UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Informatica e dell'Automazione



TESI DI LAUREA

Un approccio basato su complex network per la ricerca e la caratterizzazione di motif nel connettoma della Drosophila

A complex network-based approach for detecting and characterizing motifs in Drosophila connectome

Relatore

Prof. Domenico Ursino

Candidata

Arianna Ronci

Correlatori

Dott. Enrico Corradini

Prof. Giorgio Terracina

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

“Dovrei chiedere scusa a
me stessa per aver creduto
di non essere abbastanza”.

Alda Merini

Sommario

Il connettoma è una mappa completa delle connessioni neurali presenti nel cervello di un organismo. Lo studio dei connettomi mira a comprendere come le diverse regioni del cervello comunichino tra loro e come la sua struttura si relazioni al funzionamento complessivo. Recentemente, sono stati compiuti significativi progressi nella ricostruzione del connettoma strutturale di vari organismi. Tra questi, il caso più complesso è quello della Drosophila melanogaster, oggetto di due studi distinti, ciascuno volto a ricostruire il connettoma di tale organismo in una differente fase evolutiva, ovvero la fase larvale e la fase adulta. Analizzando i connettomi, attraverso metodi della Complex Network Analysis, i ricercatori hanno ottenuto nuove informazioni sulla struttura cerebrale e sul comportamento della Drosophila, contribuendo alla comprensione delle dinamiche neurali e delle loro implicazioni biologiche. Questo lavoro di tesi si propone di proseguire questi studi. Sono state costruite due reti di supporto rappresentanti i connettomi della larva di Drosophila e della Drosophila adulta. È stato, poi, definito un insieme di tecniche per estrarre nuova conoscenza dai connettomi della Drosophila, al fine di approfondire la comprensione della connettività cerebrale in entrambe le fasi evolutive. Innanzitutto, è stata condotta un'analisi esplorativa dei dati sui connettomi della larva e dell'adulta per individuare le somiglianze e le differenze che li caratterizzano. Successivamente, si sono definiti algoritmi per l'estrazione di particolari motif, denominati pattern funzionali. Infine, si sono esplorate diverse modalità di estensione dei pattern funzionali per ottenere strutture di crescente complessità. L'analisi di questi permette di investigare i processi di interazione tra le aree cerebrali nel cervello della Drosophila.

Keyword: Complex Network Analysis, Network Science, Neuroscienze, Drosophila melanogaster, Connettoma, Connettività cerebrale, Aree celebrali, Pattern funzionali

Indice

Introduzione **1**

1 Dalla Network Science allo studio del cervello **4**
1.1 La complessità del cervello 4
1.1.1 L'attività cerebrale e il connettoma 5
1.2 Neuroscienze 6
1.3 Network Science 7
1.3.1 Reti e teoria dei grafi 7
1.4 La Network Science come approccio innovativo per la Neuroscienza 8
1.4.1 Aree di applicazione e possibili sviluppi 9
1.4.2 Neurosviluppo 9
1.4.3 Connettività tra il cervello e altri organi 10
1.4.4 Integrazione della struttura e delle funzioni cerebrali 11
1.4.5 Neuromorphic Computing 12

2 Introduzione agli studi sul connettoma della Drosophila **14**
2.1 La Drosophila melanogaster 14
2.2 La Drosophila nelle stadio larvale 15
2.2.1 Tipologie di connessioni 16
2.2.2 Clustering gerarchico 19
2.2.3 Propagazione dei segnali 21
2.2.4 Analisi sugli emisferi 22
2.3 La Drosophila nello stadio adulto 22
2.3.1 Interconnessione dei neuroni 23
2.3.2 L'esistenza di un *ricco club* 24
2.3.3 Motif a due e a tre nodi 26
2.3.4 Connettività tra le regioni cerebrali 27
2.3.5 Classificazione delle cellule 28
2.4 Ulteriori sviluppi 29

3 Explorative Data Analysis sul connettoma della Drosophila **30**
3.1 Dataset 30
3.2 Rappresentazione del connettoma come grafo 31
3.3 Caratteristiche e proprietà strutturali 31
3.4 Analisi delle centralità 36

3.4.1 Correlazione tra le misure di centralità 41
3.5 Aree funzionali 44

4 Estrazione di motif di base **47**
4.1 Network motif 47
4.1.1 Pattern funzionale di un neurone 48
4.1.2 Quadratic Assignment Procedure 49
4.1.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale 50
4.2 Analisi dei pattern funzionali nella larva di Drosophila 51
4.3 Analisi dei pattern funzionali nella Drosophila adulta 56

5 Estrazione di motif complessi **62**
5.1 Dai motif di base a motif complessi 62
5.2 Estensione lineare dei pattern funzionali 62
5.2.1 Processo di estensione lineare 63
5.2.2 Descrizione di una catena lineare di pattern funzionali 65
5.2.3 Rappresentazione grafica di una catena lineare di pattern funzionali . 65
5.2.4 I risultati del processo di estensione lineare 66
5.3 Estensione gerarchica dei pattern funzionali 79
5.3.1 Processo di estensione gerarchica 79
5.3.2 Descrizione di pattern funzionale gerarchico 80
5.3.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale gerarchico 80
5.3.4 I risultati del processo di estensione gerarchica 81
5.4 Estensione multi-core dei pattern funzionali 84
5.4.1 Processo di estensione multi-core dei pattern funzionali 85
5.4.2 Descrizione di un pattern funzionale multi-core 86
5.4.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale multi-core 86
5.4.4 I risultati del processo di estensione multi-core dei pattern funzionali . 86
5.5 Sviluppi futuri 89

Conclusioni **91**

Bibliografia **93**

Sitografia **97**

Ringraziamenti **98**

Elenco delle figure

2.1 Morfologia del connettoma della larva di Drosophila 16
2.2 I quattro tipi di connessione nella larva di Drosophila 17
2.3 Matrici di adiacenza riferite ai differenti tipi di connessione tra i neuroni della larva di Drosophila 18
2.4 Clustering gerarchico dei neuroni basato sulla connettività nella larva di Drosophila 19
2.5 Percorsi dai neuroni di input ai neuroni di output con 6 o meno salti nella larva di Drosophila 21
2.6 Classificazione dei neuroni in base alle modalità sensoriali nella larva di Drosophila 22
2.7 Morfologia del connettoma della Drosophila adulta 23
2.8 Distinzione in categorie dei nodi del ricco club in base all'indegree e all'outdegree nella Drosophila adulta 25
2.9 Distribuzione dei motif a tre nodi nella Drosophila adulta rispetto ai modelli nulli di ER e di CFG 26
2.10 Suddivisione in neuropili del connettoma della Drosophila adulta 27
2.11 Annotazione gerarchica (primi due livelli) dei neuroni della Drosophila adulta 28
2.12 Conteggio dei neuroni per superclassi negli emisferi della Drosophila adulta . 29

3.1 Reti parziali indotte dalle differenti tipologie di connessioni nella larva di Drosophila 35
3.2 Rete indotta dalla totalità delle connessioni nel connettoma della larva di Drosophila 35
3.3 Distribuzione della degree centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso) 38
3.4 Distribuzione della closeness centrality su scala normale per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso) 39
3.5 Distribuzione della betweenness centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso) 40
3.6 Distribuzione della eigenvector centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso) 40

3.7 Valori del coefficiente di correlazione di Spearman per le diverse centralità nella larva di Drosophila 42
3.8 Valori del coefficiente di correlazione di Spearman per le diverse centralità nella Drosophila adulta 42
3.9 Conteggio dei neuroni per area funzionale nella larva di Drosophila 45
3.10 Conteggio dei neuroni per area funzionale nella Drosophila adulta 45
3.11 Connettività tra le aree nel connettoma della larva (a sinistra) e nel connettoma dell'adulta (a destra) 46

4.1 Associazione cromatica per le aree funzionali nella larva di Drosophila 50
4.2 Associazione cromatica per le aree funzionali nella Drosophila adulta 50
4.3 Frequenza dei pattern funzionali basati su "cell type" identificati nella larva di Drosophila 51
4.4 Frequenza dei pattern funzionali basati sull'astrazione di livello superiore di tipo di cellula identificati nella larva di Drosophila 51
4.5 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "pre-output" più frequenti nella larva di Drosophila 54
4.6 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "innate" più frequenti nella larva di Drosophila 54
4.7 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "deep brain" nella larva di Drosophila 55
4.8 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "learning/memory" più frequenti nella larva di Drosophila 55
4.9 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "sensory" più frequenti nella larva di Drosophila 56
4.10 Frequenza dei pattern funzionali identificati nella Drosophila adulta 56
4.11 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "central" più frequenti nella Drosophila adulta 59
4.12 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "visual projection" più frequenti nella Drosophila adulta 59
4.13 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "sensory" più frequenti nella Drosophila adulta 60
4.14 Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "optic" più frequenti nella Drosophila adulta 60

5.1 Rappresentazione grafica di alcune coppie di pattern funzionali 67
5.2 Rappresentazione grafica di alcune triple di pattern funzionali 69
5.3 Rappresentazione grafica di alcune quadruple di pattern funzionali 71
5.4 Rappresentazione grafica di alcune quintuple di pattern funzionali 73
5.5 Rappresentazione grafica di alcune sestuple di pattern funzionali 75
5.6 Rappresentazione grafica di alcune settuple di pattern funzionali 77
5.7 Rappresentazione grafica di alcune ottuple di pattern funzionali 78
5.8 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale gerarchico 82
5.9 Rappresentazione grafica di un altro pattern funzionale gerarchico 83
5.10 Rappresentazione grafica di alcuni pattern con una coppia di core 88
5.11 Rappresentazione grafica di alcuni pattern con una tripla di core 89

Elenco delle tabelle

2.1 Tipi di cellula neuronale, definizione e aree cerebrali nella larva di Drosophila 20
2.2 Descrizione delle proprietà funzionali delle superclassi nella Drosophila adulta [Schlegel *et al.*, 2023] 29

3.1 Caratteristiche strutturali delle reti indotte dalle differenti tipologie di connessioni nella larva di Drosophila 32
3.2 Confronto tra le caratteristiche strutturali delle reti associate al connettoma della larva di Drosophila e al connettoma della Drosophila adulta 36
3.3 Percentuale dei nodi nell'intersezione tra il 20 % superiore dei nodi per due diverse misure di centralità 43

4.1 Pattern funzionali significativi presenti nel connettoma della larva di Drosophila 52
4.2 Pattern funzionali significativi presenti nel connettoma della Drosophila adulta 58

5.1 Coppie di pattern funzionali significative 67
5.2 Triple di pattern funzionali significative 68
5.3 Quadruple di pattern funzionali significative 70
5.4 Quintuple di pattern funzionali significative 72
5.5 Sestuple di pattern funzionali significative 74
5.6 Settuple di pattern funzionali significative 76
5.7 Ottuple di pattern funzionali significative 76
5.8 Pattern funzionali gerarchici di livello 2 significativi 82
5.9 Pattern con una coppia di core significativi 87
5.10 Pattern con una tripla di core significativi 87

Introduzione

La totalità delle connessioni tra i neuroni di un sistema nervoso è mappata dal connettoma. L'analisi del connettoma consiste nello studio dettagliato di come le diverse regioni del cervello comunichino tra loro e di come la struttura del cervello sia correlata alle sue funzioni. La comprensione del connettoma di un organismo offre importanti dettagli sulle basi biologiche di processi complessi, come memoria, apprendimento, percezione e attenzione, oltre a chiarire le dinamiche alla base delle scelte comportamentali e delle patologie psicologiche. Le potenzialità dello studio del connettoma sono confermate dalle nuove scoperte nel campo delle neuroscienze, alcune delle quali hanno dimostrato, ad esempio, che alterazioni specifiche del connettoma sono associate a disturbi neurologici, quali autismo, epilessia, malattia di Alzheimer e morbo di Parkinson [Arias-Vergara *et al.*, 2017; de Ipiña *et al.*, 2015; Fouladi *et al.*, 2022; Fu *et al.*, 2019; Lariviére *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Mekyska *et al.*, 2018]. Tali scoperte aprono la strada allo sviluppo di strategie terapeutiche innovative, che integrano le conoscenze acquisite sulle connessioni neuronali. Oltre alla sua rilevanza nel campo neuroscientifico, lo studio del connettoma fornisce rilevanti spunti per lo sviluppo di reti neurali artificiali sempre più avanzate, migliorando le capacità di apprendimento e calcolo computazionale. Questi aspetti rendono evidente l'importanza cruciale di questo ambito di ricerca che, negli ultimi anni, ha raccolto un crescente interesse.

Nell'affrontare lo studio del connettoma, è fondamentale distinguere tra il connettoma strutturale e quello funzionale. La connettività strutturale si riferisce alle connessioni fisiche che, a livello anatomico, legano i vari elementi neuronali, mentre la connettività funzionale descrive le interazioni dinamiche tra le diverse regioni del cervello, spiegando come queste siano collegate in termini operativi.

Mentre la ricostruzione del connettoma funzionale può essere effettuata tramite tecniche non invasive, come la risonanza magnetica, la costruzione del connettoma strutturale rappresenta una sfida piuttosto complessa. A causa della densa rete di connessioni tra miliardi di neuroni, la mappatura completa richiede enormi risorse computazionali. Ad ogni modo, recenti progressi hanno permesso di sviluppare nuove tecniche, tra cui l'uso combinato di microscopia ad alta risoluzione, tomografia a emissione di positroni e Intelligenza Artificiale, che aprono nuove prospettive nella mappatura del cervello.

Il primo traguardo nella mappatura del connettoma di un organismo era già stato raggiunto nel 1986, quando il connettoma di Caenorhabditis elegans è stato ricostruito nella sua interezza [White *et al.*, 1986]. Questo nematode, con poche centinaia di neuroni, ha rappresentato il punto di partenza per lo studio delle connessioni neurali. Grazie ai progressi tecnologici più recenti, è stato poi possibile mappare connettomi di organismi di complessità crescente, caratterizzati da sistemi nervosi più articolati, come Ciona intestinalis [Ryan *et al.*, 2016]

e Platynereis dumerilii [Verasztó *et al.*, 2020]. Il salto di complessità più significativo si è compiuto con la mappatura completa del connettoma di Drosophila melanogaster, che ad oggi rappresenta il più complesso sistema nervoso completamente mappato, con milioni di sinapsi e centinaia di migliaia di connessioni neurali. La Drosophila, nonostante la sua apparente semplicità, manifesta comportamenti sofisticati, come l'apprendimento e la capacità decisionale. Studi recenti hanno ricostruito la connettività cerebrale di questo organismo sia nella fase larvale [Winding *et al.*, 2023] sia in quella adulta [Lin *et al.*, 2024]. I due gruppi di ricercatori hanno applicato semplici tecniche di Complex Network Analysis per estrarre alcune informazione dai connettomi della Drosophila nelle due fasi evolutive. La disponibilità del connettoma in differenti fasi evolutive rappresenta un'opportunità unica per condurre analisi avanzate che possono fornire nuove intuizioni sul funzionamento del cervello e dei suoi processi cognitivi ed, inoltre, per analizzare l'evoluzione celebrare.

In questo contesto si inserisce il nostro lavoro in continuità con gli studi di Winding *et al.* [2023] e Lin *et al.* [2024], rappresentando il punto di partenza per un affascinante percorso di scoperta, volto a svelare le caratteristiche fondamentali del cervello e dei suoi processi, aprendo la strada a future indagini più approfondite sulle reti neurali nei vari organismi. Intendiamo quindi proseguire su questa linea di ricerca, adottando un approccio che sfrutta tecniche innovative di Network Analysis e di teoria dei grafi per studiare il connettoma della larva di Drosophila e dell'adulta.

In particolare, questa tesi è incentrata sullo studio dei cosiddetti "*network motif*", ossia schemi di interconnessione tra nodi di una rete, caratterizzati da una probabilità di occorrenza significativamente superiore a quella delle reti casuali [Milo *et al.*, 2002]. Questi sono stati esaminati nel contesto di reti sia biologiche che artificiali ed è ormai ampiamente riconosciuto che costituiscano i mattoni funzionali di base delle reti neuronali. Pertanto, analizzarli può fornire informazioni preziose su come le reti siano organizzate e su come avvenga l'elaborazione delle informazioni al loro interno. Indagini sistematiche sulla connettività neuronale nel nematode Caenorhabditis elegans [White *et al.*, 1986] e sulle vie interregionali su larga scala nella corteccia cerebrale dei mammiferi, come nel ratto, nel gatto e nella scimmia macaco [Burns e Young, 2000; C.C. Hilgetag *et al.*, 2000; Felleman e Essen, 1991; Scannell *et al.*, 1995, 1999], hanno dimostrato che la topologia di queste reti non è né completamente casuale né completamente regolare, suggerendo che i connettomi di questi organismi possano essere composti da un insieme ristretto di schemi ricorrenti. Un esempio pionieristico di ricerca che esplora lo studio dei motif ha sottolineato come questo lavoro potrebbe permettere di ottenere intuizioni sulle regole che governano la struttura delle reti complesse, indagando la loro composizione a partire da blocchi costitutivi di rete più piccoli, appunto i motif [Sporns e Kötter, 2004].

A differenza di tali studi, che si sono limitati a considerare motif comunemente utilizzati nella Network Science, proponiamo una nuova tipologia di motif, progettata ad hoc, per indagare le interazioni tra le aree funzionali del connettoma della Drosophila. Definiamo tali motif come *pattern funzionali*. Il pattern funzionale di un neurone descrive l'area funzionale di appartenenza del neurone stesso e le aree funzionali a cui appartengono i neuroni ad esso collegati, indicando l'esistenza di una sottorete che coinvolge neuroni di aree funzionali specifiche, collegati da connessioni specifiche. Con il termine "area funzionale" intendiamo l'astrazione di livello più alto del tipo di cellula specificato per i neuroni della larva di Drosophila e la superclasse di riferimento per i neuroni della Drosophila adulta. Abbiamo utilizzato questa terminologia per unificare le differenti classificazioni dei neuroni, adottate nei due lavori precedenti.

Abbiamo poi proseguito l'analisi valutando la possibilità di estendere questi motif di base, cercando di combinarli tra loro, ottenendo motif di complessità crescente. Nello specifico, sono state formulate tre possibili metodologie di estensione ciascuna delle quali sfrutta differenti

elementi che permettono l'integrazione di istanze di pattern funzionali in modo diverso. Il primo meccanismo di espansione ha previsto una combinazione lineare dei pattern funzionali, da cui si sono ottenute catene lineari di lunghezza crescente, aggiungendo nuovi pattern in modo sequenziale alla catena. Il secondo meccanismo di espansione ha cercato di definire un'espansione gerarchica, creando una struttura stratificata. Infine, il terzo meccanismo di espansione si è basato su un approccio ancora diverso integrando gradualmente nuove aree funzionali e permettendo una crescita incrementale della struttura di un pattern funzionale. Ciascuna di queste metodologie ha offerto un modo unico di affrontare l'espansione dei motif, fornendo prospettive differenti su come i pattern funzionali di base possano essere combinati per formare strutture sempre più complesse.

La presente tesi è strutturata come di seguito specificato:

- Nel Capitolo 1 inquadriamo il background del lavoro, fornendo una descrizione generale delle discipline che costituiscono il fulcro dell'analisi, ossia la Network Science e le Neuroscienze, esplorando il potenziale della loro combinazione e le relative applicazioni.
- Nel Capitolo 2 presentiamo una panoramica degli studi precedentemente condotti sulla Drosophila. In particolare, esponiamo alcuni dei risultati delle analisi sul connettoma della larva eseguite da Winding *et al.* [2023] e sul connettoma dell'adulta da Lin *et al.* [2024], che rappresentano il punto di partenza della nostra ricerca.
- Nel Capitolo 3 introduciamo i dataset utilizzati e discutiamo i risultati dell'Explorative Data Analysis eseguita su di essi.
- Nel Capitolo 4 definiamo il concetto di pattern funzionale di un neurone e discutiamo i risultati ottenuti dal processo di estrazione di tali motif dal connettoma della larva di Drosophila e della Drosophila adulta.
- Nel Capitolo 5 esploriamo tre possibili modalità di estensione dei motif di base e ne riportiamo i risultati ottenuti per la larva di Drosophila.
- Infine, traiamo le nostre conclusioni sul lavoro svolto e delineiamo alcuni possibili sviluppi futuri.

CAPITOLO 1

Dalla Network Science allo studio del cervello

In questo capitolo, si introduce il campo di studio e di ricerca in cui il lavoro di tesi proposto si inserisce. Le Neuroscienze e la Network Science di recente sono state combinate insieme con l'obiettivo di approfondire la conoscenza dell'architettura biologica-neurale e delle funzioni del sistema nervoso di organismi più o meno complessi. Ciò ha offerto un approccio innovativo per comprendere come le intricate connessioni del cervello supportino e influenzino le sue funzioni complesse, come la percezione, la memoria, l'apprendimento, l'elaborazione dell'informazione e del pensiero.

1.1 La complessità del cervello

Si considera spesso il cervello umano come l'oggetto più complesso dell'universo.

Il cervello è l'organo centrale del sistema nervoso di molti organismi, che funge da centro di controllo per le attività corporee e per la regolazione delle funzioni vitali. È una struttura altamente complessa e sofisticata, composta da numerose sottostrutture.

Il neurone è l'unità cellulare fondamentale del cervello ed è attraverso il coordinamento di miliardi di queste cellule che questo organo riesce a gestire l'informazione e dettare il comportamento.

Una moltitudine di neuroni interagiscono tra loro attraverso innumerevoli connessioni, dette sinapsi, le quali consentono il passaggio degli impulsi nervosi, che consistono in segnali elettrici. Questa fitta rete di connessioni forma la base della connettività neurale, un concetto centrale nella comprensione del funzionamento del cervello. Lo studio della connettività funzionale e strutturale è tra i temi attualmente più discussi nell'ambito delle neuroscienze. Scoprire questa rete di connessioni, base strutturale del funzionamento del cervello, costituisce proprio un campo di studio noto come connettomica.

Chiaramente la complessità del cervello varia notevolmente da specie a specie, data la diversità delle funzioni necessarie per la sopravvivenza e il differente processo evolutivo che interessa ciascuna di esse. Nei vertebrati più semplici, come i pesci e gli anfibi, il cervello è relativamente piccolo e meno complesso. Al contrario, nei mammiferi, l'evoluzione ha favorito l'espansione della corteccia cerebrale e l'aumento della connettività, permettendo lo sviluppo di comportamenti maggiormente complessi e sofisticati. Nonostante questa differenziazione, anche per organismi più semplici, il cervello risulta essere un sistema complesso, il che

pone sfide significative nella comprensione della sua struttura, delle sue funzioni e della sua dinamica.

Data tale complessità, è ben presto diventato evidente che limitarsi allo studio dei singoli elementi, quali neuroni, sinapsi e neurotrasmettitori, non è sufficiente per comprendere in modo completo il funzionamento del cervello. Per capire le basi neurali del comportamento e delle funzioni come il controllo del pensiero, l'elaborazione delle informazioni, la memoria, il linguaggio, la percezione, il movimento e la cognizione, è necessario studiare e catalogare tutte le interazioni che avvengono tra i neuroni e analizzare come la struttura cerebrale, il connettoma, è collegata alla funzione cerebrale.

1.1.1 L'attività cerebrale e il connettoma

L'attività cerebrale può essere metaforicamente immaginata come un fiume che scorre lungo il suo letto. In questa metafora, il corso d'acqua rappresenta l'attività elettrica del cervello e il letto del fiume simboleggia il connettoma, ossia la complessa rete di connessioni neurali che guida il "corso" del flusso dell'informazione.

Il termine "connettoma" è stato definito per la prima volta non molti anni fa, in un rivoluzionario articolo del 2005, in cui gli autori Sporns *et al.* hanno definito il connettoma come "una descrizione strutturale completa della rete di elementi e connessioni che formano il cervello umano". Nell'articolo si anticipava l'idea di costituire una vera e propria mappa delle aree del cervello, impiegando tecniche di mappatura avanzate.

Si distingue un connettoma strutturale e un connettoma funzionale.

Il connettoma strutturale è l'insieme delle connessioni fra i neuroni instaurate attraverso dei prolungamenti citoplasmatici, chiamati assoni e dendriti, che si diramano da questi corpi cellulari e che permettono di mettere in comunicazione, attraverso le sinapsi, parti diverse del cervello, le cosiddette aree cerebrali. L'aggettivo "strutturale" è dato dal fatto che tale connettoma è costituito da veri e propri collegamenti fisici fra le diverse strutture cerebrali. Il connettoma funzionale, invece, è la mappa delle aree del cervello non necessariamente connesse, anche lontane fra loro, che lavorano insieme per adempiere a una determinata funzione; è indipendente dalla conoscenza delle connessioni fisiche. Esiste una stretta relazione tra connettoma strutturale e funzionale. Si può pensare al connettoma strutturale come all'hardware del cervello e al connettoma funzionale come al software.

Per studiare il connettoma si hanno oggi a disposizione tecniche innovative che consentono di guardare all'interno del cervello in maniera non invasiva. La struttura del cervello può essere osservata grazie a tecniche disponibili ormai da molto tempo, quali la tomografia assiale computerizzata e la risonanza magnetica nucleare. Tuttavia, ottenere la mappa completa del connettoma strutturale, essendo questo costituito da connessioni tra miliardi di neuroni, è un'impresa computazionale rilevante, resa possibile solo con l'uso combinato di microscopia ad altissima risoluzione, sia elettronica che a fluorescenza, e dell'Intelligenza Artificiale. Ad oggi, sono stati mappati connettomi completi solo per pochi organismi con diverse centinaia di neuroni, tra cui: Caenorhabditis elegans [White *et al.*, 1986], un verme nematode fasmidario, Ciona intestinalis [Ryan *et al.*, 2016], un'ascidia solitaria bentonica sessile, Platynereis dumerilii [Verasztó *et al.*, 2020], un minuscolo verme marino, e Drosophila melanogaster, un insetto, detto anche moscerino della frutta. I diagrammi circuitali delle sinapsi di cervelli più grandi, come insetti, pesci e mammiferi, sono stati affrontati finora considerando sottoregioni in modo isolato, determinando quindi una visione frammentata e non completa. Mappare il cervello umano è una delle grandi sfide scientifiche del 21° secolo.

Accanto a questo occorrono strumenti che consentano di esplorare come si comporta il cervello durante il suo funzionamento: mentre si pensa, si provano emozioni come gioia, tristezza, rabbia, paura, amore, o si compie un'azione, nel cervello, opportunamente stimolato, si "accendono" o si "spengono" specifiche aree cerebrali correlate a specifici comportamenti o

a specifiche funzioni cognitive. Questo obiettivo apparentemente utopico sta in realtà pian piano diventando sempre più raggiungibile grazie all'evoluzione delle tecniche d'immagine computerizzata. Le moderne strumentazioni di imaging cerebrale, come la risonanza magnetica funzionale, la tomografia a emissione di positroni, l'elettroencefalografia quantitativa e la magnetoencefalografia permettono di rilevare cambiamenti nell'attività elettrica e magnetica del cervello, nel flusso di sangue e di ossigeno in determinate aree cerebrali, mostrando, così, la dinamica sulla rete di neuroni. In particolare:

- La *risonanza magnetica funzionale* (fMRI) misura i cambiamenti nell'attività cerebrale rilevando le variazioni nella concentrazione di ossigeno nel sangue per mappare le regioni cerebrali coinvolte in diverse attività cognitive e comportamentali.
- La *tomografia ad emissione di positroni* utilizza radionuclidi per tracciare l'attività metabolica nel cervello, quindi studiare i processi biochimici e le disfunzioni cerebrali in pazienti con disturbi neurologici o psichiatrici.
- L'*elettroencefalografia* registra l'attività elettrica del cervello attraverso elettrodi posti sulla superficie del cuoio capelluto.
- La *magnetoencefalografia* misura i campi magnetici generati dall'attività elettrica neuronale per la localizzazione precisa delle fonti di attività cerebrale e l'analisi dei tempi di reazione.

Combinando tutte queste informazioni, si mira ad ottenere una conoscenza accurata del funzionamento della normale attività cerebrale. Questo permetterebbe, inoltre, di individuare i danni cerebrali all'origine di patologie neurologiche e di disturbi mentali, come la depressione, l'ansia, i deliri, le allucinazioni.

1.2 Neuroscienze

Le Neuroscienze consistono nello studio della struttura e del funzionamento del sistema nervoso. In particolare, si occupano di indagare circa lo sviluppo del sistema nervoso, la sua anatomia, il suo funzionamento, le connessioni esistenti tra le diverse aree cerebrali e i comportamenti manifesti, con lo scopo di comprendere come lavora il sistema nervoso sia in condizioni di sanità che in condizioni deficitarie e patologiche. Come già detto, i neuroni sono le cellule specializzate nel trasmettere segnali elettrici e chimici all'interno del sistema nervoso. Le Neuroscienze cercano di comprendere come questi neuroni lavorano insieme per generare ed elaborare pensieri, emozioni, ricordi e molto altro.

Il termine "Neuroscienze" deriva dall'inglese "neurosciences", un neologismo introdotto dal neurofisiologo americano Francis O. Schmitt negli anni Sessanta del secolo scorso. Con questo termine Schmitt volle sottolineare la necessità di unire competenze, conoscenze e risorse di diverse discipline scientifiche per ottenere una comprensione completa e profonda della complessità del funzionamento cerebrale. In un'epoca in cui le discipline scientifiche tendevano spesso ad operare in modo isolato, egli credeva fermamente nell'importanza di un approccio integrato e interdisciplinare che combinasse la biologia, la psicologia, la chimica, la fisica e altre scienze.

Fin dalla loro nascita, le Neuroscienze si sono evolute in un campo sempre più ampio che continua a integrare tecniche e metodologie provenienti da una vasta gamma di settori, come l'Intelligenza Artificiale, l'ingegneria e la data science. Questa fusione di conoscenze permette di affrontare in modo più efficace le sfide sempre più complesse nella comprensione del cervello e delle sue funzioni.

Ad oggi, i principali argomenti di studio e di ricerca delle Neuroscienze sono:

- *Struttura e funzione del cervello.*
  Comprendere come il cervello è strutturato e come questa struttura influisce sulle funzioni cognitive e comportamentali è l'obiettivo primario delle Neuroscienze. L'intento è quello di mappare le diverse regioni cerebrali e determinare quali compiti siano associati a ciascuna di esse.

- *Trasmissione neuronale.*
  Per comprendere come i neuroni comunicano tra loro, le Neuroscienze studiano e analizzano come i segnali elettrici si propagano lungo gli assoni dei neuroni e come questi vengono trasmessi, attraverso le sinapsi, da un neurone all'altro.

- *Plasticità neurale.*
  Con plasticità neurale si intende la capacità del cervello di cambiare e adattarsi nel corso della vita. Questo processo di evoluzione si basa sulla capacità del cervello di apprende nuove informazioni, di adattarsi a lesioni o danni e può essere influenzato da esperienze ed esercizi mentali.

- *Neurochimica.*
  La neurochimica studia i prodotti chimici presenti nel cervello e come questi influenzano il comportamento e la funzione cerebrale. Questo campo di studio è legato alla comprensione delle basi chimiche delle malattie mentali e delle droghe psicoattive.

- *Neuroimaging*.
  Mediante l'uso di tecniche di imaging cerebrale, come la risonanza magnetica funzionale e la tomografia ad emissione di positroni, gli scienziati sono in grado di osservare l'attività cerebrale in tempo reale.

1.3 Network Science

La scienza delle reti, dall'inglese "Network Science", si occupa dello studio delle reti complesse, utilizzando il metodo scientifico. Questa disciplina è stata definita dal Consiglio Nazionale delle Ricerche degli Stati Uniti come

> "the study of network representations of physical, biological, and social phenomena leading to predictive models of these phenomena".

Le reti sono uno strumento efficace per rappresentare gran parte della realtà che ci circonda. Il web è l'esempio classico, ma anche le relazioni di amicizia, di parentela, le strade di una città e molti altri scenari possono essere modellati sotto forma di rete. Persino il processo di diffusione e contagio da un virus o una patologia può essere analizzato a partire da una rappresentazione sotto forma di rete.

La Network Science si basa sui concetti chiave della teoria dei grafi, una branca della matematica, che amplia poi con teorie e metodi tipici di diversi ambiti, quali il data mining, la data visualization, la modellazione inferenziale, le metodologie dalla statistica e lo studio della struttura sociale dalla sociologia.

1.3.1 Reti e teoria dei grafi

Un grafo è un formalismo grafico utile per descrivere e rappresentare relazioni binarie su una collezione finita e discreta di elementi. La relazione binaria è rappresentata da segmenti, detti archi del grafo, che congiungono gli elementi in relazione, detti nodi del grafo.

Formalmente, un grafo G è una coppia ordinata di insiemi finiti $G = (N, E)$, dove:

- N è l'insieme di nodi (o vertici),
- E è l'insieme di archi.

I nodi possono essere di un solo tipo o di più tipi. Se un grafo contiene nodi di un solo tipo allora è detto 1-mode graph; se contiene nodi di due tipi allora è un grafo bimodale o 2-mode. In generale, si parla di grafi multi-modali.

Gli archi possono essere orientati o meno. Un grafo orientato è caratterizzato da archi orientati, ossia dotati di una direzione e di un verso. Un grafo non orientato è, invece, un insieme di nodi e archi non orientati, cioè dotati di una direzione, ma non dotati di un verso; ciò significa che la connessione tra nodo i e un nodo j ha lo stesso significato della connessione tra j e i. Un legame di amicizia è un esempio di relazione binaria simmetrica, che quindi sarebbe rappresentato come un arco non orientato.

Inoltre, talvolta è possibile che ad ogni arco sia associato un valore numerico, detto peso, che è indicatore dell'intensità del legame. Si parla in tal caso di grafo pesato.

Un grafo viene generalmente raffigurato sul piano da punti, che rappresentano i nodi, e i collegamenti tra essi sono rappresentati da segmenti che collegano due nodi. Nel caso di un grafo orientato, il verso degli archi è indicato da una freccia. La "testa" della freccia raggiunge un nodo in entrata, e la "coda" lascia un nodo in uscita. Il posizionamento dei nodi e la forma degli archi è irrilevante poiché non inficia le proprietà del grafo che sono univocamente determinate dall'insieme dei nodi e degli archi. Infatti, lo stesso grafo può essere disegnato in diversi modi, secondo differenti layout.

La rappresentazione grafica, per quanto utile, non è idonea per la manipolazione della rete. Esistono, quindi, modalità di rappresentazione alternative. Il modo più classico di rappresentare matematicamente un grafo è tramite una matrice, detta matrice di adiacenza.

Data un grafo G con n nodi, la matrice di adiacenza A è una matrice quadrata di dimensione $n \times n$, in cui ciascun elemento A_{ij} descrive la presenza o l'assenza di un arco tra il nodo i e il nodo j, come valore binario 0 o 1. Per un grafo pesato, l'elemento A_{ij} rappresenta il peso dell'arco tra il nodo i e il nodo j.

Su tale struttura si possono misurare differenti indici di base, si possono applicare strumenti di attraversamento delle reti, algoritmi più o meno complessi, al fine di estrapolare conoscenza.

1.4 La Network Science come approccio innovativo per la Neuroscienza

I progressi tecnici e sperimentali nelle Neuroscienze hanno permesso di studiare il cervello in maniera sempre più precisa e dettagliata, rendendo possibile una mappatura accurata e di alta qualità della connettività e la descrizione del profilo genetico.

La microscopia elettronica, con i suoi recenti sviluppi, consente di ottenere immagini ad alta risoluzione delle strutture cellulari, comprese le sinapsi tra i neuroni. In questo modo, è stato possibile ottenere informazioni sul connettoma di interi organismi, quali Ciona Intestinalis [Ryan *et al.*, 2016] e Platynereis dumerilii [Verasztó *et al.*, 2020], nonché mappe di connettività a livello cerebrale, in diversi stadi di sviluppo, per la Drosophila [Eichler et al. 2017, Scheffer et al. 2020, Winding et al. 2023], insieme a connettomi parziali per specie molto più complesse, come zebrafish [Hildebrand *et al.*, 2017], topi [Ding *et al.*, 2023] ed esseri umani [Shapson-Coe *et al.*, 2024].

La trascrittomica a singola cellula, biotecnologia che mira all'analisi del trascrittoma, ovvero dell'intero profilo degli RNA messaggeri, ha permesso anche di ottenere una sorta di profilazione diversificata delle identità cellulari in vari animali, stadi di sviluppo e modelli di salute del cervello. Questo ha permesso di raccogliere informazioni dettagliate sulla connettività e sull'identità di migliaia di neuroni.

I continui avanzamenti nelle Neuroscienze hanno reso possibile una comprensione sempre più dettagliata del cervello e delle sue funzioni, creando, così, nuove opportunità di ricerca molto interessanti e che fanno ben sperare.

Per catture le dinamiche di questo sistema complesso, è essenziale adottare la scienza delle reti. Questo approccio collaborativo mira a rivelare l'influenza tra l'identità neurale, le dinamiche neuronali, il comportamento e le malattie, offrendo una visione integrata di come questi elementi siano interrelati. Più in generale, nell'articolo proposto da Barabási *et al.* [2023], gli autori hanno sottolineato l'importanza di studiare le reti neurali biologiche utilizzando gli strumenti della Network Analysis.

La possibilità di impiegare la Network Science passa per la modellazione della connettività neurale come un grafo, descrivendo, quindi, il cervello come un insieme di nodi, che modellano i singoli neuroni, e un insieme di archi, che modellano le sinapsi. Per ogni neurone si ha un nodo e per ogni sinapsi un arco. Questa modellazione rende la scienza delle reti particolarmente adatta allo studio del connettoma: partendo dalla matrice di adiacenza, che codifica chi è connesso a chi, la Network Science offre una serie di strumenti per caratterizzare la struttura locale, le distribuzioni dei gradi, la struttura delle comunità, le correlazioni dei gradi, la robustezza della rete e molteplici altre proprietà topografiche.

Tuttavia, questo approccio è ancora limitativo poiché basato su grafi statici, come "congelati nel tempo", semplificando eccessivamente la reale complessità del cervello, ignorando i tipi di trasmissioni di impulsi, le dinamiche e i vincoli spaziali propri del cervello. Nuovi approcci emergenti della scienza delle reti offrono una metodologia per tentare di esplorare questi ulteriori elementi di complessità. Ad esempio, le reti multiplex e multistrato si configurano come un valido strumento per la comprensione e la descrizione delle relazioni e delle gerarchie cellula-cellula, catturando i motif circuitali che possono avere un impatto significativo sulle proprietà dinamiche e topologiche delle reti funzionali.

Il futuro della ricerca neuroscientifica e della scienza delle reti risiede nell'integrazione delle informazioni sulla connettività con una comprensione dettagliata delle proprietà fisiche e biochimiche dei neuroni. Esiste una reale necessità di andare oltre la semplice analisi delle connessioni tra i neuroni e incorporare la comprensione della loro natura fisica e biologica. Questo significa prendere in considerazione non solo come i neuroni sono collegati tra loro, ma anche come le proprietà intrinseche di queste cellule influenzano e modifichino queste connessioni.

1.4.1 Aree di applicazione e possibili sviluppi

L'integrazione delle Neuroscienze con altre discipline scientifiche ha creato nuove e affascinanti scenari di applicazione. Questo approccio collaborativo interdisciplinare, oltre a migliorare la comprensione del cervello, sta anche aprendo la strada ad innovazioni tecnologiche, diagnostiche e terapeutiche. In questa sezione, si discutono alcune aree di applicazione vicine al mondo dell'informatica e gli sviluppi che potrebbero derivare da ricerche in tali campi.

1.4.2 Neurosviluppo

Il neurosviluppo è il processo attraverso il quale il sistema nervoso si forma durante la vita pre-natale e raggiunge la maturità strutturale e funzionale durante la vita post-natale, fino all'invecchiamento. Se lo sviluppo neurobiologico è anomalo questo potrebbe essere indicatore del rischio di manifestazione di disturbi del neurosviluppo.

L'uso di strumenti di Network Science in questo campo è stato finora limitato alla mappatura e all'analisi di mappe di rete statiche. Tuttavia, per capire l'origine delle caratteristiche della rete, osservate grazie alle tecniche neuroscientifiche prima citate, è necessario estrarre

le regole che governano la crescita e lo sviluppo della topologia delle reti che modellano la connettività. La teoria e gli strumenti propri della Network Science possono colmare questa lacuna e permettere di "completare il puzzle", quindi fornire un quadro quantitativo completo per studiare e comprendere il neurosviluppo.

In questo campo sono stati già ottenuti alcuni risultati interessanti. Si sono osservate e individuate alcune caratteristiche, definibili universali, in quanto presenti in quasi tutte le reti neurali, indipendentemente dalla specie. Tra queste caratteristiche rientrano la distribuzione dei gradi a coda pesante, la modularità e la presenza di hub altamenti interconessi [van den Heuvel, Bullmore e Sporns 2016; Buzsáki e Mizuseki 2014; Towlson et al. 2013].

Una distribuzione a coda pesante è una distribuzione statistica caratterizzata da una maggiore probabilità di eventi estremi o valori anomali rispetto a una distribuzione normale. In questo caso, tale distribuzione comporta che la maggioranza dei neuroni abbia poche connessioni, quindi un grado basso, e solo pochi neuroni abbiano un numero molto elevato di connessioni, suggerendo, tra l'altro, che esistano neuroni che svolgono un ruolo centrale nella comunicazione tra le differenti aree cerebrali. Tali neuroni si comportano come degli hub, permettendo una rapida trasmissione delle informazioni e il coordinamento della rete.

La modularità della rete dimostra, invece, la tendenza alla formazione di gruppi o moduli di neuroni altamente connessi tra loro. Un'organizzazione modulare è indicatrice di una strutturazione del cervello in unità funzionali distinte.

Una possibile spiegazione alla base di queste caratteristiche condivise è l'esistenza di vincoli strutturali dettati da un tentativo di bilanciamento tra i costi del neurosviluppo, associati alla costruzione e al mantenimento delle connessioni neurali, i vincoli fisici, come le dimensioni e la disposizione spaziale delle regioni cerebrali, l'efficienza e la velocità della trasmissione tra le diverse parti del cervello.

Proseguire in questa direzione nella ricerca sul neurosviluppo potrebbe fornire una comprensione più completa delle dinamiche cerebrali e avere implicazioni significative per la diagnosi e il trattamento delle patologie neurologiche. Conoscere le deviazioni dalla normale organizzazione della rete neurale può aiutare a diagnosticare disturbi del neurosviluppo, come l'autismo e la dislessia, con maggiore precisione.

Per studiare le cause e le dinamiche di disturbi cerebrali e di patologie mentali è fondamentale comprendere come il cervello transiti da uno stato di salute ad uno stato di malattia. Alcune ricerche hanno individuato alcune traiettorie dello sviluppo cerebrale sulla base dei dati ottenuti da tecniche di risonanza magnetica. Una deviazioni da tali traiettorie può essere indicatore di uno stato non in salute.

1.4.3 Connettività tra il cervello e altri organi

Oltre a considerare la connettività interna del cervello può essere altrettanto importante analizzare le connessioni esistenti tra il cervello e gli altri organi. È stato dimostrato che esistono interazioni complesse tra il cervello e il microbiota intestinale, il quale non solo modula le risposte immunitarie, ma influisce anche sulla produzione di neurotrasmettitori e sullo stato di infiammazione cerebrale. Le alterazioni nel microbiota possono contribuire a disturbi come l'ansia e la depressione. Inoltre, anche il sistema endocrino interagisce con il cervello, influenzando i livelli degli ormoni sessuali durante la pubertà, la menopausa e la gravidanza (Pritschet et al. 2020; Andreano et al. 2018), nonché determinando fluttuazioni ormonali dovute, ad esempio, allo stress cronico o alle disfunzioni tiroidee.

Esplorare in modo integrato le interazioni tra il cervello e il corpo nel suo complesso può fornire una comprensione più completa ed ampia dello sviluppo e della funzione cerebrale, contribuendo a identificare nuovi fattori che influenzano la salute e le patologie in modo più generale e a migliorare le strategie diagnostiche e terapeutiche.

1.4.4 Integrazione della struttura e delle funzioni cerebrali

Il cervello è una rete complessa che non si limita soltanto a trasmettere le informazioni da un punto all'altro, ma soprattutto si occupa di elaborare tali informazioni per trasformarle opportunamente.

Nelle reti informatiche, come Internet, la struttura e le funzioni sono distinte: la rete è semplicemente un'infrastruttura per la propagazione delle informazioni, che sono codificate nei segnali trasmessi. Ciò non è altrettanto valido nel cervello, dove questa distinzione non esiste e la codifica delle informazioni non avviene in modo isolato: il significato dell'informazione emerge non dal comportamento di un singolo neurone, ma da modelli collettivi di attività neuronale che coinvolgono molti neuroni contemporaneamente. Più neuroni si attivano in risposta ad uno stimolo. In altri termini, l'informazione non è codificata in un singolo neurone, bensì in un pattern di attivazione di una popolazione di neuroni.

Poiché la codifica delle informazioni è distribuita sulla rete, analizzare la disposizione dei neuroni e il modo in cui essi sono collegati è fondamentale per comprendere come il cervello elabora le informazioni. Da ciò segue che, nel cervello, a differenza di reti tecnologiche, la struttura stessa della rete non è solo il canale per trasmettere informazioni, ma è parte integrante del processo di codifica ed, in generale, dell'algoritmo che governa il funzionamento cognitivo. Questo significa anche che il connettoma non può essere studiato separatamente delle sue funzioni. Di conseguenza, per ottenere una rappresentazione robusta della rete cerebrale, è necessario combinare la modellazione strutturale con moduli, metriche e processi generativi. Recenti studi hanno dimostrato che le strutture legate alle funzioni cerebrali sono riflesse nella struttura delle reti neurali. Per approfondire questo campo, la ricerca futura dovrebbe incentrarsi sulla comprensione di come i modelli di connettività influenzino la geometria a livello di popolazione e su come ciò conduca alla formazione di strutture rilevanti dal punto di vista comportamentale.

Un esempio chiave di queste ricerche è dato dalle "mappe cognitive" dell'ippocampo, assimilabili a reti in cui ogni stato comportamentale è un nodo e le transizioni possibili tra stati sono rappresentate come archi [Muller (1996); Eichenbaum e Cohen (2004); Stachenfeld, Botvinick e Gershman (2017); George et al. (2021)].

In questo discorso è, inoltre, importante tenere conto della doppia dinamica del cervello tale per cui la connettività della rete definisce le possibili funzioni che possono essere supportate, mentre la dinamica funzionale della rete permette alle sinapsi di modificarsi, influenzando, così, la connettività stessa.

I metodi di apprendimento automatico rappresentano un possibile approccio per creare questa combinazione tra struttura e funzione della rete. Ulteriori sviluppi dovrebbero mirare ad individuare opportuni pesi che possano determinare prestazioni sempre migliori su compiti complessi. Questo inoltre permetterebbe anche di identificare sottoreti con maggiore influenza e maggiore importanza nella buona riuscita di una funzione. Un recente lavoro d'avanguardia [Lappalainen *et al.*, 2023] ha ricostruito sperimentalmente la connettività dei neuroni nelle vie di movimento del lobo ottico del moscerino della frutta e ha utilizzato quest'ultima per ottimizzare i parametri della rete neurale risultante, impiegando tecniche di Deep Learing. Le previsioni del modello ottenuto con questo lavoro sono state avvalorate da misurazioni sperimentali dell'attività neurale su 24 prove. Ciò ha dato una ulteriore dimostrazione del fatto che la conoscenza della struttura delle connessioni neuronali fornisce importanti spunti per la simulazione del comportamento di organismi reali.

Un approccio alternativo consiste, invece, nell'identificare i processi di sviluppo che producono reti altamente performanti. Questo modus operandi si ispira ai comportamenti innati degli animali, i quali nascono con dinamiche preesistenti che sono poi ottimizzate da un insieme di processi di sviluppo che producono un connettoma funzionale evoluto, a partire da quello delineato in fase natale. Codifiche dei pesi delle reti neurali ispirate allo sviluppo

hanno già mostrato prestazioni elevate in task di Reinforncement Learning e Transfer Learning [Barabási *et al.*, 2023]

La sfida da affrontare per ottenere ulteriori progressi è quella di fornire topologie o pesi personalizzati per i modelli di apprendimento automatico, così da superare le architetture standard a strati e feedforward e modellare in modo ottimo i processi neuroevolutivi.

1.4.5 Neuromorphic Computing

Il cervello umano è paragonabile ad una macchina con capacità computazionali ed efficienza di gran lunga superiori ai più prestanti computer moderni. La sfida chiave per l'Intelligenza Artificiale è quella di emulare in modo sempre più accurato il funzionamento del cervello umano e la sua abilità nell'apprendere ed estrarre pattern, elaborando gli stimoli non strutturati che riceve in input, da cui estrae solo la parte rilevante dell'informazione. Questa l'idea alla base del Neuromorphic Computing, una tecnologia che si ispira al funzionamento del cervello umano con il fine di migliorare l'efficienza dell'elaborazione dei dati, l'efficienza energetica, la velocità di calcolo e la capacità di apprendimento . Utilizzando osservazioni e scoperte provenienti dalle Neuroscienze, si stanno sviluppando chip che imitano l'attività del cervello biologico.

Questi chip si basano interamente sul concetto di rete neurale, ovvero un sistema che non viene programmato con una sequenza di istruzioni da eseguire, ma che viene addestrato e definito per mezzo di una serie di parametri associati ad ogni coppia neurone/sinapsi.

L'idea di realizzare sistemi informatici ispirati al cervello umano fu per la prima volta esplorata da alcuni ricercatori alla fine degli anni Ottanta dal secolo scorso, quindi quasi una cinquantina di anni fa.

Il Neuromorphic Computing e i computer basati sull'architettura di Von Neumann si rifanno a due approcci diversi dell'elaborazione dei dati. I sistemi neuromorfici abbandonano l'architettura di Von Neumann, su cui sono basati tutti i computer che siamo abituati a utilizzare ogni giorno. Tale architettura è caratterizzata una separazione netta tra memoria e unità di elaborazione, e ciò implica la necessità di spostare i dati da una componente all'altra. Questa separazione porta con sè due svantaggi principali:

- limitazione delle prestazioni, a causa della latenza;
- aumento del consumo energetico, per il continuo spostamento delle informazioni avanti e indietro, soprattutto considerato che ad oggi le informazioni da elaborare e, quindi, da trasmettere sono maggiori.

Inoltre, questo tipo di architettura informatica porta con sé una logica sequenziale: le operazioni vengono eseguite una alla volta, secondo un elenco predefinito di istruzioni. Il compito del programmatore è quello di scrivere il codice che definisce in modo esplicito ciò che il computer deve eseguire. Si utilizzano linguaggi di programmazione come C++, Python, Java, ecc.

D'altra parte, nel Neuromorphic Computing, i dati e il calcolo non sono separati. L'architettura neuromorfica è, infatti, costituita da nodi computazionali, ciascuno dei quali è composto sia da un'unità di calcolo che da una memoria, in modo da distribuire in maniera più uniforme la gestione del calcolo e delle informazioni. Questa architettura è più vicina alla modalità di lavoro del cervello umano.

In termini di programmazione, i sistemi neuromorfici non vengono programmati per eseguire sequenze di istruzioni specifiche, come i computer di Von Neumann, ma vengono configurati per eseguire specifiche operazioni attraverso un processo di addestramento della rete.

Una ulteriore differenza si ha nel modo in cui il sistema rappresenta dei dati: il linguaggio digitale binario è sostituito da un linguaggio analogico non binario, basato su un sistema pesato delle informazioni. In particolare, a ciascuna informazione viene assegnato un livello di importanza, assimilabile al potenziale di attivazione dei neuroni.

Un'altra caratteristica chiave dei sistemi neuromorfici, in quanto reti neurali, è il parallelismo che abilitano nell'elaborazione: le informazioni vengono processate simultaneamente da più nodi, permettendo alla rete di affrontare più compiti contemporaneamente. Ogni neurone può ricevere input da molti altri neuroni e inviare output a molti altri ancora. Questo significa che le informazioni non passano attraverso un flusso sequenziale, lineare, predefinito, come accade nei computer tradizionali; al contrario, l'informazione può essere elaborata in parallelo su vari percorsi, incrementando, così, l'efficienza e la velocità complessiva. Inoltre, la natura parallela delle reti neurali offre anche una certa ridondanza, rendendo i sistemi più resistenti a guasti, poiché l'informazione può essere ridistribuita attraverso altre parti della rete.

Queste caratteristiche determinano un vantaggio notevole per i sistemi di apprendimento automatico basati su reti poiché, così facendo, si riducono drasticamente i tempi di elaborazione e i costi di training, che sono attualmente i punti critici delle AI tradizionali. Rispetto a queste ultime, le AI neuromorfiche sono, quindi, più sostenibili e molto più efficienti, aspetti molto rilevanti per affrontare l'attuale crisi energetica e ambientale.

In sintesi, sistemi in grado di mimare il funzionamento del cervello umano in modo sempre più preciso aprono la strada ad enormi possibilità per sfruttare al meglio le caratteristiche proprie delle reti neurali, facendole evolvere in maniera spinta, superando i limiti della computazione tradizionale.

CAPITOLO 2

Introduzione agli studi sul connettoma della Drosophila

In questo capitolo, sono descritti alcuni dei risultati ottenuti da precedenti lavori portati a termine da gruppi di ricercatori, che hanno ricostruito il connettoma strutturale della Drosophila melanogaster, nello stadio larvale e in quello adulto. Questi, utilizzando avanzate tecniche di microscopia e di neuroimaging, hanno tracciato le connessioni sinaptiche tra i neuroni, costruendo delle mappature del connettoma, sulle quali, poi, hanno applicato strumenti e metodologie della Complex Network Analysis per estrarre e interpretare informazioni sul cervello della Drosophila e sul suo comportamento. Questi risultati rappresentano il punto di partenza per il lavoro di tesi qui presentato, che, come continuazione, si propone di estendere e approfondire tali analisi.

2.1 La Drosophila melanogaster

La Drosophila melanogaster, in gergo nota come "moscerino della frutta", in quanto comunemente si trova nelle vicinanze della frutta matura, è un insetto appartenente alla famiglia dei Drosophilidae, dell'ordine di insetti terrestri Diptera.

Il corpo di questo insetto si compone di tre segmenti principali, ovvero la testa, il torace e l'addome, un paio di ali e tre paia di zampe. Mediamente, un esemplare ha delle dimensioni pari a $2/4$ mm di lunghezza e un peso di circa 1 mg.

Da oltre cent'anni, la Drosophila è ampiamente utilizzata come modello per la ricerca scientifica, soprattutto nella genetica. Il sequenziamento del suo genoma è stato completato nel 1998 e comprende poco meno di 14 mila geni codificanti proteine, distribuiti su un totale di quattro cromosomi [Adams *et al.*, 2000]. Successivi studi condotti su questa specie hanno portato a molti progressi nella comprensione delle basi genetiche di una vasta gamma di processi biologici relativi al neurosviluppo e alle dinamiche comportamentali, nonché hanno permesso di approfondire la conoscenza della struttura del cervello di un organismo.

In particolare, il suo diffuso impiego nella ricerca è legato a molteplici fattori favorevoli, tra cui:

- è un insetto piccolo, facile da allevare in laboratorio e da manipolare geneticamente, grazie alla disponibilità di molti strumenti atti allo scopo;
- ha un ciclo di vita breve, di circa 2 settimane, a 25°C, che si articola in quattro stadi di sviluppo, che sono l'embrione, la larva, la pupa e l'adulta;

- ha una prolificità che può superare le 100 uova al giorno per esemplare femmina, caratteristica ideale per esperimenti statistici, che richiedono numerosi campioni per poter dimostrare la valenza scientifica di una tesi, o studi su più generazioni;
- sono disponibili tecniche avanzate di trasformazione genetica, che consentono manipolazioni precise del suo genoma;
- le mutazioni genetiche nella specie sono molto frequenti;
- ha un sistema nervoso sufficientemente complesso da consentire lo studio di un ricco repertorio di processi neuronali, compreso l'apprendimento, la capacità decisionale avanzata, il calcolo, la memoria a breve e a lungo termine, ma al contempo abbastanza semplice da poter essere completamente mappato e compreso;
- la disponibilità del connettoma completo in differenti stadi del ciclo di vita rende possibile effettuare analisi evolutive e confronti tra le differenti fasi evolutive.

Inoltre, dal punto di vista genetico, l'uomo e il moscerino della frutta condividono alcuni aspetti comuni. Molti dei geni presenti nella Drosophila sono presenti anche in molti mammiferi, inclusi gli esseri umani. Analogie si hanno anche relativamente alle malattie conosciute, che si possono verificare nel patrimonio genetico del moscerino: circa il 75 % dei geni correlati alle malattie umane ha un gene *ortologo*, ossia un gene omologo che codifica una stessa proteina, o un gene simile nella mosca, il che la rende un prezioso modello genetico per lo studio delle malattie umane neurodegenerative, come la sclerosi laterale amiotrofica, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, il morbo di Alzheimer, i tumori cerebrali e l'epilessia [Jeibmann e Paulus, 2009; Lawrence *et al.*, 2001; Prüssing *et al.*, 2013; Sarah *et al.*, 2013].

Sebbene la struttura anatomica del cervello della Drosophila sia differente in modo significativo da quella del cervello umano, molte delle funzioni cerebrali fondamentali sono conservate in entrambe le specie. Per questo, infatti, il modello dell'insetto viene utilizzato anche per studiare i meccanismi biologici alla base del sistema immunitario, del cancro, dell'intelligenza, dell'invecchiamento, e persino dell'abuso di sostanze stupefacenti.

In generale, questa somiglianza genetica fa sì che i risultati ottenuti nella ricerca condotta sulla Drosophila siano in parte rilevanti per la comprensione delle funzioni cerebrali dell'uomo e delle patologie correlate.

La disponibilità del connettoma completo della Drosophila negli stadi larvale [Winding *et al.*, 2023] e adulto [Lin *et al.*, 2024] costituisce il punto di partenza per una serie di studi teorici e sperimentali, volti a comprendere in modo più preciso i meccanismi che regolano il funzionamento di questo organismo.

Inoltre, in futuro, man mano che saranno mappati connettomi di organismi sempre più complessi, l'approccio e gli strumenti impiegati in queste ricerche condotte sulla Drosophila potranno essere rispesi come linee guida per nuovi casi di studio.

2.2 La Drosophila nelle stadio larvale

La struttura fisica delle connessioni neuronali, ovvero il connettoma strutturale, dell'intero cervello della Drosophila nello stadio larvale è stata ricostruita sperimentalmente grazie al lavoro di Winding *et al.* [2023]. Il connettoma completo di risoluzione sinaptica, mappato dai ricercatori, autori dell'articolo, si compone di 3016 neuroni e 548.000 sinapsi. La mappatura è stata ottenuta dagli autori utilizzando la ricostruzione assistita da computer con *Collaborative Annotation Tool for Massive Amounts of Imaging Data* (CATMAID), applicato a un volume di dati ottenuto tramite microscopia elettronica (EM).

Nonostante i neuroni crescano di dimensione per accompagnare in maniera proporzionale la crescita del corpo dell'animale, l'architettura della Drosophila è stabile durante gli stadi larvali.

La maggioranza dei neuroni (oltre il 99 %) è stata ricostruita in maniera completa e senza problemi di qualità dei dati, che avrebbero potuto impedire l'identificazione delle terminazioni, quali assoni e dendriti.

I siti sinaptici sono stati, invece, collegati ad un neurone specifico solo in parte, per circa il 75 %. Il restante 25 % si riferisce a piccoli frammenti dendritici. La difficoltà nel tracciare con precisione questi siti sinaptici ha impedito la completa ricostruzione degli stessi, che sono, quindi, stati appellati come *sinapsi orfane*, in quanto non collegati ad un neurone specifico. Tuttavia, come sottolineato nell'articolo, questo non ha un impatto significativo sul lavoro, dal momento che studi precedenti hanno dimostrato l'evidenza per cui i neuroni spesso stabiliscono connessioni multiple con lo stesso neurone partner, ma su diversi rami dendritici. Questo significa che, anche se alcune sinapsi sono "orfane", è improbabile che la loro inclusione cambi significativamente la struttura delle connessioni principali nel cervello. Al più, queste sinapsi potrebbero influenzare in una qualche misura i pesi sinaptici, cioè l'importanza di una connessione, ma non è probabile che introducano nuove connessioni forti e possano, quindi, alterare le conclusioni dello studio.

Per comprendere appieno la morfologia dei neuroni mostrata in Figura 2.1, la ricerca ha identificato tutti gli assoni e i dendriti di ognuna delle cellule.

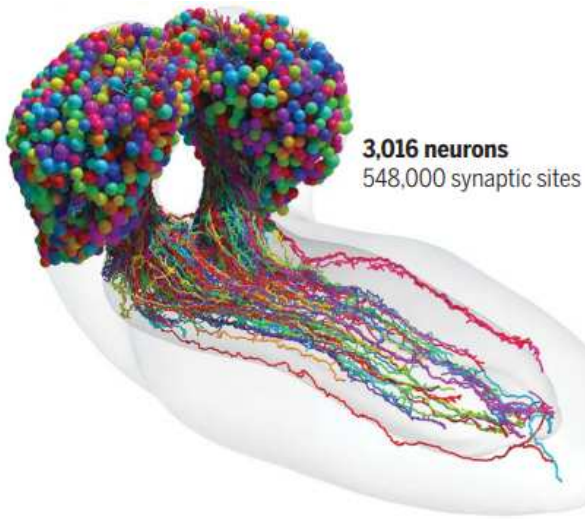


Figura 2.1: Morfologia del connettoma della larva di Drosophila

2.2.1 Tipologie di connessioni

Si distinguono quattro possibili tipi di connessione: *assone-assone* (a-a), *assone-dendrite* (a-d), *dendrite-assone* (d-a) e *dendrite-dendrite* (d-d). Queste sono mostrate in Figura 2.2. Lo spessore della freccia rappresenta la quantità di connessioni di un certo tipo che sono state individuate.

Come era prevedibile, la maggioranza delle connessioni sono del tipo assone-dendrite (circa il 67 %). Sebbene meno comuni rispetto alle connessioni neuronali canoniche, che, solitamente, coinvolgono un assone che si lega al dendrite di un secondo neurone, sono comunque presenti anche le altre tipologie di connessioni, le cui funzioni non sono ancora del tutto note a livello scientifico.

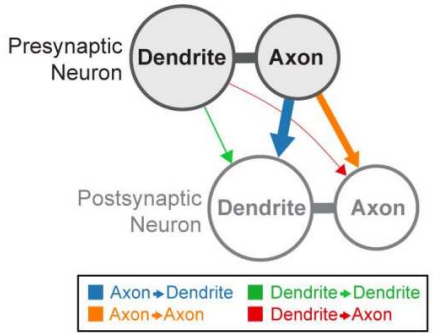


Figura 2.2: I quattro tipi di connessione nella larva di Drosophila

Le connessioni dendrite-dendrite si verificano quando i dendriti di due neuroni interagiscono direttamente tra loro. Queste connessioni svolgono diversi ruoli cruciali tra cui:

- la *modulazione dell'attività neuronale post-sinaptica*, ossia la regolzione dell'attività del neurone post-sinaptico, migliorando la precisione del firing neuronale e prevenendo l'eccitazione eccessiva;
- la *neuromodulazione*, ossia l'influenza dell'attività di un circuito neurale attraverso il rilascio di neuromodulatori, come dopamina e serotonina, con effetti su apprendimento, memoria e umore.

Le connessioni assone-assone si verificano quando il terminale pre-sinaptico dell'assone di un neurone si connette con l'assone di un altro neurone, piuttosto che con il suo dendrite. In modo complementare alla precedente tipologia di connessione, una sinapsi assone-assone ha come principale funzione la *modulazione dell'attività neuronale pre-sinaptica*, ovvero regola il rilascio di neurotrasmettitori dal neurone pre-sinaptico, operando, quindi, un'inibizione o una facilitazione dell'attività neurale pre-sinaptica, riducendo o aumentando il rilascio. Alcuni studi, inoltre, suggeriscono che tali connessioni potrebbero contribuire alla *stabilità della rete neuronale*, agendo come meccanismi omeostatici per mantenere l'equilibrio dell'attività di rete.

Infine, le connessioni dendrite-assone, opposte a quelle canoniche assone-dendrite, si verificano quando il dendrite di un neurone si connette con l'assone di altri neuroni. Tali connessioni sono state associate alle seguenti funzioni:

- la *modulazione della trasmissione sinaptica*, ossia la modulazione della forza della trasmissione sinaptica, influenzando la sensibilità del neurone post-sinaptico o la capacità di rilascio del neurotrasmettitore del neurone pre-sinaptico;
- la *generazione di potenziali d'azione retroattivi*, che possono viaggiare dal corpo cellulare del neurone lungo il dendrite, influenzando il rilascio di neurotrasmettitori all'assone;
- l'*influenza nel processo di rafforzamento sinaptico a lungo termine* (LTP) delle sinapsi, che è uno dei modi con cui la plasticità sinaptica può esplicarsi, nonché, un processo fondamentale per la formazione della memoria.

Per distinguere tali connessioni, i dati del connettoma sono forniti come quattro matrici di adiacenza, ciascuna delle quali si riferisce ad una differente tipologia di connessione. Ogni matrice riporta lo stesso insieme di neuroni e indica sulle righe i neuroni pre-sinaptici, ossia le cellule da cui si originano i legami, e sulle colonne i neuroni post-sinaptici. In particolare, le quattro matrici di adiacenza sono le seguenti:

1. la *matrice assone-assone*, che rappresenta le connessioni tra gli assoni dei due neuroni coinvolti;
2. la *matrice assone-dendrite*, che rappresenta le connessioni tra l'assone del neurone pre-sinaptico e il dendrite del neurone post-sinaptico;
3. la *matrice dendrite-assone*, che rappresenta le connessioni tra il dendrite del neurone pre-sinaptico e l'assone del neurone post-sinaptico;
4. la *matrice dendrite-dendrite*, che rappresenta le connessioni tra i dendriti dei due neuroni coinvolti.

I quattro grafici in Figura 2.3 mostrano la connettività in base al tipo.

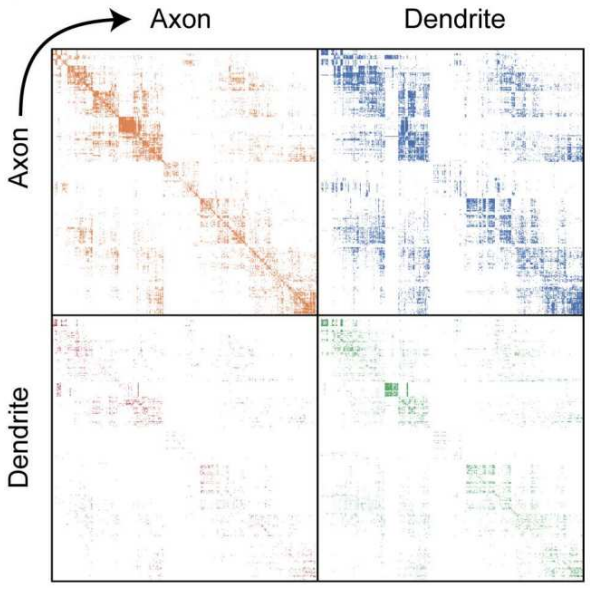


Figura 2.3: Matrici di adiacenza riferite ai differenti tipi di connessione tra i neuroni della larva di Drosophila

In ciascuna di queste matrici, a ogni coppia di neuroni è associato un valore indicatore del peso associato alla connessione, pari al numero di sinapsi coinvolte nella stessa, quindi, rappresentante la forza funzionale del legame.

Inoltre, è fornita anche un'ulteriore matrice, detta ALL-ALL, risultato della fusione delle quattro matrici appena introdotte.

È stato studiato dagli autori come i quattro diversi tipi di connessione contribuiscono in modo differenziato ai percorsi *feedforward*, ossia quelli che si proiettano dalla periferia sensoriale della rete verso i neuroni discendenti, e ai percorsi di *feedback*, ossia quelli nella direzione opposta. Ciò che è emerso è quanto segue:

- le connessioni asso-dendritiche mostrano il maggior numero di sinapsi feedforward;
- le connessioni assone-assone e dendrite-dendrite mostrano sia percorsi di feedforward e di feedback;
- le connessioni dendrite-assone coinvolgono il maggior numero di sinapsi di feedback.

Da questa analisi è emersa anche una elevata reciprocità delle connessioni a-a e d-d, queste ultime in misura minore.

Gli autori di Winding *et al.* [2023] hanno poi identificato hub cerebrali per tutti i tipi di connessione, dimostrando che la maggior parte di questi sono pre o post-sinaptici rispetto al centro di apprendimento del cervello. Gli hub cerebrali sono particolarmente interessanti poiché rappresentano dei centri di elaborazione e di snodo fondamentali per le funzioni del cervello. Per questo, il loro studio è assolutamente rilevante.

2.2.2 Clustering gerarchico

Dall'analisi dettagliata dell'architettura connettomica appena descritta, gli autori sono stati in grado di raggruppare i neuroni identificati, costruendo un'opportuna gerarchia, in base alla connettività sinaptica e alla coerenza in termini di morfologia e di funzione cerebrale svolta.

Essendo l'approccio gerarchico è possibile scegliere il livello di granularità desiderato. Al livello zero sono riportati tutti i neuroni, distinti per tipologia di cellula; al primo livello sono identificati due cluster e così via, fino all'ultimo livello, che determina 93 raggruppamenti di neuroni, a grana fine.

Il clustering gerarchico risultante è mostrato in Figura 2.4. Il colore dei vari segmenti è legato al tipo di cellula, astrazione di livello superiore rispetto al concetto di area funzionale di un neurone che varrà poi definito.

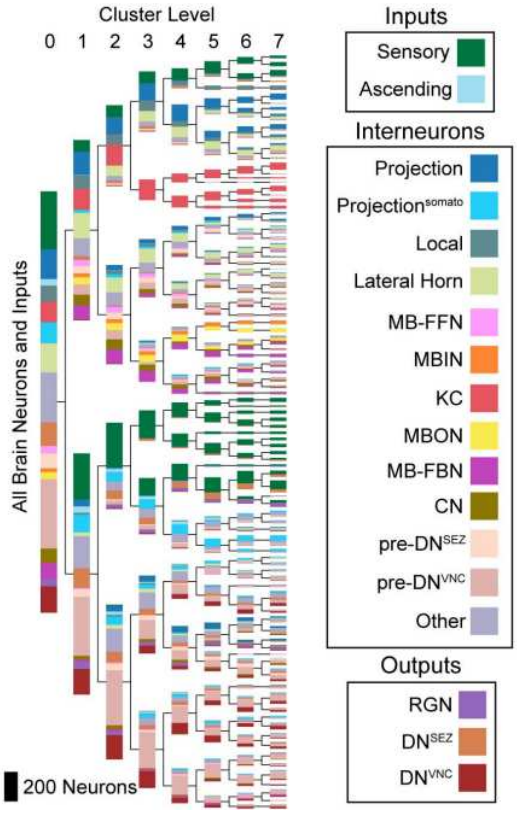


Figura 2.4: Clustering gerarchico dei neuroni basato sulla connettività nella larva di Drosophila

Gli autori sottolineano che i cluster individuati non sono necessariamente comunità di neuroni più densamente connessi. I cluster ottenuti, infatti, raggruppano neuroni con connettività simile, indipendentemente dalla connettività intra-cluster. Questo significa che il risultato ottenuto si riferisce al tentativo di classificare i neuroni nelle differenti tipologie e non ad un'indagine circa i meccanismi di elaborazione e di trasmissione dell'informazione. A conferma di questo risultato, infatti, nonostante il clustering sia basato esclusivamente sulla

connettività, senza includere dati sulla morfologia, i neuroni all'interno di ciascuno dei cluster mostrano caratteristiche morfologiche analoghe. Inoltre, come si nota dai colori, i cluster sul settimo livello sono anche omogenei in termini di tipo di cellula. Pertanto, il raggruppamento di neuroni basato sulla connettività sinaptica ha prodotto cluster internamente coerenti anche per altre caratteristiche.

Per completezza, nella Tabella 2.1, è riportato l'elenco dei tipi di cellula.

Cell Type	*Definizione*	*Area*
sensory	Neuroni che trasmettono impulsi dalla periferia al centro del cervello.	sensory
ascending	Neuroni che trasmettono informazioni sensoriali dal corpo al cervello centrale.	ascending
LN	*Lateral Neurons*: Neuroni laterali situati nei lobi ottici, che elaborano informazioni visive dagli occhi della mosca.	innate
PN	*Process Neurons*: Neuroni che trasmettono informazioni sensoriali dagli organi sensoriali ai centri superiori del cervello, per ulteriori elaborazioni.	
PN-somato	Neuroni che elaborano specificamente informazioni somatosensoriali, come il tatto.	
LHN	*Lateral Horn Neurons*: Neuroni situati nel corno laterale; essi integrano ed elaborano informazioni chemosensoriali, come il gusto e l'olfatto.	
MB-FFN	*Mushroom Body Fringe Fan Cell Neurons*: Neuroni che modificano l'attività di altri neuroni del corpo a fungo.	
MBIN	*Mushroom Body Intrinsic Neurons*: Neuroni intrinseci del corpo a fungo che modulano il flusso di informazioni.	learning/memory
MBON	*Mushroom Body Output Neurons*: Neuroni che trasmettono segnali di uscita dal corpo a fungo ad altre regioni del cervello.	
KC	*Kenyon Cells*: Neuroni centrali per l'elaborazione delle informazioni nel corpo a fungo, ricevute in input da varie regioni del cervello; sono cruciali per l'apprendimento e la memoria.	
MB-FBN	*Mushroom Body Fast-Broadcast Neurons*: Neuroni che trasmettono rapidamente informazioni attraverso il corpo a fungo.	deeep brain
CN	*Cluster Neurons*: Neuroni situati nel corpo a fungo che ricevono informazioni elaborate all'interno del corpo a fungo da altri neuroni del corpo a fungo (come le cellule di Kenyon), e trasmettono queste informazioni ad altre regioni del cervello; le informazioni che elaborano sono cruciali per influenzare il comportamento basato sull'esperienza appresa.	
pre-DN-SEZ	Neuroni precursori che si differenziano poi in neuroni DN-SEZ.	pre-output
pre-DN-VNC	Neuroni precursori che si differenziano poi in neuroni DN-VNC.	
RGN	*R Motor Neurons*: Neuroni responsabili del coordinamento di vari movimenti del corpo.	brain outputs
DN-SEZ	*Dopamine Neurons - SEZ*: Neuroni situati nel corpo ellissoidale (SEZ) che influenzano la ricompensa, la motivazione e il rinforzo.	
DN-VNC	*Dopamine Neurons - Ventral Nerve Cord*: Neuroni situati nel cordone nervoso ventrale che modulano la locomozione, il sonno e la ricompensa.	

Tabella 2.1: Tipi di cellula neuronale, definizione e aree cerebrali nella larva di Drosophila

Per ognuna della voci *cell type* è data una definizione, dal punto di vista delle proprietà funzionali. Inoltre, nella terza colonna della tabella è indicata la corrispondenza dei vari tipi di cellula neuronale alle varie aree cerebrali.

Va sottolineato che tale informazione non è fornita per la totalità dei neuroni identificati; infatti, manca la specifica del tipo di cellula per 346 neuroni.

2.2.3 Propagazione dei segnali

Il lavoro poi prosegue con lo sviluppo di un algoritmo per monitorare la propagazione del segnale, in tutto il cervello, attraverso i percorsi sinaptici.

Per identificare le vie sensoriali del cervello, gli autori si sono limitati a considerare le connessioni asso-dendritiche, che sono quelle maggioritarie. A partire da queste, sono stati generati tutti i possibili percorsi che, dai neuroni di input, attraverso tutti gli altri neuroni del cervello, terminano in un neurone di output, in meno di 6 salti. I neuroni di input, ossia i neuroni sensoriali e i neuroni ascendenti, sono stati classificati in base alle loro modalità sensoriali conosciute: olfattivo, gustativo, termosensoriale, visivo, intestinale e respiratorio. Sono risultati circa 3,6 milioni di percorsi, dei quali, in Figura 2.5, viene mostrata una selezione casuale di 100.000 percorsi.

Studiando questi percorsi, si è evidenziato che, nella maggior parte dei casi, le informazioni in input possono raggiungere i neuroni di output entro tre salti. Tuttavia, accanto ai percorsi più brevi, si sono anche evidenziati percorsi che presentano dei salti aggiuntivi, che, probabilmente, sono responsabili di una ulteriore elaborazione dello stimolo.

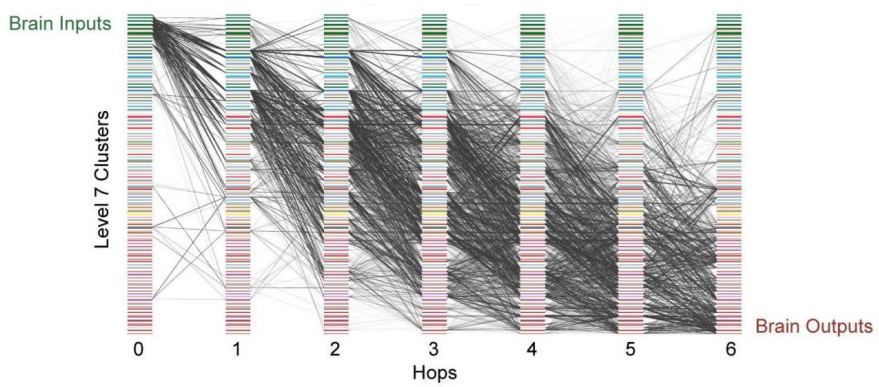


Figura 2.5: Percorsi dai neuroni di input ai neuroni di output con 6 o meno salti nella larva di Drosophila

Un'architettura con connessioni che saltano i livelli è un elemento condiviso da alcune delle principali reti di Machine Learning. Nelle reti artificiali, la presenza di scorciatoie tra i livelli è spesso garanzia di maggiori prestazioni rispetto a reti profonde, prive di scorciatoie. Di conseguenza, si può interpretare la scoperta sui salti di livello come il tentativo di aumentare la capacità computazionale del cervello, bypassando alcuni vincoli strutturali della rete.

I ricercatori hanno anche notato un'elevata connettività tra percorsi paralleli, aspetto che suggerisce che la rete sia caratterizzata da un modello di elaborazione distribuita.

È stato osservato che i neuroni all'interno di un singolo percorso non sono quasi mai tutti assimilabili alla stessa modalità sensoriale; spesso, infatti, un singolo percorso attraversa cellule legate a differenti attività dei sensi. A tal proposito, in base alla modalità degli stimoli sensoriali, i neuroni sono stati classificati in *unimodali* e *multimodali*. Come si nota dalla Figura 2.6, pochissimi neuroni, meno del 20 %, hanno ricevuto segnali da una sola modalità sensoriale, mentre la maggioranza dei neuroni integra stimoli sensoriali di tipo differente, classificandosi come multimodali.

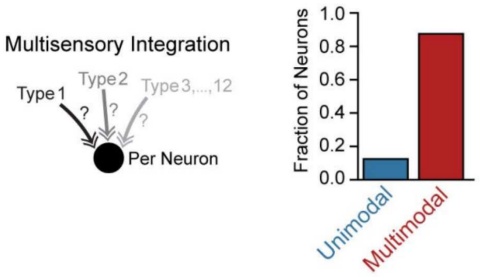


Figura 2.6: Classificazione dei neuroni in base alle modalità sensoriali nella larva di Drosophila

2.2.4 Analisi sugli emisferi

Il cervello della Drosophila si divide in due emisferi, ossia due porzioni semisferiche di tessuto nervoso. La divisione in emisferi è una caratteristica molto importante del cervello ed il suo studio è assolutamente rilevante per comprendere come le informazioni provenienti dall'una e dall'altra porzione vengano integrate ed utilizzate per le funzioni cerebrali.

Gli autori hanno dimostrato che la maggioranza dei neuroni, circa il 93 %, ha una cellula omologa corrispondente nell'emisfero opposto. Per farlo sono stati impiegati strumenti grafici automatizzati e quanto ottenuto è stato validato da una successiva revisione manuale.

Per comprendere come avvengono le interazioni inter-emisferiche, sono state identificati i neuroni ipsilaterali, bilaterali e controlaterali.

I *neuroni ipsilaterali* sono neuroni che hanno il loro corpo cellulare e le loro proiezioni nervose sullo stesso lato del cervello. Si tratta, quindi, di neuroni che comunicano solo con neuroni nello stesso emisfero. Al contrario, i *neuroni bilaterali* hanno connessioni che coinvolgono entrambi gli emisferi cerebrali. Infine, i *neuroni controlaterali* hanno connessioni che attraversano il cervello, da un emisfero all'altro.

Circa il 61 % dei neuroni è stato classificato come ipsilaterale, il 24 % come bilaterale e il restante 15 % come controlaterale. Il risultato che segue è quello che dimostra che il 39 % dei neuroni hanno prolungamenti controlaterali o bilaterali, da cui si deduce, in modo diretto, che i due emisferi sono fortemente interconnessi.

Da tale classificazione, inoltre, gli autori hanno scoperto che i neuroni bilaterali, nella maggioranza dei casi, proiettano le loro connessioni a neuroni con un elevata somiglianza nei due emisferi e che i neuroni controlaterali hanno una probabilità di connessione su un neurone omologo controlaterale molto maggiore che su un neurone non omologo.

2.3 La Drosophila nello stadio adulto

Il lavoro di Lin *et al.* [2024] è, in qualche modo, il proseguo di quello appena presentato. Infatti, questo gruppo di autori ha applicato tecniche di Complex Network Analysis al connettoma cerebrale completo di una Drosophila melanogaster femmina adulta di 7 giorni. La mappatura è stata, anche in questo caso, ricostruita tramite microscopia elettronica (EM), includendo entrambi gli emisferi cerebrali e i lobi ottici. Il risultato è mostrato in Figura 2.7.

La rete ottenuta si compone di 127.978 neuroni e 32 milioni di sinapsi. Ad essa è stato applicato un filtro che comporta che solo le connessioni con almeno 5 sinapsi siano incluse. In particolare, dalle sinapsi rilevate algoritmicamente sono state rimosse quelle che soddisfano uno dei seguenti criteri:

- la sinapsi manca del legame pre- o post-sinaptico (similmente alle cosiddette "sinapsi orfane" nella larva di Drosophila);

- la sinapsi ha un punteggio di fiducia associato inferiore a 50.

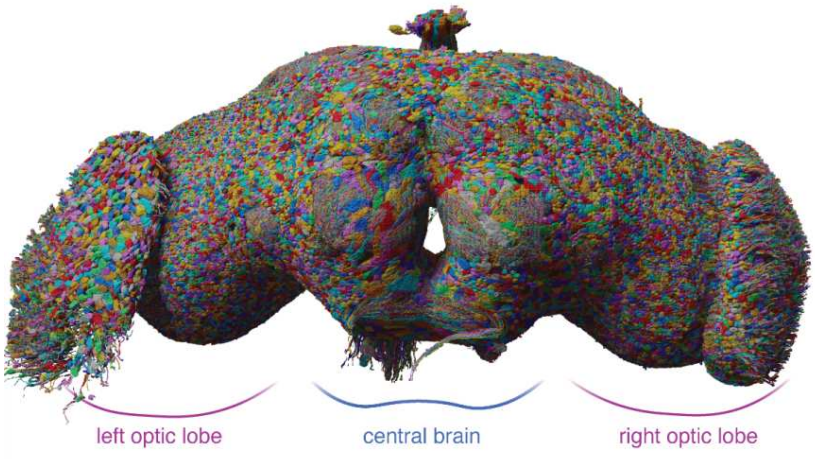


Figura 2.7: Morfologia del connettoma della Drosophila adulta

Alle sinapsi rimanenti è stato, poi, applicato un filtraggio basato su soglia, prima specificato. Successivamente, per ciascuna coppia di neuroni, si è calcolata la somma del numero totale di connessioni sinaptiche che coinvolgono i neuroni considerati, così da ottenere il peso della loro connessione. A valle di questa attività, risultano circa 2,7 milioni di connessioni.

In questo caso, non viene fatta una distinzione sulla tipologia delle connessioni, come è stato, invece, fatto nell'articolo sulla larva di Drosophila. Le connessioni tra i neuroni sono rappresentate, quindi, da una sola matrice di adiacenza, che corrisponde alla matrice ALL-ALL larvale. Analogamente al caso larvale, nella matrice, ad ogni coppia di neuroni è associato un peso che rappresenta il numero di sinapsi coinvolte nella connessione, ossia la forza funzionale corrispondente.

Versioni più aggiornate della ricostruzione del connettoma presentano un numero maggiore di neuroni, mancanti nella versione disponibile al tempo del lavoro. L'ultima istantanea del connettoma è la v783 e include 139.255 cellule revisionate, di cui 136.589 (98 %) sono etichettate o classificate, 2.700.513 connessioni e 34.153.566 sinapsi. Tuttavia, la maggior parte dei neuroni mancanti sono fotorecettori, ossia cellule specializzate nel percepire il movimento e la luce nell'ambiente circostante, presenti nei lobi ottici, ed è poco probabile che l'aggiunta di questi neuroni cambi significativamente i risultati della rete cerebrale globale.

Rispetto alla larva, la mosca adulta presenta un comportamento più ricco, che include il controllo motorio complesso durante la camminata o il volo, il comportamento di corteggiamento, la presa di decisioni complesse, la memoria associativa, l'apprendimento spaziale e la navigazione multisensoriale complessa.

Le analisi che sono state condotte da Lin *et al.* sono differenti da quelle condotte da Winding *et al.*: le indagini specifiche condotte nei due lavori sembrano in molti casi complementari poiché vari fenomeni studiati nella larva non sono stati studiati nell'adulta, e viceversa.

Di seguito, sono presentati i principali risultati ottenuti da questo gruppo di ricerca. A partire dallo stesso set di dati, anche altri hanno condotto delle ricerche e contribuito ad arricchire l'attuale conoscenza [Dorkenwald *et al.*, 2023; Schlegel *et al.*, 2023].

2.3.1 Interconnessione dei neuroni

Una delle analisi spesso effettuata su reti di vario genere riguarda la connessione dei nodi e la ricerca delle componenti connesse. Identificare tali componenti in un grafo fornisce informazioni fondamentali sulla struttura e la connettività della rete.

Nella teoria dei grafi, una componente connessa di un grafo è un sottografo in cui tra ogni coppia di nodi inclusa nella componente esiste almeno un cammino che li collega.

Il lavoro di Lin *et al.* ha individuato le componenti fortemente connesse e le componenti debolmente connesse. Queste ultime si riferiscono ad un criterio di individuazione che ignora la direzionalità delle connessioni. Di conseguenza, biologicamente, poiché le connessioni tra i neuroni sono dirette, il concetto di componente fortemente connessa è più realistico.

Quanto emerso è che il cervello della Drosophila adulta è altamente connesso, secondo entrambe le definizioni di componente connessa; infatti:

- il 93,3 % dei neuroni è compreso in un'unica componente fortemente connessa;
- il 98,8 % dei neuroni è compreso in un'unica componente debolmente connessa.

Inoltre, è stato anche osservato che, anche qualora fossero potate alcune delle connessioni da entrambe le componenti, queste sottostrutture continuerebbero a esistere, suggerendo una robustezza intrinseca della rete.

Ciò che, a questo punto, si sono chiesti gli autori è quale sia l'elemento alla base di questa alta interconnessione: da una parte essa potrebbe essere dovuta ad un numero elevato di neuroni interconnessi oppure, al contrario, da un numero piccolo di neuroni tra loro fortemente interconnessi, i quali, quindi, formerebbero un hub.

Per rispondere a questa domanda, sono state costruite ed esaminate delle curve di sopravvivenza. Tali curve permettono di osservare per quanto tempo le componenti connesse "sopravvivono" man mano che i neuroni vengono rimossi dalla rete. Sono stati rimossi 2500 neuroni per passaggio, a partire da quelli con il grado totale più elevato. Nella componente fortemente connessa, la rimozione dei neuroni porta alla divisione in due componenti quando vengono rimossi neuroni con un grado approssimativamente pari a 50. Queste due componenti corrispondono alla divisione tra gli emisferi sinistro e destro e non si dividono, a loro volta, in reti separate fino a quando non sono rimossi circa il 60 % di tutti i neuroni, dimostrando che i due emisferi sono altamente interconnessi.

Procedendo, invece, con la rimozione dei neuroni a partire da quelli con grado più basso, in questo caso non si determina una divisione della più grande componente connessa fino all'ultimo passaggio, quando tutti i neuroni vengono rimossi. Questo dimostra che l'interconnessione del cervello è robusta.

2.3.2 L'esistenza di un *ricco club*

Gli autori Lin *et al.* hanno dimostrato l'esistenza di un *ricco club* di neuroni nella Drosophila adulta, ossia un sottoinsieme di nodi tra loro altamente interconnessi, più di quanto ci si aspetterebbe in una rete con connessioni stabilite casualmente. Il criterio definito per individuare i neuroni facenti parte di questo club si basa sulla centralità di grado, dall'inglese *degree centrality*, e una soglia fissata in maniera arbitraria.

Nella teoria dei grafi e nella Network Science, le misure di centralità sono strumenti che permettono di valutare e capire quali siano i nodi centrali e, di conseguenza, i più importanti. Tra le differenti misure di centralità, la più semplice è la centralità di grado, che tiene conto del grado di ogni nodo, ossia del numero di archi che collegano il nodo agli altri nodi del grafo. In un grafo diretto si può fare la distinzione tra *indegree* e *outderee*, che, rispettivamente, misurano il numero di connessioni in ingresso e il numero di connessioni in uscita rispetto al nodo.

Questo ricco club comprende circa il 30 % di tutti i neuroni del cervello e presenta una probabilità di connessione 5 volte superiore alla probabilità di connessione complessiva che caratterizza l'intero cervello. La presenza di un insieme di nodi con queste caratteristiche in una rete complessa implica una migliore connettività complessiva della rete, grazie alla quale

le sue diverse aree possono comunicare in modo efficiente, sfruttando proprio le connessioni che collegano questi nodi.

Per approfondire l'analisi, gli autori hanno poi suddiviso i nodi inclusi nel club in tre categorie, sulla base della distinzione tra indegree e outdegree; più specificatamente:

1. Un neurone con grado di uscita pari ad almeno 5 volte il grado di ingresso è definito come *neurone broadcaster*.

2. Un neurone con grado di ingresso pari ad almeno 5 volte il grado di uscita è definito come *neurone integratore*.

3. I neuroni che non rientrano nelle due categorie precedenti sono detti *neuroni bilanciati*.

Risultano 676 neuroni broadcaster, 638 neuroni integratori e i restanti, quindi la netta maggioranza, sono neuroni bilanciati.

Nella Figura 2.8, il grafico mostra il posizionamento dei neuroni del club rispetto all'indegree e all'outdegree. L'area in verde è quella che soddisfa il criterio della categoria broadcaster, l'area in viola è quella che soddisfa il criterio della categoria integratori, mentre l'area centrale, in arancione, è quella che soddisfa il criterio della categoria dei neuroni bilanciati. Una nuvola di punti si concentra in quest'ultima zona e solo pochi neuroni ne superano il confine che delimita la categoria.

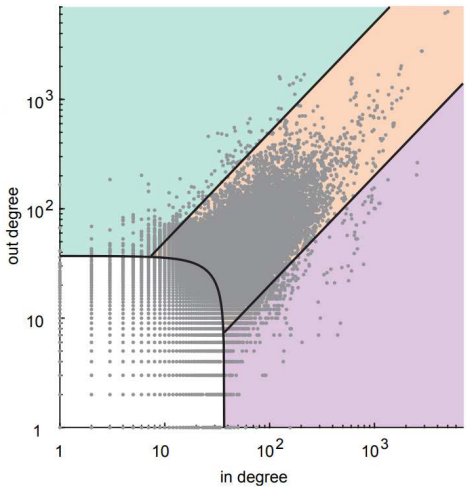


Figura 2.8: Distinzione in categorie dei nodi del ricco club in base all'indegree e all'outdegree nella Drosophila adulta

Ulteriore risultato che gli autori hanno ottenuto è che i neuroni del club sono mediamente più vicini agli input sensoriali. Ciò è stato osservato impiegando un modello probabilistico di flusso informativo per determinare la distanza relativa di ciascun neurone da un insieme di neuroni seme, ciascuno corrispondente a specifici gruppi di neuroni sensoriali, nonché con il set completo di tutti gli input sensoriali. In questo modo è stata calcolata la distanza di ciascun neurone nel dataset da ciascuna modalità sensoriale.

Si noti che, come ulteriore sviluppo del lavoro, è possibile estendere l'analisi considerando anche le altre misure di centralità, ossia la *closeness centrality*, la *betweenness centrality* e l'*eigenvector centrality*. Individuare neuroni che hanno contemporaneamente alti valori di degree centrality, closeness centrality, betweenness centrality ed eigenvector centrality significherebbe individuare neuroni essenziali nella trasmissione e nell'elaborazione dell'informazione. Questo ulteriore passo avanti rispetto al concetto di ricco club è stato fatto dal nostro gruppo di ricerca dimostrando la presenza di nodi che si caratterizzano per valori elevati di tutti e quattro i tipi di centralità, sia nella larva di Drosophila che in quella adulta.

2.3.3 Motif a due e a tre nodi

Per ottenere informazioni sulla connettività locale, sono stati calcolati i motif a due e a tre nodi. La ricerca dei motif in una rete può aiutare ad approfondire la conoscenza su come la rete è strutturata, a livello topologico, e come la topologia influenza il funzionamento della rete stessa.

Un motif a due nodi è il più semplice possibile. Rispetto a queste sottostrutture, gli autori si sono focalizzati sull'analisi della reciprocità delle connessioni, valutando la probabilità che, data una connessione tra un neurone a e un neurone b, il neurone b sia connesso al neurone a nella direzione opposta. Tale probabilità è di circa il 14 %, indicando una reciprocità significativamente più alta rispetto a quella presente nei modelli nulli casuali di Erdos-Rényi (ER) e di configurazione (CFG), impiegati come termine di confronto.

Circa 2 neuroni su 3 partecipano ad almeno una connessione reciproca, anche considerando la soglia di filtraggio applicata alle sinapsi, e molti di questi neuroni partecipano anche a più connessioni reciproche.

Passando da due a tre nodi, è stato calcolato il *coefficiente di clustering*, una metrica di connettività di ordine superiore che valuta quanto la rete è propensa a formare "cluster". In altre parole, tale coefficiente misura la probabilità che i vicini di un nodo siano anche vicini tra loro, formando in questo modo delle strutture a triangolo all'interno della rete, formalmente dette *triadi*. Il coefficiente di clustering misurato nella Drosophila adulta è di 0,0477; anche in questo caso, si tratta di un valore superiore a quello misurato nei modelli nulli. Un alto coefficiente di clustering dimostra che la rete del cervello della mosca è altamente connessa e non casuale nella sua struttura.

Nel dettaglio, come mostrato in Figura 2.9, i motif 021U (1, in figura), 021D (2, in figura) e 021C (3, in figura) sono sottorappresentati, mentre tutti gli altri sono sovrarappresentati rispetto ai modelli nulli di Erdos-Rényi (ER) e di configurazione (CFG).

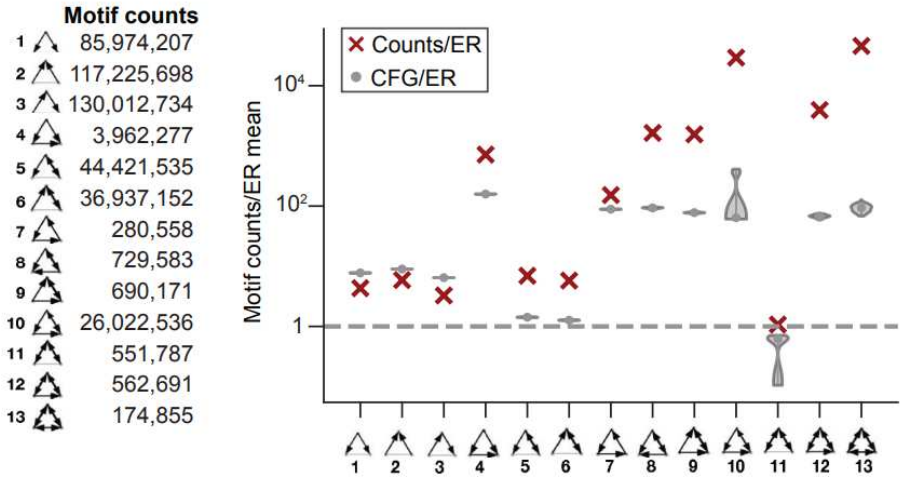


Figura 2.9: Distribuzione dei motif a tre nodi nella Drosophila adulta rispetto ai modelli nulli di ER e di CFG

Per entrambe le tipologie di motif, gli autori hanno, inoltre, esaminato la loro composizione neurochimica.

Il passo successivo, che permetterebbe di estendere tali risultati, è quello di ricostruire ed analizzare motif che includano un numero maggiore di nodi.

2.3.4 Connettività tra le regioni cerebrali

Il connettoma della Drosophila adulta è stato segmentato in 78 *neuropili*, ossia aree dense di sinapsi e, quindi, aree in cui avviene la maggior parte delle connessioni e delle comunicazioni sinaptiche tra i neuroni. Ogni sinapsi è assegnata a un neuropilo in base alla posizione della sinapsi stessa.

In Figura 2.10 è mostrata una vista esplosa del cervello che riporta le regioni cerebrali, o neuropili, in cui è suddiviso.

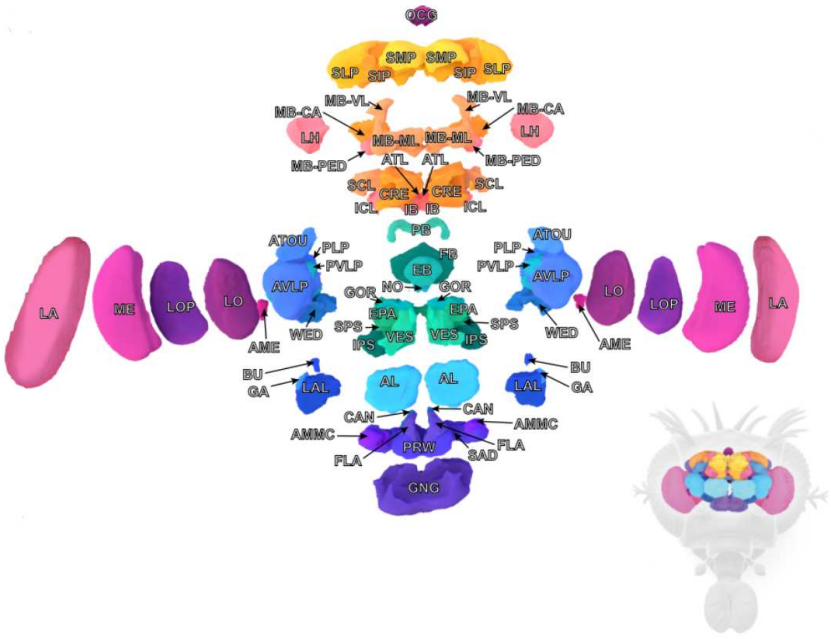


Figura 2.10: Suddivisione in neuropili del connettoma della Drosophila adulta

Per capire come le informazioni vengono trasmesse tra queste regioni, è importante esaminare non solo le connessioni esistenti, ma anche la direzione e l'intensità di queste connessioni.

Con il metodo di ponderazione frazionaria è stata quantificata l'importanza delle connessioni tra i neuroni, tenendo conto delle loro proiezioni da e verso ogni neuropilo. In particolare, si sono calcolate diverse frazioni relative per ciascun neuropilo; esse sono:

- la *frazione relativa delle connessioni interne*, che riflette quante delle connessioni totali di un neuropilo avvengono al suo interno, cioè tra neuroni che si trovano nello stesso neuropilo;
- la *frazione relativa delle connessioni esterne in entrata*, che riflette la quantità di connessioni che arrivano al neuropilo da altre regioni, indicando quanto un neuropilo riceve informazioni da altre aree del sistema nervoso;
- la *frazione relativa delle connessioni esterne in uscita*, che riflette la quantità di connessioni che escono dal neuropilo verso altre regioni, indicando quanto un neuropilo invia informazioni ad altre aree.

Per ciascun neuripilo, è stata poi identificata la sottostante rete di connessioni, includendo nel sottografo indotto tutti quei neuroni che sono vertici di almeno una delle connessioni che determinano il sottografo. Le diverse sottoreti dei neuropili differiscono notevolmente sia per forza di connessione che per densità.

Come per la rete complessiva, si è analizzata la reciprocità delle connessioni per ciascuna sottorete, ossia per ciascun neuropilo. Nella maggior parte dei neuropili, come nell'intero connettoma, le connessioni reciproche sono più forti delle connessioni unidirezionali.

Anche le connessioni reciproche inter-neuropili sono state oggetto di analisi, mappando le connessioni reciproche che esistono tra i 78 neuropili. È emersa l'esistenza di connessioni reciproche tra molte coppie di neuropili. Ciò significa che i motif ricorrenti che si sono osservati nel cervello non si limitano solo alle connessioni locali, ma possono esistere anche su ampia scala spaziale, tra aree cerebrali distinte.

In ultimo, è stata estesa l'analisi ai motif a tre nodi in ciascuna sottorete determinata da un neuropilo, come fatto per l'intera rete. In generale, quanto osservato a livello globale si ripete anche nei singoli neuropili: c'è una sottorappresentazione dei motif feedforward, ossia delle triadi numerate da 1 a 3, e una sovrarappresentazione dei motif complessi. Inoltre, in molti neuropili, si è osservato che le connessioni che partecipano ai motif sottorappresentati sono più deboli in media rispetto alle connessioni che partecipano ai motif sovrarappresentati.

2.3.5 Classificazione delle cellule

La conoscenza dei diversi tipi di neuroni è fondamentale per esplorare e interpretare qualsiasi connettoma.

Un lavoro minuzioso di annotazione delle cellule è stato fatto da Schlegel *et al.* [2023] che ha definito una gerarchia di quattro livelli, a partire del lavoro di classificazione di Dorkenwald *et al.* [2023]:

$$\textit{flusso} \rightarrow \textit{superclasse} \rightarrow \textit{classe} \rightarrow \textit{tipo cellulare}.$$

I primi due livelli della gerarchia, flusso e superclasse, sono stati annotati in modo dettagliato. Questi sono riportati in Figura 2.11.

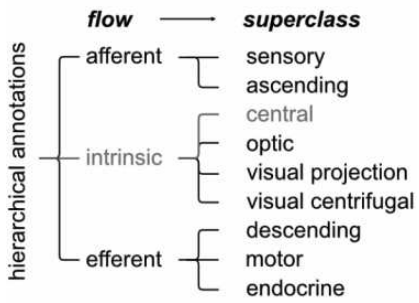


Figura 2.11: Annotazione gerarchica (primi due livelli) dei neuroni della Drosophila adulta

Ogni neurone è classificato come afferente, efferente o intrinseco al cervello, rispetto al flusso, e rientra in una delle 9 superclassi, riassunte nella Tabella 2.2, che sono un'astrazione di livello superiore del concetto di classe, ossia di raggruppamenti neurobiologici preesistenti dalla letteratura. Nella tabella è, inoltre, riportata una rielaborazione delle definizioni, dal punto di vista funzionale, date per ciascuna superclasse.

Come si nota dalla Figura 2.12 esiste un certo equilibrio tra i due emisferi in termini di densità di neuroni per superclasse. Le superclassi maggiormente rappresentate sono *optic* e *central*, ossia quella legata alla vista, situata nei due lobi ottici, e quella presente nel corpo centrale del cervello, aspetto che non stupisce dal momento che sono i neuroni fondamentali per l'elaborazione delle informazioni e degli stimoli sensoriali visivi.

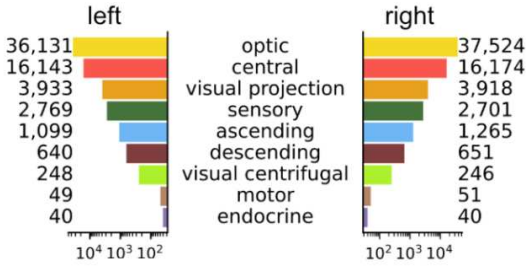


Figura 2.12: Conteggio dei neuroni per superclassi negli emisferi della Drosophila adulta

Superclasse	*Definizione*
sensory	Neuroni che entrano nel corpo centrale del cervello dalla periferia. La superclasse *ascending* include anche alcuni neuroni sensoriali, distinguibili dagli interneuroni ascendenti, anch'essi parte di tale superclasse.
ascending	Neuroni che entrano nel cervello dal cordone nervoso ventrale (VNC). Questi possono essere neuroni sensoriali o interneuroni ascendenti.
central	Neuroni completamente contenuti nel cervello centrale.
optic	Neuroni completamente contenuti nei lobi ottici o nel ganglio ocellare.
visual projection	Neuroni con dendriti nei lobi ottici o nel ganglio ocellare e assoni nel cervello centrale.
visual centrifugal	Neuroni con dendriti nel cervello centrale e assoni nei lobi ottici o nel ganglio ocellare.
descending	Neuroni con il soma nel cervello che escono dal cervello verso il VNC.
motor	Neuroni che escono dal cervello verso la periferia; per questo sono, quindi, considerati neuroni motori.
endocrine	Neuroni che lasciano il cervello attraverso i nervi della Corpora Cardiaca (NCC) verso il complesso retrocerebrale (corpora cardiaca e corpora allata).

Tabella 2.2: Descrizione delle proprietà funzionali delle superclassi nella Drosophila adulta [Schlegel *et al.*, 2023]

2.4 Ulteriori sviluppi

Come già detto, il presente lavoro di tesi parte dai risultati appena introdotti e si propone di estendere ed approfondire lo studio sul connettoma della Drosophila, sia nello stadio larvale che in quello adulto. Nei successivi capitoli, quindi, saranno discusse le analisi eseguite a partire dai connettomi della Drosophila nei suoi stadi di sviluppo.

CAPITOLO 3

Explorative Data Analysis sul connettoma della Drosophila

In questo capitolo, vengono presentati i risultati dell'analisi esplorativa dei dati (EDA), un processo fondamentale nella Data Science per esplorare, indagare e visualizzare le principali caratteristiche di un dataset. Lo studio sul connettoma della Drosophila melanogaster si è inizialmente focalizzato sulle proprietà strutturali della rete derivata dalle connessioni. Successivamente, l'analisi si è concentrata in modo più approfondito sulla centralità, con l'obiettivo di identificare i nodi centrali all'interno della rete. Queste indagini costituiscono la base per ulteriori approfondimenti.

3.1 Dataset

I dati utilizzati per questo lavoro provengono da due dataset distinti, ciascuno dei quali contiene informazioni sul connettoma della Drosophila in due diverse fasi dello sviluppo neuronale.

I dati grezzi di microscopia elettronica (EM) e le ricostruzioni dei neuroni per la larva sono pubblicamente accessibili tramite l'interfaccia CATMAID (Collaborative Annotation Toolkit for Massive Amounts of Image Data), disponibile al seguente link. In particolare, i dati sono organizzati in diversi set:

- Il set *S1* contiene le matrici di connettività tra i neuroni del cervello, quindi fornisce informazioni sulle connessioni sinaptiche tra i neuroni, distinguendo in file distinti le diverse tipologie di connessioni. Le singole matrici sono memorizzate come file *.csv* e corrispondono alla connettività asso-dendritica (*ad_connectivity_matrix.csv*), asso-assonica (*aa_connectivity_matrix.csv*), dendro-dendritica (*dd_connectivity_matrix.csv*) o dendro-assonica (*da_connectivity_matrix.csv*). La connettività combinata di tutti questi tipi di connessioni è fornita anche nel file *all − all_connectivity_matrix.csv*. Le righe e le colonne di ogni matrice sono popolate dagli identificatori dei neuroni. I neuroni nelle righe sono pre-sinaptici, mentre i neuroni nelle colonne sono postsinaptici. Inoltre, ciascun file include anche dati sugli input e output sinaptici per ogni neurone.

- Il set *S2* fornisce i metadati relativi ai neuroni del cervello, incluse informazioni sugli identificatori univoci dei neuroni, sulla loro classificazione per tipo cellulare, sulla presenza o sull'assenza di coppie di neuroni corrispondenti tra i due emisferi cerebrali e, infine, sul clustering gerarchico di livello 7.

- I set *S3* e *S4* descrivono il rapporto tra input e output assonico, in *S3*, e dendritico, in *S4*, per ciascun neurone, offrendo dettagli sul numero di sinapsi che ogni neurone riceve (in input) e stabilisce (in output) attraverso i propri assoni e dendriti. In realtà, tali dati non sono stati utilizzati; tuttavia, non si esclude che per esperimenti futuri possano essere di interesse.

Per la Drosophila adulta, invece, i dati sono condivisi all'interno di FlyWire Codex. La versione utilizzata è la *v783*, che risale all'ottobre del 2023. Poiché è una versione più aggiornata della ricostruzione del connettoma rispetto a quella a cui si riferisce l'articolo Lin *et al.* [2024] è possibile che nelle analisi che seguono ci siano delle piccole discrepanze. I dati sulla connettività sinaptica sono riportati nel file *connections.csv*; si ricorda che le connessioni con meno di 5 sinapsi sono escluse. Il file $classification.csv$ contiene, invece, informazioni sulla classificazione gerarchica (superclasse, classe e sottoclasse) di ciascun neurone. L'intero dataset si compone di molti altri file, che, tuttavia, per le seguenti analisi non sono di interesse.

3.2 Rappresentazione del connettoma come grafo

A partire dai due lavori fondamentali di Winding *et al.* [2023] e di Lin *et al.* [2024], che hanno completato il primo connettoma dell'intero cervello di una larva di Drosophilale e adulta, si sono costruite due reti, utilizzando gli strumenti della teoria dei grafi, alla base della Network Science.

Come già detto nel Capitolo 2, per la Drosophila nello stadio larvale sono state fornite quattro differenti matrici che specificano ognuna una differente tipologia di connessione, più un'ulteriore matrice, chiamata ALL-ALL, che fonde le quattro matrici in una sola e rappresenta il connettoma nella sua interezza. Per la ricerca qui condotta si è scelto di utilizzare la matrice ALL-ALL, senza includere, quindi, nelle successive analisi, la distinzione per tipologia di connessione.

Per il connettoma della Drosophila adulta, invece, le connessioni tra i neuroni sono rappresentate da un'unica matrice di adiacenza, senza distinguere tra diversi tipi di connessioni.

In entrambi i casi si è deciso di trascurare i pesi degli archi, ignorando la possibile presenza di connessioni multiple tra una stessa coppia di neuroni. Pertanto, per una data coppia di neuroni, non è stato preso in considerazione il numero di sinapsi che partecipano alla connessione, che determina il peso della stessa, e ci si è concentrati esclusivamente sulla sua esistenza.

Pertanto, i connettomi della Drosophila sono modellati ciascuno come una rete:

$$\mathcal{C} = (N, E)$$

N è l'insieme dei nodi della rete e E è l'insieme degli archi.

Esiste un nodo $n_i \in N$ per ogni neurone del connettoma. Esiste un arco $(n_i, n_j) \in E$ se esiste almeno una connessione dal neurone n_i al neurone n_j.

Nel seguito, si utilizzano in modo intercambiabile i termini "nodo" e "neurone" e i termini "connessione" e "arco" poiché esiste una corrispondenza biunivoca tra tali concetti.

La modellazione del connettoma come grafo consente di applicare una vasta gamma di tecniche e strumenti per analizzare la struttura e la funzione del cervello della Drosophila.

3.3 Caratteristiche e proprietà strutturali

Come primo passo dell'indagine è stata condotta un'analisi esplorativa sui connettomi della Drosophila melanogaster nello stadio larvale e adulto per confrontare alcune delle loro

caratteristiche strutturali di base. Questa fase preliminare è volta ad acquisire una comprensione iniziale delle proprietà fondamentali dei connettomi studiati, che possa indirizzare e contestualizzare le analisi di dettaglio che seguiranno.

Le misure calcolate includono metriche standard della teoria dei grafi, come il numero di nodi, il numero di archi, il grado medio, la densità della rete, il coefficiente di clustering medio, la lunghezza media del cammino, il diametro, l'assortatività di grado e la dimensione della massima componente fortemente connessa. Queste valutazioni forniscono un quadro completo della struttura globale della rete e permettono di evidenziare somiglianze e differenze tra i connettomi della larva e dell'adulta. In questo modo, è possibile distinguere gli elementi che si sono mantenuti invariati da quelli che hanno subito modifiche durante il processo di sviluppo dell'organismo.

Per la Drosophila nello stadio larvale, seppure è vero che per il proseguo dell'analisi si è utilizzata esclusivamente la matrice di adiacenza ALL-ALL, in questa fase si sono comunque costruite e analizzate le reti che si riferiscono ad ognuna delle tipologie di connessione. Questo è utile, in realtà, anche per caratterizzare la rete completa, essendo questa derivata dall'unione delle singole reti.

Nella Tabella 3.1 sono riportate le misure calcolate sulle reti descritte dalle quattro matrici, ossia dalle diverse tipologie di connessioni del connettoma della larva della Drosophila, insieme alla rete che combina tutte le connessioni. I risultati evidenziano rilevanti differenze nelle proprietà topologiche delle reti, che riflettono la natura delle diverse tipologie di connessioni.

Misure	*Rete a-a*	*Rete a-d*	*Rete d-a*	*Rete d-d*	*Rete ALL-ALL*
Numero di nodi	2,887	2,880	1,907	2,204	2,952
Numero di archi	40,636	63,545	3,722	9,019	110,677
Grado medio	28.151	44.128	3.904	8.184	74.984
Densità	0.00488	0.00766	0.00102	0.00186	0.01271
Coefficiente di clustering medio	0.235	0.058	0.020	0.130	0.178
Lunghezza media del cammino	5.18	3.37	7.58	8.44	3.28
Diametro	19	10	24	29	15
Assortatività di grado	0.672	-0.016	-0.073	0.054	0.252
Massima componente connessa	2,705	2,282	88	718	2,810

Tabella 3.1: Caratteristiche strutturali delle reti indotte dalle differenti tipologie di connessioni nella larva di Drosophila

Il *numero di nodi*, ossia di neuroni, varia leggermente tra le reti indicando che solo alcuni nodi sono coinvolti in connessioni di ognuna delle tipologie. La rete ALL-ALL presenta il maggior numero di nodi, pari a 2,952; ciò è prevedibile poiché tale rete unisce tutte le connessioni e, di conseguenza, include tutti i nodi che sono presenti in almeno una delle reti parziali, ma non necessariamente in tutte. Poco meno di un centinaio di nodi sono assenti nelle reti a-a e a-d, mentre un numero significativamente maggiore di neuroni manca nelle reti d-a e d-d.

Il *numero di archi*, che corrisponde al numero totale di connessioni tra i neuroni, mostra una variazione ancora più marcata tra le diverse reti. Le connessioni a-d sono le più frequenti, per cui la rete a-d è quella che presenta il maggior numero di archi, indicando un'elevata connettività tra i suoi nodi. Al contrario, le reti d-a e d-d mostrano un numero notevolmente inferiore di archi. Questo risultato, in cui le connessioni a-d sono le più numerose tra le differenti tipologie, è coerente con la struttura funzionale tipica dei circuiti neuronali. Le connessioni a-d rappresentano, infatti, la direzione predominante del flusso informativo nel sistema nervoso. Per quanto riguarda la rete ALL-ALL, è importante notare che il numero totale di archi non corrisponde alla somma degli archi delle singole reti, ma è inferiore ad essa. Questo accade perché alcune coppie di neuroni sono gli estremi di connessioni di

differente tipo; ad esempio, una stessa coppia di neuroni potrebbe essere interessata sia da una connessione a-d che da una d-a. Questi archi "duplicati" tra una stessa coppia di nodi vengono considerati come un singolo arco nella rete ALL-ALL, che ignora la tipologia di connessioni, portando, di conseguenza, a un numero di archi inferiore rispetto alla somma delle connessioni caratterizzanti le reti parziali.

Il grado di un nodo rappresenta il numero di archi che lo collegano ad altri nodi nella rete. In altre parole, è il numero di connessioni che quel nodo ha con altri nodi, in ingresso o in uscita. Il *grado medio*, calcolato come la media aritmetica dei gradi di tutti i nodi parte della rete, fornisce informazioni importanti sulla connettività globale della rete: un alto grado medio indica che i nodi tendono ad avere molte connessioni, suggerendo che la rete è densa e altamente connessa; al contrario, un basso grado medio indica che i nodi sono interessati da poche connessioni, suggerendo una rete più sparsa. Nel caso specifico, i valori di questa misura seguono un andamento simile al numero di archi. Tra le reti parziali, la rete a-d ha il grado medio più elevato. Il grado medio della rete ALL-ALL risulta chiaramente più elevato rispetto a ciascuna rete parziale, poiché in essa ogni nodo ha una maggiore probabilità di essere connesso a più nodi, dal momento che la rete include e combina insieme le connessioni presenti nelle diverse reti.

Anche la *densità* della rete, definita come il rapporto tra il numero effettivo di connessioni e il numero massimo di connessioni che potrebbero esistere nella rete, mostra una tendenza simile, riconfermando il risultato per cui la rete a-d è caratterizzata da una maggiore connessione rispetto alle altre reti parziali.

Il *coefficiente di clustering medio* misura la tendenza dei nodi a formare cluster o gruppi fortemente connessi. Questo valore può variare tra 0 e 1; un coefficiente pari a 0 indica che nessun nodo forma sottogruppi connessi, mentre un valore pari a 1 segnala che tutti i vicini di un nodo sono connessi tra loro, formando un cluster completo. Le reti a-a e ALL-ALL presentano i coefficienti di clustering più alti, indicando una maggiore propensione alla formazione di sottogruppi all'interno della rete. Contrariamente a quanto accade per tutte le metriche precedenti, in questo caso, non è la rete ALL-ALL ad essere caratterizzata dal valore maggiore perché, sebbene essa integri tutte le connessioni possibili e abbia, quindi, un numero maggiore di archi delle altre reti, molte delle connessioni aggiuntive potrebbero collegare nodi che non fanno parte di un cluster esistente in una rete parziale, espandendo la rete in modo più dispersivo e riducendo la coesione locale dei cluster.

La *lunghezza media del percorso* (o lunghezza media del cammino) in una rete è la media delle distanze più brevi, in termini di numero di archi, tra tutte le coppie di nodi. Questa metrica fornisce un'indicazione di quanto, in media, i nodi della rete siano "vicini" tra loro; un valore basso della lunghezza media del percorso suggerisce che la rete è altamente connessa, con la maggior parte dei nodi raggiungibili tramite pochi passaggi, mentre un valore più alto indica una rete meno connessa. La rete ALL-ALL ha una lunghezza media del cammino inferiore a tutte le altre, indicando che l'integrazione di tutte le connessioni migliora l'efficienza globale della rete in termini di distanza media tra i neuroni del connettoma completo.

Il *diametro* di una rete rappresenta la distanza massima tra qualsiasi coppia di nodi, ovvero il percorso più lungo tra tutte le distanze minime calcolate. Nella rete d-d, si osserva il diametro più ampio; ciò suggerisce la presenza di coppie di neuroni particolarmente distanti tra loro e conferma la natura poco coesa di questa rete, come evidenziato anche dalle altre misure. Anche la rete d-a mostra un diametro relativamente elevato, quindi valgono considerazioni simili a quelle fatte per la rete d-d. Al contrario, la rete a-d presenta il diametro più piccolo, indicando una struttura più compatta. La rete ALL-ALL, pur avendo un diametro maggiore rispetto alla rete a-d, mantiene comunque un livello di coesione buono.

L'*assortatività di grado* indica la tendenza dei nodi di una rete ad avere legami con nodi di grado simile e può essere interpretata come un caso particolare del concetto più generico di

omofilia nell'analisi delle reti [Khanam *et al.*, 2023]. L'assortatività di grado può assumere valori nell'intervallo continuo $[-1, 1]$. I valori positivi sono indicatori di assortatività, i valori nulli sono indicatori di mancanza di assortatività e i valori negativi sono indicatori di disassortatività, cioè della tendenza dei nodi di una rete ad avere legami con nodi caratterizzati da gradi dissimili. Nel confronto tra le reti considerate, l'assortatività di grado mostra una significativa variazione. La rete a-a presenta un valore di assortatività nettamente più alto rispetto alle altre reti, suggerendo che i neuroni tendono a connettersi preferibilmente con altri neuroni che hanno un numero simile di connessioni. Ciò indica una struttura altamente omogenea. Al contrario, le reti d-a e d-d mostrano valori negativi di assortatività, quindi si configurano come una struttura disassortativa. La rete ALL-ALL mostra un valore di assortatività moderatamente positivo, come risultato di un bilanciamento tra l'assortatività delle altre reti in essa unificate.

Infine, si sono confrontate le reti in termini di *massima componente fortemente connessa*, ossia il più grande sottoinsieme di nodi tale per cui esiste un percorso tra ogni coppia di nodi. La rete ALL-ALL, come pronosticabile, presenta la componente connessa massima più grande, molto vicina al numero totale di nodi nella rete; solo qualche decina di nodi sono tagliati fuori. Questo risultato rispecchia il risultato dell'integrazione di tutte le connessioni possibili, che consente di ottenere una rete altamente connessa e con pochi sottoinsiemi di nodi isolati. Anche la rete a-a, considerando che questa ha un numero di nodi inferiore a quello della rete ALL-ALL, è caratterizzata da una componente connessa massima piuttosto ampia, con una buona percentuale dei nodi inclusi in essa. La rete d-a, invece, ha una componente connessa massima molto limitata, che comprende soli 88 dei suoi $2,204$ nodi, indicando, ancora una volta, che questa rete è altamente frammentata e poco coesa rispetto alle altre.

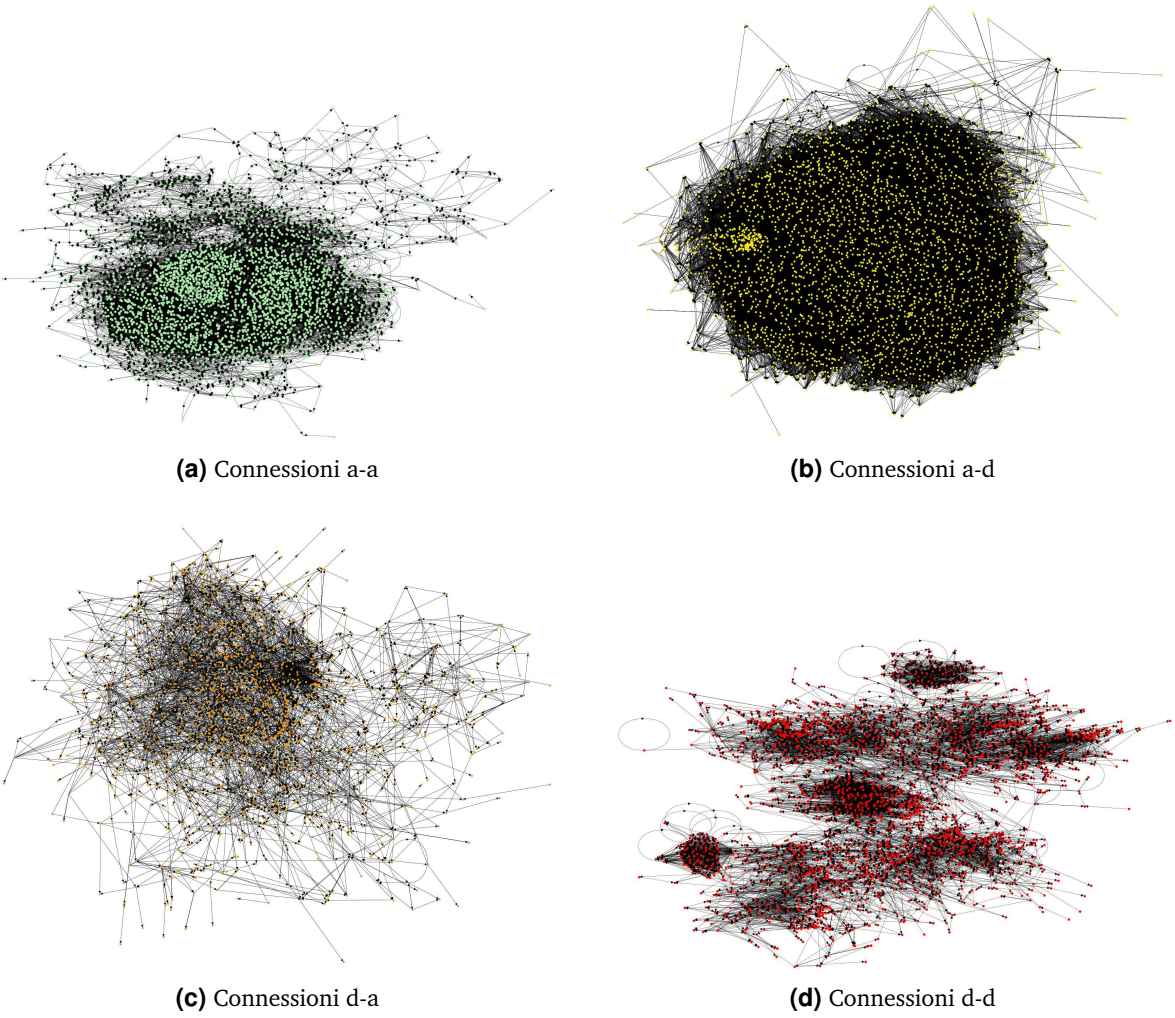
Tali reti sono mostrate nelle Figure 3.1 e 3.2. Visivamente queste rappresentazioni confermano le osservazioni fatte sulla densità e sulla coesione.

Nella Tabella 3.2 vengono, invece, confrontati il connettoma della larva di Drosophila e adulta, utilizzando le stesse metriche analizzate nella discussione precedente. L'analisi comparativa tra i connettomi rivela cambiamenti considerevoli nella struttura della rete, risultanti dal processo di maturazione e specializzazione del sistema nervoso durante lo sviluppo. Dall'analisi dei valori riportati in tabella si osserva che, nella transizione dalla larva all'adulta:

- Il *numero di nodi* e il *numero di archi* sono significativamente più elevati nel connettoma dell'adulta rispetto a quello della larva (circa due ordini di grandezza per i neuroni e un ordine di grandezza per le connessioni). La rete adulta ha circa 134.181 nodi e 2.700.513 archi, rispetto ai 2.952 nodi e 110.677 archi del connettoma della larva. Questo aumento riflette la crescita e l'espansione del cervello della Drosophila durante lo sviluppo, indicando che, nel passaggio allo stadio adulto, il sistema neurale diventa più esteso e sofisticato.

- Il *grado medio* è molto più alto nel connettoma della larva rispetto a quello dell'adulta, così come la *densità* che, durante lo sviluppo, diminuisce di circa due ordini di grandezza. Questa diminuzione può essere giustificata considerando che la rete della Drosophila adulta, pur avendo un numero maggiore di connessioni, mostra un incremento considerevole nel numero di nodi. La crescita delle connessioni è inferiore a quella dei neuroni.

- Il connettoma della larva ha un *coefficiente di clustering medio* più alto rispetto al connettoma dell'adulta. I valori di questa misura suggeriscono che nel connettoma della larva i neuroni tendono a formare cluster più densamente connessi rispetto a quanto accade nel connettoma dell'adulta. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che, durante lo sviluppo, i neuroni della Drosophila adulta si sono specializzati maggiormente, portando



(a) Connessioni a-a

(b) Connessioni a-d

(c) Connessioni d-a

(d) Connessioni d-d

Figura 3.1: Reti parziali indotte dalle differenti tipologie di connessioni nella larva di Drosophila

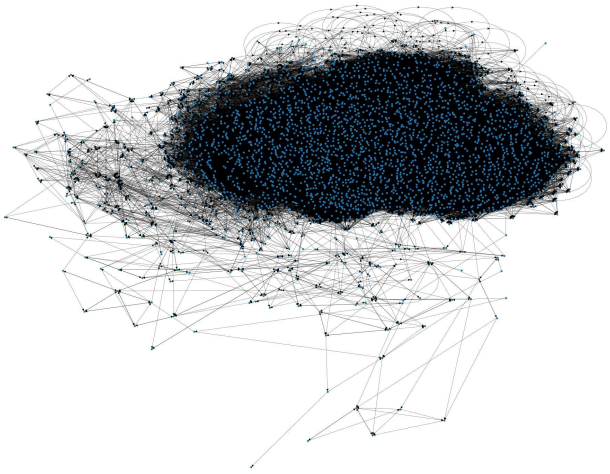


Figura 3.2: Rete indotta dalla totalità delle connessioni nel connettoma della larva di Drosophila

a una struttura più organizzata e meno orientata alla formazione di ampi cluster. In altre parole, tale risultato lascia pensare che, nel passaggio dalla larva all'adulta, i neuroni tendano a differenziarsi maggiormente e le loro connessioni tendano a essere più selettive, rispondendo a determinati schemi che mirano a collegare nodi di certe

aree con nodi di altre aree specifiche.

- La *lunghezza media del percorso* e il *diametro* rimangono sostanzialmente simili. Questo suggerisce che, nonostante la maggiore complessità della rete dell'adulta, la distanza massima e media tra i nodi rimane relativamente stabile.
- L'*assortatività di grado* è moderatamente positiva nel caso della larva e praticamente nulla nel caso dell'adulta.
- I connettomi della larva e dell'adulta mostrano una caratterizzazione molto simile in termini di *massima componente fortemente connessa*. Infatti, in entrambi i casi si osserva la presenza di una grande componente connessa che include quasi la totalità dei nodi del connettoma; in particolare, tale componente include il 95,2 % dei nodi nella larva e l'89,3 % dei nodi nell'adulta.

Si osserva che l'evoluzione di alcune caratteristiche di base durante la transizione dal connettoma della larva a quello dell'adulta segue un andamento diverso rispetto a quanto avviene in altri tipi di reti, come quelle sociali, tecnologiche e informatiche, dove è stato dimostrato che la densità tende ad aumentare e il diametro a diminuire con l'espansione della rete [Leskovec *et al.*, 2005].

Misure	*Larva*	*Adulta*
Numero di nodi	2,952	134,181
Numero di archi	110,677	2,700,513
Grado medio	74.98	40.25
Densità	0.01271	0.0001
Coefficiente di clustering medio	0.178	0.1102
Lunghezza media del cammino	3.28	4.52
Diametro	15	14
Assortatività di grado	0.252	-0.056
Massima componente connessa	2,810	119,756

Tabella 3.2: Confronto tra le caratteristiche strutturali delle reti associate al connettoma della larva di Drosophila e al connettoma della Drosophila adulta

3.4 Analisi delle centralità

Poiché i nodi sono diversi e non svolgono lo stesso ruolo nella rete, uno degli obiettivi principali nella Network Analysis è capire quali siano i nodi centrali. Una delle prime analisi consiste, quindi, nel misurare il potere o l'influenza dei nodi sulla base delle loro connessioni. In letteratura, tuttavia, non c'è unanimità su che cosa significhi potere o influenza e su quali tipologie di connessione debbano essere considerate per la valutazione di questa caratterizzazione dei nodi. Questo, di conseguenza, comporta l'esistenza di molteplici modi per definire l'importanza e, quindi, la centralità di un nodo.

Le quattro misure di centralità classiche della Network Analysis sono le seguenti:

1. La *degree centrality* è la misura di centralità più semplice, che tiene conto del grado di ciascun nodo. In altri termini, la degree centrality di un nodo corrisponde al suo grado, ovvero al numero di connessioni che esso ha. Secondo questa misura, un nodo centrale è un nodo che possiede un numero elevato di connessioni. Generalmente, la maggior parte dei nodi presenta valori bassi di degree centrality, mentre pochi nodi mostrano valori

elevati. Ciò significa che, in una rete, una piccola parte dei nodi esercita una grande influenza sugli altri. La distribuzione della degree centrality segue, quindi, una power law, il che significa che in molte reti reali pochi nodi hanno molte connessioni, mentre la maggior parte dei nodi ha solo poche connessioni. Questa caratteristica è tipica di molte reti complesse, come le reti sociali o le reti biologiche, dove pochi nodi altamente connessi fungono da hub centrali per il resto della rete.

2. La *closeness centrality* valuta la centralità di un nodo misurando quanto questo è vicino agli altri nodi della rete. In questo caso, non conta tanto il numero di connessioni dirette che un nodo possiede, quanto la sua prossimità al maggior numero possibile di nodi della rete. Questa misura di centralità si basa sull'idea che la capacità di un nodo di ricevere e inviare informazioni all'interno della rete dipenda in modo significativo dalla distanza che lo separa dagli altri nodi. Lo svantaggio di questa misura è che il suo calcolo è piuttosto costoso, poiché richiede di determinare il percorso più breve tra ciascuna coppia di nodi. La closeness centrality di un nodo è definita come il reciproco della somma delle distanze tra esso e tutti gli altri nodi della rete. Ciò significa che la closeness centrality può assumere valori nell'intervallo continuo $[0, 1]$. Un valore più elevato indica che il nodo è più "vicino" in media agli altri nodi della rete, fortificando, così, la sua capacità di diffondere e ricevere informazioni. Rispetto alla degree centrality, la distribuzione della closeness centrality tende ad essere meno sbilanciata e si avvicina, approssimativamente, a una distribuzione gaussiana. Questo riflette una maggiore uniformità nella dispersione dei valori di centralità all'interno della rete.

3. La *betweenness centrality* misura l'importanza di un nodo in base alla sua posizione strategica da intermediario all'interno della rete. Un nodo con elevata betweenness centrality agisce da ponte tra due o più gruppi di nodi, facilitando la comunicazione tra di essi. La sua rimozione, quindi, potrebbe interrompere il flusso di informazioni tra diverse parti della rete, rendendo questi nodi particolarmente cruciali per la coesione della rete stessa. Detto altrimenti, la betweenness centrality è la centralità di chi mette in comunicazione due comunità. L'algoritmo per il calcolo della betweenness centrality, anche esso piuttosto costoso, richiede di determinare i percorsi più brevi tra tutte le coppie di nodi della rete. Per ciascun nodo si conta il numero di percorsi più brevi in cui esso è coinvolto, cioè quelli che lo attraversano come intermediario. Il valore finale viene normalizzato per far sì che la centralità vari tra 0 e 1, con un valore più alto che indica una maggiore influenza del nodo come intermediario.

4. Secondo Philip Bonacich, l'importanza di un nodo in una rete non dovrebbe essere semplicemente determinata dal numero di connessioni dirette che possiede, come avviene nella degree centrality, ma dovrebbe tenere conto anche della centralità dei nodi a cui è collegato. Su questa intuizione, si basa l'ultima misura di centralità, ossia l'*eigenvector centrality*. Questa misura è, quindi, un'estensione della degree centrality basata su un approccio ricorsivo: l'importanza di un nodo non dipende solo dal numero di connessioni dirette che esso possiede, ma anche dall'importanza dei nodi a cui è connesso. Questo significa che un nodo è tanto più centrale quanto più elevata è la centralità dei suoi vicini. Nella pratica, il peso di ciascun arco che coinvolge il nodo dovrebbe essere proporzionato al grado di centralità dell'altro nodo della connessione. Ciò significa che i nodi collegati a nodi altamente centrali ricevono un punteggio di centralità maggiore rispetto ai nodi collegati a nodi meno centrali. Il calcolo dell'eigenvector centrality inizia assegnando un valore di centralità pari a 1 a tutti i nodi. Successivamente, i punteggi di ciascun nodo sono ricalcolati iterativamente come una media ponderata delle centralità dei nodi vicini, considerando che i nodi più centrali nel vicinato contribuiscono maggiormente al punteggio. I valori risultanti vengono, quindi, normalizzati dividendo ciascun valore per

il massimo valore riscontrato. Questo processo iterativo continua fino alla convergenza, cioè fino a quando i valori non cambiano più in modo significativo. Tuttavia, il processo può richiedere numerose iterazioni, rendendo questa metrica computazionalmente costosa e poco pratica per reti di grandi dimensioni.

Sebbene nella letteratura siano presenti numerose altre misure di centralità, quelle introdotte sono tra quelle più comunemente utilizzate.

Inoltre, anziché sceglierne una misura di centralità a discapito delle altre, è consigliabile combinare le diverse misure, così da cogliere le varie sfumature che ciascuna di esse è in grado di catturare. Questo approccio è stato adottato nell'analisi qui presentata, in cui sono calcolate le distribuzioni di tutte queste centralità sui connettomi della larva di Drosophila e della Drosophila adulta.

La Figura 3.3 illustra la distribuzione della degree centrality, sia in scala normale che log-log, per le reti associate ai connettomi della larva, in alto, e dell'adulta, in basso. L'utilizzo della scala logaritmica consente di evidenziare meglio la distribuzione dei nodi con alto grado di connessione, rivelando una power law molto accentuata nel connettoma dell'adulta, caratterizzata da pochi nodi altamente connessi e da molti nodi con poche connessioni. Al contrario, la distribuzione della centralità nel connettoma della larva presenta un andamento più complesso e irregolare, visibile anche in scala lineare. In questo caso, nella parte sinistra si osserva una distribuzione a campana alla quale, proseguendo verso destra, si sovrappone un'altra distribuzione a campana, per poi terminare con una coda, formata da un numero ridotto di nodi con un alto grado di centralità. Questo indica che, nel connettoma della larva, la maggioranza dei neuroni possiede un numero medio-basso di connessioni, mentre un numero limitato di neuroni presenta un elevato grado di connessioni. Chiaramente, le due scale lineari utilizzate per rappresentare i valori della centralità nelle distribuzioni mostrano estensioni molto diverse: nel caso del connettoma della larva, l'intervallo è limitato a poche centinaia, mentre nel connettoma dell'adulta i valori raggiungono ordini di grandezza dell'ordine di 10^4.

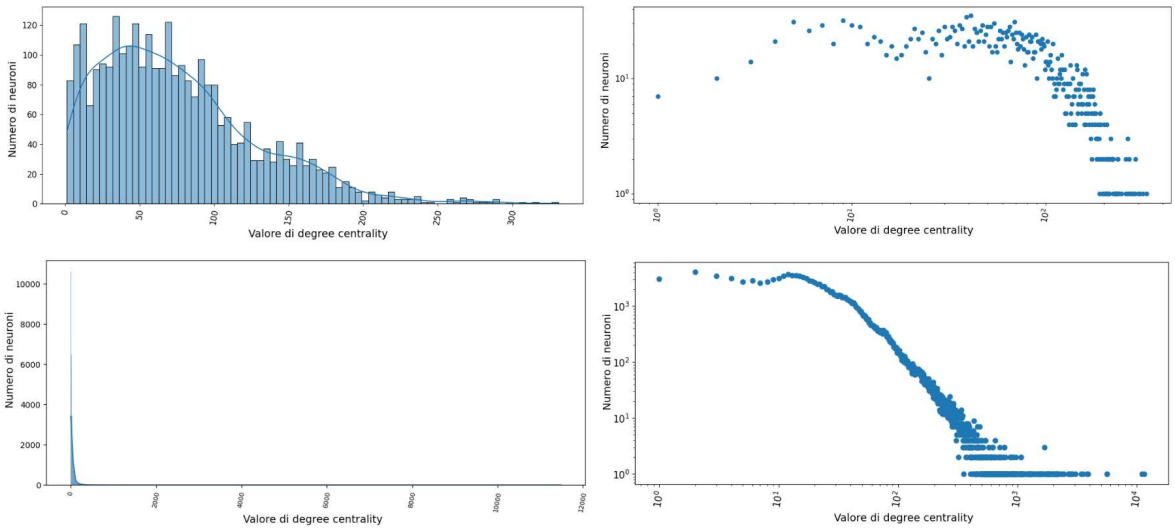


Figura 3.3: Distribuzione della degree centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso)

Nella Figura 3.4, invece, è rappresentata la distribuzione della closeness centrality. Il plot in alto si riferisce al connettoma della larva, mentre quello in basso al connettoma dell'adulta. In questo caso, è stata utilizzata esclusivamente una scala normale, senza ricorrere a quella logaritmica, poiché l'andamento della distribuzione risulta evidente anche limitandosi a tale scala. Entrambi i casi mostrano una distribuzione a campana, come ci si aspetta per questa mi-

sura di centralità che, tipicamente, ha questo andamento. Tuttavia, esistono alcune differenze tra le distribuzioni della larva e dell'adulta. In particolare, nella larva, la distribuzione della centralità appare più regolare e uniforme, mentre, al contrario, quella dell'adulta mostra una sovrapposizione di tre curve a campana con altezze crescenti, accompagnata da alcuni valori anomali nella coda della distribuzione, sul lato destro. Inoltre, la distribuzione dell'adulta è molto più ripida. Entrambe le distribuzioni presentano una coda lunga, ma nella larva la coda si trova a sinistra della campana principale, mentre nell'adulta si estende verso destra.

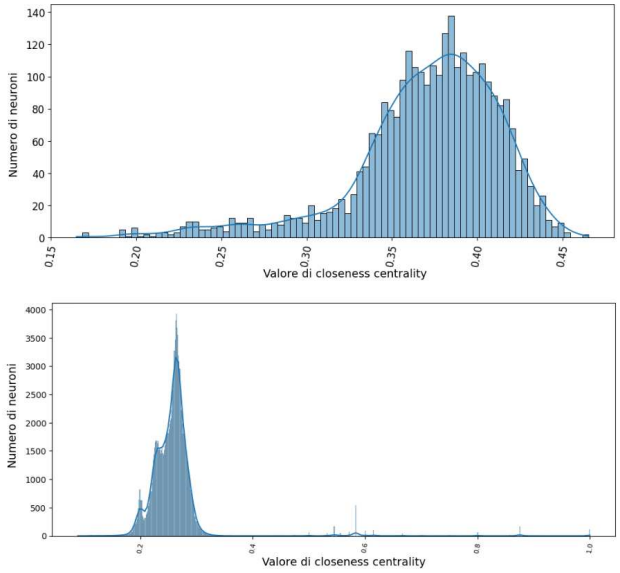


Figura 3.4: Distribuzione della closeness centrality su scala normale per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso)

Nel dettaglio, analizzando il grafico della larva, si può notare che:

- una porzione abbastanza ampia di neuroni è connessa agli altri tramite percorsi brevi caratterizzandosi, quindi, per un alto valore di closeness centrality;
- i pochi neuroni rimanenti sono collegati agli altri tramite percorsi più lunghi.

Nel grafico dell'adulta, invece, emerge che:

- un numero limitato di neuroni presenta una closeness centrality alta, essendo connessi ad altri neuroni tramite percorsi brevi;
- la maggior parte dei neuroni ha una centralità media e sono, quindi, connessi agli altri neuroni tramite percorsi di lunghezza intermedia, né troppo lunghi né troppo corti;
- pochi neuroni mostrano una bassa closeness centrality, risultando collegati agli altri tramite percorsi lunghi.

Inoltre, si può osservare che, nel caso della larva, il valore massimo della centralità è appena superiore a 0.45. Al contrario, nella rete adulta, la coda della distribuzione si estende fino al valore massimo della misura, pari a 1.

Per quanto riguarda la betweenness centrality, le distribuzioni per i connettomi della larva e dell'adulta sono illustrate nella Figura 3.5. Graficamente si può notare che entrambe le distribuzioni seguono una power law, sebbene quella dell'adulta sia notevolmente più ripida rispetto a quella della larva. Questa power law che caratterizza queste curve indica che, sia

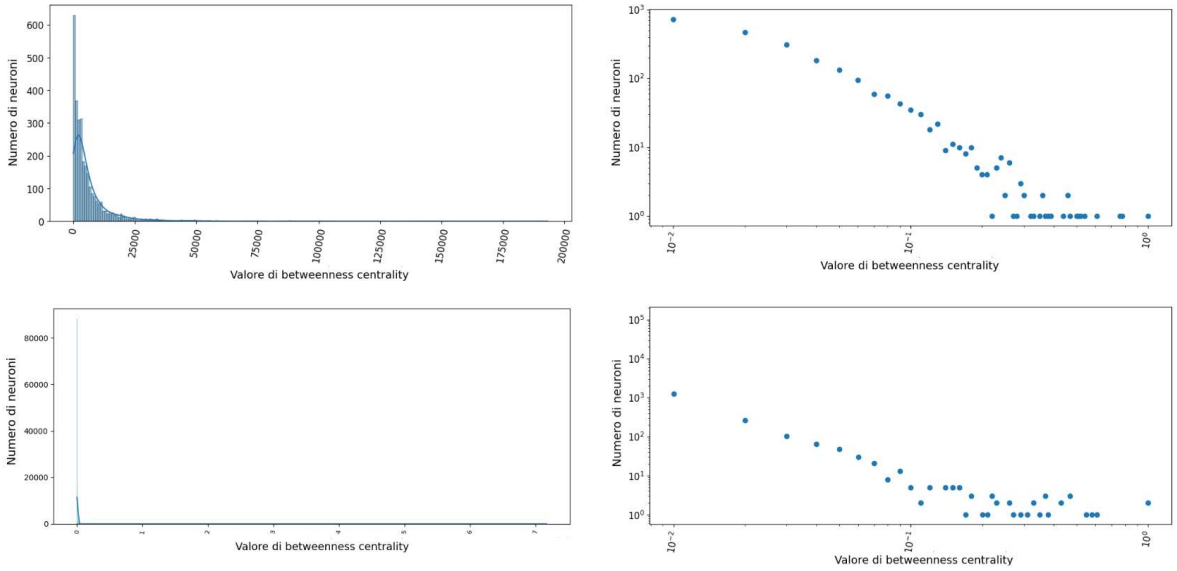


Figura 3.5: Distribuzione della betweenness centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso)

nel connettoma della larva che in quello dell'adulta, esiste una limitata quantità di neuroni che svolgono un ruolo strategico nella connessione tra diverse aree del cervello.

In ultimo, la distribuzione dell'eigenvector centrality per la larva e l'adulta è mostrata nella Figura 3.6. Come per la closeness centrality, entrambe le distribuzioni seguono una power law e, anche in questo caso, la distribuzione per l'adulta è molto ripida, mentre quella per la larva ha un andamento più dolce. Questo pattern indica che sia nel connettoma dell'adulta che in quello della larva, ci sono numerosi neuroni che non sono particolarmente importanti, poiché sono collegati con pochi neuroni, anch'essi non rilevanti. D'altro canto, esistono pochi neuroni di grande importanza, in quanto sono connessi a numerosi neuroni a loro volta altamente centrali.

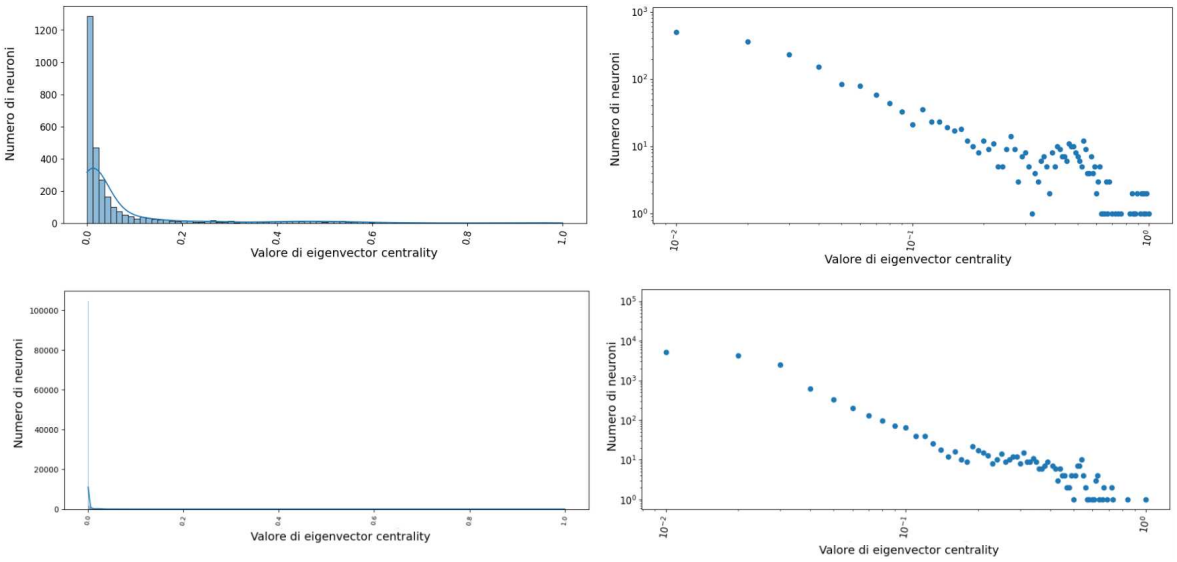


Figura 3.6: Distribuzione della eigenvector centrality, sia su scala normale che log-log, per la rete associata al connettoma della larva (in alto) e al connettoma dell'adulta (in basso)

In conclusione da questa analisi, considerando contemporaneamente tutte le distribuzioni delle centralità calcolate per i connettomi della larva e dell'adulta, emergono alcune

osservazioni rilevanti:

1. Le distribuzioni della betweenness centrality e dell'eigenvector centrality sono simili sia per la larva che per l'adulta. Questo suggerisce che, durante lo sviluppo, la centralità in termini di connessione strategica e importanza indiretta preserva e mostra dei pattern analoghi.

2. Le distribuzioni della degree centrality e della closeness centrality mostrano alcune somiglianze, come la forma a campana, ma presentano anche differenze importanti tra la larva e l'adulta. Questo riflette variazioni nelle caratteristiche di connessione e vicinanza tra le due fasi di sviluppo.

3. Molte delle distribuzioni mostrano somiglianze tra loro; questo è vero soprattutto per l'adulta, ma si può riscontrare anche per la larva.

In tutti i tipi di centralità, sia nella larva che nell'adulta, si evidenzia la presenza di un numero ristretto di neuroni con valori di centralità estremamente elevati. Questo fenomeno, non inaspettato per le altre centralità, è particolarmente degno di nota per la closeness centrality, che generalmente non presenta tale comportamento.

Ciò suggerisce di esaminare se i neuroni con valori elevati di centralità siano o meno gli stessi per tutte le misure di centralità, dimostrando, in caso affermativo, la presenza di neuroni estremamente centrali ed strategici per la struttura connettomica.

3.4.1 Correlazione tra le misure di centralità

L'osservazione delle distribuzioni delle centralità appena introdotte suggerisce una somiglianza tra di esse, particolarmente evidente nel connettoma dell'adulta e, sebbene in modo meno marcato, anche nel connettoma della larva. A tal proposito, si è quindi proseguita l'analisi nel tentativo di verificare se esiste una correlazione tra le diverse misure di centralità calcolate nella larva e nell'adulta.

Lo strumento principale per misurare la correlazione è il *coefficiente di Spearman* [Zar, 2014]. Si tratta di una misura statistica non parametrica di correlazione, spesso indicata con il simbolo greco ρ (rho) o come r_S, che permette di stabilire quanto bene una relazione tra due variabili può essere descritta usando una funzione monotona crescente o decrescente. Tale coefficiente può assumere valori tra -1 e 1.

- Se $\rho = -1$ allora tra le due variabili vi è una correlazione perfetta negativa. In altre parole, al crescere di una variabile, l'altra diminuisce costantemente. Questa relazione è espressa come una funzione decrescente.

- Se $\rho = 1$ allora tra le due variabili vi è una correlazione perfetta positiva. In questo caso, al crescere di una variabile, anche l'altra aumenta costantemente. Questa relazione è espressa come una funzione crescente.

- Se ρ è vicino allo zero allora non esiste una correlazione tra le due variabili. Questo non esclude completamente una relazione tra di esse, ma indica che non esiste una tendenza monotona né crescente né decrescente.

Per ognuna delle coppie di misure di centralità è stato, quindi, calcolato il valore del coefficiente di Spearman. I risultati ottenuti sono riportati nella matrice in Figura 3.7 per la larva e nella matrice in Figura 3.8 per l'adulta.

Per entrambe, si ottengono risultati che confermano l'esistenza di una correlazione positiva tra tutte le coppie di misure di centralità calcolate. Chiaramente, questa correlazione è più

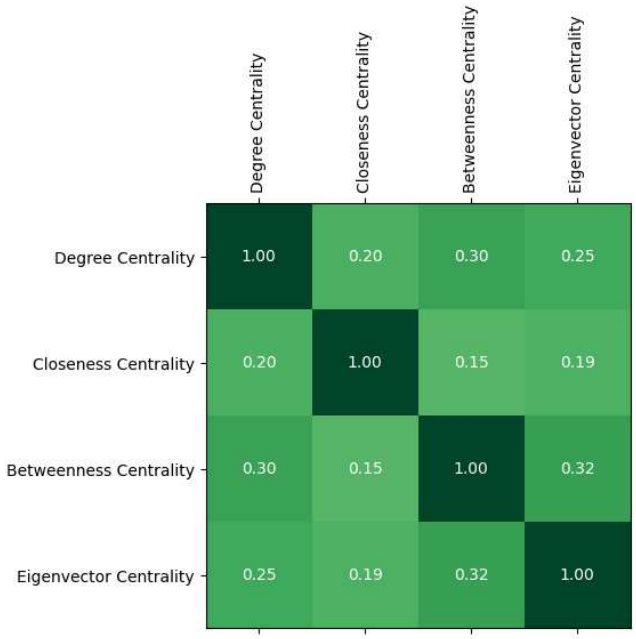


Figura 3.7: Valori del coefficiente di correlazione di Spearman per le diverse centralità nella larva di Drosophila

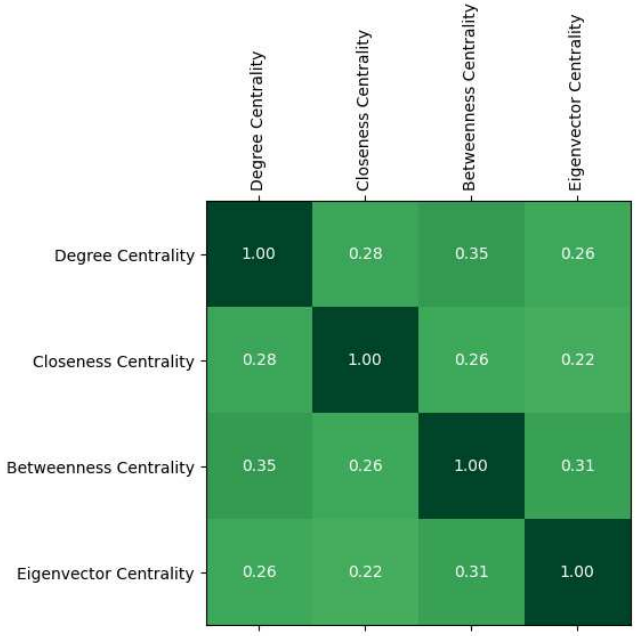


Figura 3.8: Valori del coefficiente di correlazione di Spearman per le diverse centralità nella Drosophila adulta

forte in alcuni casi, come, ad esempio, tra la degree e la betweenness centrality nell'adulta, mentre è più debole in altri, come, ad esempio, tra la closeness e la betweenness centrality nella larva. Stante questo fatto, ciò che è degno di nota è che tale correlazione positiva esiste anche tra misure di centralità che, in linea teorica, la Network Analysis non prevede.

In particolare, questa correlazione positiva riscontrata implica che i nodi che sono caratterizzati da un alto valore per una qualche misura di centralità sono contemporaneamente anche caratterizzati da alti valori per le altre misure.

L'ipotesi formulata nella sezione precedente, la quale ipotizzava la possibile esistenza di nodi caratterizzati contemporaneamente da valori elevati per tutte e quattro le centralità, è quindi avvalorata dall'esistenza di questa correlazione che, in modo empirico, dimostra l'esistenza di un gruppo di neuroni molto potente in grado di esercitare una forte influenza nella trasmissione delle informazioni all'interno del connettoma della Drosophila, sia per la larva che per l'adulta.

Per verificare la veridicità di questa ipotesi, per ognuna delle misure di centralità, si è identificato il 20 % dei neuroni con il valore di centralità più alto. Si sono, così, ottenuti otto set di neuroni, quattro per la larva e quattro per l'adulta. La soglia del 20 % stata scelta empiricamente sulla base delle seguenti considerazioni:

- la maggior parte delle distribuzioni segue una power law, per cui una piccola parte dei nodi ha un valore molto elevato, mentre la maggior parte degli altri nodi ha valori molto bassi;
- si vuole porre l'attenzione ai neuroni più importanti per ogni centralità, evitando però di essere eccessivamente restrittivi nella selezione poiché l'obiettivo finale è quello di identificare tutti i neuroni che soddisfano l'ipotesi, senza escluderne alcuni.

Per capire se i nodi nei set costruiti siano gli stessi, si è calcolata l'intersezione tra le diverse coppie di sottoinsiemi per la larva e per l'adulta. I risultati dell'operazione insiemistica in valori percentuali sono riportati nella Tabella 3.3.

Dall'analisi di questa tabella, si può notare che la percentuale di neuroni in comune per ogni coppia di centralità è molto alta, cosa che, come già detto, non avviene in genere nell'analisi delle reti. Questo permette di concludere che il caso della Drosophila è un caso "speciale", e che quindi ci potrebbero essere realmente neuroni molto potenti nel suo connettoma.

Centralità	Larva	Adulta
Degree & Closeness	62.37%	58.34%
Degree & Betweenness	57.97%	63.78%
Degree & Eigenvector	66.1%	45.86%
Closeness & Betweenness	61.86%	58.48%
Closeness & Eigenvector	51.19%	31.20%
Betweenness & Eigenvector	37.12%	30.53%

Tabella 3.3: Percentuale dei nodi nell'intersezione tra il 20 % superiore dei nodi per due diverse misure di centralità

Formalmente, si sono definiti tali neuroni detti *power neuron*, o neuroni potenti, come segue:

Definizione 1 (Power neuron)**.**
Un power neuron in un connettoma è un neurone che appartiene simultaneamente al 20 % dei neuroni caratterizzati dai valori più alti di degree centrality, closeness centrality, betweennes centrality ed eigenvector centrality.

Per quantificare quanti siano questi neuroni speciali, si è calcolata l'intersezione tra tutti e quattro i set dei neuroni. La percentuale di neuroni che appartengono contemporaneamente al 20 % dei neuroni con i valori più alti per tutte e quattro le centralità è pari al 27,46 % per la larva e al 20,39 % per l'adulta. Nella larva, la frazione di power neuron è quindi $0,2746 \cdot 0,20 = 0,05492$, da cui si ha che il numero di power neuron è 162 su 2.952. Analogamente, nell'adulta, la frazione di power neuron è $0,2039 \cdot 0,20 = 0,04078$, quindi il numero di power neuron è 5.473 su 134.181.

Nell'articolo di Lin *et al.* [2024] si introduce la nozione di ricco club di neuroni, già descritto nel capitolo precedente. Poiché questo si basa solo sulla degree centrality (un nodo appartiene al club se il proprio grado è superiore a una certa soglia, che gli autori hanno fissato a 37 per la Drosophila adulta), la scoperta dell'esistenza di questi power neuron è qualcosa che va oltre a tale risultato.

Questo risultato determina un importante contributo nella letteratura in materia e potrebbe portare a risvolti ed evoluzioni assolutamente rilevanti. Per questo è di interesse indagare in maniera approfondita le caratteristiche e le funzioni che contraddistinguono questi nodi eccezionalmente ben connessi, nonché localizzarli nella rete, rivelando la loro organizzazione strutturale [Corradini *et al.*, 2024].

In modo immediato, dalla sola semantica delle centralità, si possono derivare quattro importanti caratteristiche di questi neuroni:

1. Data l'elevata degree centrality, i power neuron hanno molte connessioni e possono quindi fungere da hub per altri neuroni.

2. Data l'elevata closeness centrality, i power neuron sono collegati ad altri neuroni da percorsi medio-corti, abilitando una trasmissione delle informazioni molto rapida.

3. Data l'elevata betweenness centrality, i power neuron sono tra i pochi nodi strategici che fungono da punto di contatto tra diverse aree del connettoma.

4. Data l'elevata eigenvector centrality, i power neuron sono collegati a diversi altri neuroni altrettanto centrali della rete; questo permette, inoltre, di ipotizzare la presenza di una backbone che collega molti dei power neuron.

Anche solo da queste proprietà, si intuisce che i power neuron sono neuroni molto influenti, in grado di esercitare una forte influenza e un forte controllo sull'intero connettoma.

3.5 Aree funzionali

Un elemento di particolare rilevanza per le analisi successive è rappresentato dalle *aree funzionali* (o cerebrali), che caratterizzano i neuroni all'interno del connettoma. Per la larva di Drosophila e per l'adulta, sono stati definiti diversi livelli di astrazione per le aree funzionali. Nei due studi [Lin *et al.*, 2024; Winding *et al.*, 2023], le terminologie e le tassonomie utilizzate per rappresentare questo concetto differiscono, rendendo impossibile una comparazione diretta. A causa di queste discrepanze, non è possibile studiare lo sviluppo delle aree funzionali nel passaggio dalla larva all'adulta. Tuttavia, studiare l'evoluzione delle caratteristiche del connettoma della Drosophila durante la transizione da larva ad adulta non è l'obiettivo di questa ricerca, per questo motivo tali differenze non hanno ostacolato l'analisi.

Con lo scopo di consentire una trattazione coerente del concetto di area funzionale, per la presente tesi si è, quindi, scelto di adottare di un termine unificato, nonostante le differenze nelle tassonomie e terminologie utilizzate nei due dataset. In particolare, con il termine *area* (funzionale) si fa riferimento all'astrazione di livello superiore rispetto a ciò che viene indicato con il nome di "cell type" nella larva e alla nozione di "superclasse" definita nell'adulta. Questi elementi sono stati già introdotti e dettagliati nel capitolo precedente (si vedano le Tabelle 2.1 e 2.2).

Per facilitare la comprensione dei dati relativi alle aree, si è effettuato un conteggio dei neuroni per area funzionale, che ha permesso di ottenere una visione dettagliata della distribuzione dei neuroni all'interno delle diverse aree definite nel connettoma di Drosophila. Si sono, quindi, realizzati due grafici distinti, uno per la larva (Figura 3.9) e l'altro per l'adulta

(Figura 3.10), tenendo conto delle differenze nella tassonomia tra i due stadi di sviluppo. I conteggi esatti dei neuroni per area sono annotati sopra le barre. In dettaglio:

- Nella larva le aree con il numero maggiore di neuroni sono "innate" e "pre-output"; al contrario, l'area "ascending" è molto meno rappresentata rispetto a tutte le altre.
- Nell'adulta, i valori sono chiaramente più alti poichè il numero di neuroni è molto maggiore. L'area "optic" emerge, in modo evidente, come quella con il numero più elevato di neuroni, pari a più del doppio del numero di neuroni nell'area "central", immediatamente successiva nell'ordinamento decrescente per numero di neuroni delle aree. Altre aree quali "sensory" e "visual projection" contano anch'esse un numero considerevole di neuroni.

È bene ricordare che per la larva l'informazione sul tipo di cellula non è disponibile per tutti i neuroni che, quindi, non sono inclusi in questa analisi.

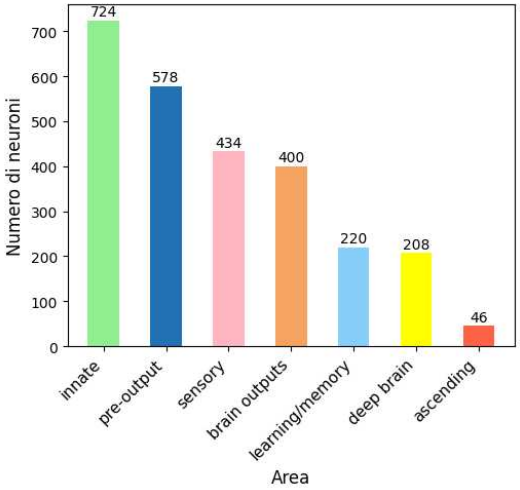


Figura 3.9: Conteggio dei neuroni per area funzionale nella larva di Drosophila

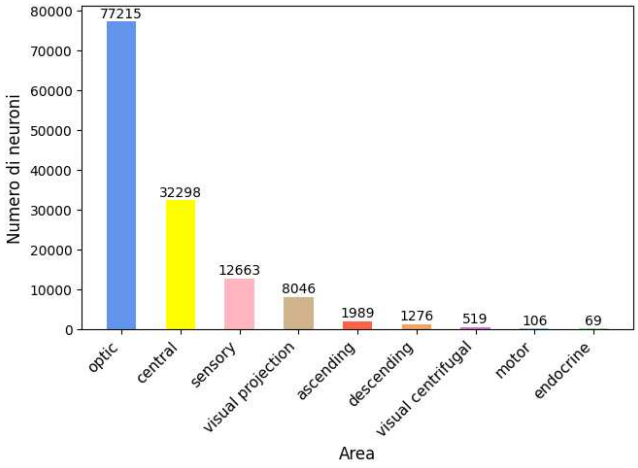


Figura 3.10: Conteggio dei neuroni per area funzionale nella Drosophila adulta

Per esplorare, in modo preliminare, il ruolo delle aree nella trasmissione e nell'elaborazione delle informazioni nel connettoma di Drosophila, si è infine analizzato come le connessioni neurali si distribuiscono tra le aree di input e di output. Per ottenere una rappresentazione

visiva intuitiva si è impiegato il diagramma di Sunkey, un particolare tipo di diagramma di flusso in cui l'ampiezza delle frecce è disegnata in maniera proporzionale alla quantità di flusso. In questo contesto, il flusso rappresenta la quantità di connessioni che partono da un neurone di input, appartenente a una specifica area, e arrivano a un neurone di output in un'altra area. Lì dove si osservano frecce più spesse, il diagramma suggere un flusso maggiore di informazioni tra le aree di input e output coinvolte, evidenziando le vie neurali predominanti.

La distinzione tra input e output di una connessione permette di chiarire quali aree giocano principalmente un ruolo nella trasmissione delle informazioni e quali aree sono i principali destinatari. In generale, sia per la larva che per l'adulta, si nota un certo equilibro in questo senso, per cui il numero di connessioni che partono da un'area è simile al numero di connessioni che arrivano nella stessa. Non sorprende che le aree maggiormente interessate da connessioni siano le stesse che si caratterizzano per un numero maggiore di neuroni. Infatti, nella larva si osserva un flusso importante in uscita dall'area "innate" e "pre-output", mentre nell'adulta sono le aree "central" e "optic" che sono interessate dal maggior numero di connessioni. Inoltre, dal diagramma si nota che ciascuna area di input si connette a più aree di output, suggerendo processi di elaborazione complessi.

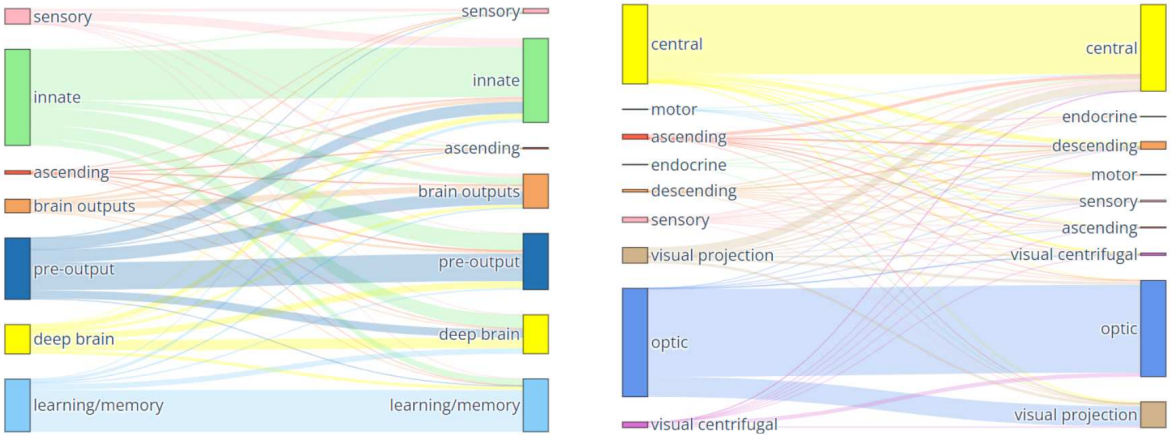


Figura 3.11: Connettività tra le aree nel connettoma della larva (a sinistra) e nel connettoma dell'adulta (a destra)

Per creare coerenza visiva e facilitare l'interpretazione dei dati, per tutte le analisi riferite alle aree funzionali si utilizza uno stesso codice di colori.

CAPITOLO 4

Estrazione di motif di base

In questo capitolo vengono esposti i risultati ottenuti dal processo di estrazione di motif dal connettoma della Drosophila. Identificare e analizzare questi schemi ricorrenti all'interno di una rete biologica permette di scoprire i principi strutturali e dinamici che regolano il funzionamento cerebrale. Di seguito sono presentati i metodi utilizzati per individuare determinati motif, denominati pattern funzionali, e le possibili implicazioni della loro identificazione.

4.1 Network motif

Una rete biologica di qualsiasi tipo mostra un'organizzazione modulare e in essa si possono osservare gruppi più o meno estesi di neuroni interagenti. Questi rappresentano i cosiddetti "*network motif*" ed è ormai opinione diffusa che essi costituiscano i mattoni funzionali di base delle reti neuronali, per cui analizzarli può fornire informazioni preziose su come le reti sono organizzate e su come avviene l'elaborazione delle informazioni al loro interno.

I network motif sono stati introdotti da un gruppo di ricercatori guidato da Uri Alon, professore e biologo presso il Weizmann Institute of Science. Alon è stato un pioniere nello studio di queste strutture, proponendo che esse potessero svelare i principi di progettazione e le funzionalità intrinseche delle reti complesse [Milo *et al.*, 2002].

Nel dettaglio, i network motif sono pattern di connessione ricorrenti all'interno di una rete, che si verificano con una frequenza significativamente più alta rispetto a quella attesa in una rete randomica. La ricorrenza di determinati motif suggerisce che essi non siano casuali, ma, al contrario, che abbiano una funzione specifica e critica all'interno della rete, contribuendo al suo funzionamento e alla sua stabilità. Lo studio di questi motif permette, quindi, di comprendere meglio i principi di progettazione delle reti biologiche e di altre reti complesse, oltre a fornire preziose indicazioni per progettare e ottimizzare reti artificiali. Come discusso nel Capitolo 1, le applicazioni di questi studi non si limitano al campo biologico, ma si estendono a numerosi altri ambiti, inclusi quelli dell'informatica.

Precedenti lavori hanno osservato che sia reti di microorganismi che reti di organismi più complessi sembrano essere costituite da un piccolo insieme di schemi ricorrenti, rivelando, così, numerosi motif funzionalmente significativi nelle reti biologiche di queste specie, e non solo.

Si è, inoltre, scoperto che alcuni motif sono associati a specifiche funzioni biologiche desiderate o, in certi casi, a disfunzioni indesiderate. Altri motif sono fondamentali perché

influenzano direttamente la dinamica complessiva del sistema; esempi significativi sono i loop di feedforward, i loop di feedback, le catene lineari, e molti altri ancora.

Oltre a ciò, i motif svolgono un ruolo importante nello sviluppo e nell'ottimizzazione della rete.

Pertanto, l'estrazione di motif in una rete è assolutamente rilevante per comprendere in profondità la rete stessa e il suo funzionamento.

4.1.1 Pattern funzionale di un neurone

Prima di iniziare a discutere e anlizzare i motif presenti nel connettoma della Drosophila, è opportuno definire in maniera formale quali tipi di motif sono stati considerati in questo studio. Il termine utilizzato per descriverli è *pattern funzionale di un neurone*.

Il pattern funzionale di un neurone descrive l'area funzionale di appartenenza del neurone stesso e le aree funzionali a cui appartengono i neuroni ad esso collegati. Più precisamente, sia $\mathcal{C}$ il connettoma della Drosophila e sia n_i un neurone di $\mathcal{C}$; si definiscono:

- Il *vicinato entrante* di n_i, indicato con $nbh_{in}(n_i)$, come l'insieme dei neuroni connessi a n_i da archi entranti; in altre parole, esso comprende i neuroni che inviano segnali verso n_i.
- Il *vicinato uscente* di n_i, indicato con $nbh_{out}(n_i)$, come l'insieme dei neuroni connessi a n_i da archi uscenti; ciò significa che n_i invia segnali verso questi neuroni.

Queste definizioni preliminari permettono di definire rigorosamente il concetto di pattern funzionale di un neurone.

Definizione 2 (Pattern funzionale)**.**
Il pattern funzionale $\mathcal{P}(n_i)$ di n_i è una rete i cui nodi rappresentano aree funzionali e i cui archi rappresentano connessioni tra le aree, ottenuta a partire dal neurone n_i, dal suo vicinato entrante $nbh_{in}(n_i)$, dal suo vicinato uscente $nbh_{out}(n_i)$ e dagli archi corrispondenti, sostituendo ai neuroni coinvolti le rispettive aree funzionali di appartenenza. Inoltre, se due nodi in $nbh_{in}(n_i)$ (risp., $nbh_{out}(n_i)$) appartengono alla stessa area, i nodi corrispondenti nel pattern funzionale $\mathcal{P}(n_i)$ vengono collassati in un unico nodo che rappresenta quell'area.

Intuitivamente, un pattern funzionale indica l'esistenza di una sottorete che coinvolge neuroni di aree funzionali specifiche, collegati da connessioni specifiche.

Per ogni neurone del connettoma della Drosophila si è quindi identificato il pattern funzionale dello stesso. Il neurone a cui si riferisce un dato pattern funzionale è definito come *core neuron* e la sua area funzionale di appartenenza come *core area*.

Definizione 3 (Core neuron and core area)**.**
Sia $\mathcal{P}(n_i)$ un pattern funzionale di un neurone n_i. Si definisce n_i come core neuron di $\mathcal{P}(n_i)$ e si definisce l'area a cui appartiene n_i come core area di $\mathcal{P}(n_i)$.

Come indicato dalla Definizione 2, il pattern funzionale di un neurone non specifica i singoli neuroni a cui esso è collegato, ma fornisce un livello di astrazione superiore, identificando le aree funzionali dalle quali riceve e verso le quali invia impulsi elettrici. Questo approccio consente di analizzare le interazioni a livello di aree cerebrali anziché a livello di singoli neuroni, semplificando la comprensione dei ruoli e delle funzioni biologiche dei pattern identificati. Inoltre, aggregando i nodi in base alle loro aree di appartenenza e unificando i nodi corrispondenti nel pattern funzionale, si ottiene una rappresentazione più chiara delle connessioni e delle dinamiche nella rete neurale.

Inoltre, sempre dalla Definizione 2 emerge che diversi core neuron, chiaramente se appartenenti alla stessa area, possono avere associato lo stesso pattern funzionale. Si è

calcolata, quindi, la frequenza di un dato pattern funzionale come il numero di core neuron da cui questo può essere derivato.

Essendo di interesse individuare pattern statisticamente significativi, successivamente al calcolo del conteggio dei pattern, si è eseguito un test basato sulla *procedura di assegnazione quadratica* (QAP) per verificare la significatività statistica dei pattern. A partire da questa procedura è possibile ottenere pattern funzionali "privilegiati", cioè più frequenti di quanto atteso dal semplice caso.

4.1.2 Quadratic Assignment Procedure

La Quadratic Assignment Procedure (QAP) è un metodo statistico che può essere utilizzato per analizzare la relazione tra due matrici di dati, ciascuna delle quali rappresenta l'insieme di connessioni di una rete. In particolare, il QAP è un test di permutazione che consente di verificare ipotesi su quantità che variano in funzione delle etichette associate ai nodi della rete; tale test prevede, infatti, di far permutare le etichette, preservando, al contempo, la struttura complessiva della rete [Hubert e Schultz, 1976].

Questo test si presta esattamente all'obiettivo prefissato di valutare la significatività statistica dei pattern funzionali, essendo questi costruiti a partire dalle etichette, rappresentanti le aree funzionali, che possono essere associate ai nodi.

Dato un pattern funzionale $\mathcal{P}$, derivato dalla rete $\mathcal{C}$ associata al connettoma della Drosophila, si esegue il QAP test per verificare se il suo numero di occorrenze, ossia il numero di nodi della rete da cui è derivabile il pattern stesso (per Definizione 2), è statisticamente superiore a quello che ci aspetterebbe dal solo caso.

Se, per valutare la significatività statistica, si adottasse un modello nullo di riferimento che alterasse completamente la rete $\mathcal{C}$, non sarebbero mantenute proprietà importanti come la modularità, la degree assortativity, le distribuzioni delle diverse misure di centralità, e altre caratteristiche strutturali. Al contrario, il QAP test genera un modello nullo tramite una permutazione casuale delle etichette dei nodi, conservando, così, le proprietà strutturali della rete. In questo modello nullo, i neuroni vengono semplicemente assegnati ad una delle aree funzionali in modo casuale, ma mantengono invariate le loro connessioni.

Idealmente, si dovrebbe generare il maggior numero possibile di modelli nulli, ciascuno ottenuto mediante una differente permutazione casuale delle etichette dei nodi. Per la larva di Drosophila sono state eseguite $N = 1.000$ permutazioni delle etichette dei nodi, da cui sono stati derivati i relativi modelli nulli. Per ogni modello nullo sono stati estratti i pattern funzionali casuali, analogamente a quanto fatto sulla rete reale. I pattern ottenuti sono utilizzati come termine di confronto per valutare la significatività statistica dei pattern funzionali reali. Per la Drosophila adulta, sarebbe stato auspicabile seguire lo stesso approccio. Tuttavia, a causa della maggiore complessità della rete, la costruzione di modelli nulli si è rivelata molto più onerosa, e pertanto è stato considerato solo un modello nullo di riferimento ($N = 1$). Gli sviluppi futuri si concentreranno certamente su questo aspetto, con l'obiettivo di incrementare il numero di modelli nulli di riferimento, al fine di consolidare i risultati ottenuti.

Per ogni pattern funzionale $\mathcal{P}$ trovato in $\mathcal{C}$, si verifica la sua significatività statistica come segue:

1. Sia $\gamma_{\mathcal{P}}$ il numero di volte in cui $\mathcal{P}$ compare nella rete originale e siano $\gamma_1, \gamma_2, \ldots, \gamma_N$ il numero di volte in cui compare negli N modelli nulli.

2. Si calcola il p-value come il rapporto tra il numero di volte in cui la frequenza di $\mathcal{P}$ nel modello nullo i-esimo (γ_i) è maggiore della frequenza di $\mathcal{P}$ nel modello reale ($\gamma_{\mathcal{P}}$) e il numero totale di modelli nulli N considerati; in formule:

$$p_{\mathcal{P}} = \frac{\sum_{i=1}^{N} \iota(\gamma_i > \gamma_{\mathcal{P}})}{N},$$

dove $\iota(\cdot)$ è la funzione indicatrice che restituisce 1 se la condizione tra parentesi è vera, restituisce 0 altrimenti.

3. Il pattern funzionale $\mathcal{P}$ è statisticamente significativo se e solo se $p_{\mathcal{P}} < 0.05$.

Con questi passi si identificano i pattern statisticamente significativi. Tra di essi l'attenzione è stata posta solo su pattern più rilevanti, ossia caratterizzati da una frequenza maggiore di una certa soglia. Si è, quindi, ricavata, in modo empirico, attraverso una serie di esperimenti, una soglia di minima di frequenza per i pattern funzionali sia per la larva che per l'adulta. Nella larva si sono considerati i pattern funzionali che si ripetono almeno 20 volte, mentre nell'adulta i pattern funzionali che si ripetono almeno 200 volte.

4.1.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale

Per agevolare l'interpretazione delle relazioni tra le aree coinvolte, la rappresentazione di un pattern funzionale segue le seguenti convenzioni:

- ogni area coinvolta nel pattern funzionale è rappresentata da un nodo, con uno specifico colore associato, come specificato nelle Figure 4.1 e 4.2;
- la core area è posizionata in basso, al centro dello schema;
- le aree parte del vicinato entrante $nbh_{in}(n_i)$ sono allineate a sinistra del nodo core;
- simmetricamente, le aree parte del vicinato uscente $nbh_{out}(n_i)$ sono allineate a destra del nodo core;
- eventuali aree che appartengono sia al vicinato entrante che uscente $(nbh_{in}(n_i) \cap nbh_{out}(n_i))$ sono rappresentate una sola volta, per evitare ridondanza nello schema, e sono posizionate sullo stesso asse verticale della core area;
- qualora la core area coincida con una delle aree di input o di output, queste vengono rappresentate separatamente per evidenziare la duplice funzione della core area.



Figura 4.1: Associazione cromatica per le aree funzionali nella larva di Drosophila



Figura 4.2: Associazione cromatica per le aree funzionali nella Drosophila adulta

Sotto ogni pattern sono specificate le seguenti informazioni:

- Il numero di occorrenze, ossia la frequenza, del pattern.
- Per ogni arco in entrata nell'area core o in uscita dall'area core, quindi per ogni coppia di aree connesse, il numero medio di connessioni di quel tipo, ricavato dalla somma del numero di archi tra neuroni distinti appartenenti alle aree coinvolte in ogni singola istanza del pattern, quindi il pattern di un singolo core neuron, sul numero totale di occorrenze del pattern.

Queste informazioni numeriche permettono di associare una maggiore o minore importanza ai pattern funzionali e alle connessioni in essi presenti.

Di seguito sono mostrati i pattern funzionali identificati nella larva di Drosophila e nella Drosophila adulta.

4.2 Analisi dei pattern funzionali nella larva di Drosophila

Nel connettoma della larva di Drosophila, ogni neurone è classificato in base al tipo di cellula ("cell type"). Utilizzando questa classificazione come etichetta per definire un'area funzionale, l'estrazione dei pattern ha portato a un numero limitato di pattern funzionali statisticamente significativi. Come mostrato in Figura 4.3, solo due pattern presentano un conteggio superiore alla soglia fissata, rappresentata dalla linea tratteggiata in rosso.

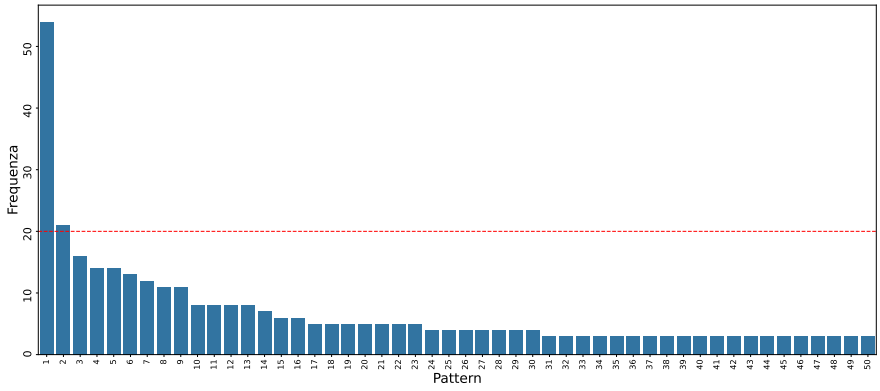


Figura 4.3: Frequenza dei pattern funzionali basati su "cell type" identificati nella larva di Drosophila

Per identificare un numero maggiore di pattern rilevanti, si è quindi deciso di aumentare il livello di astrazione, considerando come aree funzionali raggruppamenti di "cell type", come indicato nella Tabella 2.1. La Figura 4.4 mostra la frequenza dei pattern così ottenuti. Come si può osservare, in questo caso i pattern con frequenza superiore alla soglia sono molto più numerosi e la frequenza massima dei pattern è aumentata, passando da poco più di 50 a quasi 70.

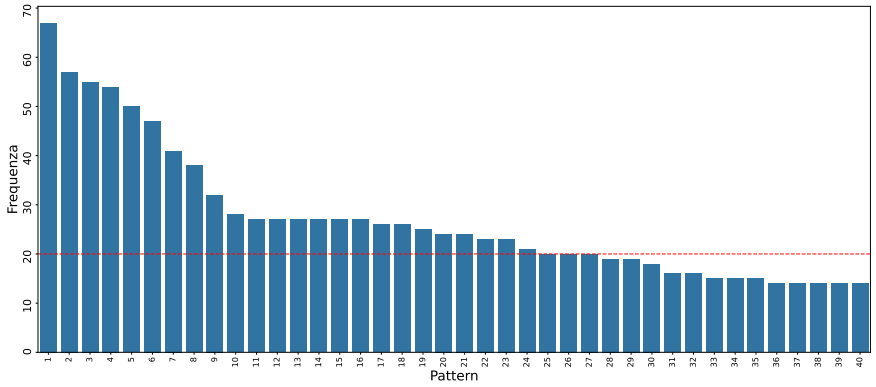


Figura 4.4: Frequenza dei pattern funzionali basati sull'astrazione di livello superiore di tipo di cellula identificati nella larva di Drosophila

In particolare, i pattern funzionali ottenuti, ordinati per frequenza decrescente, sono riportati nella Tabella 4.1. Per ogni pattern sono specificate le aree di input nella prima

colonna, la core area nella seconda colonna, le aree di output nella terza colonna e, infine, la frequenza del pattern nell'ultima colonna.

Input	*Core area*	*Output*	*Count*
deep brain, innate, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	67
brain outputs, deep brain, innate, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	57
sensory	sensory	brain outputs, innate, sensory	55
sensory	sensory	sensory	54
brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	deep brain	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	50
innate, learning/memory	learning/memory	deep brain, innate, learning/memory	47
brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	41
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	deep brain	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	38
brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	32
brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	innate	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	28
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	innate	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	27
brain outputs, sensory	sensory	brain outputs, innate, sensory	27
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	innate	deep brain, innate, learning/memory, pre-output	27
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	27
innate, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	27
ascending, brain outputs, deep brain, innate, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, pre-output	27
deep brain, innate, learning/memory	learning/memory	deep brain, innate, learning/memory	26
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	26
sensory	sensory	innate, sensory	25
deep brain, innate, pre-output	pre-output	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	24
innate, learning/memory	learning/memory	deep brain, innate, learning/memory, pre-output	24
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	learning/memory	brain outputs, deep brain, innate, learning/memory, pre-output	23
innate, learning/memory	learning/memory	innate, learning/memory	23
deep brain, innate, learning/memory, pre-output	learning/memory	deep brain, innate, learning/memory	21

Tabella 4.1: Pattern funzionali significativi presenti nel connettoma della larva di Drosophila

Nelle Figure 4.5-4.9 sono invece rappresentati graficamente i tre pattern funzionali con frequenza più elevata per ciascuna core area.

Una prima osservazione da fare è che le core area di questi pattern sono solo alcune delle aree funzionali presenti nella larva. Non esistono pattern rilevanti che vedano interessate nel ruolo di core area le aree "ascending" e "brain outputs". Inoltre, l'area "ascending" è, in generale, poco coinvolta in questi pattern; infatti, compare come area di input di un solo pattern e non compare mai negli altri. Tenuto conto del fatto che questa area è principalmente

associata alla trasmissione di informazioni sensoriali al corpo centrale del cervello e che una minima parte di neuroni appartengono ad essa (solo 46 su 2606 neuroni), la sua scarsa partecipazione ai pattern è giustificabile.

Si può notare che, nella maggioranza dei casi, l'intersezione tra le aree di input e output di un pattern contiene molteplici aree. Esistono, addirittura, pattern che hanno una totale coincidenza tra aree di input e di output, mostrando una perfetta simmetria. Ciò suggerisce un dinamismo interessante nel funzionamento del sistema neuronale. La presenza di più aree nell'intersezione tra aree di input e aree di output può indicare, infatti, la presenza di loop funzionali tali per cui il segnale proveniente da un'area di input, passando per la core area dove subisce specifiche elaborazioni, è restituito in output alla stessa area.

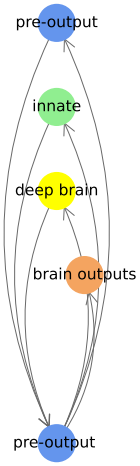
Questa osservazione si può estendere al caso in cui la core area è anche area di input e/o area di output evidenziando un flusso che coinvolge un'unica area. Infatti, come si vede dalle Figure 4.5-4.9, tutti i pattern più frequenti per ciascuna core area presentano archi in ingresso e in uscita provenienti da neuroni che appartengono alla core area stessa. Tra l'altro queste connessioni sono anche quelle che si caratterizzano per un maggiore valore medio e sono, quindi, preponderanti all'interno del pattern.

In questa considerazione è importante sottolineare che un'area funzionale all'interno di un pattern, sia essa di input o di output, rappresenta un'astrazione che aggrega al suo interno molteplici nodi. Di conseguenza, non è detto che questi loop coinvolgano necessariamente lo stesso neurone, ma piuttosto si riferiscono al concetto di area, che comprende più neuroni.

In un'analisi futura, potrebbe essere interessante indagare se dietro a questi loop tra aree funzionali esistano loop specifici che coinvolgano singoli neuroni. Se così fosse, questi neuroni, con le loro connessioni, potrebbero agire come meccanismi di feedback, contribuendo a una maggiore complessità nell'elaborazione degli stimoli ed a una maggiore adattabilità del sistema neuronale.

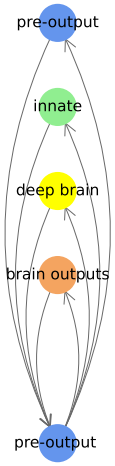
Sempre osservando le rappresentazioni grafiche dei pattern funzionali della larva, si nota che le strutture dei pattern più frequenti per ciascuna core area sono molto simili tra loro. Ad esempio, questo aspetto è facilmente osservabile nei pattern funzionali con core area "pre-output," mostrati in Figura 4.5. La differenza tra il primo e il secondo pattern è rappresentata solo dall'assenza dell'area "brain output" come area di input nel primo pattern, ossia dall'assenza di un arco che collega "brain output" alla core area "pre-output". Tuttavia, è importante notare che tale connessione ha un valore medio più basso rispetto alle altre connessioni presenti nel pattern e, di conseguenza, questi due schemi possono essere considerati sostanzialmente equivalenti. Analogamente, l'unica differenza tra i precedenti pattern e il terzo è la presenza, in quest'ultimo, dell'area "learning/memory", assente in entrambi gli altri pattern. Anche in questo caso, il numero medio di connessioni che interessano questa area è molto basso, per cui i pattern funzionali di "pre-output" sono in gran parte sovrapponibili. Le medesime considerazioni si possono fare considerando i pattern relativi alle altre core area.

Alcune somiglianze si notano anche tra le strutture di pattern con diverse core area. Questo è particolarmente vero per i pattern relativi alle core area "pre-output", "innate" e "deep brain". Infatti, il pattern più frequente per la core area "innate" (Figura 4.6), il pattern più frequente per la core area "deep brain" (Figura 4.7) e il pattern meno frequente per la core area "pre-output" (Figura 4.5) sono praticamente identici, chiaramente a meno della core area, in quanto aree di input e aree di output sono esattamente le stesse. Questa similarità strutturale tra pattern con core area diverse indica che le logiche di connessione sono conservate tra diverse aree funzionali. Solo i pattern dell'area funzionale "sensory" si differenziano maggiormente dagli altri pattern, ma sono, comunque, tra loro omogenei.



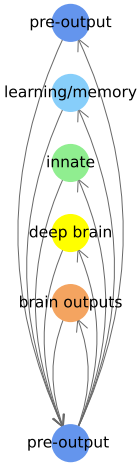
Pattern count : 67

Archi entranti:
('deep brain', 'pre-output'): 3.16
('innate', 'pre-output'): 8.4
('pre-output', 'pre-output'): 17.54
Archi uscenti :
('pre-output', 'brain outputs'): 5.57
('pre-output', 'deep brain'): 3.15
('pre-output', 'innate'): 5.01
('pre-output', 'pre-output'): 15.0



Pattern count : 57

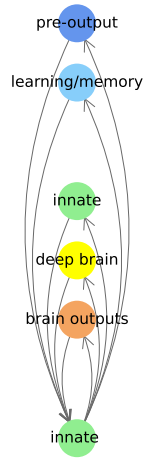
Archi entranti:
('brain outputs', 'pre-output'): 2.74
('deep brain', 'pre-output'): 3.14
('innate', 'pre-output'): 8.0
('pre-output', 'pre-output'): 16.23
Archi uscenti :
('pre-output', 'brain outputs'): 9.11
('pre-output', 'deep brain'): 3.54
('pre-output', 'innate'): 5.09
('pre-output', 'pre-output'): 15.58



Pattern count : 41

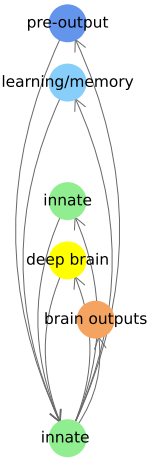
Archi entranti:
('brain outputs', 'pre-output'): 2.29
('deep brain', 'pre-output'): 10.22
('innate', 'pre-output'): 12.85
('learning/memory', 'pre-output'): 3.61
('pre-output', 'pre-output'): 20.88
Archi uscenti :
('pre-output', 'brain outputs'): 8.1
('pre-output', 'deep brain'): 12.8
('pre-output', 'innate'): 8.44
('pre-output', 'learning/memory'): 2.63
('pre-output', 'pre-output'): 20.37

Figura 4.5: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "pre-output" più frequenti nella larva di Drosophila



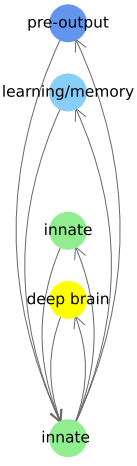
Pattern count : 28

Archi entranti:
('brain outputs', 'innate'): 1.54
('deep brain', 'innate'): 6.25
('innate', 'innate'): 31.25
('learning/memory', 'innate'): 2.79
('pre-output', 'innate'): 12.04
Archi uscenti :
('innate', 'brain outputs'): 4.04
('innate', 'deep brain'): 12.86
('innate', 'innate'): 18.71
('innate', 'learning/memory'): 4.21
('innate', 'pre-output'): 9.18



Pattern count : 27

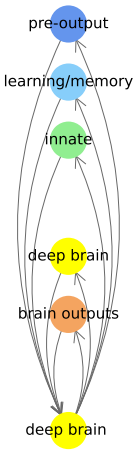
Archi entranti:
('deep brain', 'innate'): 7.59
('innate', 'innate'): 34.19
('learning/memory', 'innate'): 4.0
('pre-output', 'innate'): 8.04
Archi uscenti :
('innate', 'brain outputs'): 4.19
('innate', 'deep brain'): 13.89
('innate', 'innate'): 22.93
('innate', 'learning/memory'): 3.93
('innate', 'pre-output'): 10.52



Pattern count : 27

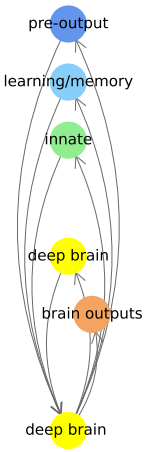
Archi entranti:
('deep brain', 'innate'): 8.44
('innate', 'innate'): 32.0
('learning/memory', 'innate'): 4.7
('pre-output', 'innate'): 5.85
Archi uscenti :
('innate', 'deep brain'): 19.89
('innate', 'innate'): 14.56
('innate', 'learning/memory'): 6.63
('innate', 'pre-output'): 3.37

Figura 4.6: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "innate" più frequenti nella larva di Drosophila



Pattern count : 50

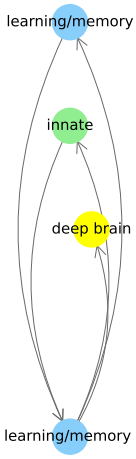
Archi entranti:
('brain outputs', 'deep brain'): 2.04
('deep brain', 'deep brain'): 21.2
('innate', 'deep brain'): 22.04
('learning/memory', 'deep brain'): 11.16
('pre-output', 'deep brain'): 17.98
Archi uscenti :
('deep brain', 'brain outputs'): 7.0
('deep brain', 'deep brain'): 19.8
('deep brain', 'innate'): 9.06
('deep brain', 'learning/memory'): 6.4
('deep brain', 'pre-output'): 14.52



Pattern count : 38

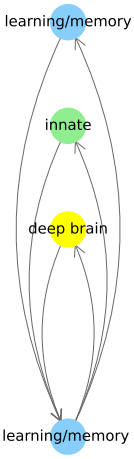
Archi entranti:
('deep brain', 'deep brain'): 18.84
('innate', 'deep brain'): 23.16
('learning/memory', 'deep brain'): 9.76
('pre-output', 'deep brain'): 11.11
Archi uscenti :
('deep brain', 'brain outputs'): 4.92
('deep brain', 'deep brain'): 17.21
('deep brain', 'innate'): 8.08
('deep brain', 'learning/memory'): 5.03
('deep brain', 'pre-output'): 12.47

Figura 4.7: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "deep brain" nella larva di Drosophila



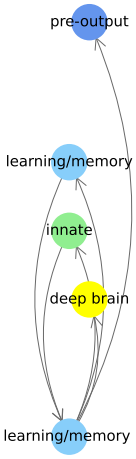
Pattern count : 47

Archi entranti:
('innate', 'learning/memory'): 6.96
('learning/memory', 'learning/memory'): 57.81
Archi uscenti :
('learning/memory', 'deep brain'): 2.85
('learning/memory', 'innate'): 2.81
('learning/memory', 'learning/memory'): 81.87



Pattern count : 26

Archi entranti:
('deep brain', 'learning/memory'): 1.46
('innate', 'learning/memory'): 7.31
('learning/memory', 'learning/memory'): 58.19
Archi uscenti :
('learning/memory', 'deep brain'): 4.15
('learning/memory', 'innate'): 2.35
('learning/memory', 'learning/memory'): 81.69



Pattern count : 24

Archi entranti:
('innate', 'learning/memory'): 5.92
('learning/memory', 'learning/memory'): 59.7
Archi uscenti :
('learning/memory', 'deep brain'): 5.21
('learning/memory', 'innate'): 5.67
('learning/memory', 'learning/memory'): 81.1
('learning/memory', 'pre-output'): 1.38

Figura 4.8: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "learning/memory" più frequenti nella larva di Drosophila

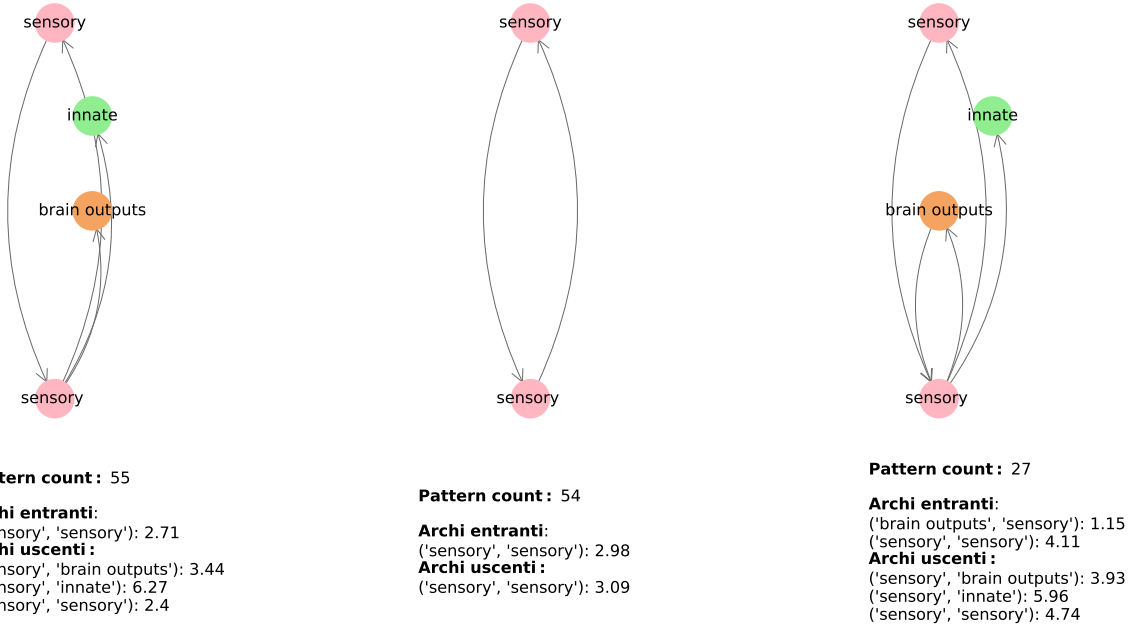


Figura 4.9: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "sensory" più frequenti nella larva di Drosophila

4.3 Analisi dei pattern funzionali nella Drosophila adulta

Nella Drosophila adulta, le aree funzionali corrispondono alle "superclassi" di appartenenza dei neuroni, riportate nella Tabella 2.2.

I pattern funzionali identificati in questo caso sono significativamente più numerosi rispetto a quelli riscontrati nella larva. Pertanto, per ragioni di spazio e per migliorare la comprensibilità del grafico, nella Figura 4.10 sono mostrati solo i pattern che superano la soglia stabilita di 200. Questi sono in totale 48.

Dall'osservazione di questo grafico, si evince che i pattern presentano una frequenza nettamente superiore a quella dei pattern nella larva; inoltre, i valori seguono una distribuzione di tipo power law con pochi pattern con una frequenza molto elevata, dell'ordine di 10^4, e la maggioranza dei pattern con una frequenza inferiore a 10^3.

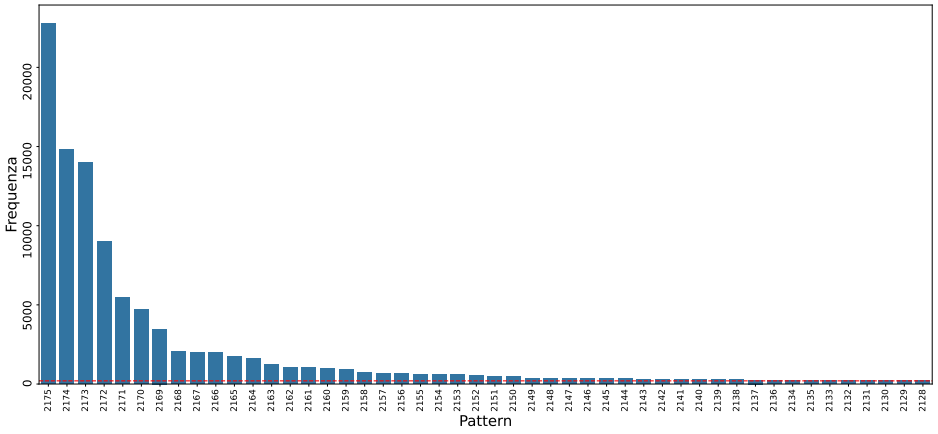


Figura 4.10: Frequenza dei pattern funzionali identificati nella Drosophila adulta

Nella Tabella 4.2 sono riportati i pattern funzionali rilevanti, ordinati per frequenza decrescente.

Input	*Core area*	*Output*	*Count*
optic	optic	optic, visual projection	22798
optic	optic	optic	14842
central	central	central	13966
optic, visual centrifugal	optic	optic, visual projection	8982
optic, visual centrifugal	optic	optic	5469
optic, visual centrifugal, visual projection	optic	optic, visual projection	4725
optic, sensory	optic	optic	3476
optic, visual projection	optic	optic, visual projection	2030
optic, visual centrifugal	optic	optic, visual centrifugal, visual projection	2019
central, visual projection	central	central	1973
central	sensory	central	1739
optic	optic	optic, visual centrifugal, visual projection	1590
optic, visual centrifugal, visual projection	optic	optic	1219
optic, sensory	optic	optic, visual projection	1044
central	central	central, descending	1021
ascending, central	central	central	1006
optic, visual centrifugal, visual projection	optic	optic, visual centrifugal, visual projection	901
ascending, central, visual projection	central	central, descending	720
central, visual projection	central	central, descending	684
ascending, central	central	central, descending	669
optic, visual projection	optic	optic	606
optic	sensory	optic	593
optic	optic	visual projection	575
optic, sensory, visual centrifugal	optic	optic, visual projection	515
ascending, central, visual projection	central	central	494
central, sensory	central	central	458
ascending, central, descending	central	central, descending	374
central, optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	central, optic, visual projection	368
ascending, central, visual projection	central	central, descending, visual centrifugal	366
optic, sensory, visual centrifugal	optic	optic	363
central, optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	central, descending, optic, visual projection	350
central, visual projection	central	central, descending, visual centrifugal	325
central, optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	central, visual projection	313
optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	optic	305
central, optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	central, descending, optic, visual projection	302
central, visual projection	central	central, visual centrifugal	298
central, visual projection	central	central, visual projection	284
ascending, central, descending, visual projection	central	central, descending	274
optic, sensory	optic	optic, sensory	253
optic, visual projection	visual projection	central, optic, visual projection	236
central, optic, visual projection	visual projection	central, visual projection	233
central	sensory	central, descending	233
central, optic, visual projection	visual projection	central, optic, visual projection	232
central, optic, visual centrifugal	visual projection	central, visual centrifugal	229
ascending, central, descending, visual projection	central	central, descending, visual centrifugal	222

central, optic, visual centrifugal, visual projection	visual projection	central, optic, visual centrifugal, visual projection	218
central, descending	central	central	213
central	central	central, descending, visual centrifugal	211

Tabella 4.2: Pattern funzionali significativi presenti nel connettoma della Drosophila adulta

Anche in questo caso, tra i pattern rilevanti non compaiono pattern che coinvolgono alcune delle aree come core area. Questo suggerisce che alcune aree funzionali non assumono mai tale ruolo all'interno di un pattern funzionale. Le aree coinvolte come core area in almeno un pattern sono "optic", "central", sensory" e "visual projection", mentre le aree "visual centrifugal", "descending", "ascending", "endocrine" e "motor" non ricoprono mai questo ruolo. Inoltre, le aree "endocrine" e "motor" non sono mai coinvolte nemmeno come area di input o output in alcun pattern. Ciò suggerisce che queste aree svolgono un ruolo marginale, o altamente specifico, nelle dinamiche neuronali osservate, non partecipando ai flussi principali di informazione all'interno dei pattern funzionali rilevati.

Nelle Figure 4.11-4.14 sono rappresentati i pattern funzionali con frequenza maggiore per ciascuna core area.

La prima osservazione che si può fare è che i pattern con stessa core area risultano omogenei quando si confrontano in modo isolato, singola core area per singola core area. Ad esempio, tra i pattern funzionali con core area "central," mostrati in Figura 4.11, esistono sottili differenze: il secondo pattern aggiunge rispetto al primo una connessione con l'area di input "visual projection" che ha, però, un peso più basso rispetto agli altri legami; analogamente, il terzo pattern aggiunge, rispetto al primo, una connessione con l'area di output "descending", la quale ha un valore medio più basso rispetto alle altre connessioni presenti nel pattern. Osservazioni simili si possono fare considerando i pattern relativi alle altre core area, eccezion fatta per la core area "sensory" che è coinvolta in pattern più diversificati e tra loro meno sovrapponibili.

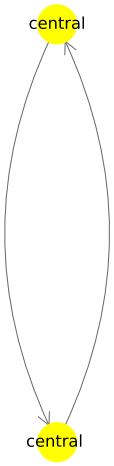
Tuttavia, al contrario di quanto si era osservato nella larva, i pattern appaiono piuttosto differenti tra loro quando si confrontano pattern funzionali con core area diverse. Infatti, le aree di input e di output sono piuttosto eterogenee quando si considerano pattern che hanno differente core area.

Come analogia tra la larva e l'adulta, si osserva che il numero medio di connessioni che coinvolgono la core area anche nel ruolo di area di input o di output è più alto rispetto a quello delle connessioni che coinvolgono aree diverse. In realtà, nel caso dell'adulta, questa tendenza è ancora più pronunciata; infatti, in quasi praticamente tutti i pattern, esistono dei loop che coinvolgono la core area sia nel ruolo di area di input che nel ruolo di area di output, indicando che, nella Drosophila adulta, come nella larva, la core area di un pattern gioca un ruolo fondamentale. Anche qui, però, i pattern con core area "sensory" non rispettano la regola; infatti, come si nota dalla Figura 4.13, i pattern ad essa relativi non si caratterizzano per la presenza di loop che vedono l'area sensoriale ricoprire sia la funzione di area di input che quella di area di output.

I pattern dell'adulta sono meno simmetrici di quelli della larva, ovvero una particolare area è presente solo come ingresso o solo come uscita in molti pattern.

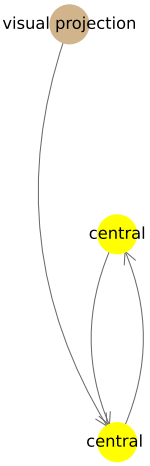
Inoltre, sempre confrontando questi pattern con quelli presenti nel connettoma della larva, emerge che i primi sono più semplici. Tra i pattern più frequenti, la maggior parte coinvolge al più una o due aree di input e una o due aree di output, con la core area che spesso coincide anche con un'area di input e/o di output.

L'unica eccezione vale per la core area "visual projection", che è coinvolta in pattern più ricchi, e quindi mostra una maggiore complessità nelle sue connessioni rispetto ai pattern relativi alle altre core area.



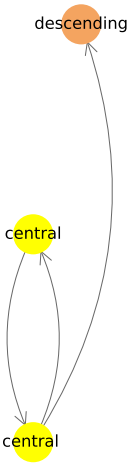
Pattern count : 13966

Archi entranti:
('central', 'central'): 16.46
Archi uscenti:
('central', 'central'): 14.72



Pattern count : 1973

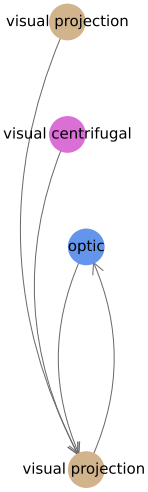
Archi entranti:
('central', 'central'): 18.6
('visual projection', 'central'): 5.28
Archi uscenti:
('central', 'central'): 19.3



Pattern count : 1021

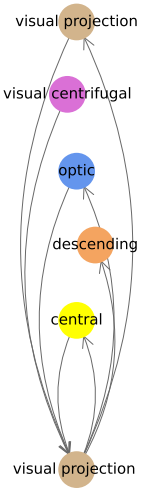
Archi entranti:
('central', 'central'): 23.02
Archi uscenti:
('central', 'central'): 21.29
('central', 'descending'): 2.32

Figura 4.11: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "central" più frequenti nella Drosophila adulta



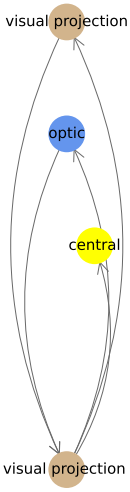
Pattern count : 305

Archi entranti:
('optic', 'visual projection'): 60.3
('visual centrifugal', 'visual projection'): 2.09
('visual projection', 'visual projection'): 3.2
Archi uscenti:
('visual projection', 'optic'): 16.78



Pattern count : 302

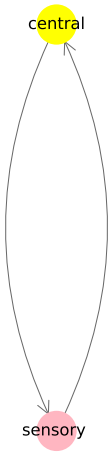
Archi entranti:
('central', 'visual projection'): 3.25
('optic', 'visual projection'): 64.9
('visual centrifugal', 'visual projection'): 3.0
('visual projection', 'visual projection'): 3.5
Archi uscenti:
('visual projection', 'central'): 13.23
('visual projection', 'descending'): 2.76
('visual projection', 'optic'): 4.03
('visual projection', 'visual projection'): 5.82



Pattern count : 236

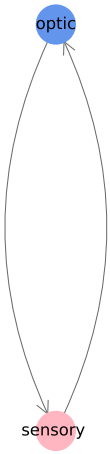
Archi entranti:
('optic', 'visual projection'): 27.06
('visual projection', 'visual projection'): 4.41
Archi uscenti:
('visual projection', 'central'): 2.95
('visual projection', 'optic'): 5.43
('visual projection', 'visual projection'): 9.78

Figura 4.12: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "visual projection" più frequenti nella Drosophila adulta



Pattern count : 1739

Archi entranti:
('central', 'sensory'): 4.15
Archi uscenti:
('sensory', 'central'): 8.55



Pattern count : 593

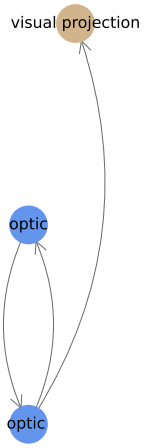
Archi entranti:
('optic', 'sensory'): 1.09
Archi uscenti:
('sensory', 'optic'): 2.47



Pattern count : 233

Archi entranti:
('central', 'sensory'): 5.53
Archi uscenti:
('sensory', 'central'): 13.27
('sensory', 'descending'): 2.69

Figura 4.13: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "sensory" più frequenti nella Drosophila adulta



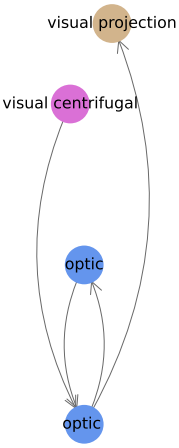
Pattern count : 22798

Archi entranti:
('optic', 'optic'): 9.49
Archi uscenti:
('optic', 'optic'): 9.8
('optic', 'visual projection'): 3.67



Pattern count : 14842

Archi entranti:
('optic', 'optic'): 6.78
Archi uscenti:
('optic', 'optic'): 12.79



Pattern count : 8982

Archi entranti:
('optic', 'optic'): 16.22
('visual centrifugal', 'optic'): 1.45
Archi uscenti:
('optic', 'optic'): 16.67
('optic', 'visual projection'): 4.75

Figura 4.14: Rappresentazione grafica dei pattern funzionali con core area "optic" più frequenti nella Drosophila adulta

In tali pattern, si osserva, infatti, una varietà più ampia di aree in input e in output. Questo suggerisce che "visual projection" svolga un ruolo più articolato nell'elaborazione e

nell'integrazione delle informazioni visive, probabilmente fungendo da hub per la trasmissione di segnali verso altre aree. Non stupisce, inoltre, che in tutti questi pattern siano sempre presenti l'area "optic" e, praticamente quasi sempre, l'area "visual centrifugal", poiché queste aree sono strettamente legate alla funzione visiva e al controllo dei segnali visivi in uscita. La stretta connessione tra "visual projection," "optic," e "visual centrifugal" suggerisce un circuito funzionale che elabora le informazioni visive in modo efficiente. In aggiunta, alcuni pattern suggeriscono che l'area "visual projection" agisca come mediatore tra le aree "optic" e "central".

In generale, il confronto tra i pattern funzionali del connettoma della larva e quelli dell'adulta suggerisce che, con la maturazione dell'organismo, si assista a una semplificazione dei pattern funzionali per alcune aree, ma anche a una specializzazione e complessità crescente per altre, come appunto l'area "visual projection". Queste osservazioni aprono interessanti possibilità di ricerca futura per comprendere meglio come l'evoluzione del connettoma sia legata all'acquisizione di nuove capacità cognitive e comportamentali.

CAPITOLO 5

Estrazione di motif complessi

In questo capitolo sono esaminati diversi approcci per estendere i motif di base, ovvero i pattern funzionali, con l'obiettivo di individuare e definire motif complessi. Verranno discussi tre principali metodi di estensione, evidenziando per ciascuno le strategie adottate e i risultati ottenuti, con l'intento di valutare la loro efficacia e applicabilità.

5.1 Dai motif di base a motif complessi

Lo studio dei motif può essere ampliato per approfondire l'analisi delle connessioni tra i neuroni e scoprire l'esistenza di strutture più complesse rispetto a quelle finora individuate. L'obiettivo è estendere l'analisi dei pattern funzionali individuati nel connettoma della Drosophila, al fine di scoprire strutture neurali più articolate e rilevanti per la comprensione delle dinamiche cerebrali.

Questa esigenza è motivata dal fatto che, come evidenziato nel capitolo precedente, esiste una forte similarità tra molti dei pattern funzionali estratti. È, quindi, ragionevole ipotizzare che tali pattern possano essere combinati tra loro per formare nuove strutture. Sfruttando tali caratteristiche comuni si è cercato di collegare tra loro i pattern funzionali, ottenendo così dei motif di complessità crescente.

Invece di limitarsi ad un solo approccio, si è deciso di sperimentare diverse modalità di estensione dei pattern funzionali, ciascuna basata su criteri distinti.

Questi approcci e gli algoritmi implementati sono adatti per estendere sia i pattern funzionali della larva di Drosophila che quelli della Drosophila adulta. Tuttavia, a causa dell'elevato costo computazionale associato all'applicazione di tali algoritmi di estensione sul connettoma dell'adulta, questa parte del lavoro si è focalizzata esclusivamente sul connettoma della larva. In futuro, si prevede di ottimizzare gli algoritmi e di dedicare maggiori risorse allo scopo, così da poter estendere questa analisi anche al connettoma della Drosophila adulta e poter confrontare i risultati ottenuti nell'uno e nell'altro caso.

5.2 Estensione lineare dei pattern funzionali

La prima modalità di estensione dei pattern funzionali, la più semplice, consiste nel combinarli in modo lineare, creando una catena di pattern funzionali di lunghezza crescente.

Questa catena inizia dalla combinazione di un'istanza di un pattern funzionale di base con una seconda istanza, ottenendo, così, una catena costituita da due pattern, o più semplicemente una coppia di pattern. Successivamente, a questa coppia si aggiunge in coda un'ulteriore istanza di un pattern funzionale di base, generando una tripla di pattern. Continuando in questo modo, è possibile prolungare indefinitamente la catena lineare.

Tuttavia, è prevedibile che, dopo una fase iniziale di incremento del numero di pattern ottenuti, si verifichi una tendenza alla diminuzione, portando alla naturale terminazione del processo di estensione. Questo è esattamente ciò che si è osservato. Tale fenomeno suggerisce che, con l'incremento della lunghezza, le catene tendono a diventare progressivamente più specifiche, quindi, meno facilmente combinabili con nuove istanze di pattern, riflettendo, così, la complessità intrinseca dei pattern stessi.

5.2.1 Processo di estensione lineare

Per stabilire come i pattern funzionali di base possono essere combinati tra loro, si definiscono le condizioni fondamentali su cui si basa il processo di estensione lineare. Data una catena di lunghezza $n-1$, con $n > 1$, è possibile combinare la catena finora costruita con un'istanza di un pattern di base se e solo se sono soddisfatte le seguenti condizioni:

1. "*Sovrapposizione delle aree*": l'insieme delle aree di output della catena coincide con l'insieme delle aree di input dell'istanza del pattern candidata per l'estensione. In altre parole, questi insiemi devono sovrapporsi perfettamente, definendo un insieme di aree comuni che fungeranno da punto di aggancio.

2. "*Nodi di collegamento*": per ciascuna area comune deve esistere almeno un nodo che sia contemporaneamente nodo di output della catena e nodo di input dell'istanza del pattern candidata per l'estensione. Questa condizione garantisce che ci sia una connessione diretta tra la catena e il pattern, permettendo effettivamente la loro integrazione.

Se le due condizioni sono entrambe soddisfatte, allora si estende la catena di pattern funzionali di lunghezza $n-1$ attraverso la combinazione dell'istanza candidata, e il risultato è una catena di lunghezza n. Questa catena risultante mantiene alcune caratteristiche della catena originale e ne integra di nuove, derivanti dal componente appena aggiunta. Man mano che la catena cresce, si osserva che la sua parte iniziale (o "testa") della catena rimane invariata. Ciò significa che l'insieme delle aree di input, le core area e le aree comuni tra le istanze di pattern già aggiunte rimangono tali e quali. Al contrario, la parte finale (o "coda") della catena evolve con l'aggiunta di un nuovo insieme di aree comuni, una nuova core area e un nuovo insieme di aree di output. In particolare, la catena risultante presenta le seguenti caratteristiche:

- *Aree di input*: l'insieme delle aree di input rimane invariato e coincide con l'insieme delle aree di input dell'istanza del pattern di base da cui ha origine la catena.

- *Core area*: la catena include $n-1$ core area invariate, derivate dai pattern combinati nei passaggi precedenti, più una nuova core area, che è l'area di appartenenza del core node dell'istanza di pattern appena aggiunta.

- *Aree comuni*: si determinano $n-1$ insiemi di aree comuni, ciascuno dei quali deriva dalla combinazione del pattern i-esimo con il pattern $(i+1)$-esimo, con i che va da 1 a $n-1$; ogni insieme di aree comuni è il risultato della sovrapposizione tra l'output di un pattern e l'input del pattern successivo. A queste aree comuni appartengono tutti e soli i nodi comuni tra le due istanze di pattern successive, per la condizione "*Nodi di collegamento*" che, come già detto, stabilisce che, per ciascuna area comune, esista almeno un nodo

che sia contemporaneamente nodo di output del pattern i-esimo e nodo di input del pattern successivo, garantendo, così, una connessione diretta tra i vari pattern.

- *Aree di output*: l'insieme delle aree di output della catena coincide con l'insieme delle aree di output dell'istanza del pattern funzionale appena aggiunta.

Questa dinamica di combinazione consente alla catena di evolversi in modo strutturato, secondo una logica iterativa.

Tuttavia, se non venissero imposti ulteriori vincoli, l'algoritmo potrebbe incorrere in catene di lunghezza indefinita a causa della possibilità di cicli. Questo potrebbe verificarsi perché stesse istanze di pattern potrebbero essere aggiunte ripetutamente alla catena, generando, così, un pattern che segue sempre lo stesso percorso, coinvolgendo sempre gli stessi nodi, senza progredire realmente, ma limitandosi a ripetersi ciclicamente. Ciò è chiaramente indesiderabile. Pertanto, sono stati introdotti due ulteriori vincoli che devono essere soddisfatti durante la costruzione per consentire a un'istanza di un pattern di base di contribuire alla crescita della catena:

1. Il core node dell'istanza di un pattern funzionale candidata per l'estensione della catena deve essere diverso dai core node già presenti nella stessa.
2. I core node già presenti nella catena non devono appartenere né all'insieme dei nodi di input né all'insieme dei nodi di output dell'istanza candidata per l'estensione.

Il primo vincolo impedisce che una catena sia costituita dalle stesse istanze di pattern di base che si ripetono, poiché ogni nodo è core node di una e una sola istanza di un pattern funzionale.

Il secondo vincolo, pur non essendo strettamente necessario per evitare cicli, limita ulteriormente le possibilità di estensione, richiedendo che un certo core node non compaia all'interno della catena più volte, non solo nel ruolo di core node, ma anche come nodo di output o come nodo comune tra due pattern successivi che si combinano per formare la catena. Questa limitazione è stata imposta perché il pattern funzionale di un nodo include già tutte le connessioni che lo interessano; pertanto, se un nodo è già presente nella catena come core node, tutti i suoi legami sono già considerati e non è desiderabile ripeterli.

È importante ricordare che, quando si fa riferimento ad istanze di pattern funzionali, si parla di specifici pattern che coinvolgono specifici neuroni. Ciò significa che, analogamente ai pattern funzionali di base, diverse combinazioni di istanze di pattern funzionali possono dare origine alla stessa catena di pattern, rappresentando, quindi, la medesima struttura. Tali combinazioni sono, quindi, aggregate nella medesima catena di lunghezza n che identificano, la cui frequenza viene calcolata come il numero di diverse combinazioni di n istanze di pattern funzionali da cui quella specifica catena può essere derivata. La frequenza così ottenuta è utilizzata per selezionare le catene di pattern più rilevanti. In particolare, come per i pattern funzionali, sono state definite soglie, stabilite in modo empirico, per selezionare solo le catene che superano una frequenza minima. Questo approccio permette di individuare le catene più significative, permettendo di focalizzarsi su quelle che si manifestano con maggiore frequenza, quindi, presumibilmente, più rilevanti.

Le catene così ottenute costituiscono il punto di partenza per l'iterazione successiva del processo di estensione. Tuttavia, non tutte queste catene potranno essere ulteriormente estese. A partire dalle catene di lunghezza n, è possibile identificare quali catene di lunghezza $n-1$ sono *massimali*, ovvero non possono essere estese oltre. Una catena è considerata massimale quando non esiste nessuna istanza di un pattern funzionale che possa essere combinata con essa senza violare i vincoli imposti. Queste catene massimali rappresentano, quindi, strutture complete, che non possono essere estese in alcun modo.

5.2.2 Descrizione di una catena lineare di pattern funzionali

Una catena lineare di pattern funzionali di lunghezza n è definita da un pattern complesso costruito nel seguente modo:

Aree di input || **Core area 1** || Aree comuni tra il primo e il secondo pattern || **Core area 2** || Aree comuni tra il secondo e il terzo pattern || ... || Aree comuni tra il *(n-1)*-esimo e il *n*-esimo pattern || **Core area *n*** || Aree di output

Le core area sono evidenziate in grassetto per distinguerle dalle altre componenti della catena. Ogni core area rappresenta l'area di appartenenza dei core node delle istanze di pattern funzionali che compongono la catena, mentre le aree comuni rappresentano le intersezioni che legano pattern successivi tra loro.

Ad esempio, per una catena di lunghezza $n = 3$, il suo pattern sarebbe:

innate learning/memory || **learning/memory** || innate sensory || **learning/memory** || deep brain innate pre-output || **deep brain** || brain outputs innate

In generale, per una catena di lunghezza n, la struttura segue una forma ripetitiva che si articola nell'alternanza di core area e aree comuni, con le aree di input che originano la catena e le aree di output che la concludono.

5.2.3 Rappresentazione grafica di una catena lineare di pattern funzionali

La rappresentazione di una catena segue regole specifiche, pensate per facilitare la comprensione e l'interpretazione della stessa. Alcune di queste regole sono le medesime definite per la rappresentazione dei pattern funzionali.

Ogni area coinvolta nella catena è rappresentata da un nodo; ciascuna area ha associato uno specifico colore, come illustrato nella Figura 4.1. Procedendo da sinistra verso destra, la rappresentazione si articola nel seguente modo:

- L'origine della catena è data dalle *aree di input* del primo pattern incluso nella catena. Queste sono allineate verticalmente e connesse da archi uscenti alla core area 1.
- Segue la *core area 1*, ossia la core area del primo pattern funzionale nella catena.
- Le aree appartenenti al vicinato uscente $nbh_{out}(n_1)$ del primo pattern e quelle appartenenti al vicinato entrante $nbh_{in}(n_2)$ del secondo pattern coincidono per la condizione di "*Sovrapposizione delle aree*". Queste definiscono l'insieme delle *aree comuni* tra i due pattern successivi e sono rappresentate una sola volta, allineate sullo stesso asse verticale e collegate alla core area 1 da archi entranti e alla core area 2 da archi uscenti.
- Segue la *core area 2*, ossia la core area del secondo pattern funzionale nella catena.
- Lo schema continua, seguendo la stessa logica di rappresentazione.
- La rappresentazione si conclude con la specifica delle *aree di output*, ossia le aree parte del vicinato uscente $nbh_{out}(n_n)$ dell'ultimo pattern incluso nella catena, che sono connesse da archi entranti alla *core area n*.

In maniera sintetica, in una catena di lunghezza n, le aree più a sinistra rappresentano le aree di input della catena e le aree più a destra rappresentano le aree di output della catena; nel mezzo, i nodi in posizione pari corrispondono alle core area di ciascun pattern di base incluso nella catena, mentre gli insiemi di nodi in posizione dispari rappresentano le aree comuni tra pattern funzionali in posizioni successive, che si sono uniti tra loro.

Sotto ogni rappresentazione sono specificati il numero di occorrenze, ossia la frequenza, e il pattern descrittore della catena.

5.2.4 I risultati del processo di estensione lineare

Il processo di estensione lineare inizia combinando due istanze di pattern funzionali di base, generando una prima catena di lunghezza $n=2$, denominata anche *coppia di pattern funzionali*. Per formare queste coppie, si sono individuate combinazioni di due istanze di pattern funzionali che soddisfacessero i vincoli imposti. A partire dalle 823 istanze di pattern funzionali di base, si sono ottenute 1,389 istanze di coppie di pattern funzionali.

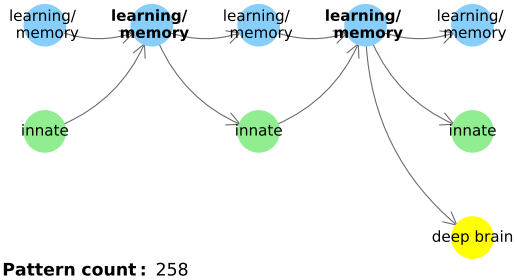
Aggregando le istanze di coppie che descrivono lo stesso pattern risultante in un'unica struttura, si sono determinate le coppie di pattern funzionali distinte e la frequenza di ciascuna di esse è stata calcolata come il numero di coppie di istanze di pattern funzionali da cui quella specifica coppia può essere derivata.

La frequenza così ottenuta è utilizzata per selezionare le coppie di pattern più rilevanti, in modo da concentrarsi sulle coppie che si manifestano maggiormente. In questo caso, la soglia di frequenza minima è stata fissata a 17, corrispondente al terzo quartile. Le coppie con una frequenza superiore alla soglia, in numero pari a 18, sono elencate nella Tabella 5.1 e la rappresentazione delle sei coppie di pattern funzionali più frequenti è mostrata in Figura 5.1.

Pattern	*Count*
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	258
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	198
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	119
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	117
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory	111
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	80
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	31
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	29
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	26
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	24
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	22
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	22
deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	21
innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	21
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	19
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output || **pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output	17

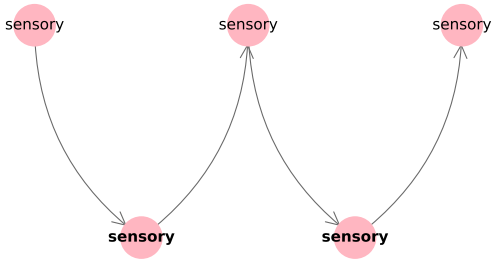
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	17
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	17

Tabella 5.1: Coppie di pattern funzionali significative



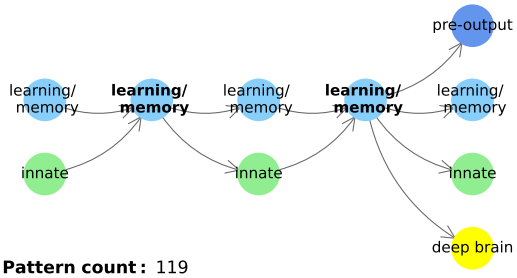
Pattern count : 258

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory



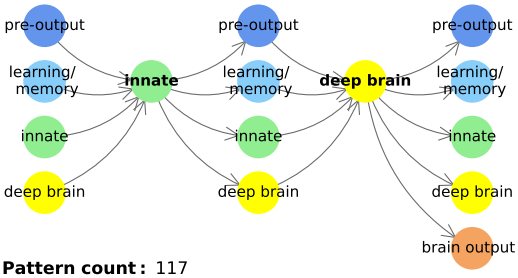
Pattern count : 198

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory



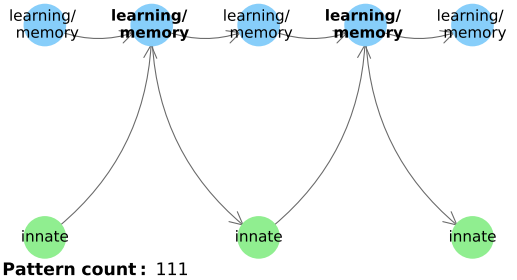
Pattern count : 119

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output



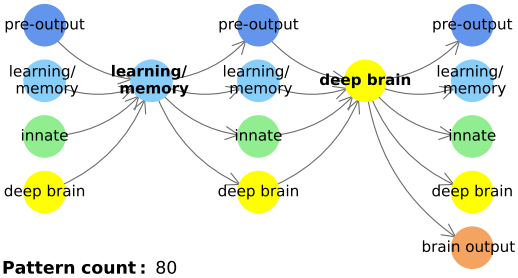
Pattern count : 117

Pattern : deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output



Pattern count : 111

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory



Pattern count : 80

Pattern : deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output

Figura 5.1: Rappresentazione grafica di alcune coppie di pattern funzionali

Proseguendo con il processo di estensione, sono stati applicati gli stessi passi per combinare ciascuna istanza di catena di lunghezza $n=2$ con un'istanza di pattern funzionale, al fine di generare catene di lunghezza $n=3$, più semplicemente dette *triple di pattern funzionali*.

In totale, si sono ottenute 1,988 istanze di triple di pattern funzionali, identificanti, a valle dell'aggregazione di istanze che descrivono lo stesso pattern risultante, 39 triple distinte. La soglia di frequenza minima è stata fissata a 15, corrispondente al terzo quartile. Questa soglia è stata superata da 16 triple di pattern funzionali, elencate nella Tabella 5.2. La rappresentazione delle sei triple di pattern funzionali più frequenti è mostrata in Figura 5.2.

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	564
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	470
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	219
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory	153
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	104
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	72
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	72
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	55
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output	41
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	28
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || brain outputs innate sensory	25
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	22
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	21
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	16
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	16
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	15

Tabella 5.2: Triple di pattern funzionali significative

Individuando combinazioni di istanze di catene di lunghezza n=3 con ulteriori istanze di pattern funzionali, è stato possibile generare catene di lunghezza n=4, denominate *quadruple di pattern funzionali*. Complessivamente, sono state ottenute 3,572 istanze di quadruple, che corrispondono a 31 quadruple distinte. Si sono selezionate le catene di lunghezza n=4 con

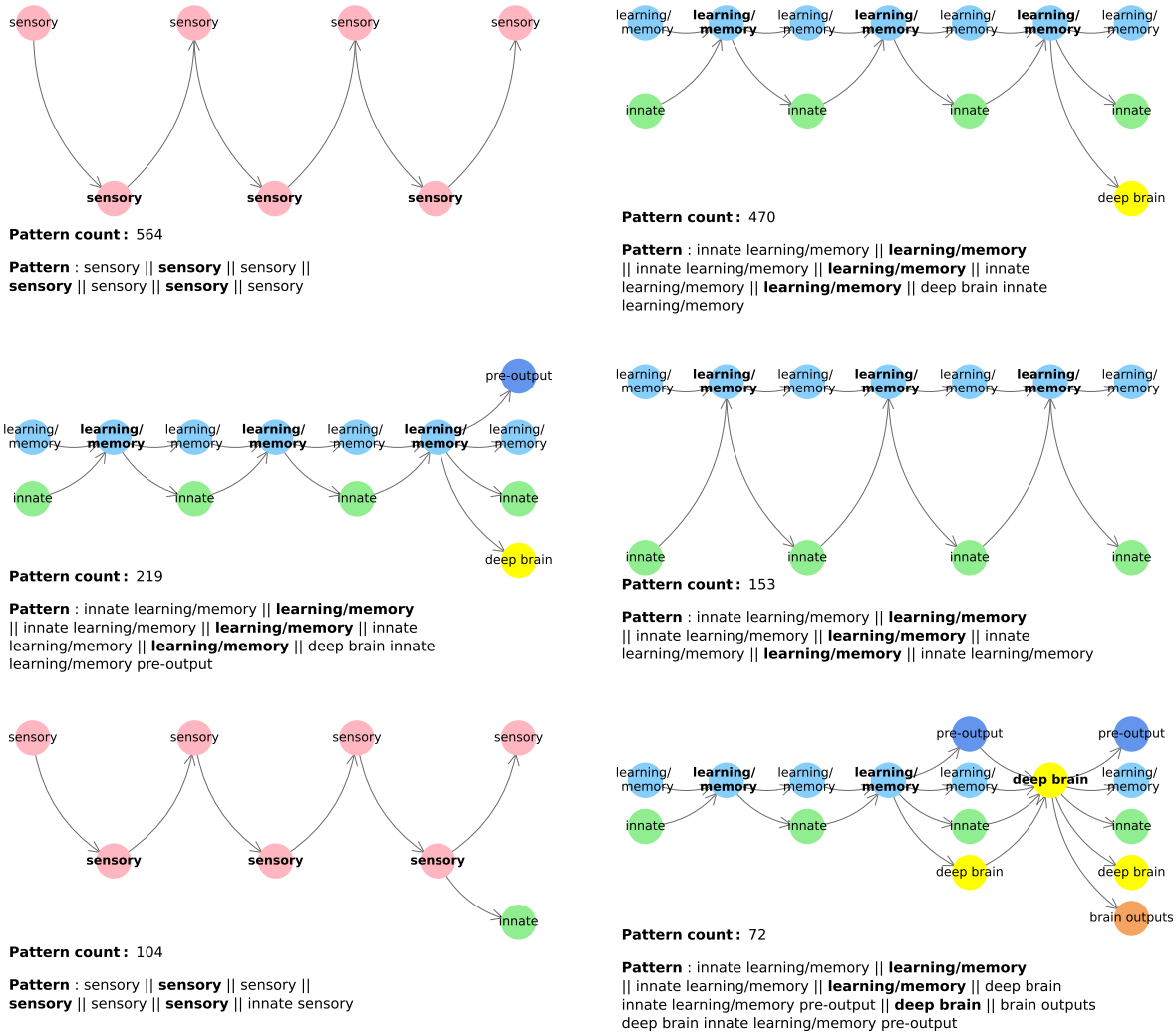


Figura 5.2: Rappresentazione grafica di alcune triple di pattern funzionali

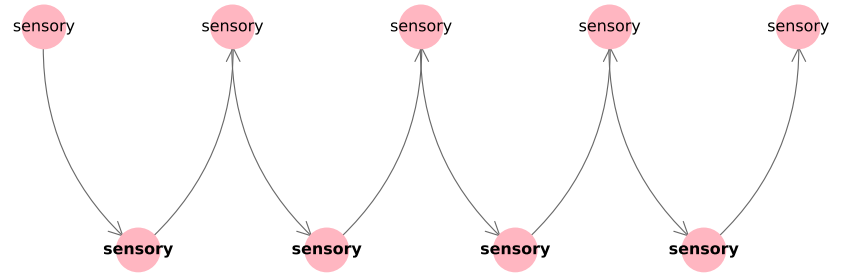
frequenza pari o superiore a 34, valore corrispondente alla mediana delle frequenze delle quadruple ottenute. Le 17 quadruple di pattern funzionali che superano la soglia di frequenza sono elencate nella Tabella 5.3 e le tre quadruple con la frequenza più alta sono illustrate nella Figura 5.3.

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	1270
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	467
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	298
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	249
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	206

innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	159
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	145
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory	131
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	116
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output	102
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || brain outputs innate sensory	72
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	43
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	39
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	39
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	38
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	34
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	34

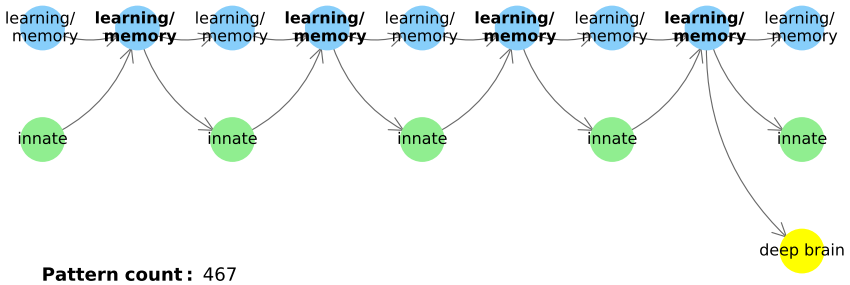
Tabella 5.3: Quadruple di pattern funzionali significative

Per il passaggio successivo, il processo di estensione ha cercato di combinare le quadruple di pattern funzionali con ulteriori istanze di pattern funzionali per ottenere catene di lunghezza n=5, ovvero *quintuple di pattern funzionali*. Questo passaggio ha generato un totale di 5,564 istanze di quintuple, le quali corrispondono a 31 quintuple distinte. Per selezionare le catene più rilevanti, è stata fissata una soglia di frequenza minima pari a 51, valore coincidente con la mediana delle frequenze osservate. Tra tutte, 15 quintuple di pattern funzionali hanno superato tale soglia e sono quindi considerate significative per il proseguimento del processo di estensione, che continuerà con l'obiettivo di ottenere catene di lunghezza n=6, ossia *sestuple di pattern funzionali*. Nella Tabella 5.4 sono elencate tali quintuple di pattern funzionali, mentre le tre più frequenti sono illustrate nella Figura 5.4.



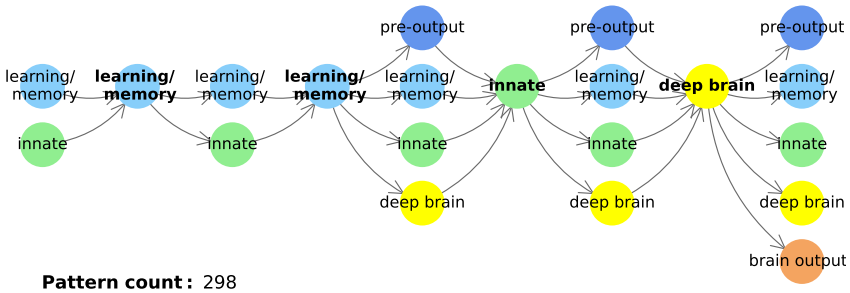
Pattern count : 1270

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory



Pattern count : 467

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory



Pattern count : 298

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output

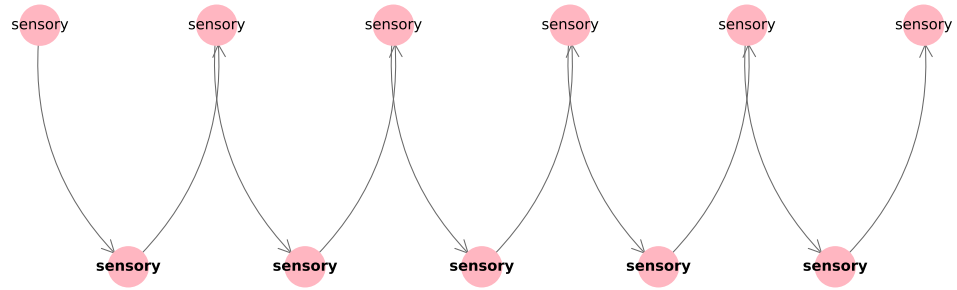
Figura 5.3: Rappresentazione grafica di alcune quadruple di pattern funzionali

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	2321
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	754
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	525

innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	333
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	200
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || brain outputs innate sensory	173
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	162
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output	130
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory	112
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	91
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	90
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	90
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	80
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	75
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	60
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output	51

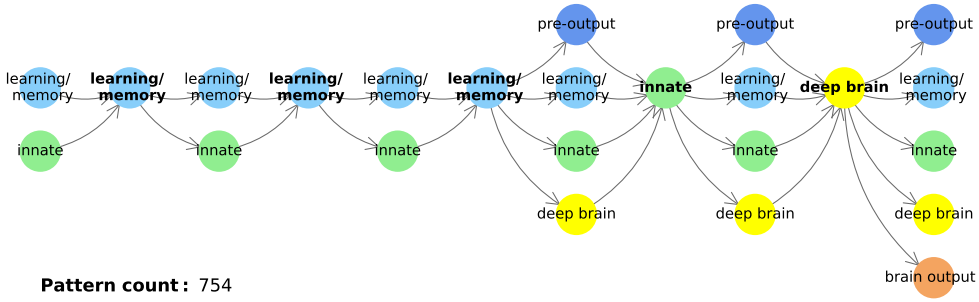
Tabella 5.4: Quintuple di pattern funzionali significative

Le istanze di sestuple di pattern funzionali ottenute sono in totale 5,891. Esse definiscono 28 sestuple distinte. Questo numero è inferiore rispetto a quanto ottenuto nelle iterazioni precedenti, segnando, così, l'inizio di una tendenza alla diminuzione, già anticipata in apertura di sezione. Solo 14 catene di lunghezza n=6 hanno superato la soglia di frequenza minima fissata a 39, che, anche in questo caso, è dettata dal valore mediano delle frequenze osservata.



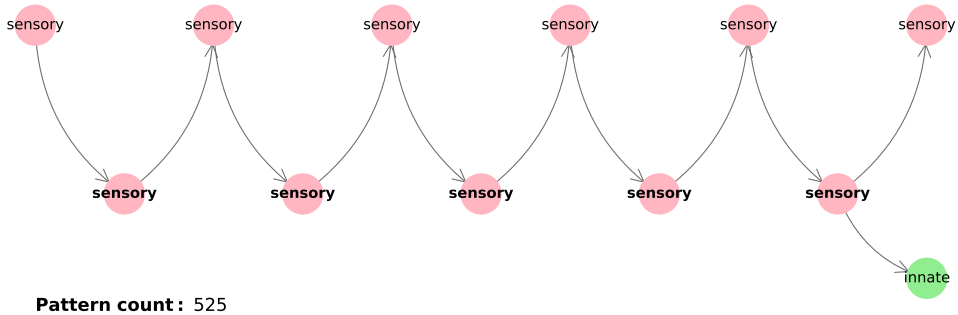
Pattern count : 2321

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory



Pattern count : 754

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output



Pattern count : 525

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory

Figura 5.4: Rappresentazione grafica di alcune quintuple di pattern funzionali

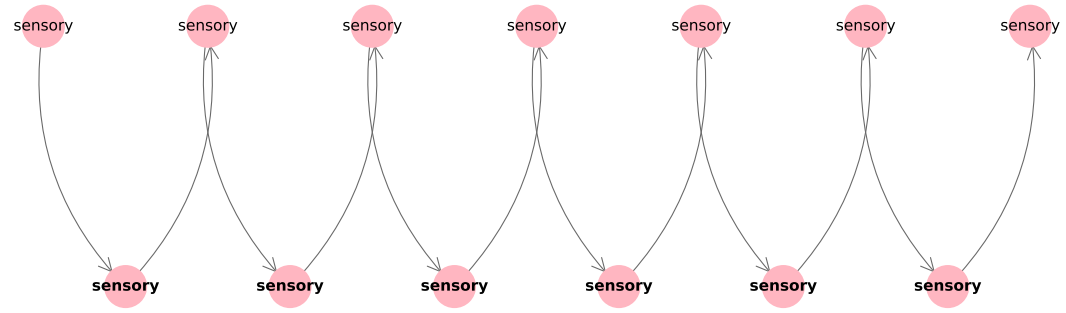
Tali catene sono riportate nella Tabella 5.5 e la rappresentazione delle tre catene più frequenti è mostrata in Figura 5.5.

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	3164
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	917

innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	377
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || brain outputs innate sensory	276
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	214
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	192
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	104
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	102
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	78
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	45
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	45
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory	43
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	41
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	39

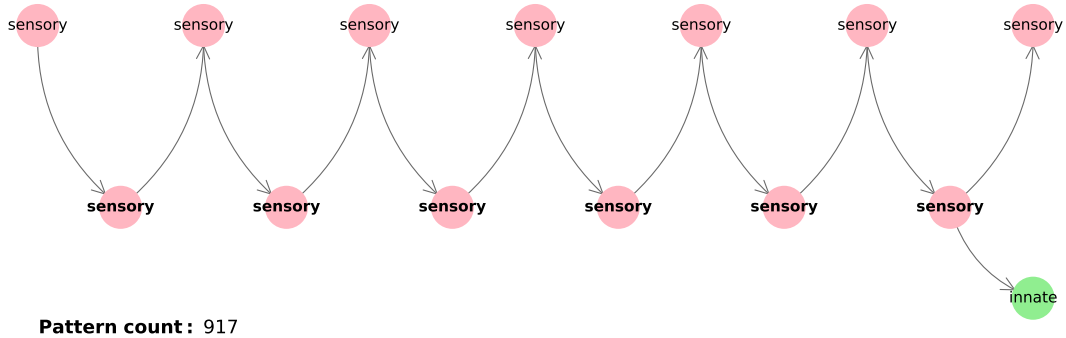
Tabella 5.5: Sestuple di pattern funzionali significative

Continuando il processo di estensione, sono state esaminate le catene di lunghezza $n=6$.



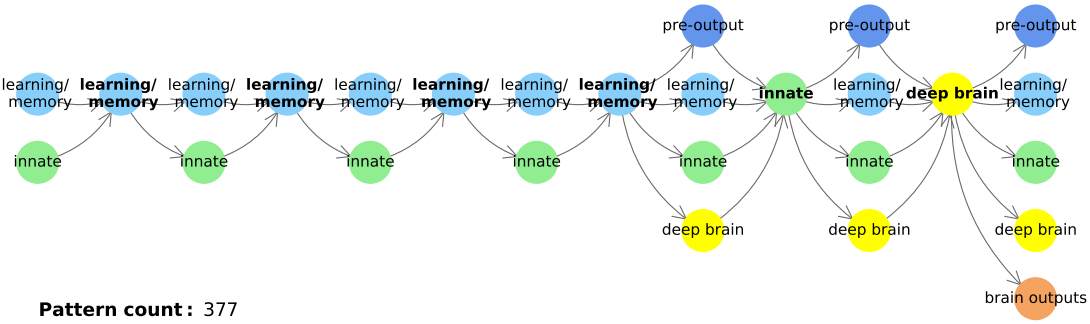
Pattern count : 3164

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory



Pattern count : 917

Pattern : sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory



Pattern count : 377

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output

Figura 5.5: Rappresentazione grafica di alcune sestuple di pattern funzionali

Si è cercato di combinare tali catene con istanze di pattern funzionali per generare catene di lunghezza n=7, denominate *settuple di pattern funzionali*. Questo passaggio ha portato alla creazione di un totale di 5,197 istanze di settuple, che identificano 13 settuple distinte. Per selezionare le combinazioni più significative, è stata fissata una soglia di frequenza minima pari a 72, corrispondente alla mediana delle frequenze osservate. Delle 13 sestuple distinte generate, 7 hanno superato questa soglia e sono, quindi, considerate rilevanti nell'analisi. Queste sestuple di pattern funzionali sono dettagliate nella Tabella 5.6, e, anche in questo caso, le tre più frequenti sono rappresentate nella Figura 5.6.

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory	3157
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || innate sensory	1185
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || brain outputs innate sensory	329
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	102
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output	96
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	82
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory	72

Tabella 5.6: Settuple di pattern funzionali significative

Per concludere il processo di estensione, è stata intrapresa un'ultima fase di combinazione, questa volta tra le istanze di settuple e le istanze di pattern funzionali, con l'obiettivo di generare catene di lunghezza n=8, note come *ottuple di pattern funzionali*. Si sono ottenute un totale di 3,944 istanze, corrispondenti a 6 ottuple distinte. La soglia di frequenza minima fissata a 169, valore corrispondente alla mediana delle frequenze, ha decretato la significatività di sole 3 catene di lunghezza n=8, le quali sono descritte nella Tabella 5.7 e rappresentate in Figura 5.7.

Pattern	*Count*
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory**|| sensory	2445
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory**|| innate sensory	1105
sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory** || sensory || **sensory**|| brain outputs innate sensory	286

Tabella 5.7: Ottuple di pattern funzionali significative

Si è deciso di interrompere qui il processo di estensione lineare dal momento che le ottuple che rappresenterebbero i punti di partenza per la successiva iterazione sono solo tre. Tra l'altro, queste catene sono tra loro molto simili, in quanto si distinguono solo per le aree di output, mentre sono uguali per tutti gli elementi precedenti.

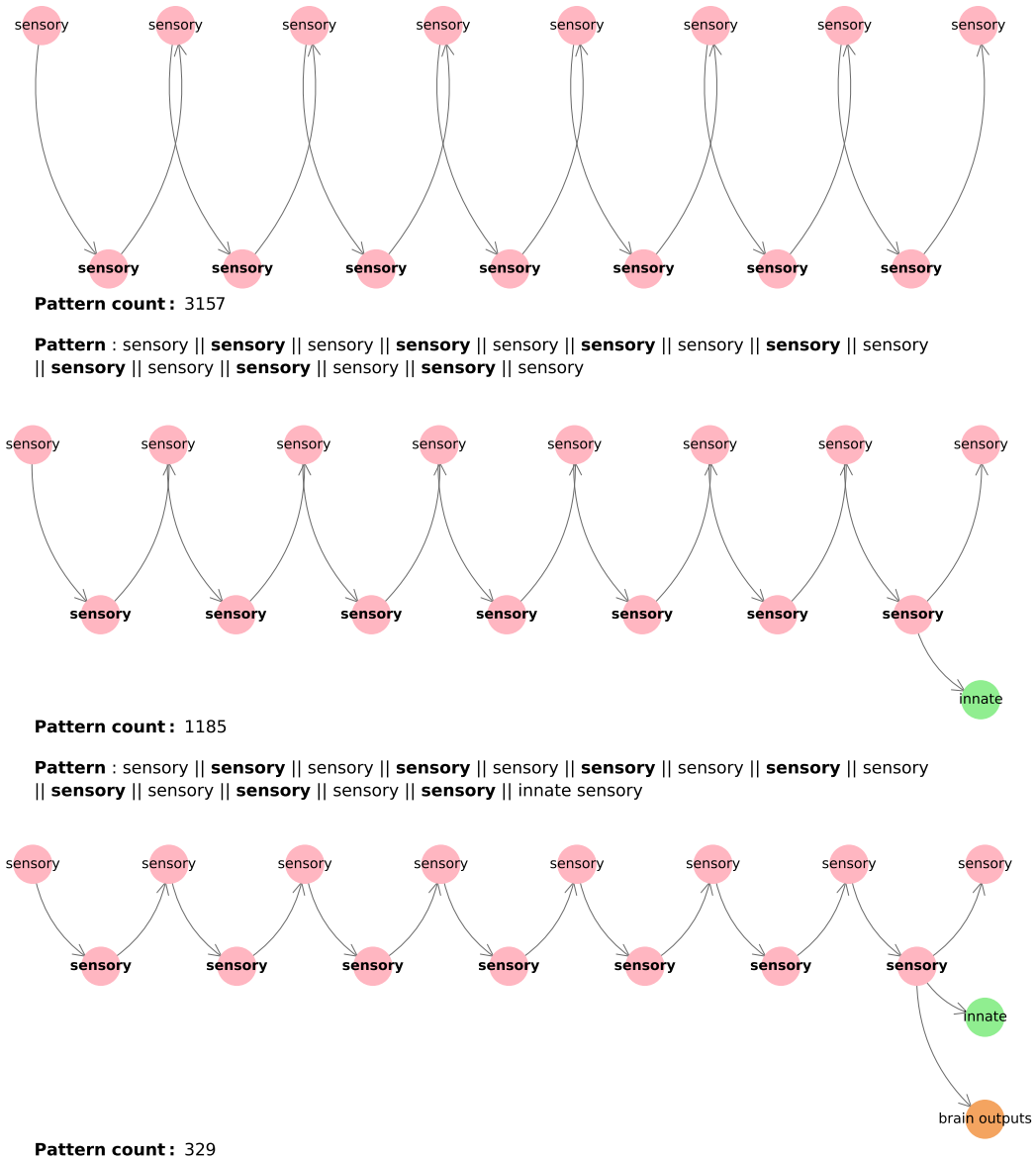


Figura 5.6: Rappresentazione grafica di alcune settuple di pattern funzionali

Inoltre, le ottuple risultano sostanzialmente ridondanti poiché rappresentano catene già identificate da settuple corrispondenti. Analizzando infatti la loro struttura, emerge che non introducono nuove configurazioni, ma si limitano ad estendere la più frequente delle settuple, quella caratterizzata esclusivamente da interazioni tra neuroni dell'area "sensory", esattamente nello stesso modo con cui si sono estese le sestuple che hanno originato le tre settuple più frequenti.

Questa ripetizione è evidente confrontando le Figure 5.6 e 5.7 e suggerisce che le ottuple non apportino un valore informativo aggiuntivo rispetto alle settuple, in quanto non fanno emergere nuove strutture diverse da quelle già descritte dalle settuple.

È importante notare che questa osservazione può essere fatta già in fasi precedenti del processo: infatti, anche nelle triple sono presenti queste tre configurazioni, caratterizzate da un loop iniziale di interazioni che coinvolgono esclusivamente l'area "sensory", ma in una forma

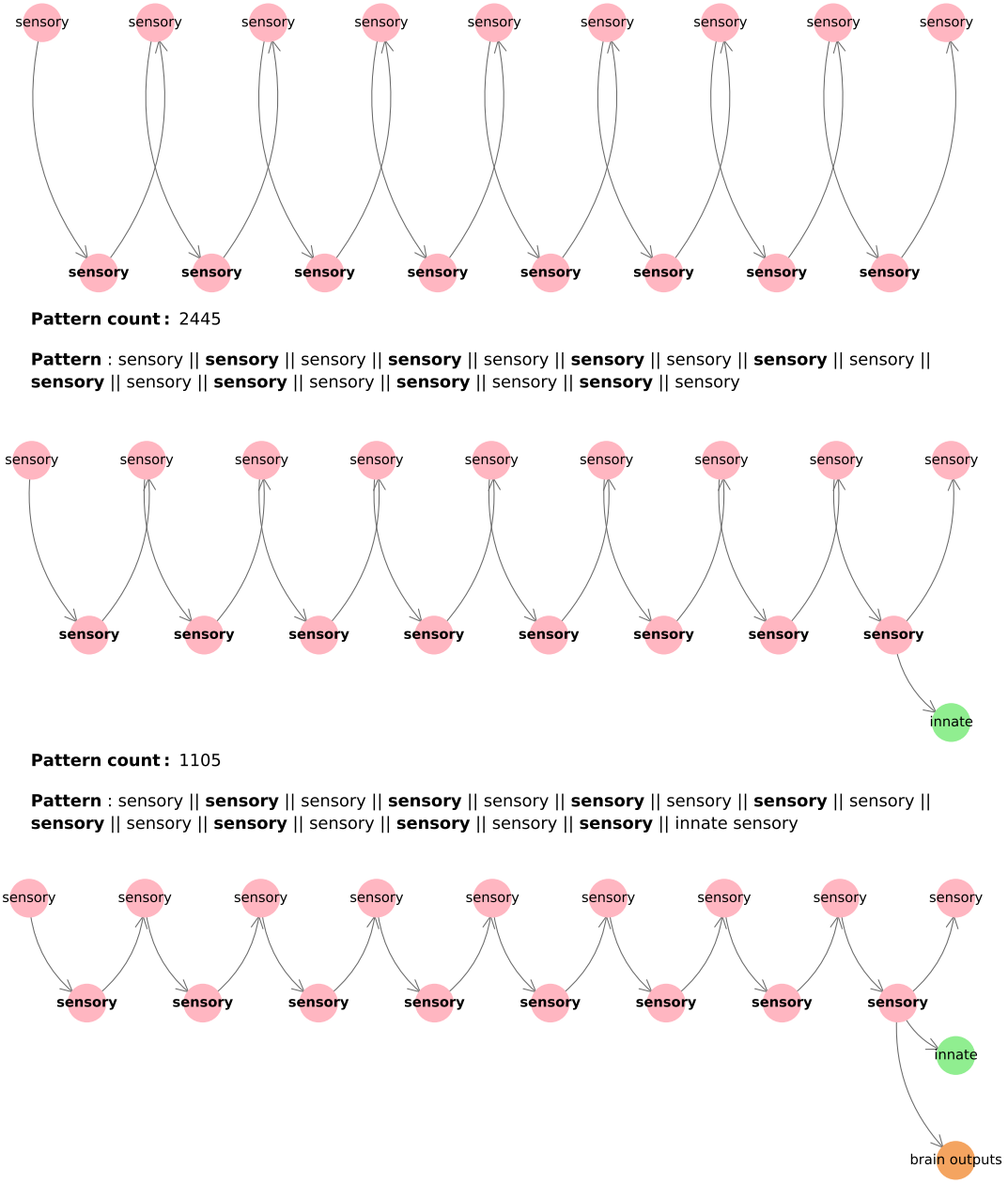


Figura 5.7: Rappresentazione grafica di alcune ottuple di pattern funzionali

più breve. Questo fa emergere un modello di ridondanza che si ripete nei diversi step della generazione delle catene, evidenziando la possibilità di semplificare ulteriormente l'analisi senza che siano tralasciati importanti configurazioni.

Un aspetto interessante che emerge dall'analisi complessiva delle catene di pattern funzionali ottenute è la presenza ricorrente di alcuni schemi che si osservano nella maggior parte delle estensioni. In particolare, dalle coppie fino alle ottuple, si osservano pattern che coinvolgono esclusivamente l'area "sensory" dalla fase di input fino all'output della catena. In altre configurazioni, l'area "sensory" è affiancata dalle aree "innate" e "brain output" nella parte finale della catena. Le tre configurazioni che rappresentano le uniche ottuple

significative ottenute sono proprio di questo tipo. Ciò sottolinea un trend che evidenzia l'importanza delle interazioni sensoriali. Analogamente, molte catene mostrano una struttura di interazione continua tra le aree "innate" e "learning/memory". In queste configurazioni, l'area "learning/memory" corrisponde alle *n* core area della catena, mentre entrambe le aree "innate" e "learning/memory" si presentano come punti di aggancio tra successivi pattern inclusi nella catena. Questo schema caratterizza l'inizio di molte catene, che si diversificano successivamente nella parte finale.

In generale, la prevalenza di determinati schemi suggerisce che, nonostante la complessità del connettoma, ci sono sequenze di interazioni fortemente rilevanti, le quali possono fornire spunti sulle modalità con cui le informazioni vengono elaborate e integrate nel sistema cerebrale.

Inoltre, alcune catene mostrano una notevole somiglianza nei descrittori, poiché coinvolgono le stesse aree ma disposte secondo sequenze differenti. Questo comportamento configura le catene come permutazioni l'una dell'altra, indicando una certa ridondanza nelle estensioni ottenute. Infatti, queste variazioni di sequenza all'interno di una catena non alterano il significato fondamentale del processo di elaborazione dell'informazione che ciascuna catena rappresenta. A tal proposito, per migliorare l'efficacia dell'algoritmo di estensione lineare, sarebbe vantaggioso sviluppare criteri che possano identificare e raggruppare tali permutazioni sotto una singola configurazione. Ciò consentirebbe di riconoscere che, sebbene alcuni passi possano apparire diversi, l'essenza del processo di elaborazione descritto da una catena rimane costante. In questo modo, si potrebbe semplificare l'analisi, eliminando ripetizioni non necessarie e rendendo più chiari i meccanismi sottostanti alle interazioni neuronali.

5.3 Estensione gerarchica dei pattern funzionali

Una seconda modalità di estensione che si è sperimentata si basa su un approccio gerarchico. A differenza dell'estensione lineare, dove i pattern vengono combinati in sequenza uno dopo l'altro, nell'estensione gerarchica i pattern sono collegati in modo più complesso, formando una struttura ramificata. L'obiettivo del processo di estensione gerarchica è costruire una struttura ad albero a partire dalle istanze dei pattern funzionali di base, definendo, così, un *pattern funzionale gerarchico*.

5.3.1 Processo di estensione gerarchica

L'estensione inizia da un'istanza di un pattern funzionale, denominata *pattern radice*, che funge da base per costruire i livelli successivi di estensione. Analogamente all'estensione lineare, i vincoli "*Sovrapposizione delle aree*" e "*Nodi di collegamento*" continuano a essere applicati. Si cercano tutte le istanze di pattern funzionali di base tali per cui:

- L'insieme delle aree di input dell'istanza di un pattern funzionale candidata per l'estensione gerarchica coincide esattamente con l'insieme delle aree di output del pattern radice, nel rispetto del vincolo "*Sovrapposizione delle aree*".
- Per ciascuna area comune tra il pattern radice e l'istanza, esiste almeno un nodo che è contemporaneamente nodo di output per il pattern radice e nodo di input per l'istanza da aggiungere, nel rispetto del vincolo "*Nodi di collegamento*".

Oltre a questi vincoli, si impone anche la condizione che i core node delle istanze dei pattern combinati siano distinti, per garantire la differenziazione delle istanze incluse ai vari livelli della gerarchia.

Questi pattern, una volta identificati, costituiscono il secondo livello del pattern funzionale gerarchico. È importante sottolineare che, affinché si possa parlare di un vero e proprio pattern

funzionale gerarchico, devono essere presenti almeno due pattern distinti nel secondo livello. Se al pattern radice venisse combinato un solo pattern, la struttura risultante non costituirebbe un pattern funzionale gerarchico, ma piuttosto una semplice coppia di pattern, come avviene nel caso dell'estensione lineare.

Il processo di estensione continua in modo iterativo per costruire i successivi livelli del pattern funzionale gerarchico, fino a formare una struttura gerarchica profonda. Ogni pattern nel secondo livello può fungere da base per la costruzione del terzo livello. Si cercano, quindi, nuove istanze di pattern funzionali di base che soddisfino i medesimi vincoli e che possano essere agganciate a uno dei pattern che formano il secondo livello.

La struttura ad albero di un pattern funzionale gerarchico si sviluppa in modo gerarchico, con l'aggiunta progressiva di nuovi livelli. Ogni livello successivo viene costruito seguendo lo stesso schema: si identificano pattern che soddisfano i criteri di estensione e si aggiungo come ramificazioni rispetto ai livelli precedenti.

Tuttavia, nel tentativo di estendere i del pattern funzionali gerarchici al terzo livello, non sono stati ottenuti risultati significativi che potessero rappresentare strutture sufficientemente ricorrenti da risultare rilevanti dal punto di vista funzionale. Al contrario, le configurazioni individuate sono risultate dei casi unici, con frequenza unitaria o poco superiore. Pertanto, si è scelto di non documentare tali pattern e di interrompere il processo di estensione gerarchica.

Ciò suggerisce che l'approccio gerarchico presenta limitazioni nella sua estendibilità. Mentre l'estensione lineare consente di costruire lunghe catene di interazioni, l'estensione gerarchica risulta più rigida e meno efficace. Questo indica che nel connettoma della larva di Drosophila prevale un'organizzazione delle connessioni tra neuroni di tipo lineare: le interazioni tendono a seguire schemi diretti piuttosto che stratificazioni gerarchiche complesse.

La predominanza di strutture lineari potrebbe riflettere l'intento di promuovere risposte agli stimoli rapide e flessibili. Un'organizzazione lineare favorisce, infatti, un'attivazione e una modulazione rapida delle interazioni. Al contrario, una gerarchia più complessa potrebbe risultare meno efficiente, introducendo ritardi o complicazioni nell'elaborazione delle informazioni.

5.3.2 Descrizione di pattern funzionale gerarchico

Un pattern funzionale gerarchico con profondità pari a 2 è descritto da un pattern complesso costruito nel seguente modo:

> Aree di input del pattern radice || **Core area del pattern radice** || Aree comuni tra il pattern radice e i pattern del secondo livello || (**Core area del i-esimo pattern di secondo livello** || Aree di output del i-esimo pattern di secondo livello) || ... || (**Core area del n-esimo pattern di secondo livello** || Aree di output del n-esimo pattern di secondo livello)

Le core area sono evidenziate in grassetto per distinguerle dalle altre componenti.

Ogni pattern di secondo livello è specificato tra parentesi tonde e, per ciascun pattern, sono indicati soltanto la core area e l'insieme delle aree di output poiché l'insieme delle aree di input coincide con l'insieme delle aree di output del pattern radice, definendo le aree comuni che legano la radice con i pattern del livello successivo.

In generale, il descrittore di un pattern funzionale gerarchico mantiene la stessa struttura, indipendentemente dal numero di pattern di secondo livello che si ramificano dalla radice.

5.3.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale gerarchico

La rappresentazione grafica di un pattern funzionale gerarchico segue criteri simili a quelli utilizzati per le catene, con la differenza principale che, in questo caso, la struttura è organizzata su livelli, piuttosto che orizzontalmente.

In questa struttura, ciascun nodo corrisponde a una delle aree coinvolte nel pattern funzionale gerarchico, e ogni nodo è contraddistinto da un colore specifico, in accordo con l'associazione cromatica illustrata nella Figura 4.1.

Nella rappresentazione del pattern funzionale gerarchico, nella parte sinistra sono disegnati i nodi che identificano le aree di input, la core area e le aree di output del pattern radice, base per l'estensione successiva.

Dal pattern radice si sviluppano i pattern di secondo livello, i quali hanno come aree di input esattamente le aree di output del pattern radice, nel rispetto del vincolo di "*Sovrapposizione delle aree*". Queste aree comuni fungono da punti di connessione tra la radice e i successivi pattern. Di conseguenza, da ciascuna delle aree di output del pattern radice si diramano una serie di archi che si collegano ai nodi che rappresentano le core area dei pattern di secondo livello. Per ognuno di questi pattern sono poi riportate le proprie aree di output, collegate alle core area corrispondenti, completando la rappresentazione.

Inoltre, ogni rappresentazione si completa con la specifica del numero di occorrenze, ossia della frequenza, e del pattern descrittore del pattern funzionale gerarchico.

5.3.4 I risultati del processo di estensione gerarchica

Il processo di estensione gerarchica inizia con la selezione di un'istanza di un pattern funzionale di base, che funge da radice per la struttura gerarchica. Questa radice rappresenta il livello iniziale della gerarchia e viene scelta tra le stesse 823 istanze utilizzate come punto di partenza per l'estensione lineare. Una volta stabilito il pattern radice, si considerano le stesse istanze, escludendo quella scelta come radice, per identificare le potenziali ramificazioni. Queste istanze devono soddisfare i criteri stabiliti per l'estensione gerarchica. Le istanze che soddisfano tali criteri vengono aggiunte al pattern funzionale gerarchico, a formare il secondo livello dello stesso.

È importante notare che diverse combinazioni di istanze di pattern funzionali possono generare la stessa configurazione in termini di pattern descrittore del pattern funzionale gerarchico. Pertanto, tali configurazioni vengono assimilate allo stesso pattern funzionale gerarchico, e la frequenza di ciascun pattern funzionale gerarchico viene calcolata come il numero di insiemi di istanze di pattern da cui il pattern funzionale gerarchico stesso può essere ottenuto.

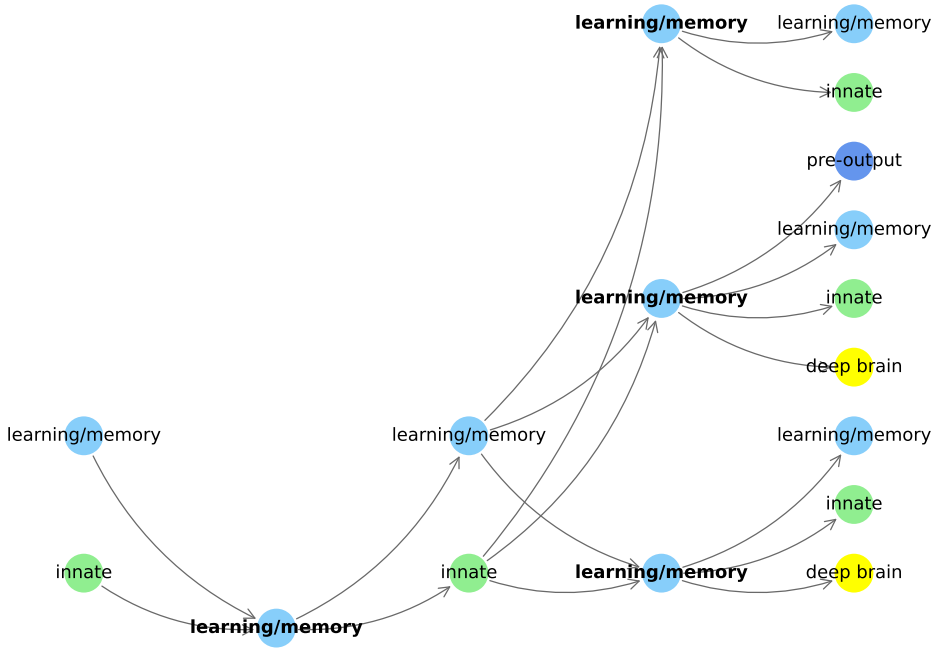
La frequenza di un pattern funzionale gerarchico è quella caratteristica che ne determina la significatività. Infatti, si sono selezionate solo quelle configurazioni con una frequenza almeno pari a 32, corrispondente al valore mediano delle frequenze di tutti i pattern funzionali gerarchici estratti. I pattern funzionali gerarchici che si manifestano maggiormente, superando la soglia fissata, sono in totale 13. I loro descrittori e la loro frequenza sono indicati nella Tabella 5.8.

Pattern	*Count*
innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || (**learning/memory** || deep brain innate learning/memory) (**learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || innate learning/memory)	463
deep brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep brain innate learning/memory pre-output || (**deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || deep brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output)	214
sensory || **sensory** || sensory || (**sensory** || brain outputs innate sensory) (**sensory** || innate sensory) (**sensory** || sensory)	214

deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output || (**deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || deep brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output)	145
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || (**deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output)	43
deep brain innate learning/memory pre-output || **learning/memory** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || (**deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output)	34
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || **deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output || (**deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output) (**pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output)	32

Tabella 5.8: Pattern funzionali gerarchici di livello 2 significativi

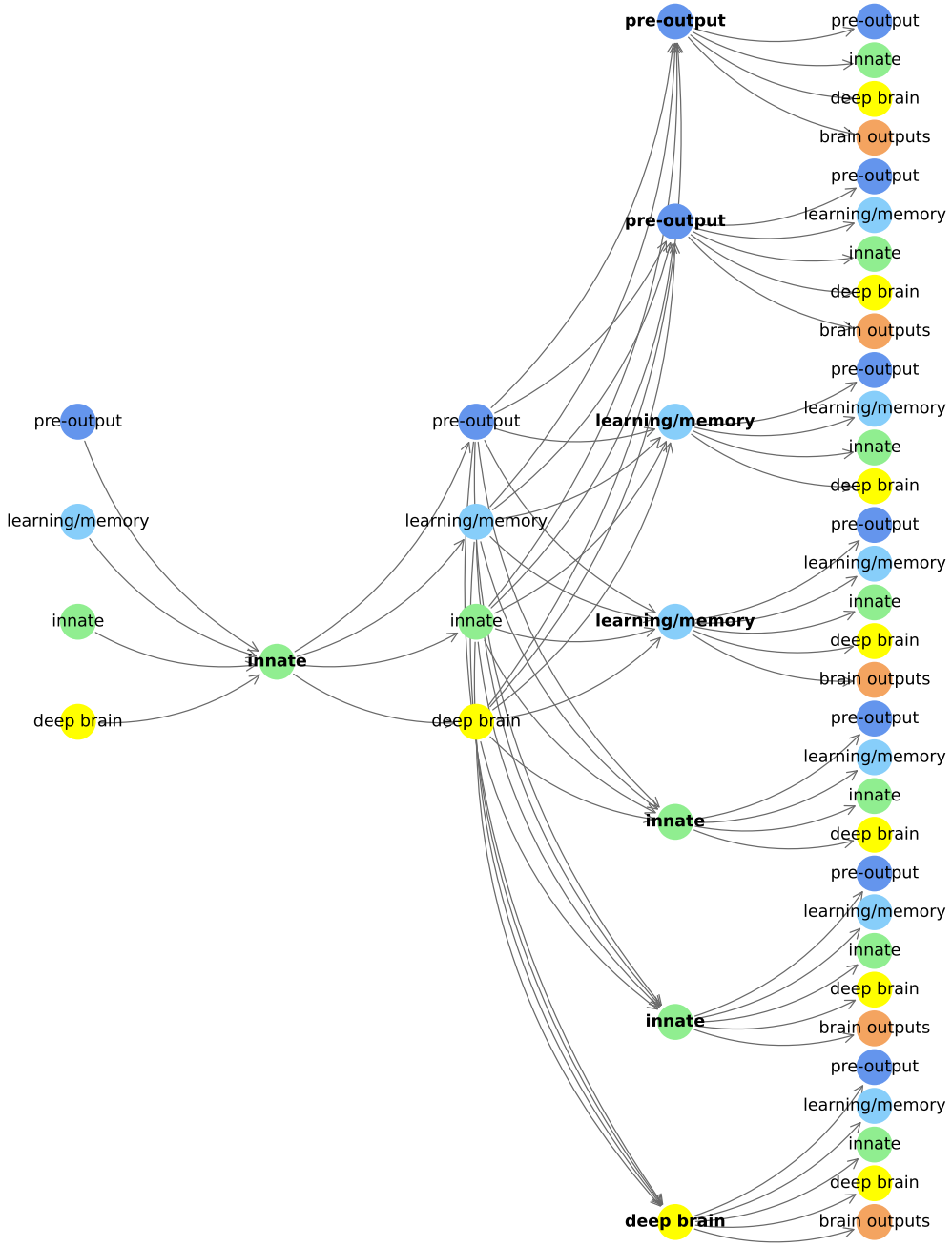
Nelle Figure 5.8 e 5.9 sono rappresentante due configurazioni di pattern funzionale gerarchico con profondità pari a 2 più frequenti.



Pattern count: 463

Pattern : innate learning/memory || **learning/memory** || innate learning/memory || (**learning/memory** || deep-brain innate learning/memory) (**learning/memory** || deep-brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || innate learning/memory)

Figura 5.8: Rappresentazione grafica di un pattern funzionale gerarchico



Pattern count: 214

Pattern : deep-brain innate learning/memory pre-output || **innate** || deep-brain innate learning/memory pre-output || (**deep – brain** || brain-outputs deep-brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || brain-outputs deep-brain innate learning/memory pre-output) (**innate** || deep-brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || brain-outputs deep-brain innate learning/memory pre-output) (**learning/memory** || deep-brain innate learning/memory pre-output) (**pre – output** || brain-outputs deep-brain innate learning/memory pre-output) (**pre – output** || brain-outputs deep-brain innate pre-output)

Figura 5.9: Rappresentazione grafica di un altro pattern funzionale gerarchico

Tutti i pattern funzionali gerarchici significativi hanno un numero di rami, ossia di pattern di livello 2, compreso tra 3 e 7.

Sebbene l'estensione gerarchica non si sia spinta oltre, aggiungendo ulteriori livelli, i

risultati ottenuti offrono comunque una buona visione sulla struttura del connettoma della larva di Drosophila.

Nel caso dell'estensione lineare, sono emerse in modo evidente catene particolarmente frequenti che modellano interazioni ripetute tra neuroni dell'area "sensory"; in questo caso, invece, solo uno dei 13 alberi vede quest'area coinvolta, suggerendo che i neuroni di quest'area tendono a collegarsi principalmente in maniera lineare. Le aree maggiormente coinvolte sono "deep brain", "innate", "learning/memory", "pre-output". L'area "ascending" non è, invece, coinvolta in nessuna configurazione.

L'analisi dei risultati rivela che molte delle configurazioni ottenute presentano similitudini significative tra i pattern che formano il secondo livello del pattern funzionale gerarchico considerato. Infatti, è interessante notare che spesso, dato un pattern funzionale gerarchico, i pattern che costituiscono le ramificazioni sono caratterizzati dallo stesso insieme di aree di output, differenziandosi quindi solo per le core area, poiché le aree di input, per costruzione (vincolo di "*Sovrapposizione delle aree*"), sono coincidenti. Elementi in comune tra i pattern di secondo livello si notano anche confrontando tra loro più alberi.

In conclusione, nonostante le limitazioni osservate nell'estensione gerarchica, questa modalità di estensione offre comunque spunti significativi per comprendere la dinamica delle interazioni tra i neuroni della larva di Drosophila. La sovrapposizione tra le aree di output del pattern radice e le aree di input dei diversi pattern del livello successivo suggerisce che l'attivazione di specifiche aree neurali possa innescare un effetto domino, in cui l'attivazione di alcune aree provoca quella di altrettante aree in modo coordinato. In questo modo, il flusso di informazione può proseguire parallelamente, seguendo le varie alternative descritte dalle diverse ramificazioni dell'albero. La capacità di attivare simultaneamente aree multiple consente al sistema di generare risposte complesse e ben integrate, ottimizzando l'efficienza del sistema nervoso e consentendo l'elaborazione di diverse informazioni in parallelo.

5.4 Estensione multi-core dei pattern funzionali

L'ultima modalità di estensione si basa sull'idea di combinare istanze di pattern funzionali che condividono lo stesso insieme di aree di input e output, a meno di una singola area, sia essa in input o in output, che differenzia le due istanze. Questa singola area rappresenta l'elemento distintivo tra le due istanze. La combinazione dei pattern avviene attraverso la sovrapposizione delle aree di input e output comuni, garantendo che l'insieme delle aree di input di un pattern coincida (a meno di un'area) con quello dell'altro, e lo stesso principio si applica alle aree di output.

In questo modo, il pattern risultante acquisisce una nuova area, aggiunta o in input o in output, aumentando la complessità della struttura complessiva. A ogni iterazione, l'estensione continua con l'introduzione di una nuova area, arricchendo progressivamente il pattern.

I pattern ottenuti sono denominati *pattern funzionali multi-core*, dove il numero di core è dato dal numero di pattern funzionali di base che si sono combinati per formare il pattern complesso. Questo significa che, oltre all'area che viene aggiunta in input o in output, il pattern risultante presenta una core area in più. Infatti, il nome scelto sottolinea che la struttura risultante non avrà più una sola core area, ma l'unione delle core area dei pattern combinati, non necessariamente tra loro distinte. In particolare, se si combinano due pattern che condividono la stessa core area, il pattern risultante presenterà comunque due core aree. Questo perché, sebbene i pattern originari condividano la stessa core area, nei due pattern questa è interessata da connessioni diverse. Dato il vincolo di sovrapposizione a meno di un'area, una delle due core area sarà connessa a un'area aggiuntiva rispetto all'altra. Di conseguenza, se queste due core area venissero collassate in una unica, si perderebbe la possibilità di distinguere l'area non comune tra i due pattern combinati. Questa separazione è,

quindi, essenziale per mantenere la coerenza delle connessioni e la ricostruzione corretta dei pattern combinati.

5.4.1 Processo di estensione multi-core dei pattern funzionali

Il processo di estensione inizia combinando due istanze di pattern funzionali di base, al fine di ottenere un *pattern con una coppia di core*. La regola che guida il processo di estensione e definisce quali pattern possono combinarsi tra loro stabilisce che:

- Se le due istanze di pattern funzionali condividono la stessa core area, essi devono differire esattamente per o un'area di input o di output e coincidere per il resto delle componenti. Qualsiasi altra differenza, oltre a questa, rende, infatti, le due istanze incompatibili.
- Altrimenti, se le due istanze di pattern funzionali hanno core area distinte, allora la differenza tra le core area è già sufficiente per distinguerli e la loro combinazione determinerebbe l'aggiunta di una nuova area al pattern risultante. Tuttavia, anche in tal caso, si richiede che i pattern differiscano per un'area di input o per un'area di output, nonostante la diversità delle core area.

La seconda condizione della regola è stata imposta poiché i risultati ottenuti senza considerare tale imposizione si sono rivelati poco significativi. Indipendentemente dalle core area, si vuole che la combinazione dei pattern restituisca una struttura più articolata che introduce una nuova area all'insieme delle aree di input o all'insieme delle aree di output.

Per ogni area comune tra i pattern, sia in input che in output, si richiede l'esistenza di almeno un nodo che sia nodo di input/di output di entrambe le istanze di pattern funzionali. Questa condizione garantisce che ci sia una connessione diretta tra i pattern funzionali, permettendo effettivamente la loro integrazione.

Anche in questo caso si richiede che i core node dei pattern candidati per l'estensione siano diversi. Questo vincolo, tuttavia, risulta superfluo, poiché, secondo la regola precedente, se i due pattern differiscono per un'area, indipendentemente dal tipo di area, i pattern sono necessariamente diversi. Di conseguenza, i core node saranno distinti, poiché ogni nodo è caratterizzato da uno e un solo pattern funzionale.

Si sottolinea che, secondo la regola di estensione, ogni pattern funzionale che contribuisce a formare un pattern multi-core può aggiungere solo una singola area, che può essere di input o di output. Se un pattern aggiungesse più di un'area in input o in output, o entrambe, violerebbe il vincolo di estensione, che prevede l'introduzione di una sola area alla volta in input o in output. Con una opportuna condizione si deve garantire che venga aggiunta un'area di input o un'area di output, in maniera esclusiva, ma mai entrambe contemporaneamente.

I pattern con una coppia di core costituiscono il punto di partenza per l'iterazione successiva del processo di estensione, che tenterà di aggiungere un nuovo pattern alla struttura, generando un *pattern con una tripla di core*. In questo caso, tra il pattern con una coppia di core e il nuovo pattern funzionale da aggiungere deve esserci una coincidenza nelle aree di input/output comuni tra i due pattern già combinati e quelle del nuovo pattern, che si deve differenziare per una sola area aggiuntiva o in input o in output. Ciò significa che l'area aggiunta dalla combinazione tra le due istanze di pattern che hanno formato il pattern con una coppia di core non deve necessariamente essere un'area coinvolta nel nuovo pattern che si vorrebbe aggiungere.

In teoria, questo processo potrebbe proseguire indefinitamente. Tuttavia, l'estensione è stata interrotta ai pattern con una tripla di core.

5.4.2 Descrizione di un pattern funzionale multi-core

Un pattern multi-core è descritto come un pattern complesso in cui le aree dei vari pattern funzionali combinati sono disposte secondo la seguente struttura:

> Aree di input comuni tra gli n pattern combinati | Area di input che aggiunge il primo pattern | Area di input che aggiunge il secondo pattern | ....| Area di input che aggiunge l'ultimo pattern || n-**upla di core area** || Aree di output comuni tra gli n pattern combinati | Area di output che aggiunge il primo pattern | Area di output che aggiunge il secondo pattern| ....| Area di output che aggiunge l'ultimo pattern

In particolare, le aree di input comuni tra gli n pattern combinati vengono elencate per prime. Successivamente, per ciascun pattern combinato, si aggiunge la singola area di input che esso introduce. Se un pattern non aggiunge alcuna area di input, questo viene indicato con dei puntini di sospensione, evidenziando che non vi è un contributo in input. In questo caso, tale pattern può aggiunge una nuova area di output, poiché, secondo la regola di estensione, ciascun pattern aggiunge esattamente un'area in input o in output.

Dopo la specifica delle core area, si elencano le aree di output comuni tra i pattern combinati. Ogni pattern può, poi, aggiungere una singola area di output; se non vi è alcun contributo aggiuntivo in output, si indicano nuovamente i puntini di sospensione.

5.4.3 Rappresentazione grafica di un pattern funzionale multi-core

La rappresentazione di un pattern multi-core segue regole specifiche, pensate per rendere la struttura chiara e di semplice comprensione. Queste regole riprendono quelle utilizzate per la rappresentazione dei pattern funzionali, con alcune specifiche aggiuntive.

Ogni area coinvolta nella catena è rappresentata da un nodo, ciascuno associato a uno specifico colore, come illustrato nella Figura 4.1. L'organizzazione dei nodi è così data:

- *Aree di input*: le aree di input del pattern multi-core sono allineate lungo un asse verticale. Tra queste, si distinguono le aree non comuni, ovvero quelle aggiunte dai singoli pattern combinati, per il differente posizionamento. Infatti, le aree aggiunte sono posizionate alle estremità superiore o inferiore dell'asse.
- *Core aree*: a destra delle aree di input si trovano le n core aree, disposte anch'esse lungo un asse verticale. L'ordine va dal basso verso l'alto, per cui la prima core area corrisponde al primo pattern combinato, la seconda al secondo pattern, e così via fino alla n-esima core area, situata all'estremo superiore.
- *Aree di output*: seguono la stessa logica delle aree di input.

Questa disposizione facilita la visualizzazione delle relazioni tra le aree e dei contributi distintivi apportati da ciascun pattern funzionale di base.

5.4.4 I risultati del processo di estensione multi-core dei pattern funzionali

Il processo di estensione multi-core dei pattern funzionali inizia con l'individuazione di possibili combinazioni di coppie di istanze di pattern funzionali di base, in modo da soddisfare i vincoli imposti. Questo porta alla creazione di un pattern con 2 core, denominato anche *pattern con una coppia di core*. A partire da 823 istanze di pattern funzionali di base, sono state generate 1,289 istanze di pattern con una coppia di core, che descrivono 39 pattern distinti. La frequenza di ciascun pattern multi-core, calcolata come nei casi precedenti, è stata confrontata con una soglia empirica pari a 13. I pattern con una coppia di core significativi

sono riportati nella Tabella 5.9 in cui, per ciascun pattern, sono indicati il suo descrittore e la sua frequenza. Le quattro configurazioni più frequenti tra queste sono illustrate in Figura 5.10.

Pattern	*Count*
innate learning/memory | ... | ... || **learning/memory learning/memory** || innate learning/memory | deep brain | ...	554
innate learning/memory | ... | deep brain || **learning/memory learning/memory** || deep brain innate learning/memory | ... | ...	242
innate learning/memory | ... | ... || **learning/memory learning/memory** || deep brain innate learning/memory | ... | pre-output	206
deep brain innate learning/memory pre-output | brain outputs | ... || **deep brain deep brain** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output | ... | ...	46
deep brain innate pre-output | ... | brain outputs || **pre-output pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output | ... | ...	24
sensory | ... | ... || **sensory sensory** || sensory | ... | innate	23
innate pre-output | deep brain | ... || **pre-output pre-output** || brain outputs deep brain innate pre-output | ... | ...	15
deep brain innate learning/memory pre-output | ... | brain outputs || **deep brain pre-output** || brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output | ... | ...	15
sensory | brain outputs | ... || **sensory sensory** || brain outputs innate sensory | ... | ...	14
deep brain innate learning/memory pre-output | ... | ... || **innate deep brain** || deep brain innate learning/memory pre-output | ... | brain outputs	13

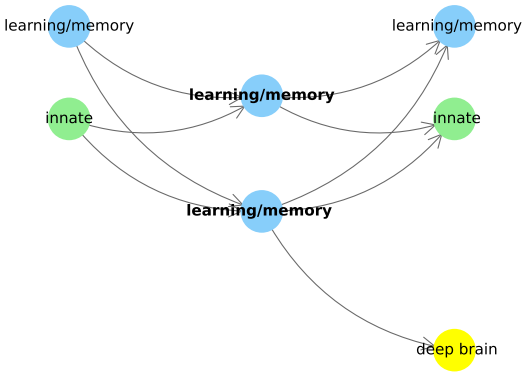
Tabella 5.9: Pattern con una coppia di core significativi

Successivamente, tali pattern sono stati ulteriormente estesi applicando lo stesso algoritmo per individuare tutte le possibili combinazioni tra un'istanza di uno dei pattern ottenuti e un'istanza di un pattern funzionale di base. Questo processo ha generato i *pattern con una tripla di core*, per un totale di 38 configurazioni. Tuttavia, la maggior parte di questi pattern si ripete poche volte, suggerendo una scarsa rilevanza. Infatti, dal confronto con una soglia empirica pari a 5, valore corrispondente al terzo quartile, solo 4 configurazioni risultano significative. Queste sono elencate nella Tabella 5.10 e la loro rappresentazione grafica è mostrata in Figura 5.11.

Pattern	*Count*
innate learning/memory | ... | ... | deep brain || **learning/memory learning/memory learning/memory** || innate learning/memory | deep brain | ... | ...	6545
innate learning/memory | ... | ... | ... || **learning/memory learning/memory learning/memory** || innate learning/memory | deep brain | ... | pre-output	5047
innate learning/memory | ... | ... | deep brain || **learning/memory learning/memory learning/memory** || deep brain innate learning/memory | ... | pre-output | ...	500
innate learning/memory | ... | deep brain | ... || **learning/memory learning/memory learning/memory** || deep brain innate learning/memory | ... | ... | pre-output	314

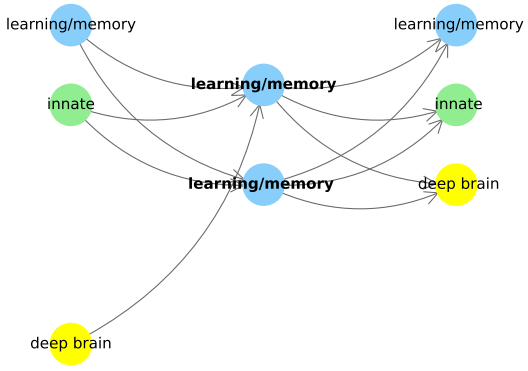
Tabella 5.10: Pattern con una tripla di core significativi

Da un'analisi approfondita dei pattern emerge che la maggioranza di quelli con una coppia di core e la totalità di quelli con una tripla di core è caratterizzata da core di una sola area. Questo implica che tali pattern sono stati generati combinando pattern funzionali di nodi



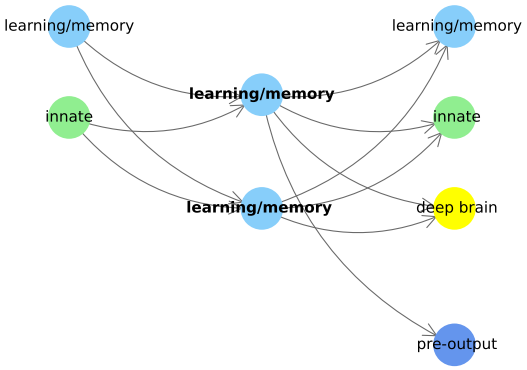
Pattern count: 554

Pattern: innate learning/memory | ... | ... ||
learning/memory learning/memory ||
innate learning/memory | deep brain | ...



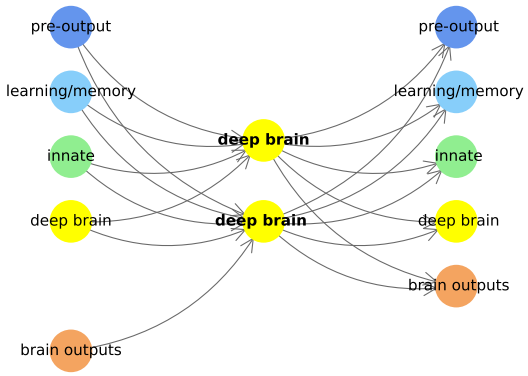
Pattern count: 242

Pattern: innate learning/memory | ... | deep brain ||
learning/memory learning/memory ||
deep brain innate learning/memory | ... | ...



Pattern count: 206

Pattern: innate learning/memory | ... | ... ||
learning/memory learning/memory ||
deep brain innate learning/memory | ... | pre-output



Pattern count: 46

Pattern: deep brain innate learning/memory pre-output |
brain outputs | ... || **deep brain deep brain** ||
brain outputs deep brain innate learning/memory pre-output | ... | ...

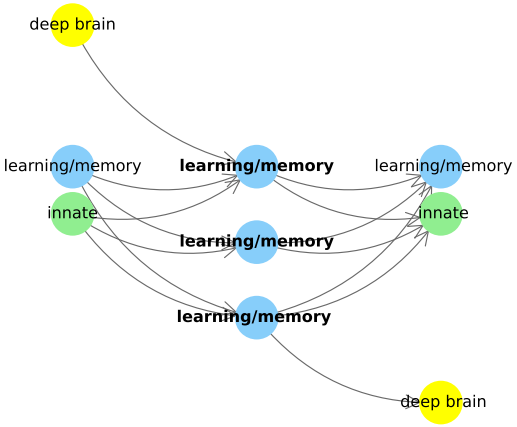
Figura 5.10: Rappresentazione grafica di alcuni pattern con una coppia di core

appartenenti alla stessa area. Inoltre, ciò rinforza l'osservazione precedente riguardo alla similitudine tra i pattern funzionali con la stessa core area. Infatti, per rispettare i vincoli imposti dal processo di estensione, questi pattern possono differire esattamente per una sola area in input o in output, mentre tutte le altre devono essere identiche. La condizione sulla differenziazione di una sola area favorisce l'emergere di configurazioni altamente simili.

Tra le varie core area individuate, l'area "learning/memory" emerge in modo preponderante sia nelle coppie che nelle triple di core. Altre core area, come "sensory", "deep brain" e "innate", pur essendo presenti, sono meno coinvolte.

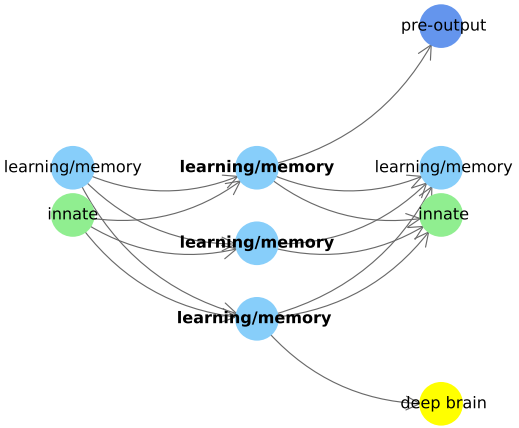
Un ulteriore aspetto interessante riguarda i pattern con una tripla di core, i quali derivano dall'estensione dei tre pattern con coppie di core più frequenti. Questi pattern presentano caratteristiche strutturali molto simili, condividendo le stesse aree comuni di input e output e differenziandosi solo per la presenza o l'assenza di aree specifiche. Tale somiglianza diventa ancor più evidente con l'estensione delle coppie di core nei pattern con triple di core.

Sebbene il processo si sia fermato ai pattern con una tripla di core, esiste la possibilità teorica di estendere ulteriormente i pattern funzionali multi-core. Tuttavia, data la ridotta variabilità dei pattern ottenuti, si è scelto di non procedere oltre, poiché i pattern risultanti rischierebbero di essere meno rilevanti o, peggio, ridondanti dal punto di vista funzionale.



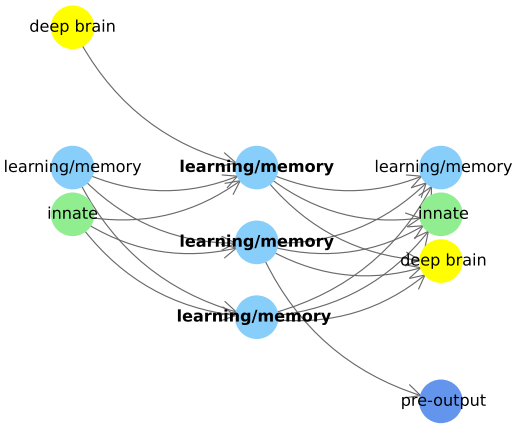
Pattern count: 6545

Pattern: innate learning/memory | ... | ... | deep brain ||
learning/memory learning/memory learning/memory ||
innate learning/memory | deep brain | ... | ...



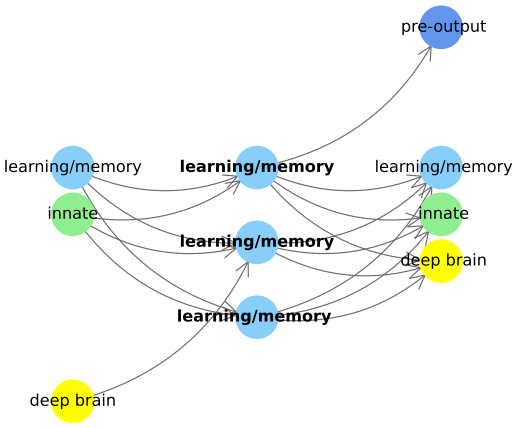
Pattern count: 5047

Pattern: innate learning/memory | ... | ... | ... ||
learning/memory learning/memory learning/memory
innate learning/memory | deep brain | ... | pre-output



Pattern count: 500

Pattern: innate learning/memory | ... | ... | deep brain ||
learning/memory learning/memory learning/memory ||
deep brain innate learning/memory | ... | pre-output | ...



Pattern count: 314

Pattern: innate learning/memory | ... | deep brain | ... ||
learning/memory learning/memory learning/memory
deep brain innate learning/memory | ... | ... | pre-output

Figura 5.11: Rappresentazione grafica di alcuni pattern con una tripla di core

5.5 Sviluppi futuri

Come già menzionato, il possibile proseguo di questo lavoro consisterà nel replicare le stesse analisi sul connettoma della Drosophila adulta. Data la maggiore complessità e densità di questo connettoma rispetto a quello larvale, sarà necessario rivedere in parte le soluzioni algoritmiche adottate. In particolare, sarà fondamentale ottimizzare le procedure per migliorare l'efficienza computazionale, riducendo sia il tempo di esecuzione sia l'occupazione di memoria e rendendole più scalabili, in modo che possano gestire efficacemente un numero maggiore di istanze di pattern senza compromettere le prestazioni.

Nell'adulta, infatti, le istanze di pattern funzionali che rappresentano il punto di partenza delle varie modalità di estensione ammontano a 120,362, un numero considerevolmente superiore rispetto a quelle del connettoma larvale.

È, quindi, essenziale affinare gli algoritmi, adottando nuove strategie, come la paralleliz-

zazione delle operazioni, o tecniche avanzate di gestione della memoria, così da mantenere sotto controllo l'uso delle risorse.

Inoltre, per migliorare il processo di estensione lineare, che si è dimostrato essere il più estendibile, sarebbe utile studiare condizioni che consentano di identificare istanze di una stessa catena che coinvolgono esattamente le stesse istanze di pattern funzionali di base, ma combinate in ordine diverso.

Il problema è che un pattern complesso può derivare da combinazioni diverse che coinvolgono, però, le stesse istanze, eventualmente ordinate in modo diverso. Tuttavia, la sola permutazione dei pattern combinati non rende i pattern risultanti differenti dal punto di vista pratico, e in un'ottica di studio delle interazioni tra le varie aree funzionali, tali distinzioni non sono significative. Questo, tra l'altro, significa anche che il conteggio delle catene potrebbe essere sovrastimato poiché la versione corrente dell'algoritmo non è in grado di riconoscere questi casi. Se si riuscisse a riconoscere e gestire queste situazioni, l'algoritmo sarebbe sicuramente più efficiente. Per raggiungere questo obiettivo, potrebbe essere utile esplorare approcci basati su tecniche di hashing o utilizzo di strutture dati avanzate che consentano di memorizzare e confrontare rapidamente i pattern in base alla loro composizione, ignorando l'ordine delle istanze. In questo modo, si ottimizzerebbe l'analisi e si migliorerebbe l'efficienza dell'intero processo di estensione.

Conclusioni

In questa tesi abbiamo analizzato la complessa struttura del connettoma della larva e dell'adulta di Drosophila, utilizzando gli strumenti e le tecniche della Network Science. Questo approccio ci ha permesso di approfondire la comprensione dell'organizzazione del connettoma di questo organismo, mettendo in evidenza alcune proprietà strutturali e funzionali che emergono dalla connettività neuronale.

L'analisi esplorativa ha messo in luce somiglianze e differenze significative tra i connettomi della larva e dell'adulta, esaminando vari indicatori di base della Network Analysis, come le varie misure di centralità, la densità, l'assortatività di grado, e altre metriche rilevanti. Questi indicatori riflettono le trasformazioni sostanziali che il cervello subisce nel corso dello sviluppo dell'organismo.

Tuttavia, il focus principale dell'analisi è stato l'estrazione di motif dalle reti associate ai connettomi della larva e dell'adulta di Drosophila. Ciò ci ha consentito di identificare alcuni schemi ricorrenti nelle reti neuronali. Questi motif offrono importanti spunti sui meccanismi di elaborazione dell'informazione e sull'architettura funzionale del cervello.

In particolare, abbiamo articolato questo lavoro come segue: *(i)* Abbiamo definito una nuova tipologia di motif che chiamiamo *pattern funzionale di un neurone* che descrive l'area funzionale di appartenenza del neurone stesso e le aree funzionali a cui appartengono i neuroni ad esso collegati, in input o in output. *(ii)* Per ciascun neurone nella rete abbiamo identificato il pattern funzionale che lo caratterizza. *(iii)* Abbiamo valutato la significatività statistica dei pattern ottenuti attraverso il QAP test, individuando così i pattern più rilevanti. *(iv)* Abbiamo esplorato tre possibili modalità di estensione dei pattern funzionali, identificando strutture di complessità crescente, seguendo un approccio lineare, un approccio gerarchico e un approccio graduale orientato all'aggiunta progressiva di una nuova area per volta.

I risultati ottenuti suggeriscono che i connettomi della Drosophila sono caratterizzati da schemi ricorrenti che descrivono le interazioni tra le diverse aree cerebrali. Inoltre, da questi schemi possiamo dedurre alcune importanti relazioni tra le aree funzionali, che potrebbero svolgere un ruolo cruciale nell'elaborazione delle informazioni. Tali relazioni potrebbero delineare le vie principali seguite dal flusso informativo, offrendo una comprensione più approfondita delle dinamiche all'interno del cervello della Drosophila.

Ciò che abbiamo scoperto con il nostro lavoro non solo contribuisce a migliorare la comprensione del connettoma della Drosophila, ma fornisce anche una base per studi futuri su connettomi di organismi più complessi, man mano che saranno disponibili, aprendo nuove prospettive nell'ambito delle Neuroscienze per svelare le intricate relazioni tra struttura e funzione cerebrale negli organismi di specie differenti.

A partire dalle analisi che abbiamo condotto sui connettomi della Drosophila, è possibile prevedere ulteriori sviluppi lungo diverse linee di ricerca. In particolare: *(i)* Il processo di estensione dei pattern proposto in questa tesi può essere affinato per ridurre la complessità computazionale e poterlo, così, applicare al connettoma della Drosophila adulta. In questo modo, sarebbe possibile effettuare un'analisi comparativa tra i due stadi di sviluppo, evidenziando le differenze e le similarità nelle interazioni neuronali. *(ii)* Abbiamo definito il concetto di area funzionale del connettoma, collegandolo all'astrazione di livello superiore del tipo di cellula nella larva e a quella di superclasse nell'adulta. Sarebbe utile studiare le proprietà delle diverse aree sia nella larva che nell'adulta per cercare di comprendere somiglianze e differenze. *(iii)* Sarebbe interessante integrare nei pattern riferimenti agli emisferi, per valutare la possibile presenza di alcune funzioni su cui un emisfero è più specializzato dell'altro. *(iv)* Sarebbe utile determinare come i pattern più rilevanti influenzano il comportamento di Drosophila in diversi contesti. *(v)* Sarebbe interessante verificare la possibilità di incorporare il connettoma completo di Drosophila e i pattern più rilevanti in esso identificati nei modelli computazionali del cervello e analizzare i loro effetti sul comportamento simulato. *(vi)* Sarebbe stimolante esplorare se le strutture dei pattern siano una caratteristica comune a diverse specie, nel qual caso si potrebbero ottenere interessanti intuizioni sui principi generali dell'organizzazione cerebrale.

Bibliografia

ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D. e AMANATIDES, P. G. (2000), «The genome sequence of Drosophila melanogaster», *Science*, vol. 287, p. 2185–2195, doi: 10.1126/science.287.5461.2185. (Cited at page 14)

ARIAS-VERGARA, T., VÁSQUEZ-CORREA, J. C. e OROZCO-ARROYAVE, J. (2017), «Parkinson's disease and aging: analysis of their effect in phonation and articulation of speech», *Cognitive Computation*, vol. 9, p. 731–748, springer. (Cited at page 1)

BARABÁSI, D., BIANCONI, G., BULLMORE, E., BURGESS, M., CHUNG, S., ELIASSI-RAD, T., GEORGE, D., KOVÁCS, I., MAKSE, H., NICHOLS, T., PAPADIMITRIOU, C., SPORNS, O., STACHENFELD, K., TOROCZKAI, Z., TOWLSON, E., ZADOR, A., ZENG, H., BARABÁSI, A., BERNARD, A. e BUZSÁKI, G. (2023), «Neuroscience Needs Network Science», *Journal of Neuroscience*, vol. 43(34), p. 5989–5995, society of Neuroscience. (Cited at pages 9 e 12)

BURNS, G. e YOUNG, M. (2000), «Analysis of the connectional organisation of neural systems associated with the hippocampus in rats», *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.*, vol. 355, p. 55–70. (Cited at page 2)

C.C. HILGETAG, G. B., YOUNG, M., O'NEILL, M. A. e SCANNELL, J. W. (2000), «Anatomical connectivity defines the organization of clusters of cortical areas in the macaque monkey and the cat», *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 355(1393), p. 91–110, https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0551. (Cited at page 2)

CORRADINI, E., MACCARONE, C., PARLAPIANO, F., RONCI, A., SPIGA, M., TERRACINA, G. e URSINO, D. (2024), «A Complex Network-Based Approach for Detecting and Characterizing Power Neurons in Drosophila», *Cognitive Computation*. (Cited at page 44)

DE IPIÑA, K. L., ALONSO, J., SOLÉ-CASALS, J., BARROSO, N., HENRIQUEZ, P., FAUNDEZ-ZANUY, M., TRAVIESO, C., ECAY-TORRES, M., MARTINEZ-LAGE, P. e EGUIRAUN, H. (2015), «On automatic diagnosis of Alzheimer's disease based on spontaneous speech analysis and emotional temperature», *Cognitive Computation*, vol. 7, p. 44–55, springer. (Cited at page 1)

DING, Z., FAHEY, P., PAPADOPOULOS, S., WANG, E., CELII, B., PAPADOPOULOS, C., KUNIN, A., CHANG, A., FU, J., DING, Z., PATEL, S., PONDER, K., MUHAMMAD, T., BAE, J., BODOR, A., BRITTAIN, D., BUCHANAN, J., BUMBARGER, D., CASTRO, M., COBOS, E., DORKENWALD, S., ELABBADY, L., HALAGERI, A., JIA, Z., JORDAN, C., KAPNER, D., KEMNITZ, N., KINN, S., LEE, K., LI, K., LU, R., MACRINA, T., MAHALINGAM, G., MITCHELL, E., MONDAL, S., MU,

S., NEHORAN, B., POPOVYCH, S., SCHNEIDER-MIZELL, C., SILVERSMITH, W., TAKENO, M., TORRES, R., TURNER, N., WONG, W., WU, J., YIN, W., YU, S., FROUDARAKIS, E., SINZ, F., SEUNG, H., COLLMAN, F., DA COSTA, N., REID, R., WALKER, E., PITKOW, X., REIMER, J. e TOLIAS, A. (2023), «Functional connectomics reveals general wiring rule in mouse visual cortex», *bioRxiv [Preprint]*, https://doi.org/10.1101/2023.03.13.531369. (Cited at page 8)

DORKENWALD, S., MATSLIAH, A., STERLING, A., SCHLEGEL, P., YU, S., MCKELLAR, C., LIN, A., COSTA, M., EICHLER, K., YIN, Y., SILVERSMITH, W., SCHNEIDER-MIZELL, C., JORDAN, C., BRITTAIN, D., HALAGERI, A., KUEHNER, K., OGEDENGBE, O., MOREY, R., GAGER, J., KRUK, K., PERLMAN, E., YANG, R., DEUTSCH, D., BLAND, D., SOREK, M., LU, R., MACRINA, T., LEE, K., BAE, J., MU, S., NEHORAN, B., MITCHELL, E., POPOVYCH, S., WU, J., JIA, Z., CASTRO, M., KEMNITZ, N., IH, D., BATES, A., E., N., FUNKE, J., COLLMAN, F., BOCK, D., JEFFERIS, G., SEUNG, H., MURTHY, M. e THE FLYWIRE CONSORTIUM (2023), «Neuronal wiring diagram of an adult brain», *bioRxiv [Preprint]*, doi:10.1101/2023.06.27.546656v2. (Cited at pages 23 e 28)

FELLEMAN, D. J. e ESSEN, D. C. V. (1991), «Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex», *Cerebral cortex*, vol. 1(1), p. 1–47, https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.1-a. (Cited at page 2)

FOULADI, S., SAFAEI, A., MAMMONE, N., GHADERI, F. e EBADI, M. J. (2022), «Efficient deep neural networks for classification of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment from scalp EEG recordings», *Cognitive Computation*, vol. 14 (4), p. 1247–1268, springer. (Cited at page 1)

FU, Z., CAPRIHAN, A., CHEN, J., DU, Y., ADAIR, J., SUI, J., ROSENBERG, G. e CALHOUN, V. (2019), «Altered static and dynamic functional network connectivity in Alzheimer's disease and subcortical ischemic vascular disease: shared and specific brain connectivity abnormalities», *Human Brain Mapping*, vol. 40(11), p. 3203–3221, wiley Periodicals. (Cited at page 1)

HILDEBRAND, D., CICCONET, M., TORRES, R., CHOI, W., QUAN, T., MOON, J., WETZEL, A., CHAMPION, A. S., GRAHAM, B., RANDLETT, O., PLUMMER, G., PORTUGUES, R., BIANCO, I., SAALFELD, S., BADEN, A., LILLANEY, K., BURNS, R., VOGELSTEIN, J., SCHIER, A., LEE, W., JEONG, W., LICHTMAN, J. e ENGERT, F. (2017), «Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish», *Nature*, vol. 545(7654), p. 345–349, https://doi.org/10.1038/nature22356. (Cited at page 8)

HUBERT, L. e SCHULTZ, J. (1976), «Quadratic assignment as a general data analysis strategy», *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, vol. 29 (2), p. 190–241, wiley Online Library. (Cited at page 49)

JEIBMANN, A. e PAULUS, W. (2009), «Drosophila melanogaster as a Model Organism of Brain Diseases», *Journal of Neurochemistry*, vol. 10(2)), p. 407–440, https://doi.org/10.3390/ijms10020407. (Cited at page 15)

KHANAM, K., SRIVASTAVA, G. e MAGO, V. (2023), «The homophily principle in social network analysis: A survey», *Multimedia Tools and Applications*, vol. 82 (6), p. 8811–8854, springer. (Cited at page 34)

LAPPALAINEN, J., TSCHOPP, F., PRAKHYA, S., MCGILL, M., NERN, A., SHINOMIYA, K., TAKEMURA, S., GRUNTMAN, E., MACKE, J. e TURAGA, S. (2023), «Connectome-constrained deep mechanistic networks predict neural responses across the fly visual system at single-uron resolution», *bioRxiv [Preprint]*, doi:10.1101/2023.03.11.532232. (Cited at page 11)

LARIVIÉRE, S., ROYER, J., RODRÍGUEZ-CRUCES, R., PAQUOLA, C., CALIGIURI, M., GAMBARDELLA, A., CONCHA, L., KELLER, S., CENDES, F., YASUDA, C., BONILHA, L., GLEICHGERRCHT, E., FOCKE, N., DOMIN, M., VON PODEWILLS, F., LANGNER, S., RUMMEL, C., WIEST, R., MARTIN, P., KOTIKALAPUDI, R., O'BRIEN, T., SINCLAIR, B., VIVASH, L., DESMOND, P., LUI, E., VAUDANO, A., MELETTI, S., TONDELLI, M., ALHUSAINI, S., DOHERTY, C., CAVALLERI, G., DELANTY, N., KÄLVIÄINEN, R., JACKSON, G., KOWALCZYK, M., MASCALCHI, M., SEMMELROCH, M., THOMAS, R., SOLTANIAN-ZADEH, H., DAVOODI-BOJD, E., ZHANG, J., WINSTON, G., GRIFFIN, A., SINGH, A., TIWARI, V., KREILKAMP, B., LENGE, M., GUERRINI, R., HAMANDI, K., FOLEY, S., RÜBER, T., WEBER, B., DEPONDT, C., ABSIL, J., CARR, S., ABELA, E., RICHARDSON, M., DEVINSKY, O., SEVERINO, M., STRIANO, P., TORTORA, D., KAESTNER, E., HATTON, S., VOS, S., CACIAGLI, L., DUNCAN, J., WHELAN, C., THOMPSON, P., SISODIYA, S., BERNASCONI, A., LABATE, A., MCDONALD, C., BERNASCONI, N. e BERNHARDT, B. (2022), «Structural network alterations in focal and generalized epilepsy assessed in a worldwide ENIGMA study follow axes of epilepsy risk gene expression», *Nature communications*, vol. 13(4320), p. 1–16, nature Portfolio. (Cited at page 1)

LAWRENCE, T. R., LORRAINE, P., SAM, C., MICHAEL, G. e ETHAN, B. (2001), «A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In Drosophila melanogaster», *Genome Research*, vol. 11, p. 1114–1125, doi: 10.1101/gr.169101. (Cited at page 15)

LESKOVEC, J., KLEINBERG, J. e FALOUTSOS, C. (2005), «Graphs over time: densification laws, shrinking diameters and possible explanations», in «Proceedings of the Eleventh ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery in Data Mining (KDD'05)», p. 177–187, Chicago, Illinois, USA, aCM, New York. (Cited at page 36)

LI, M., WANG, Y., TACHIBANA, M., RAHMAN, S. e KAGITANI-SHIMONO, K. (2022), «Atypical structural connectivity of language networks in autism spectrum disorder: A meta-analysis of diffusion tensor imaging studies», *Autism Research*, vol. 15(9), p. 1585–1602, wiley. (Cited at page 1)

LIN, A., YANG, R., DORKENWALD, S., MATSLIAH, A., STERLING, A., SCHLEGEL, P., YU, S., MCKELLAR, C., COSTA, M., EICHLER, K., BATES, A., ECKSTEIN, N., FUNKE, J., JEFFERIS, G. e MURTHY, M. (2024), «Network Statistics of the Whole-Brain Connectome of Drosophila», *bioRxiv [Preprint]*, doi:10.1101/2023.07.29.551086. (Cited at pages 2, 3, 15, 22, 23, 24, 31 e 44)

MEKYSKA, J., GALAZ, Z., KISKA, T., ZVONCAK, V., MUCHA, J., SMEKAL, Z., ELIASOVA, I., KOSTALOVA, M., MRACKOVA, M., FIEDOROVA, D., FAUNDEZ-ZANUY, M., SOLÈ-CASALS, J., GOMEZ-VILDA, P. e REKTOROVA, I. (2018), «Quantitative analysis of relationship between hypokinetic dysarthria and the freezing of gait in Parkinson's disease», *Cognitive Computation*, vol. 10, p. 1006–1018, springer. (Cited at page 1)

MILO, R., SHEN-ORR, S., ITZKOVITZ, S., KASHTAN, N., CHKLOVSKII, D. e ALON, U. (2002), «Network motifs: simple building blocks of complex networks», *Science*, vol. 298(5594), p. 824–827, https://doi.org/10.1126/science.298.5594.824. (Cited at pages 2 e 47)

PRÜSSING, K., VOIGT, A. e SCHULZ, J. B. (2013), «Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease», *Molecular Neurodegeneration*, vol. 8, https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-35. (Cited at page 15)

RYAN, K., LU, Z. e MEINERTZHAGEN, I. (2016), «The CNS connectome of a tadpole larva of Ciona intestinalis (L.) highlights sidedness in the brain of a chordate sibling», *eLife*, vol. 5, p. e16 962, https://doi.org/10.7554/eLife.16962. (Cited at pages 1, 5 e 8)

SARAH, L., PETER, K., B., S. J. e AARON, V. (2013), «Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases», *Journal of Neurochemistry*, vol. 127, p. 453–460, https://doi.org/10.1111/jnc.12446. (Cited at page 15)

SCANNELL, J., BLAKEMORE, C. e YOUNG, M. (1995), «Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex», *Journal of Neuroscience*, vol. 15, p. 1463–1483, springer. (Cited at page 2)

SCANNELL, J., BURNS, G., YOUNG, M., HILGETAG, C. e O'NEIL, M. (1999), «The connectional organization of the cortico-thalamic system of the cat», *Cerebral cortex*, vol. 9, p. 277–299, https://doi.org/10.1093/cercor/9.3.277. (Cited at page 2)

SCHLEGEL, P., YIN, Y., BATES, A., DORKENWALD, S., EICHLER, K., BROOKS, P., HAN, D., GKANTIA, M., DOS SANTOS, M., MUNNELLY, E., BADALAMENTE, G., CAPDEVILA, L., SANE, V., PLEIJZIER, M., TAMIMI, I., DUNNE, C., SALGARELLA, I., JAVIER, A., FANG, S., PERLMAN, E., KAZIMIERS, T., JAGANNATHAN, S., MATSLIAH, A., STERLING, A., YU, S., MCKELLAR, C., CONSORTIUM, F., COSTA, M., SEUNG, H., MURTHY, M., HARTENSTEIN, V., BOCK, D. e JEFFERIS, G. (2023), «Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing quantifies circuit stereotypy in Drosophila», *bioRxiv [Preprint]*, doi:10.1101/2023.06.27.546055v2. (Cited at pages vi, 23, 28 e 29)

SHAPSON-COE, A., JANUSZEWSKI, M., BERGER, D., POPE, A., WU, Y., BLAKELY, T., SCHALEK, R., LI, P., WANG, S., MAITIN-SHEPARD, J., KARLUPIA, N., DORKENWALD, S., SJOSTEDT, E., LEAVITT, L., LEE, D., TROIDL, J., COLLMAN, F., BAILEY, L., FITZMAURICE, A., KAR, R., FIELD, B., WU, H., WAGNER-CARENA, J., ALEY, D., LAU, J., LIN, Z., WEI, D., PFISTER, H., PELEG, A., JAIN, V. e LICHTMAN, J. (2024), «A petavoxel fragment of human cerebral cortex reconstructed at nanoscale resolution», *Science*, vol. 384(6696), https://doi.org/10.1126/science.adk4858. (Cited at page 8)

SPORNS, O. e KÖTTER, R. (2004), «Motifs in brain networks», *PLoS biology*, vol. 2(11), https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020369. (Cited at page 2)

SPORNS, O., TONONI, G. e KÖTTER, R. (2005), «The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain», *PLoS Computational Biology*, doi: 10.1371/journal.pcbi.0010042. PMID: 16201007; PMCID: PMC1239902. (Cited at page 5)

VERASZTÓ, C., JASEK, S., GÜHMANN, M., SHAHIDI, R., UEDA, N., BEARD, J., MENDES, S., HEINZ, K., BEZARES-CALDERÓN, L., WILLIAMS, E. e JÉKELY, G. (2020), «Whole-Animal Connectome and Cell-Type Complement of the Three-Segmented Platynereis Dumerilii Larva», *bioRxiv [Preprint]*, doi:10.1101/2020.08.21.260984. (Cited at pages 2, 5 e 8)

WHITE, J., SOUTHGATE, E., THOMSON, J. e BRENNER, S. (1986), «The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans», *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.*, vol. 314(1165), p. 1–340, royal Society. (Cited at pages 1, 2 e 5)

WINDING, M., PEDIGO, B., BARNES, C., PATSOLIC, H., PARK, Y., KAZIMIERS, T., FUSHIKI, A., ANDRADE, I., KHANDELWAL, A., VALDES-ALEMAN, J., LI, F., RANDEL, N., BARSOTTI, E., CORREIA, A., FETTER, R., HARTENSTEIN, V., PRIEBE, C., VOGELSTEIN, J., CARDONA, A. e ZLATIC, M. (2023), «The connectome of an insect brain», *Science*, vol. 379(6636), p. eadd9330, doi:10.1126/science.add9330. (Cited at pages 2, 3, 15, 19, 23, 31 e 44)

ZAR, J. (2014), «Spearman rank correlation: overview», *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, wiley Online Library. (Cited at page 41)

Sitografia

- AI4Business – www.ai4business.it
- Connectome Coordination Facility – www.humanconnectome.org
- JNeurosci, The Journal of Neuroscience –www.jneurosci.org
- Le Scienze– www.lescienze.it
- State of Mind, Il Giornale delle Scienze Psicologiche – www.stateofmind.it
- Wikipedia – www.wikipedia.org

Ringraziamenti

Studiare non è mai semplice, non è sempre bello, né sempre soddisfacente o appagante nel breve termine. Studiare richiede impegno, sacrificio e costanza, ma è fondamentale per la crescita personale e professionale. Studiare significa avere la possibilità di acquisire conoscenze, alimentare la propria curiosità e, soprattutto, significa porre le basi per la realizzazione dei propri obiettivi e delle proprie ambizioni a lungo termine.

Studiare o frequentare l'università non è qualcosa che tutti possono permettersi. Spesso si sottovaluta la fortuna che si ha di poterlo fare. Forse l'ho fatto anche io, quando, stanca, ho pensato più volte di mollare.

Per questo, dedico questo percorso e la tesi che lo conclude prima di tutto a me stessa, per aver creduto in me e non essermi arresa di fronte alle difficoltà. Per una volta, posso sinceramente dire che sono stata brava. Spero che i sacrifici fatti in questi anni siano ricompensati con un futuro che mi renda orgogliosa di ciò che sono e di ciò che sarò.

Lo dedico anche ai miei genitori, per avermi sostenuto e incoraggiato sempre, credendo in me molto più di quanto io abbia fatto. Spero che possano essere orgogliosi di me, delle scelte che ho fatto e che farò.

Lo dedico a mia nonna Maria, che forse, dopo cinque anni, non riesce ancora a capire completamente cosa studio, poiché è qualcosa di distante dalla sua generazione. Nonostante ciò, ogni volta, vedendomi studiare, mi chiedeva sempre cosa studiassi, quali esami avessi sostenuto e quali fossero i prossimi che avrei preparato, per poi fermarsi lì, in fondo alla mia scrivania, a guardarmi con gli occhi pieni di amore, silenziosamente, per non disturbarmi.

Lo dedico a tutti i miei amici che, inconsapevolmente, mi hanno aiutata a distrarmi, mi hanno fatto divertire e ridere, dopo una lunga giornata di studio. Tra tutti, dedico un pensiero speciale a Giulia, quell'amica vera che ognuno di noi dovrebbe avere, con quale senti di poter parlare liberamente di tutto, di poterti sfogare, sapendo di non essere giudicata. Ovunque le nostre strade ci porteranno, lontane o vicine, io ci sarò sempre e so che tu ci sarai per me.

Lo dedico poi a Federica, che ho incontrato al primo esame e che ho conosciuto sempre di più esame dopo esame, progetto dopo progetto. Lei è un'anima pura e gentile, piena di altruismo e sempre pronta ad aiutare tutti. Nonostante le nostre differenze, è la persona alla quale mi sono legata di più. La sua presenza ha reso questo percorso più speciale e meno duro.

Lo dedico, infine, al Professore Domenico Ursino, per avermi insegnato tanto, per avermi guidata in questo lavoro di tesi e per avermi aiutata a trovare il lavoro che desideravo fare una volta conclusa l'università.