considerato come variabile, nonostante possa influenzare il comportamento del soggetto sperimentale anche per quanto riguarda azioni apparentemente non sociali; per esempio, la vicinanza del partner potrebbe inibire o favorire certi comportamenti, come il *foraging*, nell'altro membro della diade.

4.3 Conclusioni

Il presente studio ha dimostrato che un *framework* basato su *gaussian* Hidden Markov Model può essere applicato con successo a registrazioni di popolazioni neuronali in corteccia prefrontale ventrolaterale e in corteccia premotoria ventrale ottenute da macachi *rhesus* in condizioni *freely moving* durante interazioni sociali spontanee. Nonostante le sequenze comportamentali non siano state utilizzate durante l'addestramento del modello, gli stati latenti inferiti hanno mostrato una corrispondenza sistematica con le categorie etologiche.

In particolare, sono stati trovati stati latenti rappresentativi di comportamenti che condividono lo stesso effettore, come la bocca per *eating* e *mouththing*, in linea con l'organizzazione dell'area F5. Inoltre, un cluster di stati è risultato rappresentativo di tre comportamenti: *presenting*, *received grooming* e *lying*. Questi comportamenti condividono l'appartenenza alla sfera sociale ma si differenziano per l'*output* motorio.

Ciò suggerisce che lo stato possa riflettere aspetti funzionali o contestuali condivisi piuttosto che specifiche caratteristiche motorie. La corrispondenza tra dati neurali e sequenze comportamentali rappresenta l'evidenza principale che PMv e vIPFC codificano, oltre alla rappresentazione dei singoli atti motori, aspetti del contesto sociale.

In conclusione, questi risultati indicano che la decodifica non supervisionata delle dinamiche di popolazione neurale in condizioni naturalistiche è metodologicamente praticabile e scientificamente informativa. L'approccio adottato potrà costituire un riferimento per ricerche future con paradigmi *freely moving*, contribuendo allo studio delle basi neurali del comportamento sociale in condizioni ecologicamente valide.

Appendice A

La matematica degli Hidden Markov Model

Per comprendere il funzionamento degli HMM occorre conoscere il meccanismo delle Markov Chain. Questo concetto deve il suo nome al lavoro di Andrey Markov (1906) che nel suo libro *Extension of the law of large numbers to dependent events* ha per la prima volta messo in luce il principio teorico per cui una sequenza di eventi può essere modellizzata in maniera probabilistica in modo che lo stato seguente dipenda esclusivamente dallo stato attuale e non da tutta la successione degli eventi precedenti. Questa proprietà viene definita come proprietà di Markov (Chung, 1967). Una Markov Chain è una sequenza di variabili aleatorie $(X_0, X_1, X_2, \dots)$ definite su uno spazio discreto degli stati $S = \{s_1, s_2, \dots, s_n\}$, tale per cui:

$$P(X_{t+1} = s_j \mid X_t = s_i, X_{t-1}, \dots, X_0) = P(X_{t+1} = s_j \mid X_t = s_i).$$

dove $t \geq 0$, i è l'indice dello stato a tempo t e j è l'indice dello stato a tempo $t+1$.

L'insieme delle probabilità di transizione, con $a_{ij} = P(X_{t+1} = s_j \mid X_t = s_i)$, è raccolto nella matrice di transizione $A = [a_{ij}]$, di dimensione $N \times N$:

$$A = \begin{bmatrix} a(1,1) & \cdots & a(1,N) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ a(N,1) & \cdots & a(N,N) \end{bmatrix}$$

Ogni stato al tempo t ha quindi una determinata probabilità di passare a un altro stato o di rimanere invariato al tempo $t+1$ (Norris, 1998)

Le Markov Chain sono un ottimo strumento per la modellazione dei processi stocastici, tuttavia presentano delle limitazioni importanti. Come descritto da Rabiner et al. (1986) in *An Introduction to Hidden Markov Models*, in molti sistemi reali, lo stato interno che

genera le osservazioni non è accessibile direttamente. Pertanto, in diverse situazioni è necessario un modello a due livelli: uno nascosto, che evolve secondo le Markov Chain (come nel caso degli stati di attivazione cerebrale durante un comportamento), e uno osservabile, costituito dalle emissioni misurabili derivate dallo stato nascosto (come l'insieme dei tracciati neurali delle *multi-unit*).

Un Hidden Markov Model λ è definito da tre componenti probabilistiche (Rabiner, 1989):

$$\lambda = (A, B, \pi)$$

- A rappresenta la matrice di transizione, già illustrata nella spiegazione delle Markov Chain.
- B è la matrice delle probabilità di emissione, ovvero la probabilità che una determinata osservazione o_t sia stata generata dallo stato $s_t = j$, definita come:

$$b_j(o_t) = P(o_t | S_t = j)$$

π è la distribuzione iniziale $\pi = \{\pi_i\}$ che indica la probabilità di iniziare nello stato i :

$$\pi_i = P(S_1 = i), \sum_i \pi_i = 1.$$

I tre problemi computazionali

A questo punto è necessario comprendere come il modello riesca a inferire e stimare le variabili nascoste a partire dai dati osservabili. Il processo si articola in tre problemi fondamentali.

Valutazione dell'efficacia del modello

È necessario individuare la probabilità che una determinata sequenza di osservazioni $O = (o_1, o_2, \dots, o_t)$ sia stata generata dal modello λ , quindi $P(O|\lambda)$. L'algoritmo *forward* permette di calcolare la verosimiglianza della sequenza osservata attraverso la formula ricorsiva:

$$\alpha_t(j) = \left[\sum_{i=1}^N \alpha_{t-1}(i) a_{ij} \right] b_j(o_t)$$

con $\alpha_1(j) = \pi_j b_j(o_1)$, e risultato finale:

$$P(O | \lambda) = \sum_{j=1}^N \alpha_T(j).$$

L'algoritmo costruisce ricorsivamente la probabilità di osservare la sequenza fino al tempo t , terminando nello stato j .

Decodifica della sequenza di stati nascosti

Un altro aspetto fondamentale è decodificare la sequenza di stati nascosti più probabile che ha generato le osservazioni. Questo può essere calcolato attraverso l'algoritmo di Viterbi:

$$\delta_t(j) = \max_{i=1, \dots, N} [\delta_{t-1}(i) a_{ij}] b_j(o_t),$$

dove $\delta_t(j)$ rappresenta la probabilità massima di arrivare nello stato j al tempo t lungo qualsiasi sequenza precedente.

Apprendimento dei parametri ottimali

Infine, è necessario stimare i parametri ottimali del modello λ che massimizzano la probabilità dei dati osservati (O). L'algoritmo Baum-Welch, un caso particolare

dell'algoritmo *Expectation-Maximization* (EM), è in grado di aggiornare iterativamente i parametri di transizione ed emissione attraverso le formule:

$$a_{ij}^{new} = \frac{\sum_{t=1}^{T-1} \xi_t(i, j)}{\sum_{t=1}^{T-1} \gamma_t(i)}$$

$$b_j^{new}(k) = \frac{\sum_{t: o_t = v_k} \gamma_t(j)}{\sum_{t=1}^T \gamma_t(j)},$$

dove $\gamma_t(i)$ rappresenta la probabilità di trovarsi nello stato i al tempo t , e $\xi_t(i, j)$ la probabilità congiunta di una transizione da i a j (Baum et al., 1970; Rabiner, 1989; Juang & Rabiner, 1991; Bishop, 2006).

Le diverse tipologie degli Hidden Markov Model

Esistono diverse varianti di Hidden Markov Model, adattate alla natura delle osservazioni e alla tipologia dei dati analizzati. Tra le più utilizzate si trovano:

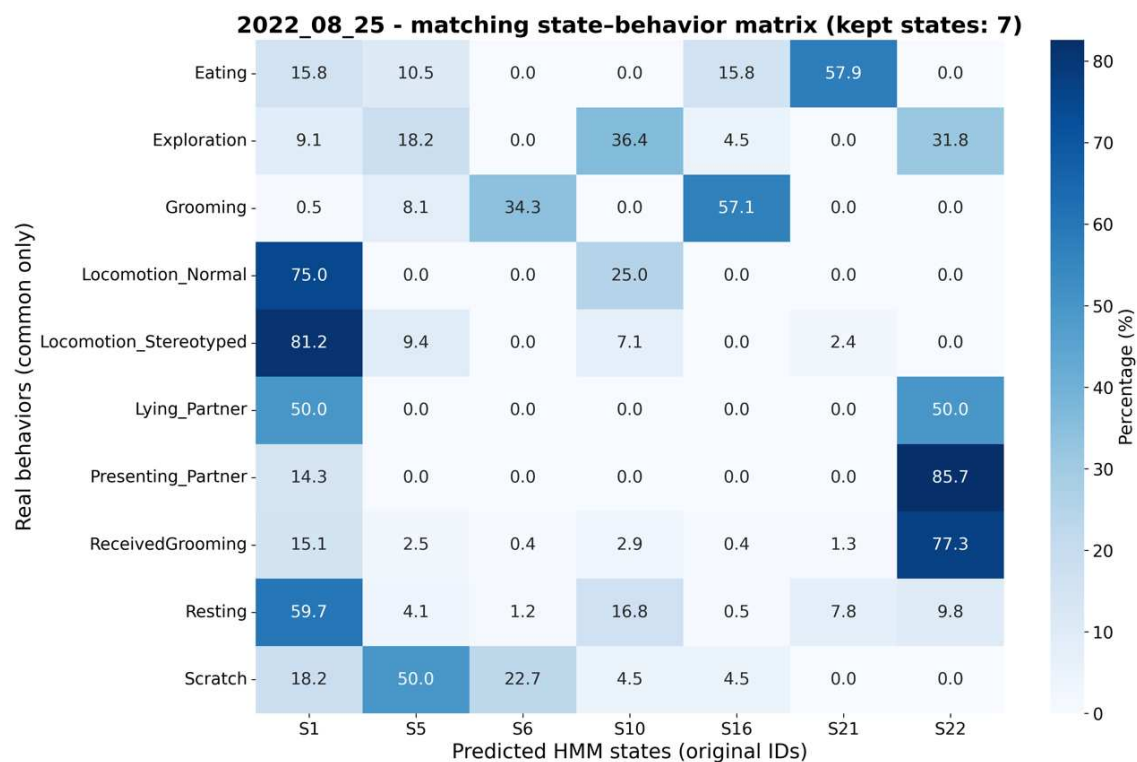
- *Discrete* HMM: le osservazioni appartengono a un insieme finito di simboli e rappresentano variabili discrete. Sono ampiamente impiegati nel riconoscimento del parlato.
- *Poisson* HMM: le osservazioni sono conteggi di eventi per unità di tempo, come nel caso degli *spike count* relativi a *task specifici*, ampiamente impiegati nelle neuroscienze (Kirchherr et al., 2023).
- *Gaussian* HMM: utilizzati per modellare osservazioni di natura continua, inclusi anche vettori di *firing rate* derivati dal *binning* di *spike trains*, dove ogni stato “*hidden*” è associato a una distribuzione gaussiana multivariata definita da una media e una matrice di covarianza; largamente impiegati nello studio delle dinamiche cerebrali (Kemere et al., 2008).

Questa varietà di formulazioni mostra come il modello HMM possa essere applicato con successo in numerosi contesti sperimentali e disciplinari, grazie alla sua flessibilità nel rappresentare dinamiche temporali derivate da stati latenti non direttamente osservabili (Rabiner, 1989). Per questo motivo, gli HMM sono uno strumento ideale per analizzare sistemi complessi come il cervello.

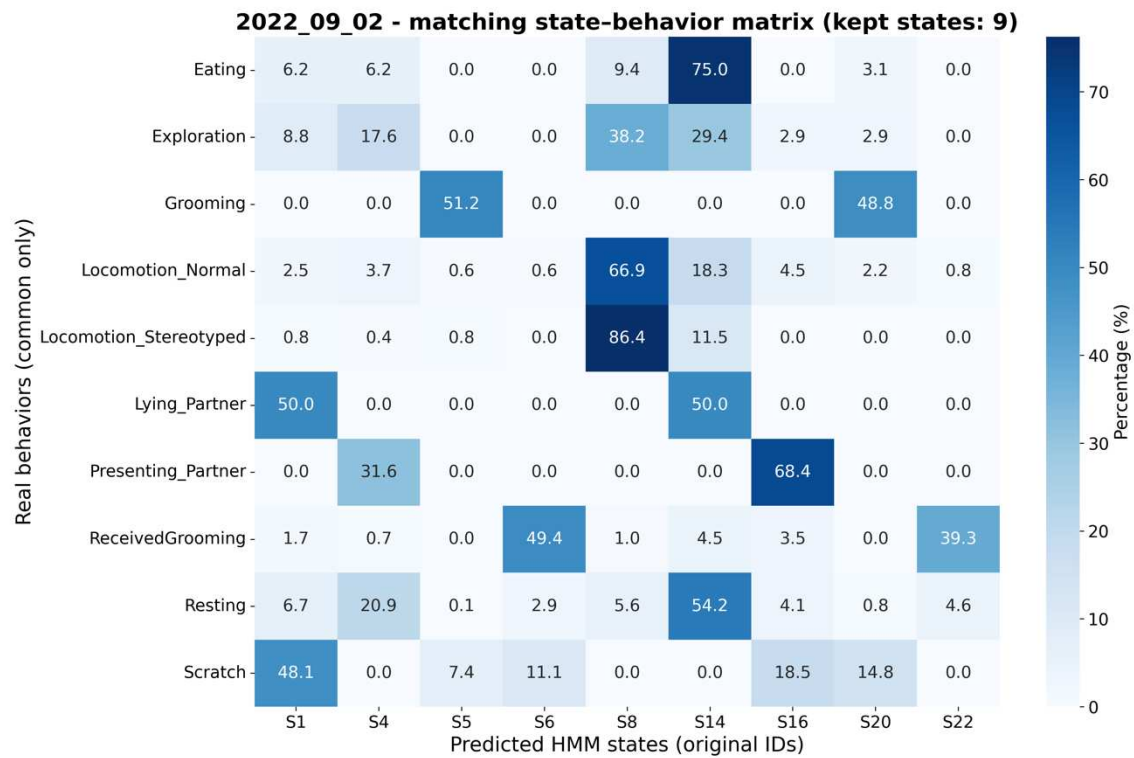
Appendice B

Questa sezione contiene figure supplementari e script di analisi a supporto dei risultati presentati nel Capitolo 4. Le figure mostrano le matrici di corrispondenza stato-comportamento, i dendrogrammi ottenuti dal clustering euclideo e dalle analisi basate sulla divergenza di Kullback-Leibler per le quattro sessioni di registrazione aggiuntive non utilizzate come esempi principali nel testo: le sessioni 2022_08_25 e 2022_09_02 per M2 e le sessioni 2022_09_07 e 2022_09_23 per M1. Queste figure seguono lo stesso formato delle analisi delle sessioni rappresentative sono riportate per consentire una valutazione della consistenza dei risultati principali tra le diverse sessioni.

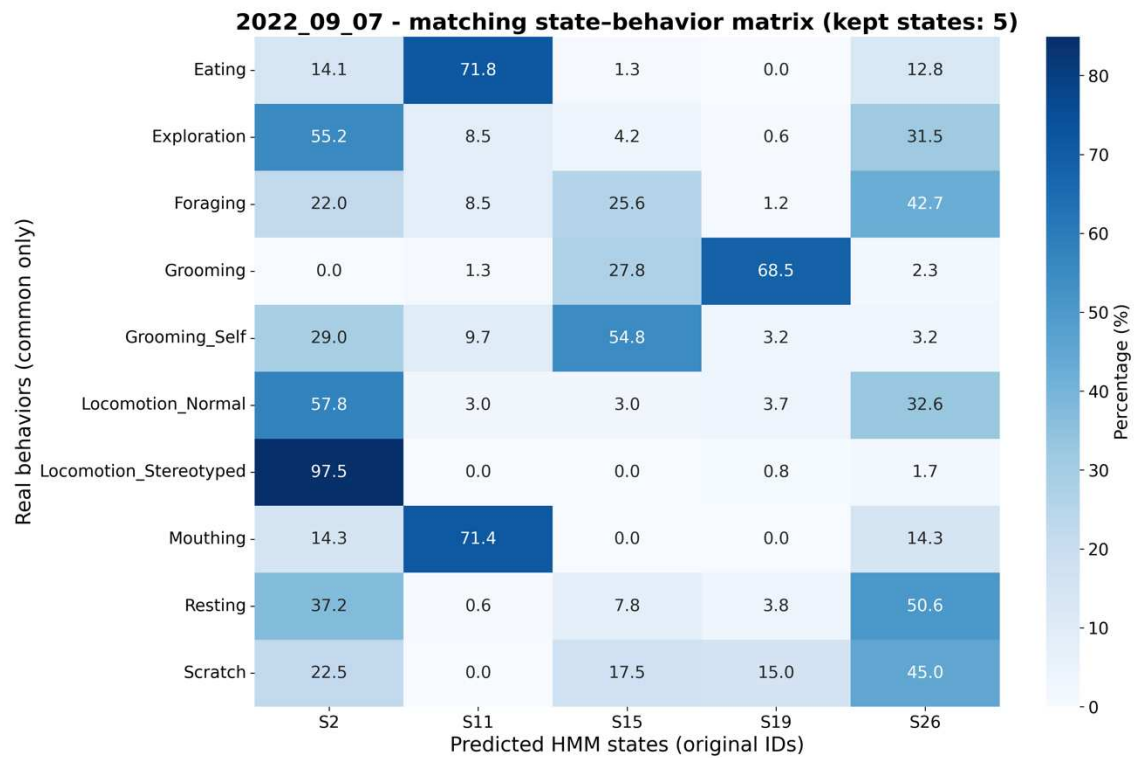
Matrici di correlazione stato-comportamento



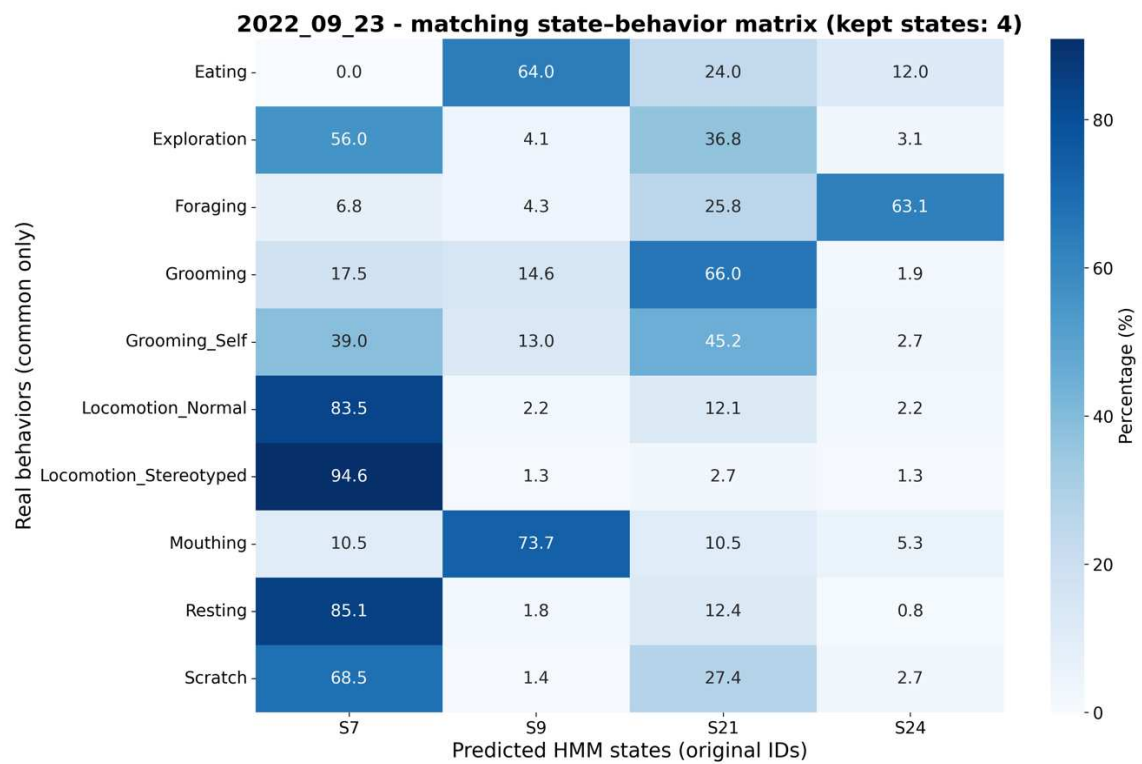
Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M2 (sessione 2022_08_25, stati trovati: 7). Ogni riga corrisponde a una categoria comportamentale comune a tutte le sessioni di M2; ogni colonna a uno stato dell'HMM. I valori nelle celle indicano $P(\text{stato}/\text{comportamento})$ (%). Sono mostrati solo gli stati per i quali almeno un comportamento supera la soglia del 20%. Gli identificativi degli stati corrispondono agli indici assegnati durante il training del modello.



Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M2 (sessione 2022_09_02, stati trovati: 9)

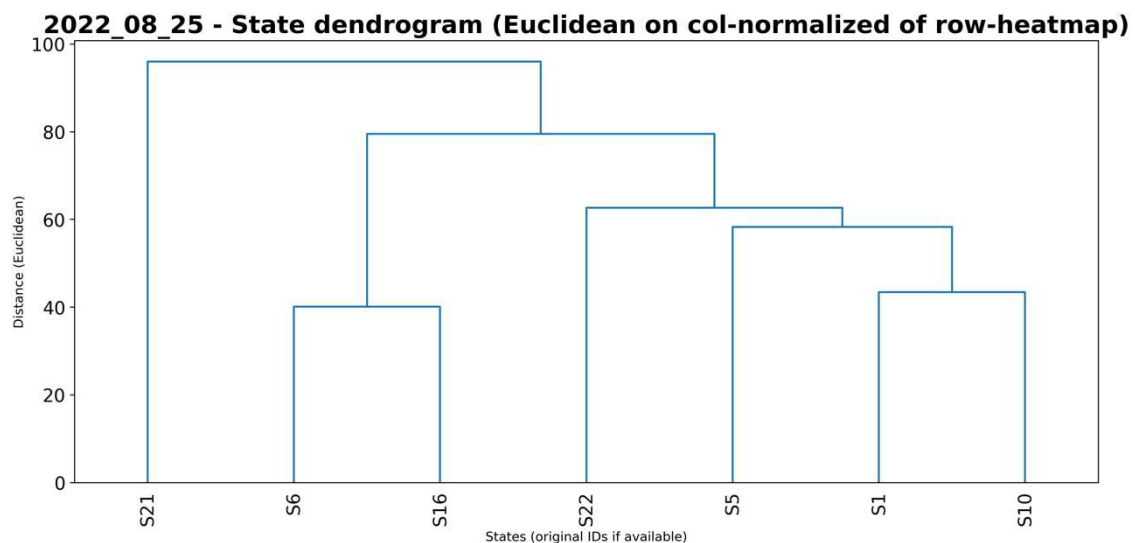


Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M1 (sessione 2022_09_07, stati trovati: 5)

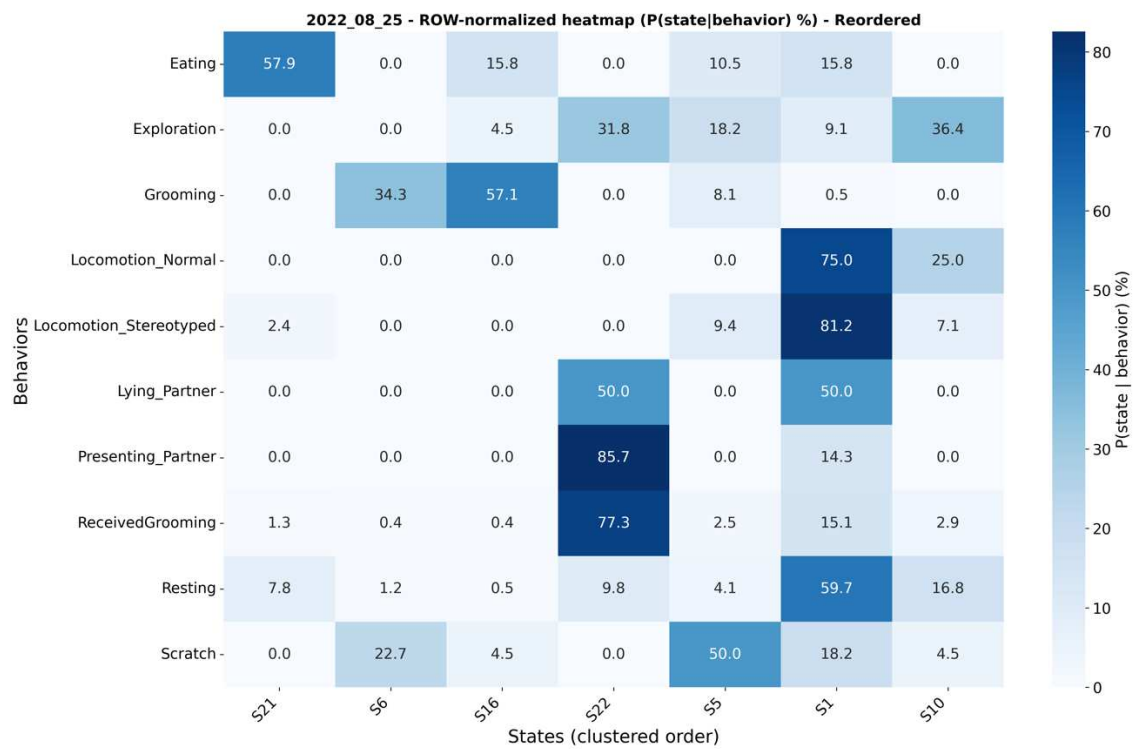


Matrice di corrispondenza stato-comportamento di M1 (sessione 2022_09_23, stati trovati: 4)

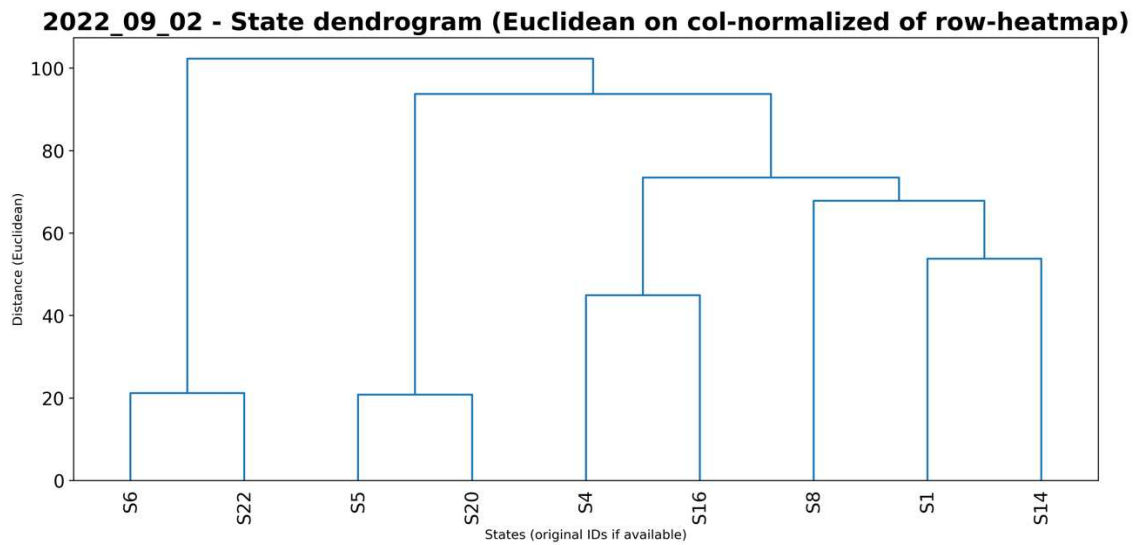
Cluster derivati dalla distanza euclidea e matrice di corrispondenza riordinata



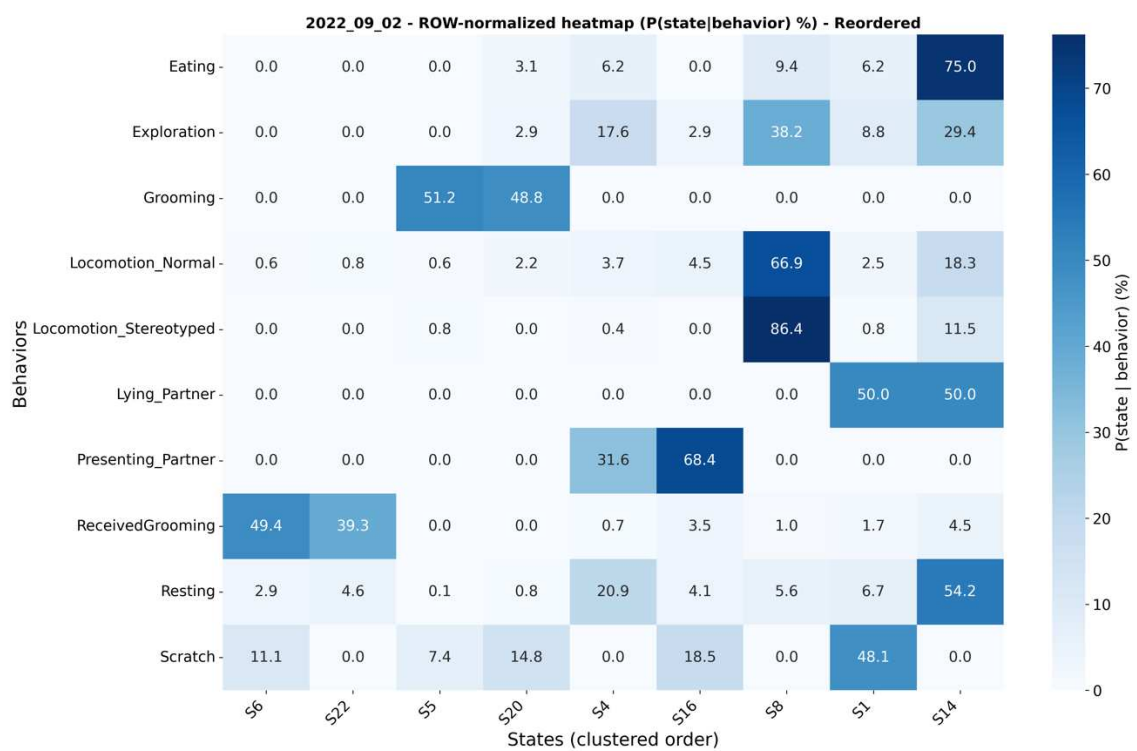
Dendrogramma relativo al clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M2 (sessione 2022_08_25). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello.



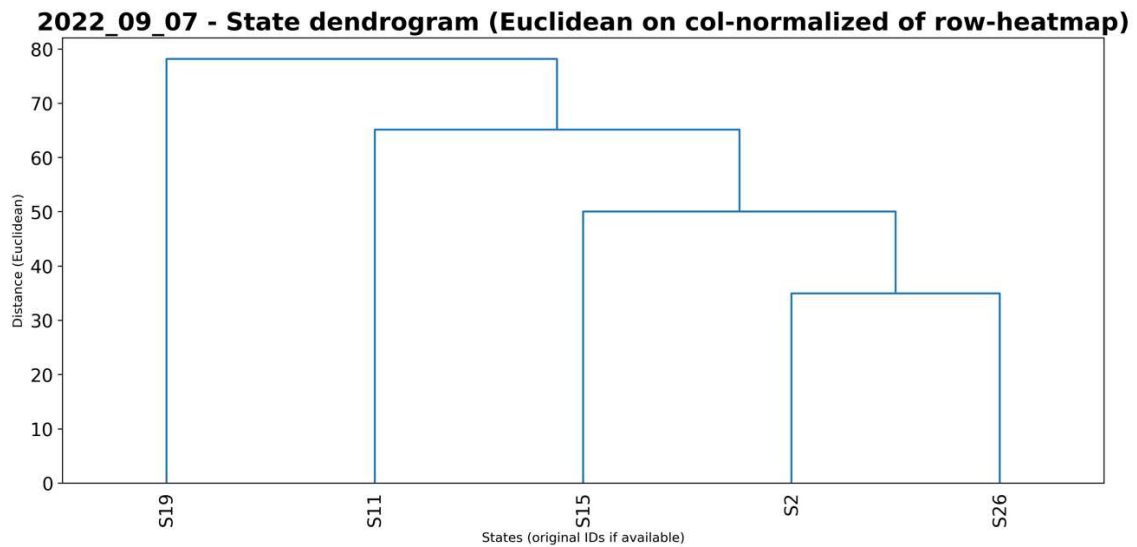
Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M2 (sessione 2022_08_25). L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.



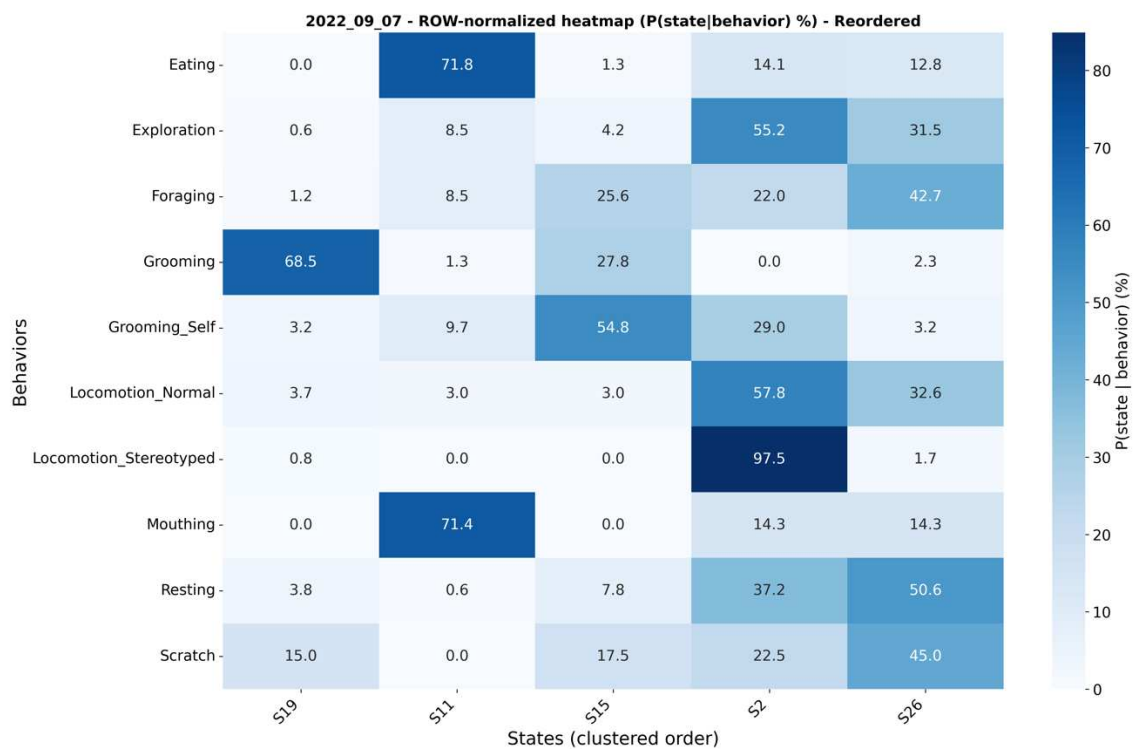
Dendrogramma relativo al clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M2 (sessione 2022_09_02). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello.



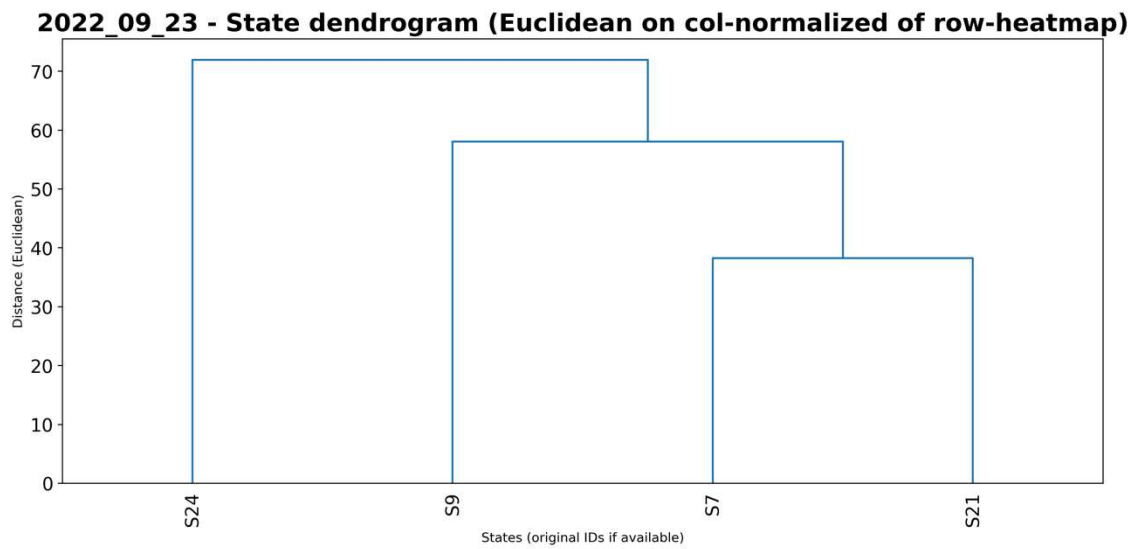
Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M2 (sessione 2022_09_02). L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.



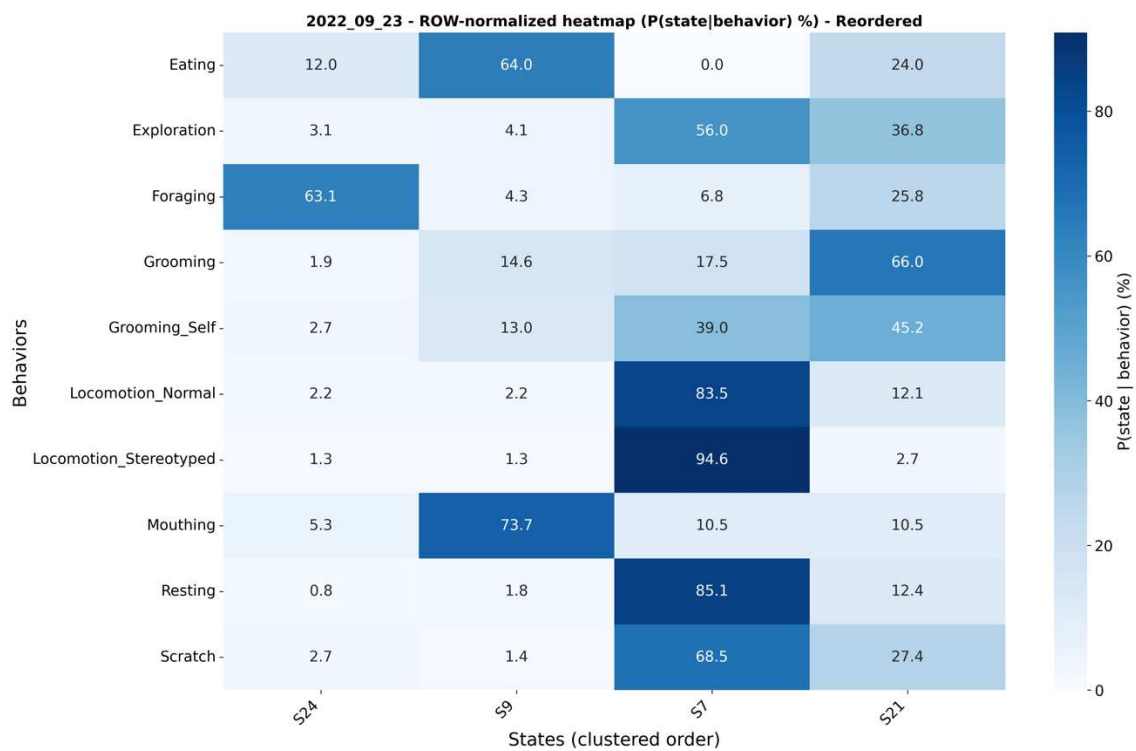
Dendrogramma relativo al clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_07). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello.



Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_07). L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.

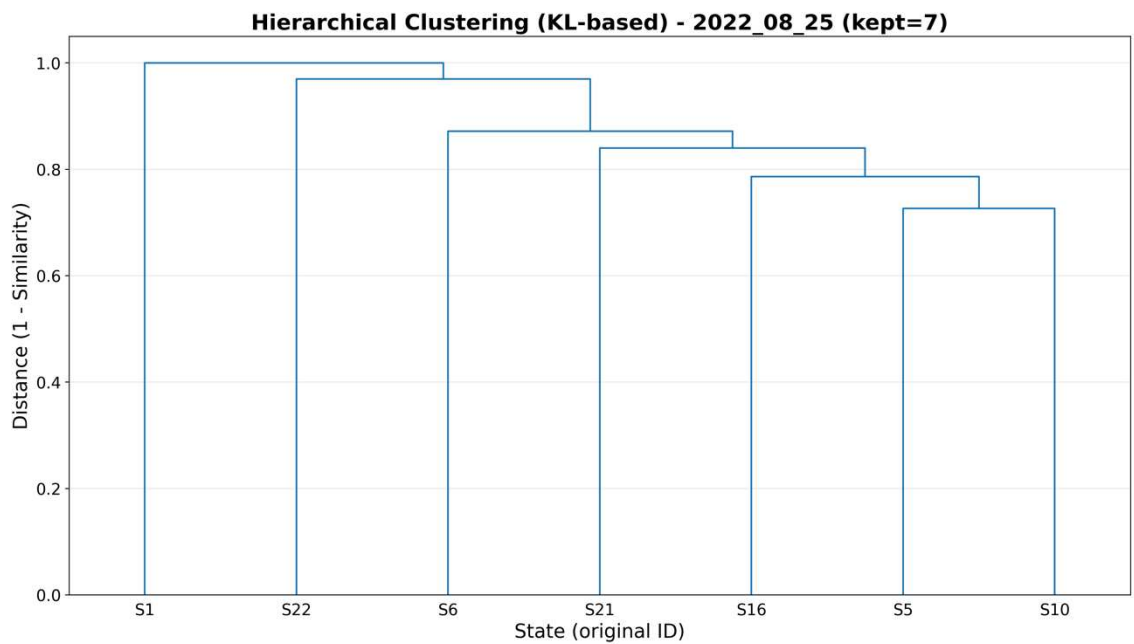


Dendrogramma relativo al clustering gerarchico basato sulla distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_23). L'asse y corrisponde alla distanza euclidea; l'asse x agli stati derivati dal modello.

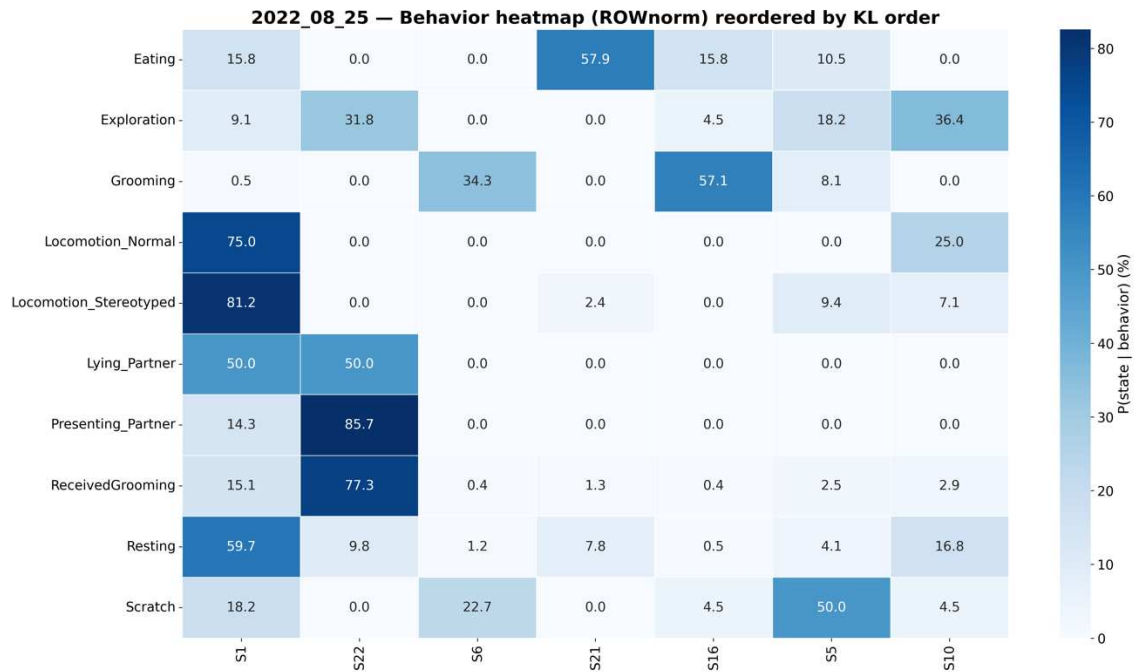


Matrice di corrispondenza riordinata secondo il clustering basato su distanza euclidea di M1 (sessione 2022_09_23). L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.

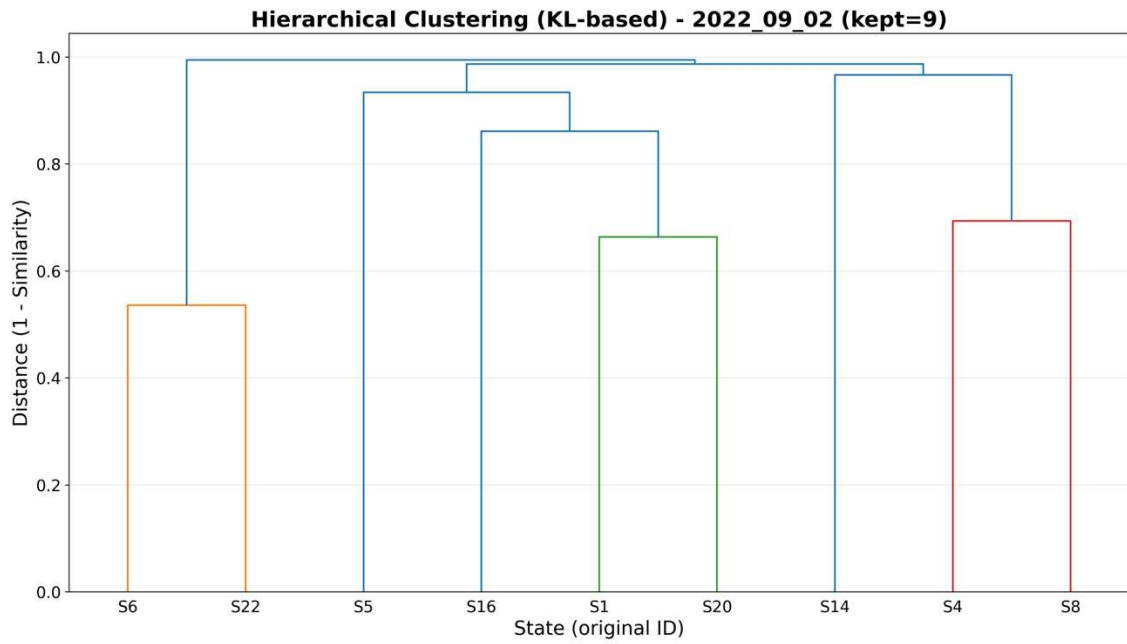
Cluster derivati dalla divergenza KL e matrici di correlazione riordinate



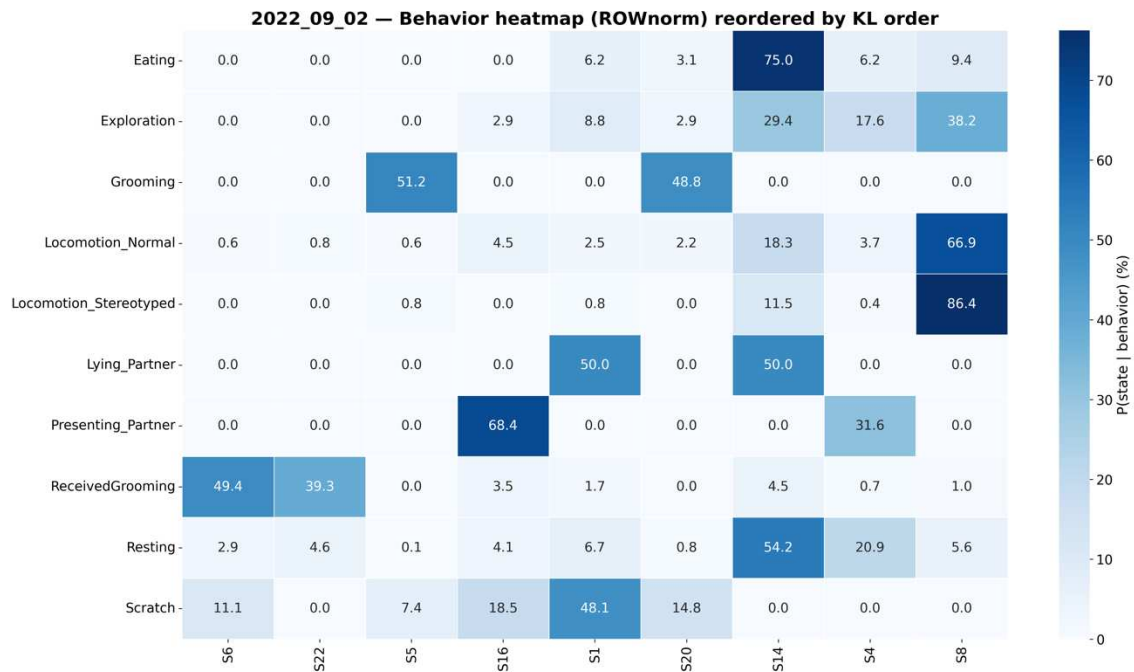
Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M2 (sessione 2022_08_25). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.



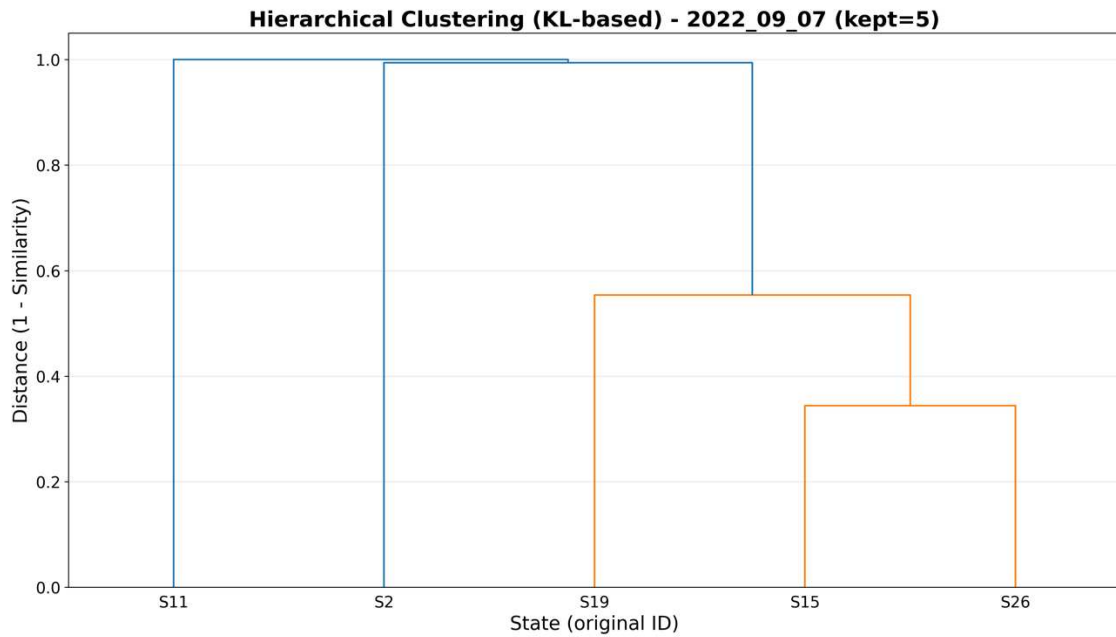
Matrice di corrispondenza stato-comportamento per M2 (sessione 2022_08_25), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.



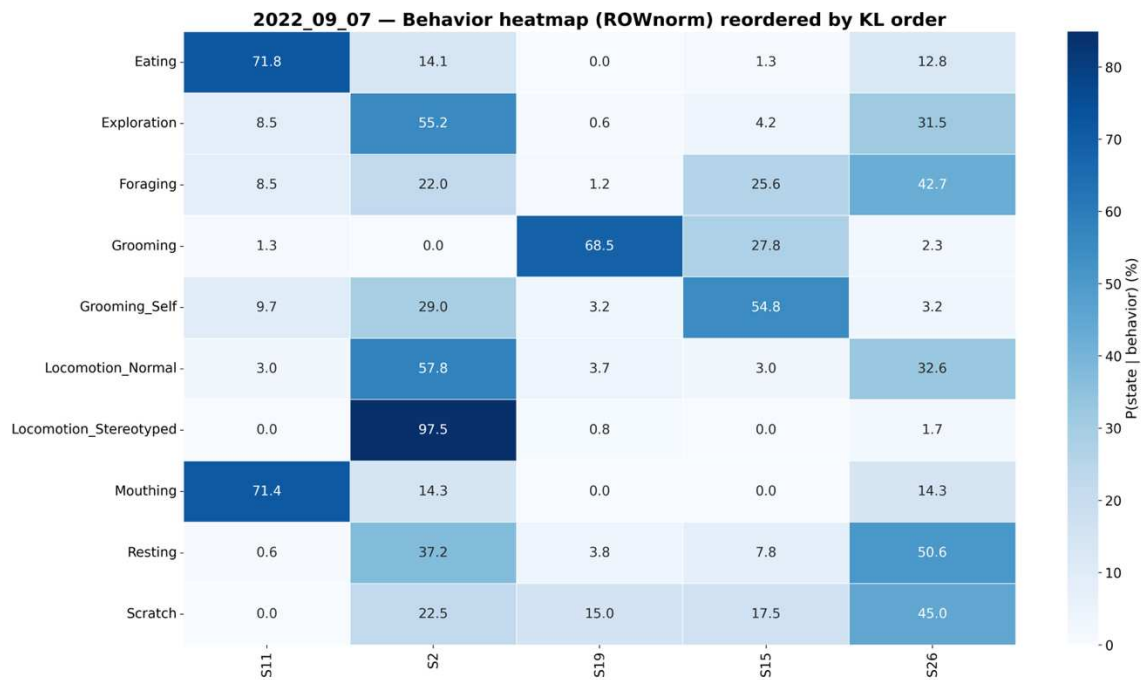
Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M2 (sessione 2022_09_02). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.



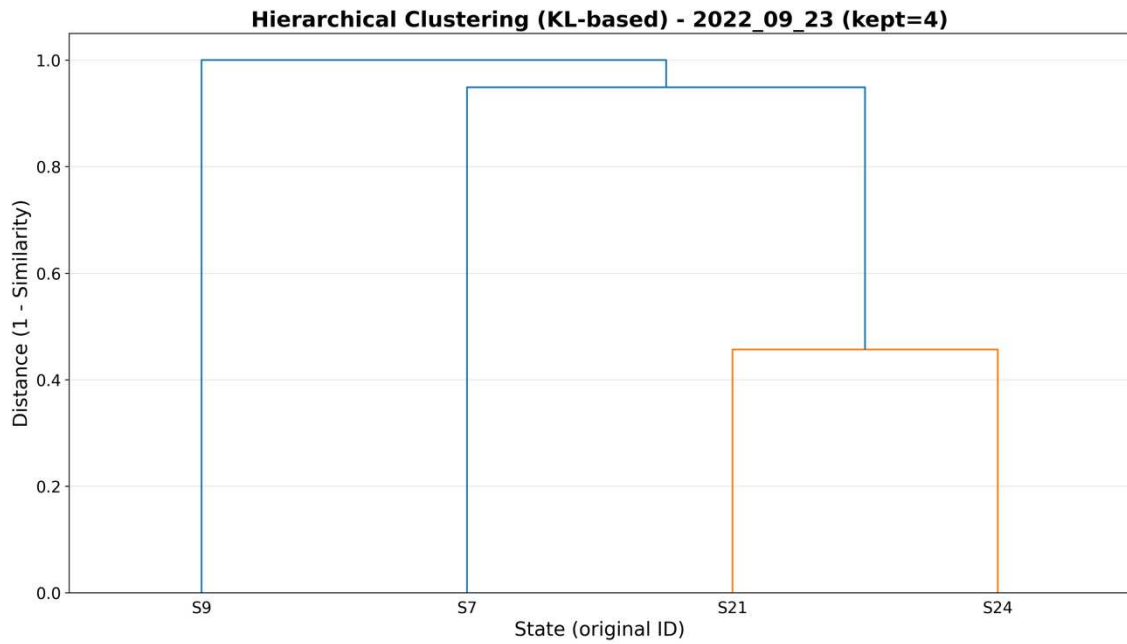
Matrice di corrispondenza stato-comportamento per M2 (sessione 2022_09_02), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.



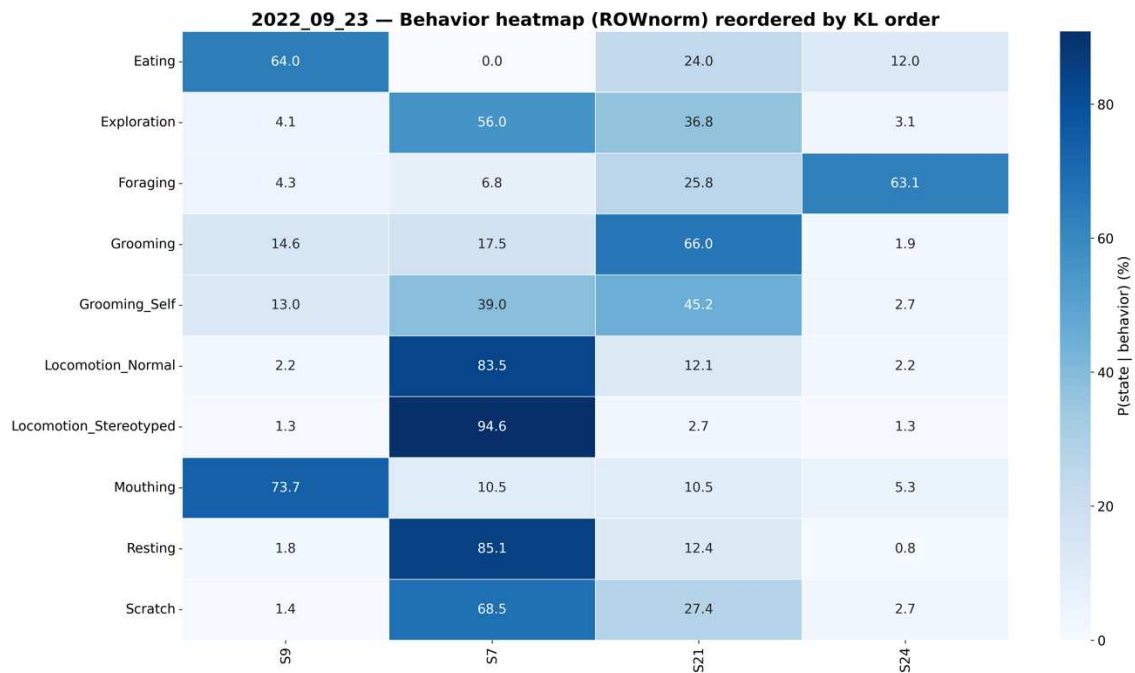
Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M1 (sessione 2022_09_07). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.



Matrice di corrispondenza stato-comportamento per M1 (sessione 2022_09_07), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.



Dendrogramma basato sul clustering gerarchico della divergenza di KL per M1 (sessione 2022_09_23). L'asse y corrisponde alla distanza relativa alla divergenza di KL; l'asse x agli stati derivati dal modello.



Matrice di corrispondenza stato-comportamento per M1 (sessione 2022_09_23), con riordinamento basato sulla divergenza KL ottenuto dal clustering gerarchico delle distribuzioni di emissione. L'intensità dei colori indicano $P(\text{stato} \mid \text{comportamento})$ in percentuale.

Bibliografia

- Abeles, M., Bergman, H., Gat, I., Meilijson, I., Seidemann, E., Tishby, N., & Vaadia, E. (1995). Cortical activity flips among quasi-stationary states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8616–8620.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8616>
- Allen, E. A., Damaraju, E., Plis, S. M., Erhardt, E. B., Eichele, T., & Calhoun, V. D. (2014). Tracking Whole-Brain Connectivity Dynamics in the Resting State. *Cerebral Cortex*, 24(3), 663–676. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs352>
- Amit, D., & Brunel, N. (1997). Model of global spontaneous activity and local structured activity during delay periods in the cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 7(3), 237–252. <https://doi.org/10.1093/cercor/7.3.237>
- Archie, E. A., Tung, J., Clark, M., Altmann, J., & Alberts, S. C. (2014). Social affiliation matters: Both same-sex and opposite-sex relationships predict survival in wild female baboons. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1793), 20141261. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1261>
- Aureli, F., Cords, M., & Van Schaik, C. P. (2002). Conflict resolution following aggression in gregarious animals: A predictive framework. *Animal Behaviour*, 64(3), 325–343. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3071>
- Aureli, F., Preston, S. D., & De Waal, F. B. M. (1999). Heart rate responses to social interactions in free-moving rhesus macaques (*Macaca mulatta*): A pilot study. *Journal of Comparative Psychology*, 113(1), 59–65.
<https://doi.org/10.1037/0735-7036.113.1.59>
- Bagi, B., Brecht, M., & Sanguinetti-Scheck, J. I. (2022). Unsupervised discovery of behaviorally relevant brain states in rats playing hide-and-seek. *Current Biology*, 32(12), 2640–2653.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.04.068>
- Baldi, J., Disarbois, E., Mendez, A. C., Cappellaro, G., Annicchiarico, G., Bimbi, M., Coudé, G., Duhamel, J.-R., & Ferrari, P. F. (2025). Frontal cortex encodes action goals and social context in freely moving and socially interacting macaques. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/2025.10.21.683128>
- Baum, L. E., Petrie, T., Soules, G., & Weiss, N. (1970). A Maximization Technique Occurring in the Statistical Analysis of Probabilistic Functions of Markov

- Chains. *The Annals of Mathematical Statistics*, 41(1), 164–171.
<https://doi.org/10.1214/aoms/1177697196>
- Berger, M., Agha, N. S., & Gail, A. (2020). Wireless recording from unrestrained monkeys reveals motor goal encoding beyond immediate reach in frontoparietal cortex. *eLife*, 9, e51322. <https://doi.org/10.7554/eLife.51322>
- Bishop, C. M. (2006). *Pattern recognition and machine learning*. Springer.
- Biswal, B., Zerrin Yetkin, F., Haughton, V. M., & Hyde, J. S. (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar mri. *Magnetic Resonance in Medicine*, 34(4), 537–541.
<https://doi.org/10.1002/mrm.1910340409>
- 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*, 20(6), 1372–1385. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp200>
- Borra, E., Belmalih, A., Calzavara, R., Gerbella, M., Murata, A., Rozzi, S., & Luppino, G. (2008). Cortical Connections of the Macaque Anterior Intraparietal (AIP) Area. *Cerebral Cortex*, 18(5), 1094–1111.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhm146>
- Borra, E., Gerbella, M., Rozzi, S., & Luppino, G. (2017). The macaque lateral grasping network: A neural substrate for generating purposeful hand actions. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 75, 65–90.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.017>
- Borra, E., & Luppino, G. (2017). Functional anatomy of the macaque temporo-parieto-frontal connectivity. *Cortex*, 97, 306–326.
<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2016.12.007>
- Caminiti, R., Borra, E., Visco-Comandini, F., Battaglia-Mayer, A., Averbeck, B. B., & Luppino, G. (2017). Computational Architecture of the Parieto-Frontal Network Underlying Cognitive-Motor Control in Monkeys. *Eneuro*, 4(1), ENEURO.0306-16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0306-16.2017>
- Carrillo, M., Han, Y., Migliorati, F., Liu, M., Gazzola, V., & Keysers, C. (2019). Emotional Mirror Neurons in the Rat's Anterior Cingulate Cortex. *Current Biology*, 29(8), 1301-1312.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.024>

- Carter, C. (1998). NEUROENDOCRINE PERSPECTIVES ON SOCIAL ATTACHMENT AND LOVE. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 779–818. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(98\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(98)00055-9)
- Caspers, S., Zilles, K., Laird, A. R., & Eickhoff, S. B. (2010). ALE meta-analysis of action observation and imitation in the human brain. *NeuroImage*, 50(3), 1148–1167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.12.112>
- Chung, K. L. (1967). *Markov Chains* (Vol. 104). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-62015-7>
- Churchland, M. M., Cunningham, J. P., Kaufman, M. T., Foster, J. D., Nuyujukian, P., Ryu, S. I., & Shenoy, K. V. (2012). Neural population dynamics during reaching. *Nature*, 487(7405), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature11129>
- Colby, C. L., Duhamel, J. R., & Goldberg, M. E. (1993). Ventral intraparietal area of the macaque: Anatomic location and visual response properties. *Journal of Neurophysiology*, 69(3), 902–914. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.3.902>
- Cunningham, J. P., & Yu, B. M. (2014). Dimensionality reduction for large-scale neural recordings. *Nature Neuroscience*, 17(11), 1500–1509. <https://doi.org/10.1038/nn.3776>
- Di Pellegrino, G., Fadiga, L., Fogassi, L., Gallese, V., & Rizzolatti, G. (1992). Understanding motor events: A neurophysiological study. *Experimental Brain Research*, 91(1), 176–180. <https://doi.org/10.1007/BF00230027>
- Dommanget-Kott, M., Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., Coraggioso, M., Bormuth, V., Monasson, R., Debrégeas, G., & Cocco, S. (2026). Linking brain and behavior states in Zebrafish Larvae locomotion using hidden Markov models. *PLOS Computational Biology*, 22(1), e1013762. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1013762>
- Duhamel, J.-R., Colby, C. L., & Goldberg, M. E. (1998). Ventral Intraparietal Area of the Macaque: Congruent Visual and Somatic Response Properties. *Journal of Neurophysiology*, 79(1), 126–136. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.126>

- Dunbar, R. I. M. (2010). The social role of touch in humans and primates: Behavioural function and neurobiological mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(2), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.07.001>
- Dunbar, R. (2016). *The Social Brain Hypothesis and Human Evolution*. Oxford Research Encyclopedia of Psychology. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190236557.013.44>
- Escola, S., Fontanini, A., Katz, D., & Paninski, L. (2011). Hidden Markov Models for the Stimulus-Response Relationships of Multistate Neural Systems. *Neural Computation*, 23(5), 1071–1132. https://doi.org/10.1162/NECO_a_00118
- Evarts, E. V. (1966). Pyramidal tract activity associated with a conditioned hand movement in the monkey. *Journal of Neurophysiology*, 29(6), 1011–1027. <https://doi.org/10.1152/jn.1966.29.6.1011>
- Evarts, E. V. (1968). Relation of pyramidal tract activity to force exerted during voluntary movement. *Journal of Neurophysiology*, 31(1), 14–27. <https://doi.org/10.1152/jn.1968.31.1.14>
- Evarts, E. V. (1969). Activity of pyramidal tract neurons during postural fixation. *Journal of Neurophysiology*, 32(3), 375–385. <https://doi.org/10.1152/jn.1969.32.3.375>
- Ezaki, T., Himeno, Y., Watanabe, T., & Masuda, N. (2021). Modelling state-transition dynamics in resting-state brain signals by the hidden Markov and Gaussian mixture models. *European Journal of Neuroscience*, 54(4), 5404–5416. <https://doi.org/10.1111/ejn.15386>
- Feldman, R. (2012). Oxytocin and social affiliation in humans. *Hormones and Behavior*, 61(3), 380–391. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.01.008>
- Fernandez-Leon, J. A., Parajuli, A., Franklin, R., Sorenson, M., Felleman, D. J., Hansen, B. J., Hu, M., & Dragoi, V. (2015). A wireless transmission neural interface system for unconstrained non-human primates. *Journal of Neural Engineering*, 12(5), 056005. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/12/5/056005>
- Ferrari, P. F., & Baldi, J. (2024). Social neuroscience: Primate research goes wireless. *Current Biology*, 34(11), R536–R539. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.04.046>
- Ferrari, P. F., Gallese, V., Rizzolatti, G., & Fogassi, L. (2003). Mirror neurons responding to the observation of ingestive and communicative mouth actions in

- the monkey ventral premotor cortex. *European Journal of Neuroscience*, 17(8), 1703–1714. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02601.x>
- Ferrari, P. F., Gerbella, M., Coudé, G., & Rozzi, S. (2017). Two different mirror neuron networks: The sensorimotor (hand) and limbic (face) pathways. *Neuroscience*, 358, 300–315. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.052>
- Ferrier, D. (1876). *The functions of the brain*. G P Putnam's Sons. <https://doi.org/10.1037/12860-000>
- Fetz, E. E. (1969). Operant Conditioning of Cortical Unit Activity. *Science*, 163(3870), 955–958. <https://doi.org/10.1126/science.163.3870.955>
- Fetz, E. E., & Finocchio, D. V. (1971). Operant Conditioning of Specific Patterns of Neural and Muscular Activity. *Science*, 174(4007), 431–435. <https://doi.org/10.1126/science.174.4007.431>
- Fogassi, L., & Ferrari, P. F. (2007). Mirror Neurons and the Evolution of Embodied Language. *Current Directions in Psychological Science*, 16(3), 136–141. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8721.2007.00491.x>
- Fogassi, L., Ferrari, P. F., Gesierich, B., Rozzi, S., Chersi, F., & Rizzolatti, G. (2005). Parietal Lobe: From Action Organization to Intention Understanding. *Science*, 308(5722), 662–667. <https://doi.org/10.1126/science.1106138>
- Fogassi, L., Gallese, V., Buccino, G., Craighero, L., Fadiga, L., Rizzolatti, G. (2001). Cortical mechanism for the visual guidance of hand grasping movements in the monkey: A reversible inactivation study. *Brain*, 124(3), 571–586. <https://doi.org/10.1093/brain/124.3.571>
- Fogassi, L., Gallese, V., Fadiga, L., Luppino, G., Matelli, M., & Rizzolatti, G. (1996). Coding of peripersonal space in inferior premotor cortex (area F4). *Journal of Neurophysiology*, 76(1), 141–157. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.1.141>
- Fogassi, L., & Luppino, G. (2005). Motor functions of the parietal lobe. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(6), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.015>
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: A free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>

- Fritsch, G. and Hitzig, E. (1870) über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns. von Bonin, G., Trans. In: *The Cerebral Cortex*, Thomas, Springfield, IL, 73-96.
- Fuster, J. M. (2001). The Prefrontal Cortex—An Update. *Neuron*, 30(2), 319–333.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00285-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00285-9)
- Gallego, J. A., Perich, M. G., Miller, L. E., & Solla, S. A. (2017). Neural Manifolds for the Control of Movement. *Neuron*, 94(5), 978–984.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.025>
- Gallese, V., Fadiga, L., Fogassi, L., & Rizzolatti, G. (1996). Action recognition in the premotor cortex. *Brain*, 119(2), 593–609.
<https://doi.org/10.1093/brain/119.2.593>
- 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. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs096>
- Gerbella, M., Belmalih, A., Borra, E., Rozzi, S., & Luppino, G. (2011). Cortical connections of the anterior (F5a) subdivision of the macaque ventral premotor area F5. *Brain Structure and Function*, 216(1), 43–65.
<https://doi.org/10.1007/s00429-010-0293-6>
- Gibson, J. J. (1979). *The ecological approach to visual perception*. Houghton Mifflin.
- Gilja, V., Chestek, C. A., Nuyujukian, P., Foster, J., & Shenoy, K. V. (2010). Autonomous head-mounted electrophysiology systems for freely behaving primates. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(5), 676–686.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.007>
- Graziano, M. (2006). THE ORGANIZATION OF BEHAVIORAL REPERTOIRE IN MOTOR CORTEX. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 105–134.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112924>
- Graziano, M. S. A., Taylor, C. S. R., & Moore, T. (2002). Complex Movements Evoked by Microstimulation of Precentral Cortex. *Neuron*, 34(5), 841–851.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00698-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00698-0)
- Grueter, C. C., Bissonnette, A., Isler, K., & Van Schaik, C. P. (2013). Grooming and group cohesion in primates: Implications for the evolution of language. *Evolution and Human Behavior*, 34(1), 61–68.
<https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2012.09.004>

- Hopfield, J. J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(8), 2554–2558. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2554>
- Hoshi, E., & Tanji, J. (2007). Distinctions between dorsal and ventral premotor areas: Anatomical connectivity and functional properties. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(2), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.02.003>
- Jiang, W., Ding, S., Xu, C., Ke, H., Bo, H., Zhao, T., Ma, L., & Li, H. (2023). Discovering the neuronal dynamics in major depressive disorder using Hidden Markov Model. *Frontiers in Human Neuroscience*, 17, 1197613. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1197613>
- Johnson, P. B., Ferraina, S., Bianchi, L., & Caminiti, R. (1996). Cortical Networks for Visual Reaching: Physiological and Anatomical Organization of Frontal and Parietal Lobe Arm Regions. *Cerebral Cortex*, 6(2), 102–119. <https://doi.org/10.1093/cercor/6.2.102>
- Juang, B. H., & Rabiner, L. R. (1991). Hidden Markov Models for Speech Recognition. *Technometrics*, 33(3), 251–272. <https://doi.org/10.1080/00401706.1991.10484833>
- Kemere, C., Santhanam, G., Yu, B. M., Afshar, A., Ryu, S. I., Meng, T. H., & Shenoy, K. V. (2008). Detecting Neural-State Transitions Using Hidden Markov Models for Motor Cortical Prostheses. *Journal of Neurophysiology*, 100(4), 2441–2452. <https://doi.org/10.1152/jn.00924.2007>
- Keverne, E. B., Martensz, N. D., & Tuite, B. (1989). Beta-endorphin concentrations in cerebrospinal fluid of monkeys are influenced by grooming relationships. *Psychoneuroendocrinology*, 14(1–2), 155–161. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(89\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0306-4530(89)90065-6)
- Keysers, C., Kohler, E., Umiltà, M. A., Nanetti, L., Fogassi, L., & Gallese, V. (2003). Audiovisual mirror neurons and action recognition. *Experimental Brain Research*, 153(4), 628–636. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1603-5>
- Kirchherr, S., Mildiner Moraga, S., Coudé, G., Bimbi, M., Ferrari, P. F., Aarts, E., & Bonaiuto, J. J. (2023). Bayesian multilevel hidden Markov models identify stable state dynamics in longitudinal recordings from macaque primary motor

- cortex. *European Journal of Neuroscience*, 58(3), 2787–2806.
<https://doi.org/10.1111/ejn.16065>
- Kohler, E., Keysers, C., Umiltà, M. A., Fogassi, L., Gallese, V., & Rizzolatti, G. (2002). Hearing Sounds, Understanding Actions: Action Representation in Mirror Neurons. *Science*, 297(5582), 846–848. <https://doi.org/10.1126/science.1070311>
- Lanzarini, F., Maranesi, M., Rondoni, E. H., Albertini, D., Ferretti, E., Lanzilotto, M., Micera, S., Mazzoni, A., & Bonini, L. (2025). Neuroethology of natural actions in freely moving monkeys. *Science*, 387(6730), 214–220.
<https://doi.org/10.1126/science.adq6510>
- Lehmann, D., Ozaki, H., & Pal, I. (1987). EEG alpha map series: Brain micro-states by space-oriented adaptive segmentation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 67(3), 271–288. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(87\)90025-3](https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90025-3)
- Lehmann, D., Faber, P. L., Galderisi, S., Herrmann, W. M., Kinoshita, T., Koukkou, M., Mucci, A., Pascual-Marqui, R. D., Saito, N., Wackermann, J., Winterer, G., & Koenig, T. (2005). EEG microstate duration and syntax in acute, medication-naïve, first-episode schizophrenia: A multi-center study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 138(2), 141–156.
<https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2004.05.007>
- Lemon, R. N. (2008). Descending Pathways in Motor Control. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 195–218.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125547>
- Linderman, S. W., Johnson, M. J., Wilson, M. A., & Chen, Z. (2016). A Bayesian nonparametric approach for uncovering rat hippocampal population codes during spatial navigation. *Journal of Neuroscience Methods*, 263, 36–47.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.01.022>
- Luppino, G., Murata, A., Govoni, P., & Matelli, M. (1999). Largely segregated parietofrontal connections linking rostral intraparietal cortex (areas AIP and VIP) and the ventral premotor cortex (areas F5 and F4). *Experimental Brain Research*, 128(1–2), 181–187. <https://doi.org/10.1007/s002210050833>

- MacNeilage, P. F. (1998). The frame/content theory of evolution of speech production. *Behavioral and Brain Sciences*, 21(4), 499–511.
<https://doi.org/10.1017/S0140525X98001265>
- Markov, A.A. (1906) Extension of the Law of Large Numbers to Dependent Events. *Bulletin of the Society of the Physics Mathematics, Kazan, Russia*, 2, 155-156.
(In Russian)
- Matelli, M., Luppino, G., & Rizzolatti, G. (1985). Patterns of cytochrome oxidase activity in the frontal agranular cortex of the macaque monkey. *Behavioural Brain Research*, 18(2), 125–136. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(85\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(85)90068-3)
- Mathis, A., Mamidanna, P., Cury, K.M. et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat Neurosci* 21, 1281–1289 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0209-y>
- Michel, C. M., & Koenig, T. (2018). EEG microstates as a tool for studying the temporal dynamics of whole-brain neuronal networks: A review. *NeuroImage*, 180, 577–593. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.11.062>
- Middleton, F., & Strick, P. L. (2000). Basal ganglia and cerebellar loops: Motor and cognitive circuits. *Brain Research Reviews*, 31(2–3), 236–250.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(99\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00040-5)
- Molenberghs, P., Cunnington, R., & Mattingley, J. B. (2012). Brain regions with mirror properties: A meta-analysis of 125 human fMRI studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(1), 341–349.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.004>
- Morrill, R. J., Paukner, A., Ferrari, P. F., & Ghazanfar, A. A. (2012). Monkey lipsmacking develops like the human speech rhythm. *Developmental Science*, 15(4), 557–568. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2012.01149.x>
- Murata, A., Gallese, V., Luppino, G., Kaseda, M., & Sakata, H. (2000). Selectivity for the Shape, Size, and Orientation of Objects for Grasping in Neurons of Monkey Parietal Area AIP. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2580–2601.
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.2580>
- 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*, 50(4), 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.03.045>

- Norris, J. R. (1998). *Markov chains* (1st pbk. ed). Cambridge University Press.
- Nummenmaa, L., Tuominen, L., Dunbar, R., Hirvonen, J., Manninen, S., Arponen, E., Machin, A., Hari, R., Jääskeläinen, I. P., & Sams, M. (2016). Social touch modulates endogenous μ -opioid system activity in humans. *NeuroImage*, *138*, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.05.063>
- Penfield, W., & Boldrey, E. (1937). SOMATIC MOTOR AND SENSORY REPRESENTATION IN THE CEREBRAL CORTEX OF MAN AS STUDIED BY ELECTRICAL STIMULATION. *Brain*, *60*(4), 389–443. <https://doi.org/10.1093/brain/60.4.389>
- Pereira, A. S., Rebelo, I. D., Casanova, C., Lee, P. C., & Louca, V. (2019). The dynamics of grooming interactions: Maintenance of partner choice and the consequences of demographic variation for female mandrills. *PeerJ*, *7*, e6332. <https://doi.org/10.7717/peerj.6332>
- Petrides, M., Tomaiuolo, F., Yeterian, E. H., & Pandya, D. N. (2012). The prefrontal cortex: Comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. *Cortex*, *48*(1), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.07.002>
- Pieramico, G., Makkinayeri, S., Guidotti, R., Basti, A., Voso, D., Lucarelli, D., D’Andrea, A., L’Abbate, T., Romani, G. L., Pizzella, V., & Marzetti, L. (2025). Robustness of brain state identification in synthetic phase-coupled neurodynamics using Hidden Markov Models. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *19*, 1548437. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2025.1548437>
- Pulvermüller, F. (2013). How neurons make meaning: Brain mechanisms for embodied and abstract-symbolic semantics. *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(9), 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.06.004>
- Rabiner, L., & Juang, B. (1986). An introduction to hidden Markov models. *IEEE ASSP Magazine*, *3*(1), 4–16. <https://doi.org/10.1109/MASSP.1986.1165342>
- Rabiner, L. R. (1989). A tutorial on hidden Markov models and selected applications in speech recognition. *Proceedings of the IEEE*, *77*(2), 257–286. <https://doi.org/10.1109/5.18626>

- Rilling, J. K., Glasser, M. F., Preuss, T. M., Ma, X., Zhao, T., Hu, X., & Behrens, T. E. J. (2008). The evolution of the arcuate fasciculus revealed with comparative DTI. *Nature Neuroscience*, 11(4), 426–428. <https://doi.org/10.1038/nn2072>
- Rizzolatti, G., Gentilucci, M., Fogassi, L., Luppino, G., Matelli, M., & Ponzoni-Maggi, S. (1987). Neurons related to goal-directed motor acts in inferior area 6 of the macaque monkey. *Experimental Brain Research*, 67(1), 220–224. <https://doi.org/10.1007/BF00269468>
- Rizzolatti, G., Cattaneo, L., Fabbri-Destro, M., & Rozzi, S. (2014). Cortical Mechanisms Underlying the Organization of Goal-Directed Actions and Mirror Neuron-Based Action Understanding. *Physiological Reviews*, 94(2), 655–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2013>
- Rizzolatti, G., Fadiga, L., Fogassi, L., & Gallese, V. (1997). The Space Around Us. *Science*, 277(5323), 190–191. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.190>
- Rizzolatti, G., Fadiga, L., Gallese, V., & Fogassi, L. (1996). Premotor cortex and the recognition of motor actions. *Cognitive Brain Research*, 3(2), 131–141. [https://doi.org/10.1016/0926-6410\(95\)00038-0](https://doi.org/10.1016/0926-6410(95)00038-0)
- Rizzolatti, G., Fogassi, L., & Gallese, V. (2001). Neurophysiological mechanisms underlying the understanding and imitation of action. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(9), 661–670. <https://doi.org/10.1038/35090060>
- Rizzolatti, G., & Luppino, G. (2001). The Cortical Motor System. *Neuron*, 31(6), 889–901. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00423-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00423-8)
- Rizzolatti, G., & Matelli, M. (2003). Two different streams form the dorsal visual system: Anatomy and functions. *Experimental Brain Research*, 153(2), 146–157. <https://doi.org/10.1007/s00221-003-1588-0>
- Rizzolatti, G., Scandolara, C., Matelli, M., & Gentilucci, M. (1981). Afferent properties of periarculate neurons in macaque monkeys. II. Visual responses. *Behavioural Brain Research*, 2(2), 147–163. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(81\)90053-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(81)90053-X)
- Sapolsky, R. M. (2005). The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. *Science*, 308(5722), 648–652. <https://doi.org/10.1126/science.1106477>
- Schino, G. (2007). Grooming and agonistic support: A meta-analysis of primate reciprocal altruism. *Behavioral Ecology*, 18(1), 115–120. <https://doi.org/10.1093/beheco/arl045>

- Schino, G., & Aureli, F. (2008). Grooming reciprocation among female primates: A meta-analysis. *Biology Letters*, 4(1), 9–11.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0506>
- Seidemann, E., Meilijson, I., Abeles, M., Bergman, H., & Vaadia, E. (1996). Simultaneously recorded single units in the frontal cortex go through sequences of discrete and stable states in monkeys performing a delayed localization task. *The Journal of Neuroscience*, 16(2), 752–768.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-02-00752.1996>
- Seyfarth, R. M., & Cheney, D. L. (2012). The Evolutionary Origins of Friendship. *Annual Review of Psychology*, 63(1), 153–177. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-120710-100337>
- Sherrington, C. S. (1906). *The integrative action of the nervous system*. Yale University Press. <https://doi.org/10.1037/13798-000>
- Shutt, K., MacLarnon, A., Heistermann, M., & Semple, S. (2007). Grooming in Barbary macaques: Better to give than to receive? *Biology Letters*, 3(3), 231–233.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0052>
- Silk, J. B., Alberts, S. C., & Altmann, J. (2003). Social Bonds of Female Baboons Enhance Infant Survival. *Science*, 302(5648), 1231–1234.
<https://doi.org/10.1126/science.1088580>
- Silk, J. B., Beehner, J. C., Bergman, T. J., Crockford, C., Engh, A. L., Moscovice, L. R., Wittig, R. M., Seyfarth, R. M., & Cheney, D. L. (2010). Strong and Consistent Social Bonds Enhance the Longevity of Female Baboons. *Current Biology*, 20(15), 1359–1361. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.05.067>
- Strick, P. L. (1986). The organization of thalamic inputs to the “premotor” areas. In *Progress in Brain Research* (Vol. 64, pp. 99–109). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63405-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63405-6)
- Testard, C., Tremblay, S., Parodi, F., DiTullio, R. W., Acevedo-Ithier, A., Gardiner, K. L., Kording, K., & Platt, M. L. (2024). Neural signatures of natural behaviour in socializing macaques. *Nature*, 628(8007), 381–390.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07178-6>

- Thiebaut De Schotten, M., Dell'Acqua, F., Valabregue, R., & Catani, M. (2012). Monkey to human comparative anatomy of the frontal lobe association tracts. *Cortex*, 48(1), 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.10.001>
- Toffoli, L., Zdorovtsova, N., Epihova, G., Duma, G. M., Del Popolo Cristaldi, F., Pastore, M., Astle, D. E., & Mento, G. (2024). Dynamic transient brain states in preschoolers mirror parental report of behavior and emotion regulation. *Human Brain Mapping*, 45(14), e70011. <https://doi.org/10.1002/hbm.70011>
- Umiltà, M. A., Escola, L., Intskirveli, I., Grammont, F., Rochat, M., Caruana, F., Jezzini, A., Gallese, V., & Rizzolatti, G. (2008). When pliers become fingers in the monkey motor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2209–2213. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705985105>
- Umiltà, M. A., Kohler, E., Gallese, V., Fogassi, L., Fadiga, L., Keysers, C., & Rizzolatti, G. (2001). I Know What You Are Doing. *Neuron*, 31(1), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00337-3)
- Uozumi, T., Tamagawa, A., Hashimoto, T., & Tsuji, S. (2004). Motor hand representation in cortical area 44. *Neurology*, 62(5), 757–761. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000113731.75479.25>
- Van Hooff, J. A. R. A. M. (1962). Facial expressions in higher primates. *Symposia of the Zoological Society of London* 8, 97–125 (1962).
- Van Hooff, J. A. R. A. M. (1967). The Facial Displays of the Catarrhine Monkeys and Apes. In D. Morris (Ed.), *Primate ethology* (pp. 7–68). AldineTransaction.
- Vidaurre, D., Hunt, L. T., Quinn, A. J., Hunt, B. A. E., Brookes, M. J., Nobre, A. C., & Woolrich, M. W. (2018). Spontaneous cortical activity transiently organises into frequency specific phase-coupling networks. *Nature Communications*, 9(1), 2987. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05316-z>
- Vidaurre, D., Smith, S. M., & Woolrich, M. W. (2017). Brain network dynamics are hierarchically organized in time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(48), 12827–12832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705120114>
- Xia, D.-P., Wang, X., Garber, P. A., Sun, B.-H., Sheeran, L. K., Sun, L., & Li, J.-H. (2021). Effects of Hierarchical Steepness on Grooming Patterns in Female Tibetan Macaques (*Macaca thibetana*). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 631417. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.631417>

- Zhu, S. L., Lakshminarasimhan, K. J., & Angelaki, D. E. (2023). Computational CROSS-SPECIES views of the hippocampal formation. *Hippocampus*, 33(5), 586–599.
<https://doi.org/10.1002/hipo.23535>
- Zucchini, W., MacDonald, I. L., & Langrock, R. (2017). *Hidden Markov Models for Time Series: An Introduction Using R* (2^a ed.). Chapman and Hall/CRC.
<https://doi.org/10.1201/b20790>