



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**ESTADOS FUNCIONALES EN EL DISPARO DE LAS
NEURONAS NEOESTRIATALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LUIS ALBERTO CARRILLO REID

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Bargas Díaz.

A lo largo del Doctorado conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Posgrado (DGEP)

ÍNDICE

Abreviaciones	i
Resumen	1
Summary	2
I, Introducción	
- Los ganglios basales	3
- Funciones relacionadas con los ganglios basales	
- Desórdenes motores	5
- Enfermedades neuropsiquiátricas	5
- Memoria y aprendizaje	7
- Codificación de estados funcionales en redes neuronales biológicas	8
- Patrones de actividad en sistemas neuronales	9
- Microcircuitos neuronales	13
- Propiedades intrínsecas de las neuronas	15
- Dinámica sináptica	19
- Propiedades de composición en sistemas neuronales	22
- Patologías	24
- Importancia fisiológica	27

II. Planteamiento del problema	31
- Preguntas a responder	32
- Objetivo	33
-Objetivos particulares	33
- Hipótesis	34
III. Métodos	
- Preparación de rebanadas de tejido cerebral para el registro <i>in vitro</i>	35
- Imágenes de calcio	35
- Inmunohistoquímica	37
- Fármacos	38
- Electrofisiología	38
- Análisis de imágenes	39
- Herramientas matemáticas	
- Identificación de los estados de la red neuronal	40
- Identificación de ciclos cerrados de actividad	43

IV. Resultados

- Registros ópticos de poblaciones neuronales en el microcircuito neoestriatal	46
- La estimulación cortical sincroniza neuronas estriatales anatómicamente dispersas	50
- Actividad de red provocada por una entrada excitadora tónica	51
- Visualización de estados funcionales durante la dinámica de la red	58
- Generación de patrones que representan estados funcionales sostenidos por ensambles neuronales	62
- Mecanismos básicos que mantienen la dinámica de la red en el microcircuito neoestriatal	66
- Las interneuronas coordinan la actividad secuencial de los ensambles neuronales	72
- Modulación colinérgica en el disparo correlacionado de los elementos del microcircuito neoestriatal	76
- Modulación colinérgica de los estados funcionales en la red neoestriatal	83
- El incremento de la actividad colinérgica promueve la organización de los ensambles neuronales en ciclos cerrados recursivos	87
- El incremento del tono colinérgico induce la propiedad de composición en los ensambles neuronales del neoestriado	94
- Propiedad de priming en los ciclos cerrados neoestriatales	96

- Cambio en la zona de conductancia con pendiente negativa producido por la activación de los receptores muscarínicos	99
- Corrientes entrantes que mantienen la conductancia con pendiente negativa generada por la modulación muscarínica	102
- El bloqueo de la corriente de sodio persistente revierte el incremento en la sincronía generado por la modulación muscarínica	106
- Dinámica de la red en rebanadas de animales hemiparkinsonianos	108
V. Discusión	112
- Transiciones del potencial de membrana en las neuronas neoestriatales	113
- Mecanismos que producen la dinámica de red en el microcircuito neoestriatal	115
- Probables procesos de memoria originados por la asociación de ensambles neuronales	119
- Construcción de microcircuitos compuestos	120
- Organización de ciclos cerrados de actividad recurrente	122
- Mecanismos que sostienen la formación de los ciclos cerrados neoestriatales	123
- Corrientes iónicas involucradas en el comportamiento biestable	125
- Implicaciones funcionales y perspectivas	126
Bibliografía	131

Apéndice

Publicaciones durante el doctorado

150

- Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol.* 2008.
- Codificación de estados funcionales en redes neuronales biológicas. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas.* 2008.
- Diversity of up-state voltage transitions during different network states. In: *Cortico-subcortical dynamics in Parkinson Disease.* 2008. (In press).
- Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol.* 2007.
- Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *PNAS.* 2007.
- Diseño modular de instrumentación virtual para la manipulación y el análisis de señales electrofisiológicas. *Rev Mex Ing Biomed.* 2006.
- Different inhibitory inputs onto neostriatal projection neurons as revealed by field stimulation. *J Neurophysiol.* 2005.

RESUMEN

Se piensa que los ensambles neuronales del estriado codifican estados funcionales relacionados con el aprendizaje asociativo, la memoria de procedimientos y la organización secuencial de distintos comportamientos. El sistema colinérgico modula los procesos de memoria en el estriado y en otras estructuras cerebrales. Sin embargo aún se desconoce cómo los microcircuitos estriatales componen los trazos de memoria. Por medio del registro electrofisiológico en célula entera y el uso de imágenes de calcio investigamos la modulación colinérgica de los ensambles neuronales estriatales, los cuales se caracterizan por exhibir estados de actividad sincronizada. Dicha actividad se alterna continuamente entre diferentes poblaciones neuronales. Analizamos la modulación colinérgica de las dinámicas de la red estriatal con técnicas de reducción multidimensional y otros algoritmos matemáticos. Encontramos que la activación del sistema colinérgico habilita a los ensambles neuronales estriatales con propiedades que antes sólo habían sido adscritas teóricamente a redes neuronales artificiales capaces de almacenar información. Por medio del uso de teoría de gráficas aplicada a los estados de la red estriatal fue posible encontrar secuencias de vectores neuronales con dinámicas recursivas similares a la actividad de los llamados ensambles neuronales. Dichos ciclos tienen una estructura modular y están organizados en jerarquías. Estos resultados experimentales llevan a la conclusión de que el sistema colinérgico habilita al microcircuito neostriatal con la capacidad de componer secuencias complejas de actividad neuronal. Ha sido propuesto que redes neuronales recurrentes con

las características mostradas en los presentes experimentos permitirían a las secuencias de actividad repetitivas convertirse en memorias, y a las memorias repetitivas componer nuestros hábitos.

SUMMARY

Striatal cell assemblies are thought to encode functional network states related to associative learning, procedural memory and the sequential organization of behavior. The cholinergic system modulates memory processes in the striatum and other brain structures. How striatal microcircuits compose memory traces is still unknown. We used whole cell and calcium imaging techniques to investigate the cholinergic modulation of striatal cell assemblies which exhibit several properties such as synchronous states of activity and the alternation of this activity among different neuron pools. We analyzed the cholinergic modulation of the network dynamics with multidimensional reduction techniques and several mathematical algorithms. The activation of the cholinergic system enables striatal cell assemblies with properties that have been ascribed to neural networks with memory storage capabilities. Graph theory techniques applied to striatal network states revealed sequences of vectors with a recursive dynamics similar to closed reverberating cycles. The cycles exhibit a modular structure and a hierarchical organization. We concluded that the cholinergic system enables the striatal microcircuit with the ability to compose complex sequences of activity. Neuronal recurrent networks with the characteristics encountered in the present experiments are proposed to allow

repeated sequences of activity to become memories, and repeated memories to compose habits.

INTRODUCCIÓN

Los ganglios basales

Los ganglios basales son un grupo de estructuras subcorticales que comprenden distintos núcleos (**Figura 1**). El funcionamiento de cada uno de ellos es de gran importancia desde el punto de vista clínico. Diversas lesiones de los ganglios basales generan desórdenes motores devastadores tales como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington. Aunado a ello, los ganglios basales están implicados en distintas enfermedades neuropsiquiátricas. También se sabe que durante estados relacionados con problemas de adicción la función de los ganglios basales se encuentra alterada. Finalmente, los ganglios basales juegan un papel determinante en el aprendizaje y la memoria de procedimientos y hábitos (Graybiel, 2000).

El estriado es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales, recibe aferencias de la corteza cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo (Wichmann, 1999; Bolam et al. 2000). La muerte de las neuronas del estriado produce distintas patologías como la enfermedad de Huntington y otros desórdenes hiperkinéticos (Wichmann y DeLong, 2003). El globo pálido (que contiene un segmento externo y otro interno) recibe la mayoría de las salidas estriatales. Éste es uno de los sitios blanco para lesiones terapéuticas (palidotomía) y estimulaciones eléctricas que buscan mejorar los signos de la

enfermedad de Parkinson (Lozano et al. 1995). El núcleo subtalámico juega un papel determinante en el control de la actividad del globo pálido, por lo cual se ha ido incrementando la frecuencia de procedimientos quirúrgicos para estimularlo eléctricamente con el objetivo de tratar la enfermedad de Parkinson (Ostergaard et al. 2002). La sustancia nigra, formada por dos regiones: la pars compacta y la pars reticulata; también es crítica para el funcionamiento de los ganglios basales. La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta produce la enfermedad de Parkinson (Ehringer y Hornykiewicz, 1960).

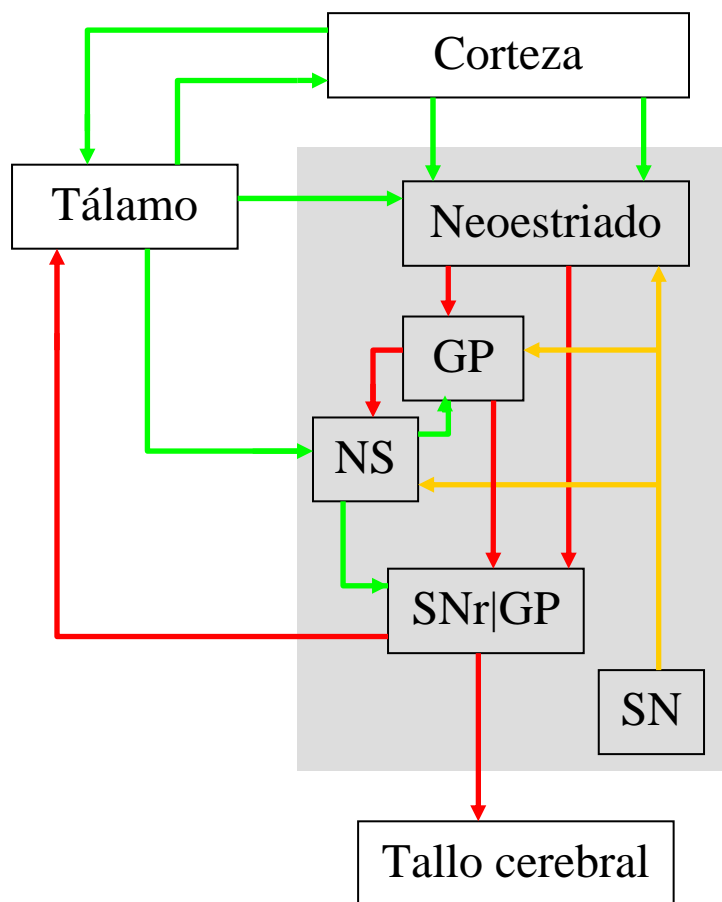


Figura 1. Esquema simplificado que ilustra la organización de los ganglios basales. Las líneas rojas indican aferencias inhibitorias, las líneas verdes indican aferencias excitadoras y las líneas amarillas indican aferencias dopaminérgicas.

Funciones relacionadas con los ganglios basales:

Desórdenes motores

El modelo sobre el funcionamiento de los ganglios basales más utilizado durante los últimos años, postula la existencia de dos vías que compiten entre ellas para facilitar (vía directa; neuronas neoestriatales que expresan receptores del tipo D1) o inhibir (vía indirecta; neuronas neoestriatales que expresan receptores del tipo D2) el movimiento (Germen et al, 1990). Desde el punto de vista más simple, la dificultad para realizar movimientos durante la enfermedad de Parkinson resulta de la sobre activación de la vía indirecta; mientras que el exceso de movimientos en desórdenes como la enfermedad de Huntington se produce por la sobre activación de la vía directa. También ha sido propuesto que el antagonismo entre ambas vías podría ayudar a seleccionar comandos específicos suprimiendo los movimientos no deseados, dando lugar a un sistema de retroalimentación que controla la generación de secuencias motoras (Albin et al. 1989). Existen diversas controversias sobre la fiabilidad de este modelo, sin embargo hasta la fecha no ha sido propuesta otra alternativa que explique mejor la funcionalidad de los ganglios basales (Takakusaki et al. 2004; Hutchison et al. 2004).

Enfermedades neuropsiquiátricas

Los síntomas neuropsiquiátricos que se presentan durante padecimientos neurodegenerativos tales como como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington han sido interpretados como problemas coexistentes

o secundarios a los padecimientos principales, sin embargo cada vez existe más evidencia mostrando que podrían ser signos y síntomas primarios (Albin y Mink, 2006; Graybiel y Rauch, 2000). Distintos métodos de imágenes funcionales han creado la posibilidad de detectar el mal funcionamiento de los ganglios basales durante desórdenes neuropsiquiátricos, dichos métodos permiten la detección de anomalías metabólicas en el cerebro incluso cuando no hay evidencia de neurodegeneración considerable; lo cual sucede en la mayoría de las enfermedades neuropsiquiátricas (Leckman y Riddle, 2000). Así, se han observado anomalías metabólicas en los ganglios basales en pacientes con trastorno obsesivo compulsivo (TOC) y con el síndrome de Tourette. Durante el TOC se ha visto una actividad anormal en el núcleo caudado. Estudios en pacientes con el síndrome de Tourette también muestran actividad anormal en el estriado, principalmente en el putamen (Albin y Mink, 2006). Incluso han sido encontrados comportamientos compulsivos en pacientes que tienen lesiones focales en el estriado o en el globo pálido (Graybiel y Rauch, 2000). Por otro lado, procedimientos de estimulación eléctrica en zonas profundas del cerebro sugieren que los ganglios basales podrían producir directamente síndromes neuropsiquiátricos. Por ejemplo, se han producido episodios depresivos severos debidos a la estimulación de la sustancia nigra, dichos episodios son seguidos por un periodo eufórico una vez que la estimulación se interrumpe (Bejjani et al. 1999). Además varios estudios han implicado al estriado, al globo pálido y al área ventral tegmental en la patogénesis de la esquizofrenia. Los estudios muestran que varios núcleos de los ganglios basales están directamente

relacionados con desórdenes neuropsiquiátricos, entender el funcionamiento de cada uno de ellos en condiciones normales es indispensable para proponer nuevas soluciones durante los estados patológicos.

Memoria y aprendizaje

Evidencias experimentales sugieren que el estriado está implicado en procesos de memoria implícita (Kim et al. 2007), es decir, respuestas automáticas que no es necesario hacer conscientes para llevarlas a cabo, como andar en bicicleta o manejar un vehículo; dichos procedimientos se asemejan mucho a los hábitos que determinan nuestra vida cotidiana (Graybiel, 2008). Otros estudios que involucran el aprendizaje de procedimientos motores han encontrado cambios significativos en la actividad global de las neuronas estriatales. Lesiones focales realizadas en el estriado después del periodo de aprendizaje generan dificultades para ejecutar tareas específicas. Dichos resultados sugieren que cambios en la actividad del microcircuito estriatal son necesarios para el aprendizaje y la formación de nuevos hábitos (Barnes et al. 2005).

¿Cómo es que los ganglios basales pueden realizar funciones tan diversas? Una primera alternativa es que los mamíferos nazcan con algunos microcircuitos necesarios para la supervivencia (succión, locomoción, respiración, expresiones faciales de los estados de ánimo, conductas oculomotoras complejas para preservar el equilibrio o explorar el ambiente, etc.). (Blair, 2003; Grillner, 2006). Dichos microcircuitos se conocen como

generadores centrales de patrones (*central pattern generators* o CPGs en inglés). Otra alternativa es que se formen microcircuitos nuevos durante el aprendizaje, los cuales podrían componerse gracias a la modificación de los circuitos originales (Graybiel, 2008).

Debería ser posible estudiar dichas estructuras desde un punto de vista celular lo cual permitiría entender el mecanismo básico de procesos aparentemente diversos y contradictorios (Graybiel, 2000). Una posibilidad consiste en descifrar la forma en la cual los microcircuitos neuronales de los ganglios basales procesan la información y codifican diversos estados funcionales. En 1949 Donald Hebb propuso que la actividad reverberante de pequeños circuitos neuronales llamados “ensambles celulares” (en inglés: Cell Assemblies) funcionaría como el sustrato sobre el cual se construyen los procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, para poder manejar y almacenar cualquier tipo de información compleja, los microcircuitos neuronales deberían tener distintas capacidades como la habilidad de sincronizarse y formar secuencias de actividad entre distintos grupos neuronales organizados en jerarquías, o aun la propiedad de componer procedimientos (algoritmos) elaborados a partir de pequeñas subrutinas representadas en la actividad neuronal. Por lo tanto en el presente trabajo de tesis investigamos si era posible observar microcircuitos neuronales biológicos que cumplieran con dichas propiedades. De ser factible, podríamos comenzar a descifrar la manera en que se almacenan y ejecutan diversos programas

(rutinas) dentro de cualquier microcircuito neuronal entendiendo las leyes que controlan su dinámica durante distintos estados funcionales.

Codificación de estados funcionales en redes neuronales biológicas

El entendimiento global de todos los procesos llevados a cabo por el cerebro necesita la integración de distintas disciplinas, desde las matemáticas hasta la filosofía, pasando por la biología, la química, la ingeniería y la neurofisiología.

Desde un punto de vista sistémico, la creación de nuevas técnicas ha permitido demostrar que existen funciones específicas asociadas con la actividad de ciertos núcleos del cerebro y que la manera en que se comunican los diferentes ensambles neuronales está íntimamente ligada con las conexiones que se establecen entre los elementos básicos del sistema (Yoshimura et al. 2005) así como por sus propiedades biofísicas o intrínsecas (Kiehn y Eken, 1998). Existen distintas variables involucradas en la generación de diferentes patrones de actividad en los sistemas neuronales, cada una de ellas tiene un papel determinante tanto en los estados funcionales normales como en los patológicos.

Patrones de actividad en sistemas neuronales

Tanto *in vivo* como *in vitro*, ha sido mostrado que el disparo de diferentes tipos de neuronas se caracteriza por exhibir transiciones entre dos estados estables del potencial de membrana: un estado inactivo cercano al potencial de reposo y

un estado activo despolarizado (Wilson, 1993; Vergara et al. 2003; Carrillo-Reid et al. 2008) (**Figura 2**). Debido a su dinámica espacio-temporal estereotipada, los estados activos (*up states*) que se presentan de manera correlacionada en distintos elementos de una red pueden funcionar como atractores, es decir, propiedades emergentes de redes neuronales que pueden implementar estados relacionados con procesos de memoria o soluciones a problemas computacionales (Cossart et al. 2003). Los atractores están teóricamente definidos como estados estables en la dinámica de redes, estas propiedades se presentan durante picos de actividad sincrónica (**Figura 3**), durante los cuales o en la cercanía de ellos, las secuencias de grupos coactivos de neuronas tienden a ser repetitivas (Carrillo-Reid et al. 2008; Cossart et al. 2003).

La actividad sincrónica de poblaciones neuronales ocurre en diversos microcircuitos cerebrales de una manera que es modulada por el comportamiento y la entrada sensorial (Traub et al. 2001). La activación de secuencias que se repiten podría estar relacionada con la memoria de trabajo, definida como el mantenimiento activo de pequeñas cantidades de información por breves periodos de tiempo cuya función es guiar procesos del pensamiento o secuencias en el comportamiento (Lewis et al. 2005). Dichas señales podrían ser útiles para planear y controlar movimientos (Beiser et al. 1997).

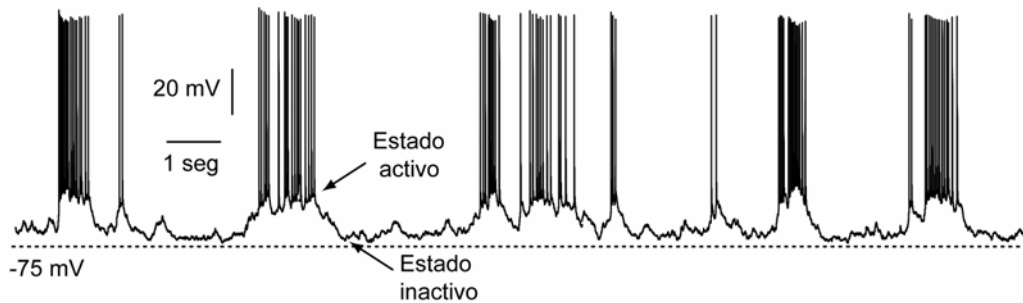


Figura 2. Oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana de las neuronas espinosas medianas. Registro electrofisiológico de una neurona espinosa mediana en fijación de corriente. Nótese la existencia de un estado inactivo (hiperpolarizado) y de un estado activo (despolarizado) en donde pueden presentarse ráfagas de potenciales de acción.

¿Cómo guardamos un objeto en la mente? ¿Cómo persisten los disparos neuronales en una red distribuida aun en ausencia de entradas sensoriales? ¿Cómo se guardan las habilidades motoras adquiridas? Hebb sugirió que la activación sostenida en un sistema distribuido es mantenida por la actividad reverberante de circuitos neuronales recurrentes, llamados “ensambles neuronales” (Hebb, 1949; Tallon-Baudry et al. 2001).

Un primer candidato para la comunicación a través de sistemas distribuidos en el cerebro humano es la sincronización de los elementos de la red. Se ha visto que ciertos patrones característicos de sincronización espacio-temporal están ligados con distintos estados de atención, lo cual conduce a diversos comportamientos. Estudios de registros intracraneales en humanos muestran que regiones limitadas, separadas por unos centímetros, se

sincronizan en diversas tareas de memorización de corto plazo. El aumento general de la sincronización también puede representar un estado de sensibilidad incrementada hacia los estímulos relevantes (mayor vigilancia). Algo similar al aumento del disparo neuronal durante periodos de atención focalizada (Gross et al. 2004).

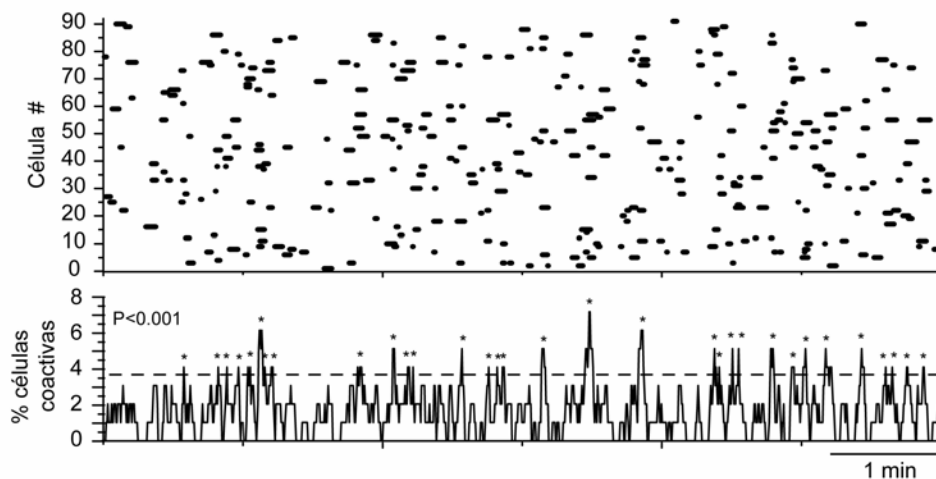


Figura 3. Actividad de red con estados sincronizados. Arriba: Gráficas de la actividad global del microcircuito neocortical. Cada renglón representa una célula activa y cada columna representa un instante de tiempo. Abajo: Histograma de la actividad mostrada en el panel superior. Nótese la existencia de picos de sincronía estadísticamente significativos (asteriscos), en donde grupos de neuronas tienen actividad al mismo tiempo de manera espontánea.

¿Cuáles son los mecanismos comunes que gobiernan la comunicación y cómo se relacionan con la estructura de los microcircuitos neuronales? ¿Cómo es que la sincronización oscilatoria promueve la comunicación neuronal? ¿Cuáles son las consecuencias de una sincronización anormal?

La comunicación neuronal se define como la transferencia de aspectos funcionales entre los elementos de una red. Depende tanto de los componentes anatómicos (estructura) como de los procesos encargados de transmitir la información (funciones). Procesos anormales en la sincronización han sido asociados con diversos desórdenes tales como: la epilepsia, la esquizofrenia, la demencia y la enfermedad de Parkinson (Schnitzler y Gross, 2005).

Las evidencias muestran que existen diferentes patrones espacio-temporales de actividad en distintas redes neuronales, algunos dependen principalmente de las propiedades intrínsecas de las neuronas (Guertin y Hounsgaard, 1998; Peña et al. 2004; Ibáñez-Sandoval et al. 2007), otros del comportamiento grupal de las mismas (Brown et al. 2005; Carrillo-Reid et al. 2008; Sasaki et al. 2007) y otros más de la forma en que se establecen las conexiones dentro del sistema (Silberberg et al. 2004). Sin embargo, falta mucho por conocer acerca de cómo todas estas variables codifican los estados de salida en un microcircuito neuronal y sobretodo saber si los estados funcionales de un mismo circuito dependen del estímulo y el contexto.

Microcircuitos neuronales

Existen varios escenarios para tratar de entender la manera en la cual se realizan las operaciones en un microcircuito neuronal:

I. Que neuronas vecinas con dendritas sobrelapadas compartan entradas comunes aleatorias. Para que funcione un módulo de este tipo, la información debe ser promediada por medio de los distintos elementos para crear una salida uniforme con una función específica (Harris, 2005).

II. Que las neuronas conectadas entre sí compartan las entradas. Las conexiones recíprocas podrían entonces servir para modular la actividad entre diferentes subgrupos y realizar tareas comunes (Yoshimura et al. 2005).

III. Que la representación de la información esté dada principalmente por la tasa de disparo de las neuronas individuales. Esto permitiría a una misma neurona la posibilidad de codificar diferentes funciones dependiendo de su frecuencia de disparo (*rate code*). En este caso, el énfasis se pone en el individuo: la neurona.

IV. Que los estados funcionales estén codificados en “ensambles neuronales”, esto es, células dispersas anatómicamente pero cuya actividad en común forme ciclos cerrados y recurrentes de actividad correlacionada con rutas preferenciales (Hebb, 1949; Huyck, 2001).

Existen muchas controversias en cuanto a la manera de estudiar la actividad de los microcircuitos neuronales; algunos infieren la actividad de poblaciones neuronales por medio de registros de campo (Berke et al. 2004); otros usan arreglos con matrices de electrodos para registrar extracelularmente

varios sitios anatómicamente dispersos (Lebedev et al. 2008; Plenz y Thiagarajan, 2007); y algunos más utilizan registros ópticos que miden indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas (Carrillo-Reid et al. 2008; Ikegaya et al. 2004; Mao et al. 2001; Huber et al. 2008). Todas estas técnicas presentan ventajas y desventajas dependiendo de la pregunta que se quiera contestar, sin embargo gracias al avance tecnológico próximamente será posible registrar varios núcleos del cerebro *in vivo* en tiempo real y con resolución de célula única. La utilización de métodos de registro *in vitro*, como el de las rebanadas de cerebro, para tratar de estudiar el comportamiento de redes o microcircuitos neuronales, aún sigue presentando controversias. Generalmente se utilizan medios farmacológicos para la generación de patrones de actividad específicos, debido a que las conexiones necesarias para que exista la actividad espontánea han sido dañadas. Sin embargo existen ciertos cortes o modelos patológicos en donde los ritmos pueden encontrarse sin la necesidad de manipulación farmacológica, lo cual sugiere que es posible preservar la arquitectura de ciertos ensamblajes neuronales. Las preparaciones que conserven a los distintos microcircuitos neuronales permitirán entender las relaciones entre sus elementos así como su desempeño bajo distintas condiciones farmacológicas (Kano et al. 2005).

Propiedades intrínsecas de las neuronas

Las conductancias activas juegan un papel importante en la generación de patrones espacio-temporales debido a la expresión de potenciales en meseta

(*plateaus*). Un potencial *plateau* es un potencial de membrana estable que está más despolarizado que el potencial de membrana en reposo (**Figura 4**). Cuando un potencial *plateau* es iniciado la célula puede disparar potenciales de acción en ausencia de excitación sináptica sostenida. Una despolarización transitoria de suficiente amplitud y duración puede iniciar un potencial en meseta. La meseta puede persistir durante minutos antes de terminar espontáneamente o de ser apagada por una entrada sináptica inhibitoria. Además, los potenciales en meseta son regulados por distintos neuromoduladores (Grillner et al. 1981; Guertin y Hounsgaard, 1998; Vergara et al. 2003).

Utilizando un campo eléctrico que despolariza a las dendritas e hiperpolariza al soma; Hounsgaard y Kiehn (Hounsgaard y Kiehn, 1993) mostraron que la corriente entrante persistente, encargada de mantener los potenciales en meseta, está localizada principalmente en las dendritas distales. La misma conclusión fue alcanzada cuando la meseta fue provocada a través de entradas sinápticas. Dichas mesetas pueden ser generadas tanto por corrientes de sodio como de calcio (Hsiao et al. 1998; Peña et al. 2004).

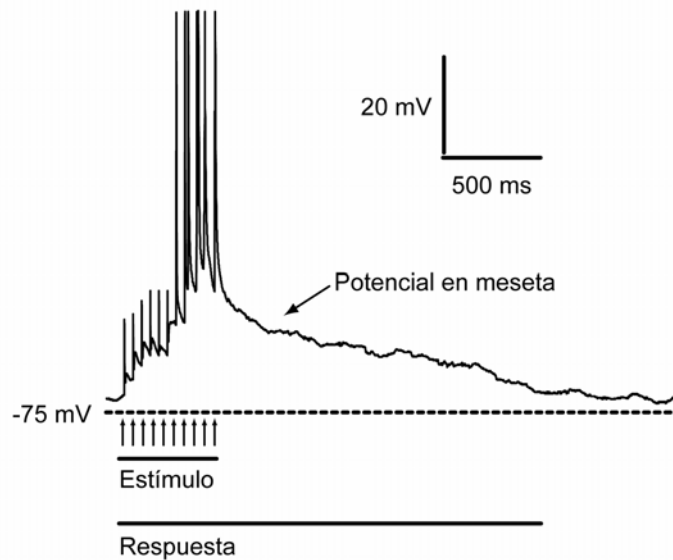


Figura 4. Potencial en meseta o *plateau*. Respuesta de una neurona espinosa mediana ante un estímulo cortical repetitivo (flechas). Nótese que la respuesta de la neurona tiene una duración mayor al estímulo que la provocó. Dicha despolarización es sostenida en parte por corrientes iónicas entrantes persistentes.

Una célula que tiene potenciales en meseta expresa una región de conductancia con pendiente negativa y tres cruces por el eje del voltaje en la función corriente-voltaje (**Figura 5**). Lee y Heckman (Lee y Heckman, 1998) demostraron que el umbral de la meseta corresponde al punto de pendiente cero. Se sabe que existen dos tipos de neuronas motoras: las motoneuronas lentas tienen el menor umbral para ser reclutadas en los movimientos y el umbral del *plateau* se encuentra abajo o muy cercano al umbral del potencial de acción; las motoneuronas rápidas, las cuales son reclutadas posteriormente en los movimientos, tienen un umbral superior al del potencial de acción para la generación de la meseta. Estos hallazgos sugieren que las propiedades

intrínsecas de las neuronas están implicadas directamente en la realización de distintas funciones motoras.

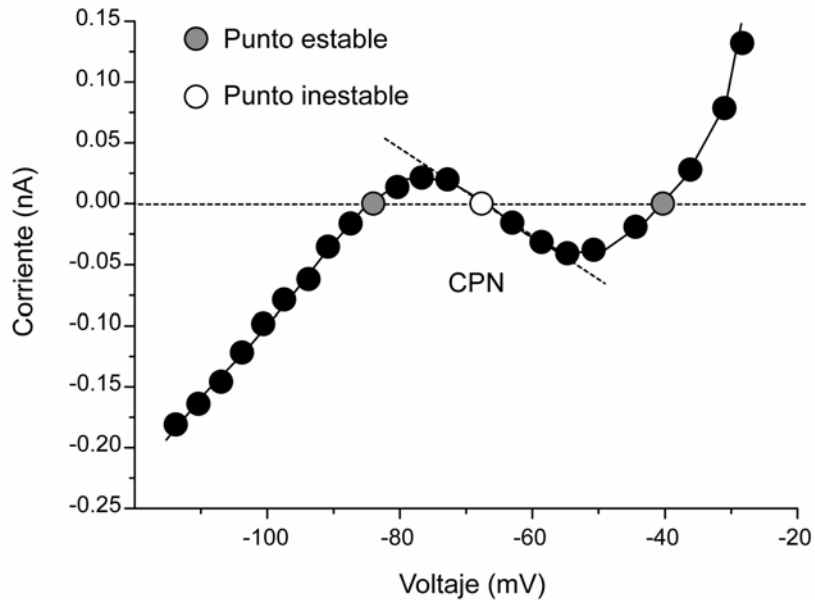


Figura 5. Biestabilidad mediada por las propiedades intrínsecas. Relación corriente voltaje (I-V) medida en fijación de voltaje en una neurona espinosa mediana. La zona de conductancia con pendiente negativa fue provocada por la activación de los receptores NMDA. Nótese los tres puntos que cruzan el eje del voltaje, dos puntos estables y un punto inestable.

Los potenciales en meseta sirven para mantener el disparo sin la necesidad de entradas sinápticas sostenidas o continuas, por lo tanto, la activación de las mesetas tiende a desacoplar la generación de espigas postsinápticas de la variabilidad de entradas presinápticas, lo cual favorece un disparo más estable y predecible (Carrillo-Reid et al. 2008). Además, durante las mesetas la conductancia de entrada se incrementa por lo cual las entradas sinápticas son menos efectivas, reduciéndose así la naturaleza estocástica de las entradas presinápticas (Kiehn y Eken, 1998). Esto sugiere que no es

necesaria una misma entrada fásica robusta para provocar ráfagas de potenciales de acción en varias células al mismo tiempo, sino que basta con que lleguen secuencias temporalmente similares para provocar mesetas simultáneas, a pesar de que provengan de fuentes distintas. Ahora es posible evaluar la presencia de potenciales *plateau* en organismos intactos, incluyendo humanos, y de averiguar el papel funcional de las mesetas en el control motor, así como en la transferencia de información dentro del cerebro (Kiehn y Eken, 1998).

Dinámica sináptica

Se ha prestado mucha atención al papel de la plasticidad sináptica, tanto a la facilitación como a la depresión de corto plazo, en el modelado de la actividad de redes. Varios estudios muestran que la depresión sináptica en redes motoras rítmicas puede cambiar la frecuencia de oscilación en una red pasando de las propiedades intrínsecas de las neuronas hacia las propiedades sinápticas. La plasticidad sináptica de corto plazo está envuelta también en la estabilización y reconfiguración de circuitos motores y en el inicio, mantenimiento y modulación de programas relacionados con el movimiento (Tecuapetla et al. 2007). Por otro lado, se sabe que la neuromodulación es la piedra de toque para esculpir diversas redes motoras funcionales mediante los mismos circuitos anatómicos ya establecidos (Nadim y Manor, 2000).

Una entrada que comanda promueve una acción directa sobre la red, mientras que una entrada moduladora puede modificar el estado de los microcircuitos neuronales en una manera que afecta el procesamiento de los programas (Schnitzler y Gross, 2005).

En el modelo de Hebb (Hebb, 1949) el disparo sostenido coincidente es necesario para incrementar la eficiencia sináptica, una característica necesaria para habilitar la transición entre memorias de corto y de largo plazo (Tallon-Baudry et al. 2001).

Las corrientes sinápticas con probabilidad de liberación baja incrementan paulatinamente su magnitud durante la activación repetitiva. Este fenómeno fisiológico descrito en los años 40 en la unión neuromuscular fue llamado facilitación de corto plazo. En cambio, en las sinapsis con una probabilidad de liberación alta, las amplitudes de las corrientes sinápticas decrecen durante la estimulación repetitiva, lo que se conoce como depresión de corto plazo (**Figura 6**). La dinámica relativa tanto de facilitación como de depresión de corto plazo determina el efecto de la sinapsis bajo diferentes condiciones en la actividad global de una red (Nadim y Manor, 2000).

Las sinapsis con depresión de corto plazo son sensibles a cambios súbitos en la tasa de disparo. La amplitud en el estado estable de una sinapsis con depresión de corto plazo es inversamente proporcional a la frecuencia de

disparo. Estas sinapsis sirven para amplificar señales transitorias mientras que restringen la actividad tónica. La depresión de corto plazo ha sido implicada en distintos procesos: mantenimiento en la estabilidad de la red, selección de rutas, selectividad direccional, filtrado de frecuencias altas, sincronización en redes recurrentes, determinación de intervalos y secuencias, así como detección de entradas sincrónicas (Tecuapetla et al. 2007). Distintos modelos muestran que en los patrones de actividad generados entre dos grupos de neuronas, la transición de la actividad de unas a otras está mediada por la depresión de corto plazo, debido a la fatiga sináptica (Nadim y Manor, 2000).

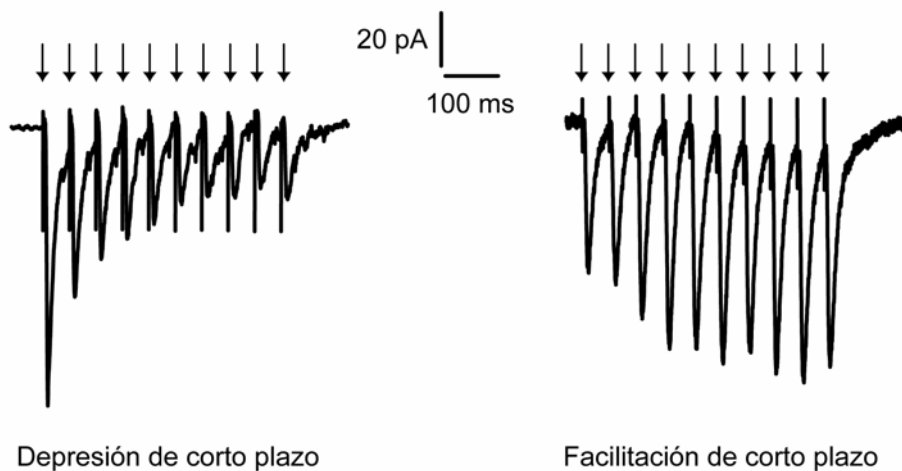


Figura 6. Dinámica sináptica de corto plazo. Izquierda: Respuesta de una neurona espinosa mediana ante un estímulo eléctrico cortical (10 estímulos, 20 Hz). Cada flecha señala un estímulo. La amplitud de la respuesta sináptica disminuye a través del tiempo. Derecha: En este caso la amplitud de la respuesta sináptica aumenta a través del tiempo. Los neuromoduladores pueden cambiar la dinámica sináptica de corto plazo, modificando así la actividad global de los microcircuitos.

Algunos modelos muestran que cuando la plasticidad de corto plazo está inmersa en una red recurrente, la neuromodulación aunada a ella puede producir la autoorganización de la red. La plasticidad sináptica de corto plazo también

puede ser usada para seleccionar dinámicamente entre diferentes patrones motores. Incluso puede ser utilizada no sólo para seleccionar diferentes patrones de movimientos, sino programas motores distintos (nado, caminata). La dinámica de las sinapsis con facilitación de corto plazo puede modular un programa motor incrementando la frecuencia con la que ocurre. La plasticidad sináptica es por sí misma dependiente de la actividad, es regulada por neuromoduladores, la experiencia sensorial o una combinación de ambas (Nadim y Manor, 2000).

Propiedades de composición en sistemas neuronales

La composición se refiere a nuestra habilidad de construir representaciones mentales, organizadas jerárquicamente, en términos de partes y sus relaciones (Bienenstock y Geman, 1994). Cualquier sistema con propiedades de composición cuenta con entidades elementales organizadas jerárquicamente, que al ser combinadas entre sí, de diferentes maneras, pueden dar lugar a un repertorio infinito de representaciones. Sin embargo, sólo cierto tipo de construcciones, que respetan reglas específicas, tienen sentido (**Figura 7**).

Por ejemplo, las letras del abecedario pueden ser ensambladas para formar sílabas, éstas a su vez pueden formar palabras, oraciones, tratados científicos, poemas, etc. En lingüística existen ciertas reglas dependientes del idioma, no obstante Chomsky (Hauser et al. 2002) propuso la existencia de regularidades *universales*, que podían ser independientes del idioma, lo cual

implica que en nuestro cerebro existen ciertas propiedades, que están genéticamente determinadas, por medio de las cuales nuestras capacidades de composición pueden extenderse más allá del lenguaje, como la facilidad por la música, la pintura, la danza, entre otras.

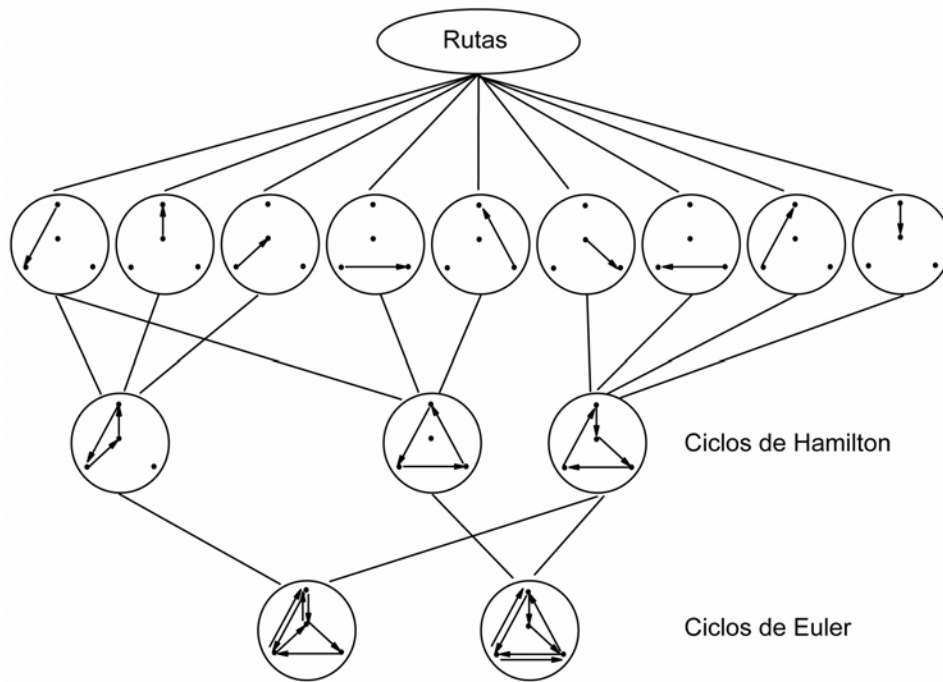


Figura 7. Organización jerárquica y reglas de composición en la actividad de redes neuronales biológicas. Diagrama de clasificación generado por un algoritmo de agrupamiento jerárquico basado en teoría de gráficas. Cada punto representa un estado de la red, las flechas indican la transición entre estados. Cada nivel puede componerse con los elementos de los niveles superiores siguiendo reglas específicas. Las unidades fundamentales componen el primer nivel del diagrama.

Si pensamos en nuestros propios hábitos, podemos ver que es fácil descomponerlos sistemáticamente en acciones motoras simples (Graybiel, 2008; Grillner, 2006). Dichas unidades básicas, análogas a las sílabas, pueden ser combinadas efectivamente para generar una variedad infinita de procedimientos con un fin específico (Bienenstock y Geman, 1994).

El conocer las reglas de composición que siguen los microcircuitos neuronales será de gran utilidad para el entendimiento de los distintos estados funcionales llevados a cabo por el cerebro tanto en condiciones normales como patológicas (Carrillo-Reid et al. 2008).

Patologías

Distintos estudios muestran que una de las causas de la esquizofrenia se debe al cambio en la dinámica sináptica de una población neuronal específica, a pesar de que el número de células se mantenga igual (Lewis et al. 2005), esto nos muestra que el cambio en la dinámica sináptica puede dar lugar a un estado anormal en el funcionamiento de las redes neuronales.

Por otro lado, los patrones anormales de sincronización en el sistema motor parecen ser una llave para entender su sintomatología (Schnitzler y Gross, 2005). Algunas teorías sobre la enfermedad de Parkinson sugieren que la pérdida de dopamina produce un desbalance entre distintos microcircuitos neuronales lo que promueve una sincronización excesiva del globo pálido interno y una sobreinhibición del tálamo (Beiser et al. 1997). Por ejemplo, durante los movimientos lentos de los dedos se observa una modulación común en el disparo de las unidades motoras, el cual tiene la misma frecuencia del movimiento. Diversos estudios muestran que en la enfermedad de Parkinson, el globo pálido externo, el globo pálido interno y el núcleo subtalámico tienen un incremento en la actividad oscilatoria. Se han encontrado incluso oscilaciones

sincrónicas entre el globo pálido interno y el núcleo subtalámico. Se sabe también que existe una tendencia de los ganglios basales a oscilar en frecuencias bajas durante este padecimiento, lo cual interfiere con la habilidad para realizar movimientos (Schnitzler y Gross, 2005).

La frecuencia de la actividad neuronal está íntimamente ligada con el desempeño de una función, si se estimula en el núcleo subtalámico con una frecuencia de 20 Hz se incrementa su sincronía con el globo pálido interno, lo cual provoca desórdenes en el movimiento. Sin embargo, estimulaciones de alta frecuencia (70 Hz) en el núcleo subtalámico suprimen los potenciales de campo locales en el globo pálido interno mejorando con ello los signos de la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto existe un balance entre la sincronización y la desincronización neuronal que es importante funcional y conductualmente (Schnitzler y Gross, 2005).

Utilizando la magneto encefalografía se ha investigado la sincronización a gran escala entre diversas áreas del cerebro y el temblor, en pacientes con la enfermedad de Parkinson. La actividad oscilatoria relacionada con el temblor se encuentra en una red muy extendida: ganglios basales – tálamo – corteza, cerebelo – tálamo – corteza. Las áreas corticales incluyen áreas motoras primarias y no primarias y áreas sensoriales contralaterales a la mano que presenta temblores. La frecuencia de acople entre diversas áreas del cerebro es

aproximadamente dos veces la frecuencia del temblor (Schnitzler y Gross, 2005).

Pollok (Pollok et al. 2004) muestra que el temblor en la enfermedad de Parkinson y el temblor voluntario en humanos sanos, comparten la misma red oscilatoria. Sin embargo en la enfermedad de Parkinson existe mayor coherencia entre el tálamo y la corteza primaria motora, mientras que en los individuos sanos la mayor coherencia se encuentra entre la corteza primaria motora y la corteza premotora. Si la corteza motora es la estructura convergente de las dos redes oscilatorias (ganglios basales-tálamo-corteza / cerebelo-tálamo-corteza), la hipótesis es que la estimulación de la corteza motora debe aminorar el temblor en la enfermedad de Parkinson. Un estudio reciente propone que la estimulación de la corteza motora es un procedimiento simple y seguro para modular el circuito *corteza-subtálamo-pálido-corteza* y así aliviar los síntomas de la enfermedad de Parkinson sin la necesidad de realizar una cirugía estereotáxica profunda del cerebro (Drouot et al. 2004).

Los ejemplos citados muestran que distintos patrones de actividad en núcleos específicos del cerebro están relacionados con estados funcionales determinados. La alteración en la actividad producida por una patología genera patrones anormales que evitan la correcta ejecución de diversas funciones. El reto es entender el papel de los distintos elementos del sistema así como de sus

propiedades para poder proponer soluciones que regresen a la red a un estado funcional normal (Carrillo-Reid et al. 2008; Marder y Calabrese, 1996).

Importancia fisiológica

Varios patrones espacio-temporales de actividad neuronal utilizan diferentes mecanismos para sincronizarse basados en distintas corrientes iónicas y/o conexiones sinápticas. La sincronización y desincronización sirven para ajustar dinámicamente el estado de una red uniendo o separando miembros del sistema que se encuentran espacialmente dispersos. Dichos procesos parecen ser un mecanismo para mejorar la ejecución de tareas específicas mientras al mismo tiempo se elimina la interferencia suprimiendo tareas falsas o blancos equivocados. También existe evidencia de que patrones específicos de sincronización están directamente relacionados con el comportamiento (Schnitzler y Gross, 2005).

Actualmente, los signos de la enfermedad de Parkinson son aliviados al estimular con altas frecuencias en el globo pálido interno o en el núcleo subtalámico, así como modulando el circuito cerebelo-tálamo-corteza a través de la estimulación del núcleo intermedio ventral. Se sabe que la sincronización del globo pálido interno y el núcleo subtalámico en el temblor y en la enfermedad de Parkinson ocurre a frecuencias bajas (15-30 Hz/3-10 Hz).

Es importante resaltar que actividades de red con las mismas características pueden emerger de parámetros muy distintos, por lo cual una enorme cantidad de combinaciones de fuerzas sinápticas y de propiedades intrínsecas membranales pueden provocar el desempeño adecuado de un sistema (Marder y Calabrese, 1996). Es decir, la salida de una red depende de la correlación de valores de distintas sinapsis y conductancias intrínsecas, por lo tanto, el reto no es sólo descubrir la estructura y función de las redes sino saber cómo es codificada y mantenida una solución objetivo, es decir, el grupo de parámetros necesarios para que la red realice una función específica (Prinz et al. 2004).

La generación de patrones espacio-temporales y la selección de programas motores dependen tanto de la plasticidad de los mecanismos regulatorios, esto es, de las características intrínsecas de las neuronas, que emergen del juego de sus corrientes iónicas no lineales; como de la dinámica sináptica de corto plazo. El reto es entender cómo se producen salidas flexibles en un circuito neuronal.

La neuromodulación también juega un papel importante ya que puede modificar la salida de una red motora cambiando las propiedades no lineales de las neuronas (Carrillo-Reid et al. 2008; Lee y Heckman, 1998) o las fuerzas relativas de las conexiones sinápticas, es decir, modela continuamente nuevos circuitos funcionales (Nadim y Manor, 2000).

Sinapsis con diferentes dinámicas operan óptimamente para distintos patrones de actividad. Por ejemplo, las sinapsis con depresión de corto plazo tienen mayor peso sobre la actividad final de una red durante la activación fásica. Por el contrario, las sinapsis con facilitación de corto plazo están más involucradas en la detección de secuencias temporales dispersas, lo cual indica que es posible encontrar correlaciones subumbrales independientemente de si las neuronas se encuentran conectadas entre sí.

Las propiedades temporales de los perfiles de correlación en el microcircuito pueden ser predichas por la dinámica de las sinapsis que cada neurona recibe en tiempos diferentes durante el proceso de la información. Dicha dispersión temporal impuesta por la dinámica de las sinapsis requiere de patrones de actividad específicos establecidos en la red (Silberberg et al. 2004), es decir, la forma en que funciona un pequeño ensamble neuronal está dada por las relaciones establecidas por sus elementos básicos, independientemente de que el microcircuito se encuentre dentro del sistema intacto o aislado de él (Carrillo-Reid et al. 2008).

Existen diferentes patrones de actividad, algunos están gobernados por la dinámica sináptica (propiedades extrínsecas); otros se basan en las conductancias que poseen los distintos elementos del sistema (propiedades intrínsecas); y otros más son el resultado de la combinación de las anteriores. Dependiendo de la función que se esté realizando las variables implicadas en la

activación de la red serán distintas, lo cual tiene consecuencias importantes, tanto en el funcionamiento normal como en el patológico, de los sistemas neuronales.

La evidencia indica que no sólo la actividad sincrónica oscilatoria de ensambles neuronales representa un mecanismo para la asociación de distintas estructuras, sino que es indispensable para la codificación de estados funcionales en redes neuronales biológicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hebb postuló en 1949 (Hebb, 1949) que la realización de tareas aprendidas llevadas a cabo por microcircuitos cerebrales, tendría que ser el resultado de la formación de los llamados ensambles neuronales: “Si una neurona A dispara y activa a una neurona B, la cual a su vez dispara y activa a una neurona C, la cual también dispara activando a la neurona A; entonces las sinapsis que unen a dichas neuronas se reforzarán e incrementará la probabilidad de que el mismo ciclo A-B-C-A... ocurra nuevamente en el futuro.” La consecuencia de esta hipótesis es la formación de rutas preferenciales formadas por microcircuitos neuronales, es decir, ciclos cerrados de actividad que se repiten a través del tiempo siguiendo secuencias específicas. Hasta el momento no existe ninguna demostración directa que muestre esto en el cerebro de mamífero. La demostración directa consistiría en la propagación secuencial de actividad sincrónica entre grupos identificados de neuronas.

Si pudiéramos registrar la actividad de los ensambles neuronales en tejido aislado *in vitro* estaríamos ante la posibilidad de estudiar sus propiedades biofísicas así como de conocer el efecto que tienen distintos neurotransmisores sobre la actividad global de los microcircuitos, incluso se podría investigar el papel que desempeña cada elemento en la función de la red. Finalmente, sería posible estudiar la actividad de los ensambles neuronales durante estados patológicos por medio del uso de modelos animales que reproducen distintas enfermedades.

PREGUNTAS A RESPONDER

¿Es posible observar *in vitro* la actividad de neuronas estriatales que cumplan con las características propuestas para formar ensambles neuronales?

¿Cuáles son los mecanismos que producen dicha actividad en el microcircuito neostriatal?

¿Qué efecto tiene la acción de distintos neurotransmisores (acetilcolina, dopamina) sobre la dinámica de red en el neostriado?

¿Se pueden estudiar las propiedades de los ensambles neuronales en un modelo de la enfermedad de Parkinson?

OBJETIVO

Estudiar las propiedades de los ensambles neuronales en el microcircuito neocortical *in vitro*.

Objetivos particulares

- Caracterizar los mecanismos que generan la actividad de red en el neocortical.
- Estudiar el papel que tienen distintos elementos del microcircuito neocortical en la dinámica de red.
- Estudiar el efecto de distintos neurotransmisores (acetilcolina, dopamina) sobre los ensambles neuronales en el neocortical.
- Indagar si es posible estudiar las propiedades de los ensambles neuronales neocorticales en un modelo de la enfermedad de Parkinson.

HIPÓTESIS

- La actividad generada en el neocóstriado por medio de una entrada excitadora tónica, presenta las características de los ensambles neuronales propuestos por Hebb.
- La dinámica de red del microcircuito neocóstriatal está mediada tanto por propiedades sinápticas como por propiedades intrínsecas de las neuronas.
- Las interneuronas juegan un papel central en la dinámica de red del microcircuito neocóstriatal.
- El sistema colinérgico cambia las características del microcircuito neocóstriatal dotándolo con propiedades computacionales asociadas con el almacenamiento y la organización de secuencias recursivas.
- La activación del sistema dopaminérgico habilita al microcircuito neocóstriatal para realizar rutinas previamente establecidas. A través de los receptores D1 se promueven los programas deseados y por medio de los receptores D2 se suprime la actividad no deseada.
- La actividad de la red neocóstriatal observada en un modelo de la enfermedad de Parkinson estará incrementada con respecto a la encontrada en condiciones control.

MÉTODOS

Preparación de rebanadas de tejido cerebral para el registro *in vitro*

Se obtuvieron rebanadas corticoestriales (300 μm) de cerebro de rata (Wistar albinas) de 14 a 18 días de edad, aunque en experimentos específicos se utilizaron ratas mayores a 20 días. Para conservar las aferencias corticales se utilizó un corte transversal con un ángulo de 45° (Carrillo-Reid et al. 2008; Kawaguchi et al. 1989; Vergara et al. 2003). Una vez extraído el cerebro fue colocado en una solución salina a una temperatura de 4°C . Dicha solución está compuesta por (mM): 123 NaCl, 3.5 KCl, 1MgCl₂, 1 CaCl₂, 26 NaHCO₃ y 11 glucosa. Dichas concentraciones favorecen la aparición de oscilaciones en el potencial de membrana de las neuronas (Sánchez-Vives y McCormick, 2000). Una vez obtenidas, las rebanadas fueron transferidas a una solución salina que se encontraba a temperatura ambiente ($21\text{-}25^\circ\text{C}$). Las rebanadas se mantuvieron en reposo durante al menos una hora antes de comenzar los experimentos.

Imágenes de calcio

Para realizar los registros ópticos las rebanadas fueron incubadas a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad durante 20 minutos en presencia de 10 μM de Fluo 4 AM (Tef Labs, Austin, TX) en 0.1% de DMSO, durante la incubación se saturó el medio con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Una vez cargadas, las rebanadas fueron colocadas en una cámara de perfusión con la solución salina antes mencionada. Se utilizó un microscopio equipado con un objetivo de

inmersión con una amplificación de 20X y una apertura numérica de 0.95 (Olympus BX51WI; Olympus). La muestra fue iluminada con pulsos de 50 a 100 ms con una longitud de onda de 488 nm. La iluminación fue realizada con una lámpara Lambda LS (Sutter instruments, Novato CA) conectada al microscopio mediante una fibra óptica. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital enfriada (CoolSNAP ES2, Photometrics, Roper Scientific, Tucson, AZ). La tasa de muestreo fue de 250-500 ms/frame. El programa utilizado para la obtención de imágenes fue RS Image (Photometrics; Roper Scientific, Tucson, AZ). El campo de adquisición tenía un tamaño de 800 X 600 μm . En cada experimento fueron realizados varios videos con una duración máxima de 5 minutos. Para evitar el blanqueo de la muestra los videos fueron separados por intervalos de 5-20 min. En algunos experimentos se realizaron secuencias de videos durante una hora o más.

El número de neuronas cargadas con el fluoróforo fue determinado al final de los experimentos con la exposición de la muestra a una solución con alto potasio (50 mM KCl). Esta maniobra nos permitió identificar a todas las neuronas cargadas, tanto las que tuvieron actividad durante el experimento como las que se mantuvieron silentes. Las células que estuvieron activas durante el experimento fueron identificadas y la tasa de células activas sobre células

silentes fue obtenida para el análisis posterior. Los transitorios de calcio, tanto espontáneos como provocados, fueron grabados simultáneamente con los registros electrofisiológicos en algunas células, durante condiciones control y en la presencia de diferentes fármacos. Esto nos permitió estudiar los cambios en la actividad de la red durante diferentes condiciones farmacológicas.

En algunos experimentos realizamos la estimulación eléctrica de distintas áreas corticales por medio de un electrodo bipolar concéntrico (12 μm ; FHC, Bowdoinham, ME). Los estímulos estaban formados por comandos de trenes a una frecuencia de 20 Hz y con una duración de 500ms – 1 segundo. Cada tren tenía una duración de 100 – 200 μs y una amplitud de 50 – 120 μA . En algunos experimentos utilizamos la intensidad mínima en los estímulos para provocar picos de actividad sincrónica que no pudieran ser confundidos con eventos azarosos ($P < 0.05$). Esto nos permitió estudiar los cambios en la respuesta ante diversos estímulos eléctricos durante diferentes condiciones farmacológicas.

Inmunohistoquímica

Algunas rebanadas fueron procesadas con EDAC después de los experimentos para fijar la fluorescencia emitida por las células activas. Una vez fijada la fluorescencia las rebanadas fueron procesadas con métodos convencionales de inmunocitoquímica para demostrar la presencia de sustancia P (SP) o encefalinas (ENK) utilizando anticuerpos comerciales (Península Labs, San Carlos, CA) conjugados con CY3 o CY5. Esto nos permitió cuantificar el

porcentaje de células activas que pertenecían a la vía directa o a la vía indirecta. Las células procesadas fueron estudiadas por medio de microscopía confocal (MRC-1024; Bio-Rad, Natford, UK). Las imágenes digitalizadas fueron transferidas a una computadora personal para su análisis posterior (Confocal Assistant, T.C. Brelje). Más del 80% de las células marcadas con este método fueron neuronas espinosas medianas.

Fármacos

Las soluciones utilizadas fueron preparadas antes de cada experimento y se añadieron a la perfusión en la concentración indicada. NMDA, APV, nicardipine, CNQX, biocytina, bicuculina, muscarina, eserina y atropina fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Electrofisiología

Se realizaron registros ópticos y electrofisiológicos simultáneamente de áreas del estriado dorsal como ha sido reportado previamente en estudios del laboratorio (Carrillo-Reid et al. 2008).

Se utilizó un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, CA) en la configuración de célula entera para registros en fijación de corriente o fijación de voltaje. Las señales obtenidas fueron filtradas a 1-3 KHz y digitalizadas a 3-9 KHz con una tarjeta AT-MIO-16E4 (National Instruments,

Austin, TX). Los programas de adquisición de datos fueron diseñados en el ambiente LabVIEW (Lemus-Aguilar et al. 2006).

Las pipetas de registro (3-6 M Ω) contenían una solución con (mM): 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.2 Na₂ATP y 0.2 Na₃GTP. En algunos experimentos se utilizó biocitina 0.5% y Fluo-4 sal de potasio (10-20 μ M) dentro de las pipetas de registro.

Análisis de imágenes

El procesamiento de las imágenes fue realizado con programas escritos en IDL, Image J y Matlab. Las neuronas activas fueron identificadas automáticamente y el cambio de fluorescencia de cada una de ellas fue medido como una función del tiempo. Las señales fluorescentes dependientes de calcio fueron obtenidas como $(F_i - F_o)/F_o$. Donde F_i representa la intensidad en la fluorescencia en cualquier cuadro de la película y F_o representa la fluorescencia basal, esto es el promedio de los primeros cuatro cuadros de la película.

Las señales de calcio provocadas por potenciales de acción fueron detectadas con base en un valor umbral dado por el criterio de la primera derivada de la señal fluorescente. Esto es, sólo se tomaron en cuenta señales de calcio cuya primera derivada temporal fuera mayor que 2.5 veces la desviación estándar de la señal basal. Todos los trazos fueron revisados manualmente para remover los artefactos o las señales que pudieran provenir

de células gliales (Carrillo-Reid et al. 2008; Ikegaya et al. 2004; Sasaki et al. 2007).

Herramientas matemáticas

Identificación de los estados de la red neuronal

Para determinar si la actividad de la red neocortical observada con resolución de célula única estaba correlacionada, se cuantificó el número de eventos simultáneos entre todas las células durante cada experimento. Para descartar que los eventos ocurridos de manera simultánea fueran azarosos, se realizaron simulaciones de Monte Carlo con 1,000 repeticiones (Mao et al. 2001).

El grado de correlación entre las células activas fue calculado con el coeficiente de correlación de Jaccard. La diferencia entre dicho coeficiente de correlación y otras medidas radica en que el coeficiente de Jaccard mide eventos en donde las correlaciones son simétricas, es decir, el grado de correlación entre dos células es el mismo sin importar cuál de ellas se toma como referencia. Después de calcular los coeficientes de correlación entre todos los posibles pares de células se construyeron mapas de correlación, en donde se conservó la ubicación espacial de las neuronas y se trazaron líneas entre las neuronas que estaban correlacionadas; el grosor de la línea es proporcional al coeficiente de correlación. También construimos mapas en pseudo color, los cuales permiten observar directamente el grado de correlación entre cada par de

células activas, sin embargo dichos mapas no conservan la ubicación espacial de las células.

Para identificar los picos de actividad sincrónica, también fueron realizadas las simulaciones de Monte Carlo con 1,000 repeticiones. El umbral escogido corresponde a un nivel de $P < 0.01$. Los picos de actividad sincrónica que no fueron azarosos se consideraron para el análisis posterior.

Para reconstruir la dinámica de la red fueron construidas matrices multidimensionales de $A \times B$, donde A representa el número de células activas durante una serie de experimentos, y B denota el disparo de las células durante ventanas de tiempo de 250 ms – 1 segundo. Dicha ventana de tiempo fue escogida debido a que la duración de los estados activos en las neuronas espinosas medianas tiene magnitudes similares (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003). De esta manera, los picos de actividad sincrónica fueron vectorizados, por lo que la actividad en ráfagas de disparo a través del tiempo en varias células corresponde a un estado de la red. Gracias a la vectorización es posible reconstruir la actividad de la red como una función del tiempo.

Para buscar patrones de disparo similares dentro de la dinámica de la red, medimos el índice de similitud entre todos los vectores de la red por medio del cálculo del producto interno entre todos los posibles pares de vectores (Sasaki et al. 2007; Schreiber et al. 2003; Carrillo-Reid et al. 2008). El producto

interno entre dos vectores representa la proyección espacial de un vector sobre el otro. Si dos vectores son iguales su índice de similitud es 1, de lo contrario es 0. Después, graficamos los índices de similitud como una matriz de pseudo color; los vectores que presentan dinámicas similares aparecen como estructuras cuadradas en dicha matriz (Carrillo-Reid et al. 2008; Sasaki et al. 2007).

Para estudiar mejor la actividad grupal de dichas estructuras, utilizamos un algoritmo de reducción dimensional llamado “agrupamiento local lineal” (en inglés: *locally linear embedding* o LLE). Dicho algoritmo es una herramienta poderosa para realizar reducciones dimensionales en sistemas no lineales (Brown et al. 2005; Roweis y Saul, 2000; Stopfer et al. 2003). Una vez que se ha realizado la reducción dimensional, los vectores que representan la dinámica de la red son proyectados a un espacio vectorial de dos dimensiones en donde cada punto representa un vector en un periodo de tiempo determinado. Un conjunto de puntos representa a los vectores neuronales con dinámicas similares. Las flechas que unen dichos puntos indican las trayectorias seguidas por la actividad sincrónica de los diferentes estados de la red (Carrillo-Reid et al. 2008).

Para separar los grupos de vectores neuronales de la forma más óptima utilizamos algoritmos de agrupamiento estrictos y difusos, tomando el índice de Dunn como medida en la función de validez (Sasaki et al. 2007).

Para identificar las neuronas que pertenecen a cada estado utilizamos algoritmos de agrupamiento jerárquico, utilizando distancias euclidianas y el método del vecino más cercano.

Identificación de ciclos cerrados de actividad

Una pregunta fundamental con respecto a las trayectorias seguidas por la actividad sincrónica de los estados en una red neuronal es si ésta cumple con los requerimientos para formar ciclos cerrados reverberantes (Abeles, 2003; Harris, 2005; Hebb, 1949). La formación de dichos ciclos permitiría sugerir la existencia de trazos de memoria en el tejido neuronal vivo y por lo tanto de manipularlos en un futuro (e.g., producirlos o borrarlos). Para visualizar las trayectorias de actividad formadas por los estados de la red, construimos gráficas dirigidas isomórficas (digrafos) entre las transiciones de los estados. Los picos de actividad sincrónica que pertenecen a diferentes estados forman los vértices de las gráficas dirigidas. Los ciclos cerrados fueron escogidos sólo si cumplían con las propiedades de los ciclos Hamiltonianos o Eulerianos. Un ciclo Hamiltoniano de una gráfica dirigida G es un recorrido cerrado que pasa por cada vértice de G sólo una vez; un ciclo de Euler es un recorrido cerrado que pasa a través de cada camino solamente una vez (Diestel, 2005). Dichos ciclos constituyen la manera más eficiente para realizar un recorrido. Como fue postulado con anterioridad (Grillner, 2006; Hebb, 1949) un ciclo cerrado en una red neuronal es capaz de auto sostener su actividad de forma reverberante en la ausencia de estímulos externos sólo cuando las ondas de actividad comienzan y

terminan en el mismo punto. Por lo tanto, para analizar dichos ciclos en el microcircuito neocortical construimos enunciados que reflejan la dinámica de la red a través del tiempo. Por ejemplo el enunciado “abcdabea” representa las transiciones entre los estados a-b, b-c, c-d, etc; donde cada letra representa un estado específico de la red en función del tiempo (vértice de las gráficas dirigidas). Una vez que fueron identificados todos los enunciados para un experimento dado, buscamos la existencia de ciclos cerrados que formaran palabras. Por ejemplo: “abcd” es una palabra dentro del enunciado anterior, la cual representa un ciclo cerrado. Para cada ciclo cerrado hallado en los enunciados obtuvimos la matriz adyacente de la gráfica dirigida (Diestel, 2005). El empleo de matrices permite estudiar dichos ciclos cerrados desde el punto de vista matemático, con lo cual es posible buscar y establecer propiedades que cumplen los ciclos. La matriz adyacente de una gráfica dirigida Hamiltoniana cumple con la siguiente propiedad matemática: $H^n = I$, donde n representa el número de vértices de la gráfica dirigida y donde I es la matriz identidad. Los ciclos Hamiltonianos también cumplen con las propiedades de los grupos cíclicos. La matriz adyacente de una gráfica dirigida de Euler cumple con la propiedad de que la suma de todos los elementos del renglón i es igual a la suma de los elementos de la columna i .

Para investigar si dichos ciclos cerrados se encuentran organizados jerárquicamente utilizamos algoritmos de agrupamiento jerárquico conceptual basado en gráficas (Jonyer et al. 2001). Dichos algoritmos nos permitieron

buscar las unidades más pequeñas o átomos semánticos (Abeles et al. 2003; Bienenstock y Geman, 1995; Hebb, 1949) que pueden representar todas las combinaciones posibles formadas por los ciclos cerrados (Bienenstock y Geman, 1995).

Finalmente, buscamos ciclos que pudieran ejecutarse en paralelo o en bajo nivel. Esto es, ciclos cerrados que aparecieran entre neuronas individuales o pequeños grupos de ellas fuera de un vector neuronal; antes de que sean reclutadas en un pico de sincronía o estado. Como los ciclos están formados por picos de actividad sincrónica entre diferentes neuronas, la aparición de estos ciclos en células individuales que aún no se han sincronizado, sugiere un procesamiento anterior de la información que daría lugar a la sincronización posterior. Dicha propiedad es conocida como “cebado” (o *priming* en inglés) (Abeles et al. 2003), lo que ayudaría a ejecutar una tarea con mayor facilidad y rapidez, ya que no sería necesario reclutar a todos los elementos que originarán una función, sino que el reclutamiento se va constituyendo paulatinamente (Abeles et al. 2003; Lee y Wilson, 2002).

RESULTADOS

Registros ópticos de poblaciones neuronales en el microcircuito neoestrial

Para estudiar los microcircuitos neoestrialales in vitro, utilizamos imágenes de calcio (**Figura 8**) lo cual nos permitió medir la actividad eléctrica en varias células de manera simultánea con resolución de célula única. La actividad eléctrica de cada célula fue medida indirectamente como un cambio en la fluorescencia. Se tomaron series de imágenes en rebanadas de cerebro cargadas con el indicador Fluo-4 AM, las imágenes fueron adquiridas con un campo visual de 800 X 600 μm en el estriado dorsal. La figura 8A muestra todas las neuronas cargadas en un experimento característico. Los contornos de todas las células, tanto activas como silentes, se muestran en la figura 8B. Únicamente las neuronas que tuvieron actividad a lo largo del experimento fueron analizadas. En condiciones control (sin fármacos en el medio de perfusión), únicamente encontramos algunas células activas que no presentaban disparos correlacionados (círculos negros en la **Figura 8B**). Estos experimentos confirman que el microcircuito neoestrial es prácticamente silente en condiciones control (Barnes et al. 2005). Para determinar el correlato entre las señales eléctricas de las neuronas y el cambio en la fluorescencia realizamos registros electrofisiológicos de forma simultánea con los registros de calcio (**Figuras 8D y E**). Como ha sido observado en diferentes circuitos neuronales (Gordon y Whelan, 2006; Grillner et al. 1981; Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al. 1998; Kiehn, 2006; Takakusaki et al. 2004b) es posible generar patrones

de actividad biestable con potenciales en meseta en las neuronas espinosas medianas después de la aplicación de NMDA en la perfusión (**Figura 8E**). Dicho agonista induce comportamientos motores cuando es administrado *in vivo* en el estriado (Ossowska, 1995; Ossowska y Wolfarth, 1995). Este tratamiento induce disparo en ráfagas en las neuronas del neostriado durante más de una hora, sin la necesidad de realizar ningún tipo de estimulación eléctrica (Vergara et al. 2003).

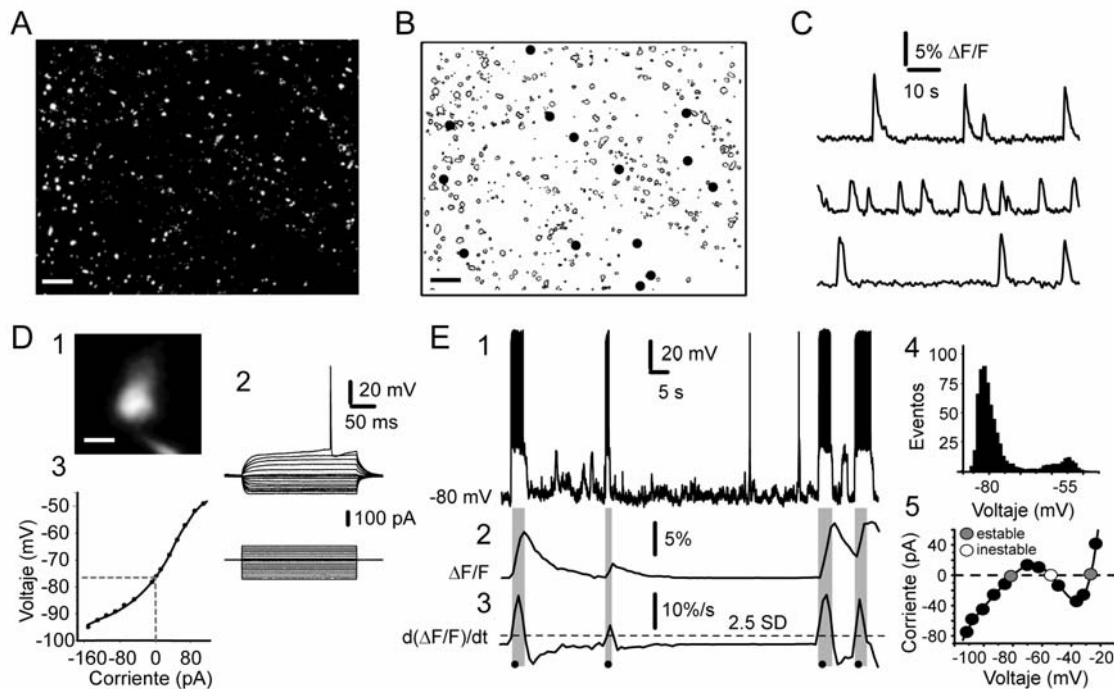


Figura 8. Registros ópticos en neuronas estriatales. A: Neuronas en una rebanada cargadas con fluo4-AM. Escala: 100 μ m. B: Detección automática de los contornos de 376 células mostradas en A. Los círculos negros indican neuronas con actividad espontánea (14/376 o 3.7%). C: Transitorios de calcio representativos tomados de tres células diferentes. D: Registros electrofisiológicos realizados simultáneamente con imágenes de calcio en una neurona espinosa mediana. (1) Neurona registrada. Escala: 10 μ m. (2) Respuestas de voltaje ante comandos de corriente de la neurona mostrada. (3) Relación corriente-voltaje medida en fijación de corriente. E: Registros simultáneos de oscilaciones de voltaje (1) y transitorios de calcio (2). La duración de la primera derivada corresponde con las ráfagas de potenciales de acción (3). Los puntos indican el inicio de los estados activos. (4) Histograma que indica el comportamiento biestable de las neuronas espinosas medianas. (5) Relación I-V medida en fijación de voltaje en presencia de NMDA.

La mayoría de las células activas durante los experimentos presentaron las características electrofisiológicas bien conocidas y descritas de las neuronas espinosas medianas (**Figura 8D**). La primera derivada temporal de las señales transitorias de calcio corresponde en duración a los estados activos en las neuronas espinosas medianas (Carrillo-Reid et al. 2008; Cossart et al. 2003; Kerr y Plenz, 2002). La distribución del potencial de membrana presenta dos picos, lo cual confirma el comportamiento biestable (**Figura 8 E4**). La relación corriente-voltaje medida en fijación de voltaje muestra una región de conductancia con pendiente negativa (CPN), lo cual a su vez demuestra la propiedad de biestabilidad condicional en las neuronas tratadas con NMDA (**Figura 8E5**).

Registros de imágenes sucesivas realizados simultáneamente con los registros electrofisiológicos mostraron que bajo nuestras condiciones experimentales, únicamente las ráfagas con dos o más potenciales de acción producen transitorios de calcio detectables de manera estadísticamente significativa ($P < 0.01$; ver Métodos) en las neuronas estriatales (**Figura 9**).

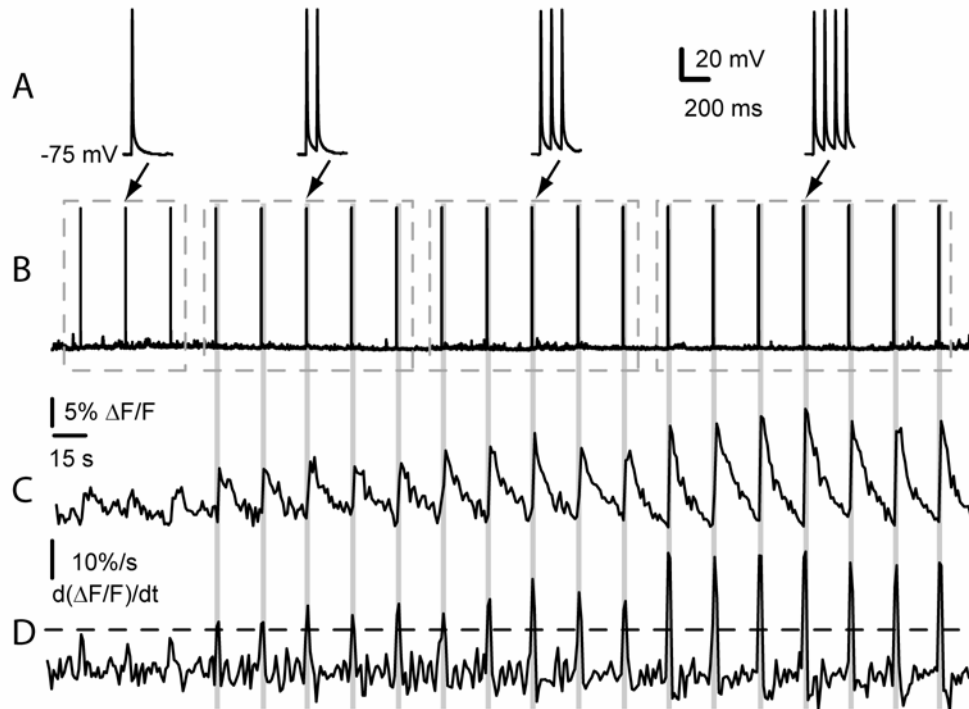


Figura 9. Potenciales de acción necesarios para producir transitorios de calcio detectables de manera significativa. A: Potenciales de acción provocados por comandos de corriente en una neurona espinosa mediana. Las flechas señalan los mismos registros en diferente escala temporal. B: Distintos potenciales de acción (de 1 a 4) fueron provocados en series sucesivas (líneas punteadas). C: Registros simultáneos de transitorios de calcio provocados por los potenciales de acción mostrados en B. Las señales de calcio que sobrepasan el nivel estadísticamente significativo necesitan de dos o más potenciales de acción. D: Primera derivada temporal de los registros de calcio mostrados en C. El umbral de detección (línea punteada) corresponde a un valor mayor de 2.5 veces la desviación estándar del ruido basal.

Los experimentos mencionados confirman que las neuronas estriatales pueden ser activadas *in vitro* por medio de la aplicación de NMDA en el medio de perfusión. La siguiente pregunta consistía en investigar si la actividad biestable generada por la aplicación de NMDA era compartida por varias neuronas simultáneamente y si algunas de estas neuronas presentaban disparos

correlacionados (coactivación o sincronización espontánea), en cuyo caso, se estaría hablando de una evidencia fuerte de que la actividad depende del circuito, que posiblemente es capaz de generar patrones estereotipados y recursivos (como los CPGs, ver Introducción).

La estimulación cortical sincroniza neuronas estriatales anatómicamente dispersas

En rebanadas corticoestriatales, la estimulación eléctrica de la corteza cerebral provoca despolarizaciones de larga duración que pueden generar ráfagas de potenciales de acción en las neuronas espinosas medianas (Bargas et al. 1991; Vergara et al. 2003). La figura 10B muestra un experimento en el cual se realizaron registros en célula entera en la modalidad de fijación de corriente simultáneamente con imágenes de calcio (la frecuencia de los trenes fue de 20Hz, se aplicaron varios trenes separados 10 segundos; los estímulos están señalados con flechas). Como puede observarse la señal de calcio es producida como respuesta a cada estímulo ortodrómico aplicado en la corteza (**Figura 10B2**). La primera derivada temporal de las señales de calcio presenta la misma duración que las respuestas de voltaje (**Figura 10B3**). Dichas señales fueron utilizadas para generar gráficas de la actividad global de la red (**Figura 10D**). Cada renglón en dichas gráficas representa una neurona activa. Los círculos llenos en la figura 10C indican las neuronas cargadas dentro del campo visual que respondieron a la estimulación cortical en un experimento representativo. Los círculos vacíos indican a las neuronas cargadas que no respondieron ante la

estimulación eléctrica. La estimulación cortical sincronizó entre 10-20% del total de las células observadas. Sólo algunas neuronas (<2%) tuvieron actividad antes y después de la estimulación cortical, de manera interesante dichas neuronas presentaron poca correlación con las neuronas restantes (**Figuras 10D y E**). En cada estímulo más del 90% de las neuronas activas siguieron los comandos corticales (**Figura 10D**, panel inferior). Sin embargo, algunas neuronas que tenían actividad espontánea antes del estímulo no siguieron los comandos corticales (líneas azules). Registros electrofisiológicos dirigidos hacia las células que respondieron a la estimulación cortical revelaron que la mayoría de las neuronas activas eran neuronas espinosas medianas (**Figura 10B**).

Actividad de red provocada por una entrada excitadora tónica

Los registros ópticos de fluorescencia con resolución de célula única nos permitieron observar distintas poblaciones de neuronas estriatales activadas tanto por la estimulación cortical (**Figura 10**) como por una entrada excitadora tónica generada por la presencia de NMDA en la perfusión (**Figura 11**)

Registros electrofisiológicos e imágenes de calcio simultáneos mostraron que las ráfagas de potenciales de acción generadas durante la activación de los receptores NMDA presentaban señales de calcio cuantificables (Carrillo-Reid et al. 2008; Kerr y Plenz, 2002). La actividad de las células en el microcircuito neostriatal fue reconstruida gracias a las señales de calcio en las gráficas del comportamiento global de la red (**Figura 11B**).

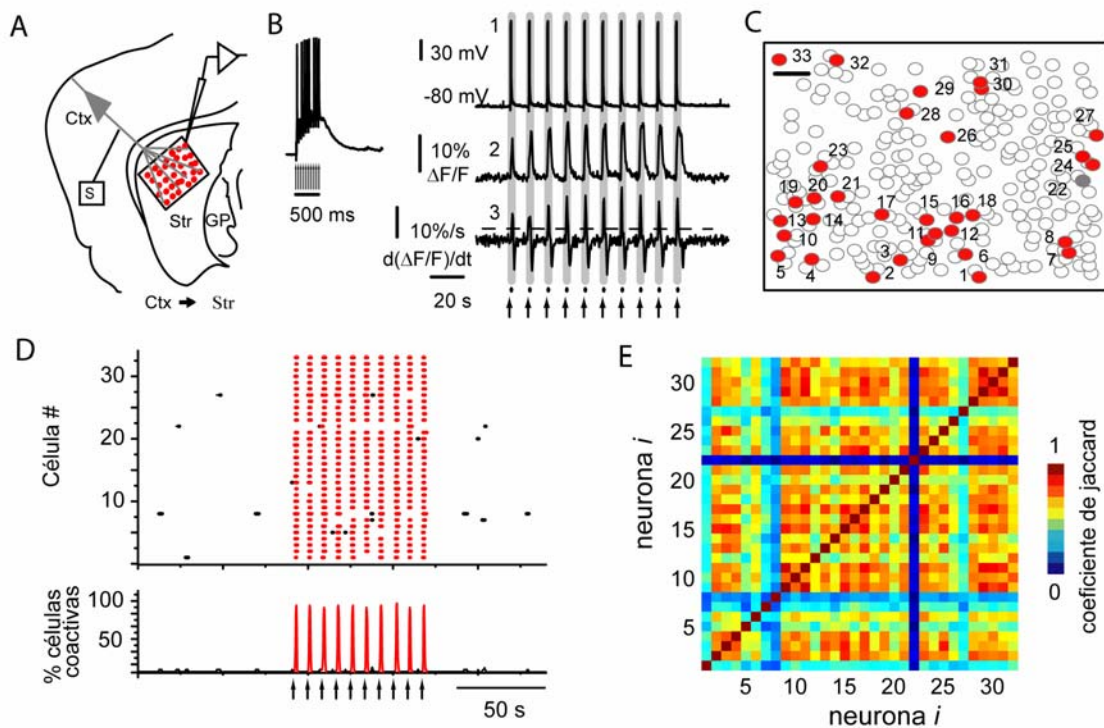


Figura 10. Las neuronas estriatales activadas por un comando cortical se encuentran anatómicamente dispersas. A: Esquema del arreglo experimental. La estimulación de campo se realizó en las aferencias corticales mientras que los registros electrofisiológicos y ópticos se realizaron en el neostriado. B: Izquierda: Respuesta sináptica de una neurona espinosa mediana ante un estímulo cortical (10 estímulos a 20 Hz; las flechas indican cada estímulo). Derecha: Transitorios de calcio provocados en la misma neurona ante el estímulo en corteza. C: Mapa espacial de todas las neuronas cargadas con el fluoróforo. Las células activadas por la estimulación cortical están marcadas con rojo (35/252; 13%). Escala: 50 μ m. D: Gráfica de la actividad global del microcircuito neostriado. Cada renglón representa una célula activa. Cada columna representa una ventana de tiempo. El histograma mostrado en la parte inferior representa el porcentaje de células respondivas. E: Mapa de correlación de las células activas.

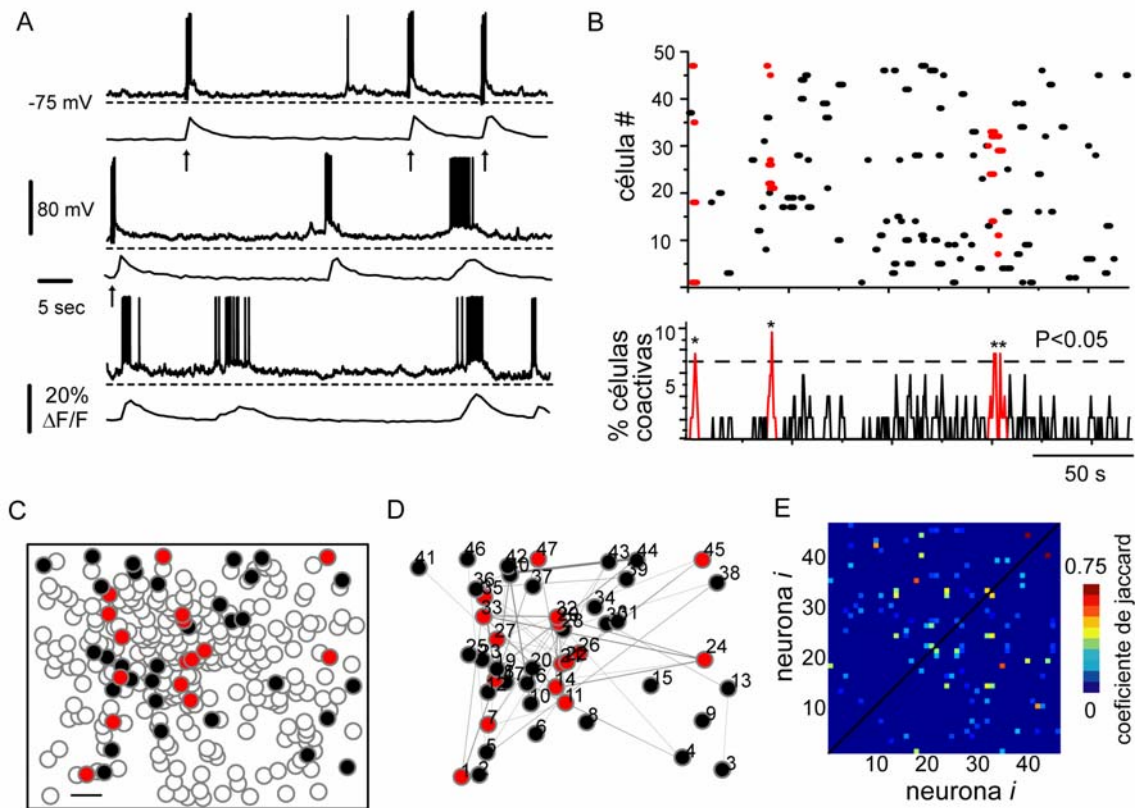


Figura 11. Actividad de red inducida por la activación de los receptores **a** NMDA. A: Registros electrofisiológicos tomados simultáneamente con imágenes de calcio en una neurona espinosa mediana en presencia de NMDA. La estimulación cortical (flechas) produce potenciales en meseta que pueden ser detectados por medio de sus correspondientes señales de calcio. Después de la estimulación cortical las neuronas espinosas medianas presentan oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana. B: Gráfica de la actividad global del microcircuito neocortical producida por la aplicación de NMDA. La aparición de picos de sincronía espontáneos (asteriscos; trazos en rojo) sugiere la existencia de un comportamiento de red. C: Mapa espacial de las células registradas. Los círculos llenos representan a las células activas. Los círculos rojos indican a las células que participan en los picos de sincronía. Escala: 100 μm . D: Mapa de correlación espacial. Las líneas unen a las células **con disparo correlacionado**. El grosor de la línea es proporcional al grado de correlación. E: Mapa de correlación entre todos los posibles pares de células. Nótese la distribución heterogénea de los coeficientes de correlación.

En neuronas que forman parte de distintos generadores centrales de patrones (CPGs, ver Introducción) también ha logrado inducirse un comportamiento biestable gracias a la presencia de NMDA en el medio de perfusión (Grillner et al. 1981; Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al. 1998; Takakusaki et al. 2004b). De manera interesante, es posible observar en las gráficas de la actividad global de la red que distintas neuronas están involucradas en la dinámica espacio-temporal (**Figura 11B**, panel superior). Es posible observar periodos de sincronía que ocurren espontáneamente en el histograma correspondiente a la actividad global, lo cual sugiere la aparición de dinámicas no lineales en el comportamiento del microcircuito neocortical (Carrillo-Reid et al. 2008; Cossart et al. 2003). En más del 80% de las rebanadas cerebrales utilizadas en los experimentos fue posible observar picos espontáneos de actividad sincrónica estadísticamente significativos ($P < 0.05$), durante la aplicación de NMDA en el medio de perfusión. En promedio encontramos 2.5 ± 0.2 picos de sincronía durante periodos de 201 ± 10 segundos. Los picos de actividad sincrónica aparecieron recurrentemente y no encontramos ninguna frecuencia periódica en su aparición, dichos picos ocurrieron con un intervalo medio de 46 ± 10 segundos. Es importante resaltar que las neuronas que dispararon de forma sincrónica durante la aplicación de NMDA podían encontrarse dispersas anatómicamente y mezcladas con células silentes (**Figura 11C**; círculos llenos). Para observar los pares de células que tenían una correlación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) construimos mapas de correlación espaciales (**Figura 11D**) en los cuales las células

correlacionadas están unidas por líneas cuyo grosor representa el grado de correlación. Las células que tuvieron actividad durante los picos de sincronía formaron la mayoría de las correlaciones dentro de la red. En promedio $77 \pm 4\%$ de las células activas tuvo actividad correlacionada durante algún momento del experimento. Las gráficas de correlación en pseudocolor (**Figura 11E**) mostraron que el grado de sincronización entre distintos pares de neuronas es heterogéneo, lo cual significa que la dinámica de red observada en el microcircuito neocortical no es debida a una correlación estocástica entre pares de células sino a la dinámica propia del circuito.

Es importante resaltar que la aplicación de NMDA en los microcircuitos neocorticales tanto *in vitro* (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003) como *in vivo* (Herrling et al. 1983) induce ráfagas de potenciales de acción y genera movimientos estereotipados en animales no anestesiados (Ossowska, 1995), lo cual sugiere un mecanismo general preservado en un amplio rango de edades.

Diversos patrones de actividad estructurada con características similares a las mostradas en nuestros experimentos han sido reportados en la corteza cerebral de ratones jóvenes (PD 13-22) y de gatos adultos *in vivo*, lo cual demuestra que la dinámica de red es intrínseca a diferentes núcleos y se preserva incluso en rebanadas de cerebro (Carrillo-Reid et al. 2008; Ikegaya et al. 2004). Sin embargo, para abordar este tema en el microcircuito neocortical, dividimos nuestros datos en diferentes grupos de acuerdo con la edad con el

objetivo de descartar resultados debidos a factores de desarrollo. La figura 12 muestra que la actividad inducida por la aplicación de NMDA es independiente de la edad, a pesar de los reportes previos en los cuales fue observada una disminución en el número de células cargadas dependiendo de la edad de los animales (PD 14-29; **Figura 12**) (Froemke et al. 2002; Peterlin et al. 2000). El número de picos de sincronía durante períodos de tiempo específicos se mantuvo en un rango considerable de edades (PD 14-29), lo cual demuestra que la actividad de red observada constituye un mecanismo robusto en el microcircuito neocortical.

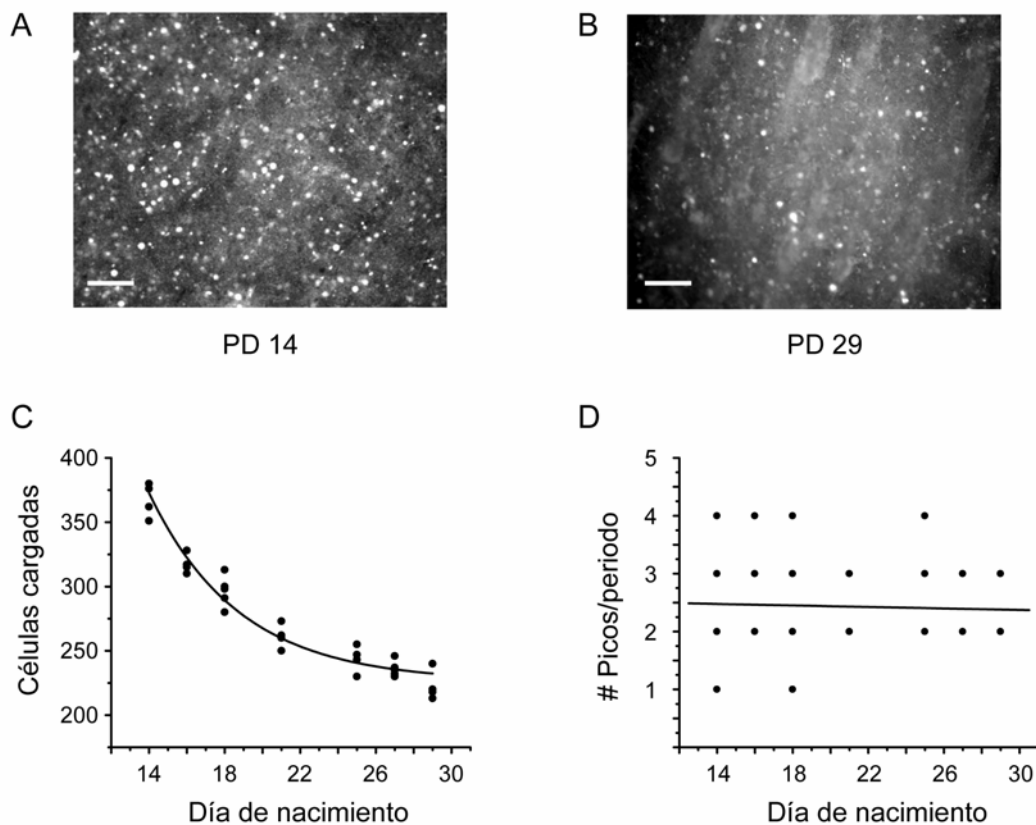


Figura 12. La dinámica de la red en el microcircuito neocortical no depende de la edad. Neuronas en una rebanada de cerebro cargadas con fluo-4 AM. (A) PD 14. (B) PD 29. Escala: 100µm. C: Número de células cargadas en función del día de nacimiento. Cada punto representa una rebanada. La línea representa el ajuste de una exponencial. D: Número de picos/periodo en función del día de nacimiento.

Los experimentos mostrados hasta el momento demuestran varios puntos importantes: 1) Una entrada excitadora tónica tal como la producida por la aplicación de NMDA, induce la generación de patrones estructurados de actividad en el neocórtex *in vitro*. 2) La actividad se encuentra distribuida a través del microcircuito y comprende a un porcentaje de neuronas mayor a las encontradas en condiciones control. 3) La actividad puede presentar diversos periodos espontáneos de sincronía que involucran a distintos elementos del microcircuito. 4) Una vez que la red está activa, el fenómeno observado continúa durante un periodo extenso, sin la necesidad de estimulación cortical. 5) La dinámica de red descrita se preserva en un rango amplio de edades (PD 14-29) y puede correlacionarse con la actividad electrofisiológica y conductual hallada en animales adultos (Herrling et al. 1983; Ossowska, 1995).

De acuerdo con los experimentos presentados, pensamos que la actividad de red inducida por la entrada excitadora tónica podría ser sostenida por grupos de neuronas correlacionadas (ensambles neuronales) que alternarían su actividad unos con los otros generando patrones espacio-temporales de actividad sincronizada. Una pregunta importante es si esta actividad sincronizada sigue trayectorias determinadas recurrentes y no azarosas, en cuyo caso, podríamos hablar de la dinámica de un microcircuito o red con pesos sinápticos establecidos y con neuronas de distintos tipos cumpliendo roles específicos en el microcircuito (Hebb, 1949). Sólo así podría explicarse que un

estímulo (entrada) no correlacionado pueda transformarse en un patrón espacio-temporal (salida) definido y recurrente.

Visualización de estados funcionales durante la dinámica de la red

Para investigar la dinámica de la red neocortical diseñamos experimentos que nos permitieran distinguir entre diversos estados funcionales codificados en el microcircuito neuronal. Realizamos secuencias cortas (100 – 200 segundos) de la actividad en la red tomadas con diferentes intervalos de tiempo (5-10 minutos). Esto nos permitió seguir la dinámica del microcircuito durante periodos largos de tiempo (hasta una hora).

Para reconstruir la dinámica de la red dividimos la actividad global del microcircuito neocortical en pequeñas ventanas de tiempo, considerando únicamente a las neuronas involucradas en los picos de sincronía (**Figura 13**). Los segmentos temporales así obtenidos representan vectores multidimensionales que codifican la actividad en ráfagas de potenciales de acción de neuronas individuales con actividad sincronizada. Cada vector representa una ventana de tiempo y la dimensión del vector indica el número de células activas. Demostramos que la vectorización de la actividad global del microcircuito neocortical permite comparar, rigurosamente, diferentes estados de la red a través del tiempo (Brown et al. 2005; Sasaki et al. 2007).

El producto interno normalizado de todos los posibles pares de vectores provee una medida de similitud entre los estados de la red (Sasaki et al. 2006; Schreiber et al. 2003). Para visualizar las similitudes a lo largo del tiempo construimos gráficas en pseudo color (**Figura 13A**) en las cuales es posible observar diversas estructuras que se repiten en tiempos diferentes. Las transiciones abruptas en este tipo de gráficas sugieren una actividad de red estructurada (Brown et al. 2005; Stopfer et al. 2003). El siguiente paso consistió en poner a prueba algoritmos que nos permitieran identificar la presencia de distintos estados funcionales en la red, para ello diseñamos condiciones experimentales específicas. De esta manera, comparamos la respuesta de la red ante tres condiciones diferentes: estimulación eléctrica cortical, aplicación de NMDA en el medio de perfusión, y finalmente estimulación eléctrica en presencia de NMDA. El algoritmo que reflejó fidedignamente las condiciones experimentales impuestas por nosotros fue el de LLE (locally linear embedding, ver Métodos), que consiste en una técnica no lineal de reducción de dimensiones de espacios vectoriales multidimensionales (Roweis y Saul, 2000). La ventaja de este algoritmo con respecto a otros radica en la conservación de la estructura del sistema analizado. Los vectores nuevos encontrados con LLE, son proyectados en dos dimensiones (**Figura 13B**). Cada punto representa un vector y un grupo de puntos muestra segmentos de la actividad global de la red con dinámicas similares. Las trayectorias entre los puntos muestra subgrupos de neuronas coactivas que generan estados específicos de la red (Brown et al. 2005; Carrillo-Reid et al. 2008; Stopfer et al. 2003).

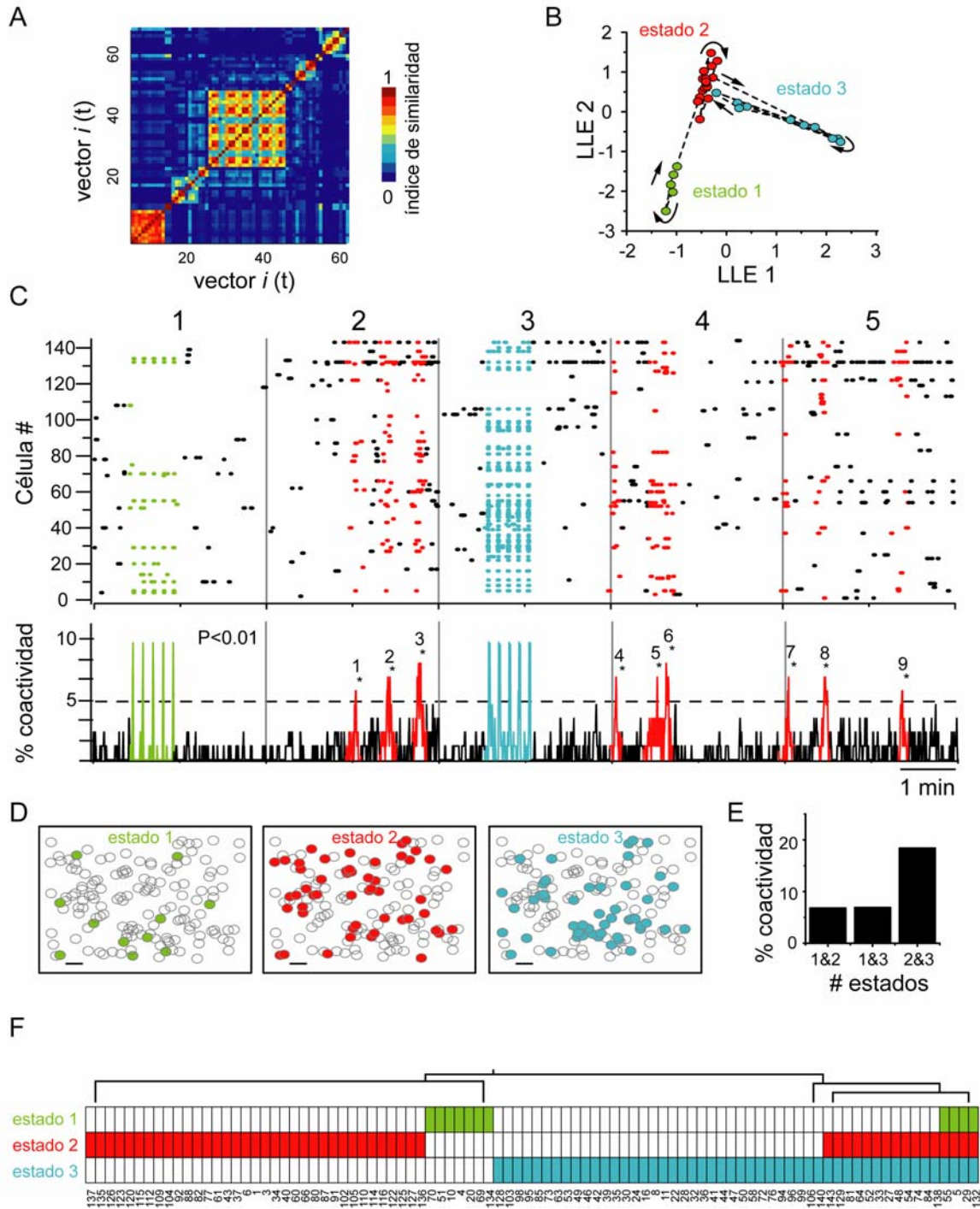


Figura 13. Visualización de estados funcionales en redes neuronales biológicas. A: Índices de similitud del arreglo multidimensional de vectores que representan la dinámica de la red.

B: Reducción multidimensional de la dinámica de la red. C: Gráfica de la actividad poblacional durante diferentes condiciones experimentales. Cada color señala un estado distinto. D: Mapas espaciales de las neuronas involucradas en los estados. E: Porcentaje de células coactivas en varios estados. F: Agrupamiento de células conforme a su dinámica de red.

Gracias a ello es posible seguir el cambio en los estados funcionales de un sistema de manera sencilla. En la figura 13B, el estado 1 representa la respuesta de la red ante los estímulos eléctricos corticales en condiciones control. El estado 2 muestra la actividad de red inducida por la presencia de NMDA en el medio de perfusión sin ningún estímulo eléctrico. El estado 3 representa la respuesta de la red ante el mismo estímulo cortical (dado en el estado 1) pero con NMDA. La estimulación cortical en presencia de NMDA reclutó más neuronas estriatales que la misma estimulación en condiciones control, lo cual produjo picos de sincronía con mayor amplitud a los provocados únicamente por NMDA. Es importante resaltar que el comportamiento general de la red generado por la aplicación de NMDA, permanece similar después del estímulo eléctrico (**Figuras 13C4 y 5**). De hecho el número de picos de sincronía permanece igual antes y después de la estimulación cortical. Incluso, después de la estimulación cortical la trayectoria del sistema regresa al punto del cual partió (**Figura 13B**), demostrando la activación recurrente de los mismos ensambles neuronales después de una perturbación (Stopfer et al. 2003). La figura 13D muestra la distribución espacial de las neuronas que generan los diferentes estados. El análisis jerárquico de grupos reveló la existencia de los diferentes conjuntos neuronales (ensamble) que conforman cada estado (**Figura 13F**). Los estados están prácticamente formados por un ensamble neuronal específico. La transición hacia otros estados implica un cambio en el ensamble neuronal activo (alternancia). Sin embargo existen distintos elementos que

forman parte de todos los estados. Hipotetizamos que estos elementos podrían estar coordinando la transición entre los diferentes estados.

En resumen, fue posible distinguir diferentes picos de actividad sincrónica que cambian a través del tiempo, que reflejan estados funcionales inducidos del microcircuito neocortical y que son generados por grupos específicos de neuronas. Con estos experimentos concluimos que los patrones de actividad espacio-temporales codificados en arreglos vectoriales multidimensionales son suficientes para reconstruir la dinámica de un microcircuito neuronal específico.

Generación de patrones que representan estados funcionales sostenidos por ensambles neuronales

Los resultados mostrados anteriormente incluyeron condiciones experimentales inducidas con el propósito de comprobar la validez de algoritmos matemáticos que nos sirvieran en la búsqueda de patrones dentro de la dinámica de red del microcircuito neocortical. Si la actividad inducida por la aplicación de NMDA en el medio de perfusión está mediada por ensambles neuronales entonces uno esperaría la aparición de estados funcionales distinguibles evocados únicamente por la presencia de una entrada excitadora tónica, es decir sin la necesidad de estímulos eléctricos (Grillner, 2006). Para contestar esta pregunta investigamos la dinámica espacio-temporal en la actividad sincrónica inducida por la aplicación de NMDA.

Para observar la alternancia entre los diversos estados funcionales, diseñamos experimentos que involucraban periodos de tiempo largos, los cuales nos permitieron estudiar la dinámica de la red neocortical (**Figura 14**). Obtuvimos secuencias cortas de imágenes (100-250 segundos) con diferentes intervalos durante una hora (**Figura 14C1-3**; panel superior; las secuencias diferentes a lo largo del tiempo están separadas por líneas verticales).

La matriz de similitud generada por la comparación de todos los vectores del arreglo multidimensional muestra claramente transiciones abruptas lo cual indica una actividad de red estructurada (Sasaki et al. 2006). La reducción dimensional de los vectores con LLE (Brown et al. 2005; Roweis y Saul, 2000; Stopfer et al. 2003) y su posterior proyección en un plano de dos dimensiones (**Figura 14B**) nos permitió observar una variedad de estados en la red cuya actividad sincronizada sigue trayectorias con secuencias determinadas. Gracias a ello encontramos a los diferentes grupos de neuronas (ensambles neuronales) que subyacen a la dinámica del microcircuito neocortical en la ventana de observación (**Figura 14D**). Se pudo seguir la evolución en el tiempo de los diversos estados funcionales (como eventos que aparecen y desaparecen) generados por grupos de neuronas que se sincronizan entre sí. Diversos experimentos como los mostrados en la figura 14B demostraron la existencia de estructuras espacio-temporales robustas con actividad recurrente y alternante (**Figura 14B y C**).

Bajo estas condiciones los estados son continuamente visitados sin que exista una preferencia de la red por permanecer en un estado dado (**Figura 14B**; observar la probabilidad de transición de un estado a otro), lo cual demuestra la existencia de varios puntos semiestables que podrían representar cierto tipo de atractores (Cossart et al. 2003). Los histogramas de la actividad global muestran varios picos de sincronía (asteriscos; **Figura 14C**) que se alternan a través del tiempo, lo cual demuestra una dinámica multiestable en el comportamiento de la red (Carrillo-Reid et al. 2008).

La figura 14D muestra la distribución espacial de los grupos neuronales que generan los diversos estados funcionales. En general, cada estado utiliza neuronas distintas (**Figura 14E**), lo que es demostrado concluyentemente por el análisis jerárquico de grupos (**Figura 14F**). Sin embargo, es importante notar la existencia de un grupo de neuronas compartidas por todos los estados (8% de las neuronas que participan en los picos de sincronía).

Con estos experimentos concluimos que los estados funcionales denotados por la aparición espontánea de picos de sincronía están generados por la actividad coordinada de diferentes ensambles neuronales, tal como ocurre con los CPGs unitarios (Grillner, 2006). Las transiciones entre los estados tienen una dinámica de red de largo plazo.

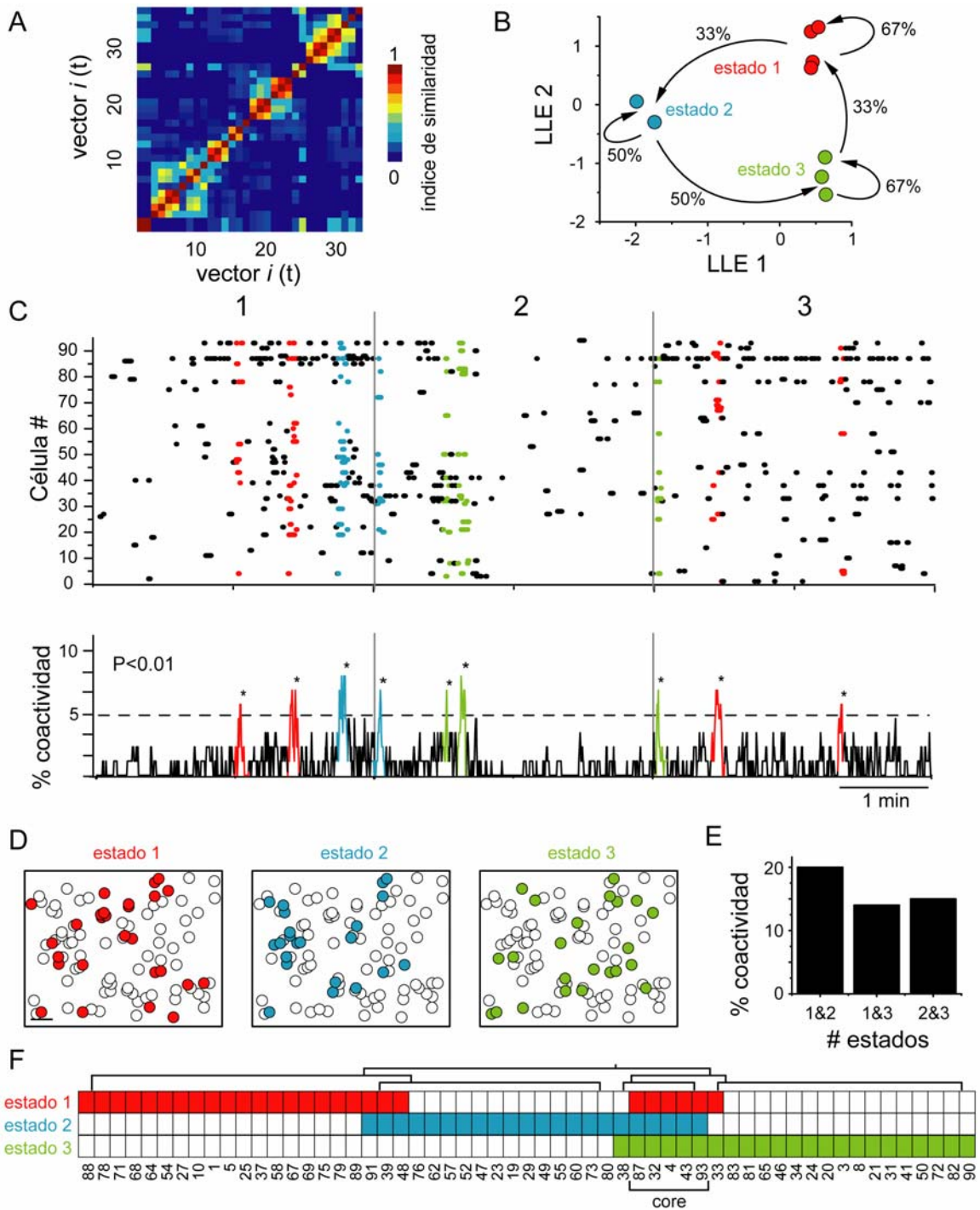


Figura 14. Los ensambles neuronales mantienen la dinámica del microcircuito neocortical.

A: Índices de similitud de los vectores que representan la dinámica de la red. B: Diferentes estados encontrados por LLE. C: Gráfica de la actividad poblacional. Los colores señalan estados distintos. D: Mapas espaciales de los ensambles neuronales que sostienen la actividad de la red. E: Porcentaje de células coactivas en varios estados. F: Agrupamiento de células que participan en los estados funcionales. Cada estado corresponde principalmente a un grupo de neuronas.

La activación recurrente de los mismos ensambles neuronales a través del tiempo muestra que los elementos que forman estos módulos están asociados de manera robusta y tienen una estructura determinada, lo cual permite que se alternen la actividad a lo largo del tiempo. Finalmente, todos estos estados están relacionados por medio de un ensamble central (“*core assembly*” en inglés) de neuronas compartidas, las cuales podrían estar dictando las relaciones temporales que ocurren entre los distintos grupos neuronales.

Mecanismos básicos que mantienen la dinámica de la red en el microcircuito neocortical

Para investigar los requerimientos básicos que mantienen la dinámica multiestable en la red neocortical, diseñamos experimentos que nos permitieran dilucidar la participación de distintos componentes sinápticos e intrínsecos.

En primer lugar investigamos la participación de la inhibición sináptica en el microcircuito (Czubayko y Plenz, 2002; Koos et al. 2004; Tepper et al. 2004; Tunstall et al. 2002), para ello utilizamos bicuculina, que es un antagonista de los receptores GABA_A. La figura 15 muestra que el bloqueo de la inhibición sináptica rápida, una vez que el circuito se encuentra activo, reduce drásticamente la transición entre estados (n = 6 rebanadas). La red se engancha en un estado preferido que es continuamente visitado (o del que es difícil salir). Los índices de similitud que representan la dinámica de la red demuestran la ausencia de estados funcionales diversos (**Figura 15A**). Únicamente es posible observar

transiciones ocasionales entre los estados (**Figura 15B**). Paradójicamente, la actividad global de la red exhibe un mayor número de picos de sincronía, mostrando un incremento en el número de estos: de 2.7 ± 0.2 picos en la condición de NMDA a 8.3 ± 2 picos en presencia de bicuculina ($P < 0.01$). También encontramos un incremento en el número de células coactivas que forman el estado funcional dominante (**Figura 15C**). De hecho, la mayoría de los picos de sincronía forman parte de un estado dominante que “acapara” la red.

Las neuronas que forman parte de los estados funcionales se muestran en las figuras 15D y E. Bajo estas condiciones el análisis jerárquico de grupos no pudo encontrar diversos ensambles neuronales a pesar de que existiera una mayor sincronización global (**Figura 15F**), lo cual significa que la mayoría de las neuronas activas se encuentran agrupadas dentro del mismo estado dominante. La estimulación cortical en presencia de bicuculina recluta más neuronas estriatales que aquellas reclutadas en condiciones control o en presencia de NMDA. Por lo tanto concluimos que la transmisión GABAérgica rápida es un requerimiento necesario para que la red neostriatal pueda exhibir una dinámica multiestable formada por la transición entre varios estados.

Esto significa que el arreglo del microcircuito estriatal es el que provoca los patrones de actividad, pues las sinapsis inhibitorias de este circuito son propias del núcleo. En otras palabras, el circuito no es un simple “seguidor” de la

actividad proveniente de otra parte, sino que procesa la información para generar una salida funcional.

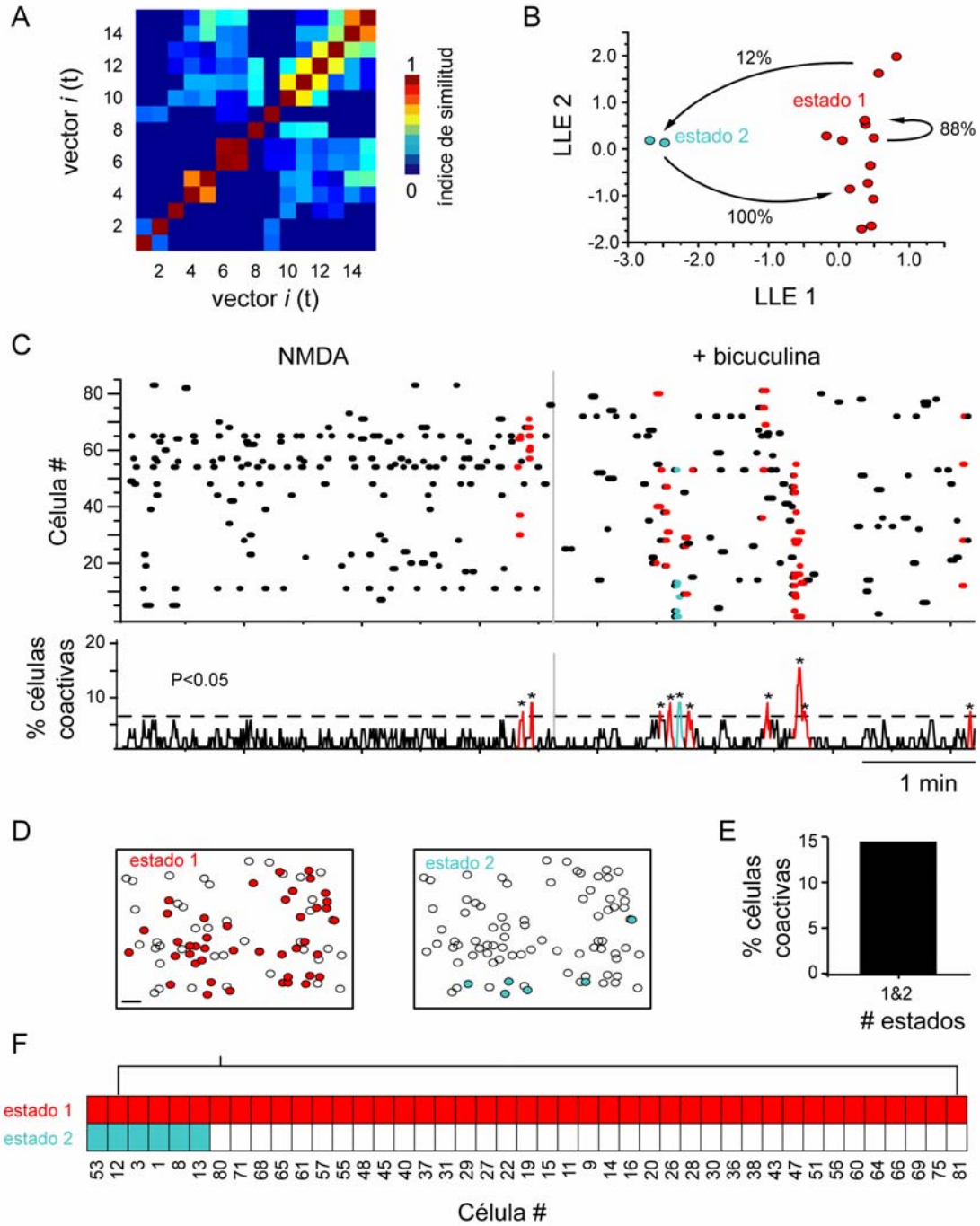


Figura 15. La transmisión GABAérgica rápida es necesaria para las transiciones entre estados. A: Índices de similitud de los vectores que representan la dinámica de la red en presencia de bicuculina. Nótese la ausencia de estructuras cuadradas. B: En presencia de bicuculina LLE muestra la existencia de un estado preferente con saltos ocasionales hacia otro estado. C: Gráfica de la actividad global de la red en diferentes condiciones experimentales. La línea vertical separa ambas condiciones experimentales. El bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida produce un incremento en la sincronización de la actividad de red del microcircuito neocortical. La frecuencia y amplitud de los picos de sincronía (asteriscos) aumenta después de la aplicación de bicuculina. D: Mapa espacial de las neuronas que participan en los estados. E: Porcentaje de células coactivas en los dos estados. F: El algoritmo de agrupamiento jerárquico muestra la existencia de un solo grupo de células activas. Todas las células del estado 2 participan en el estado 1.

La siguiente serie de experimentos tenía como objetivo determinar el papel de la transmisión glutamatérgica mediada por los receptores AMPA, en la orquestación de los ensambles neuronales. Es necesario recordar que los antagonistas de los receptores NMDA no pueden ser usados, ya que la actividad de red estudiada está generada por la aplicación de NMDA en la perfusión. Tanto el lavado del NMDA del medio de perfusión como el bloqueo de los receptores NMDA con APV, interrumpe la dinámica de la red aquí descrita (datos no mostrados).

Para bloquear los receptores AMPA utilizamos CNQX (**Figura 16A**). Una vez bloqueadas las entradas excitadoras se redujo drásticamente el número de células activas y se interrumpió la aparición de los picos de sincronía generados por la aplicación de NMDA (**Figura 16A**).

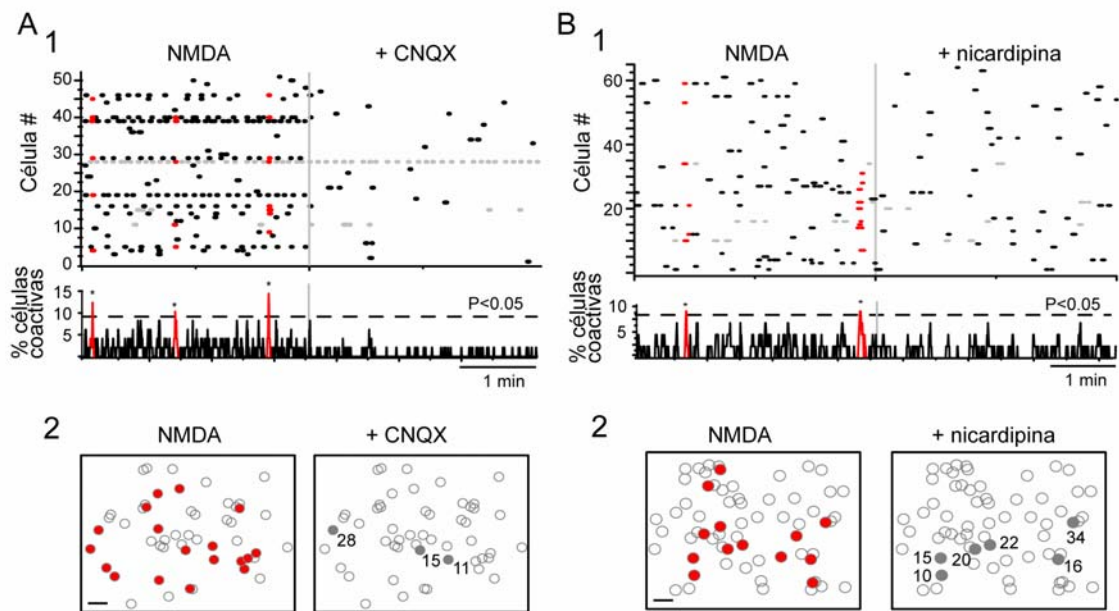


Figura 16. El bloqueo de la transmisión AMPA o de las corrientes de calcio tipo L interrumpe la actividad de red inducida por NMDA. A1: Gráficas de actividad global durante la presencia de NMDA (izquierda) y CNQX (derecha). La línea vertical separa las dos condiciones experimentales. Los picos de sincronía (asteriscos) fueron suprimidos después de la aplicación de CNQX, y la actividad global de la red se redujo drásticamente. A2: Mapas espaciales de las células que participaban en los picos de sincronía. Escala: 100 μ m. Los círculos grises representan células que continuaron activas en presencia de CNQX. B1: Gráficas de actividad global en presencia de NMDA (izquierda) y nifedipina (derecha). Los picos de sincronía (asteriscos) fueron suprimidos después de la aplicación de nifedipina. B2: Mapas espaciales de las células involucradas en los picos de sincronía. Los círculos grises representan las células que permanecieron activas en presencia de nifedipina.

De forma interesante, algunas neuronas que se encontraban activas durante los picos de sincronía permanecieron activas en la ausencia de transmisión sináptica del tipo AMPA (**Figura 16A1 y 2**; círculos grises; Vergara et al. 2003). Pero en presencia de CNQX, la estimulación eléctrica cortical fue incapaz de reclutar neuronas espinosas medianas y toda la actividad correlacionada fue suprimida. Esto quiere decir que la entrada excitadora de las aferentes (e.g.,

corticales) es necesaria para activar al microcircuito. Esto es, la actividad generada por la red depende de sinapsis propias del núcleo (GABAérgicas) y de las aferencias provenientes de otros núcleos (glutamatérgicas).

Es sabido que las conductancias intrínsecas participan en la generación de oscilaciones del potencial de membrana en distintos tipos de células. En particular, la actividad biestable generada por la activación de los receptores NMDA en las neuronas espinosas medianas está mediada por los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L (Vergara et al. 2003). Dichos canales de calcio promueven la generación de potenciales en meseta que ayudan al mantenimiento de ráfagas de potenciales de acción durante largos periodos de tiempo. Por lo tanto investigamos la participación de los canales de calcio de tipo L en la dinámica de la red inducida por NMDA. Para ello bloqueamos los canales de calcio de tipo L con nicardipina. Como se muestra en la gráfica de actividad global en la figura 16B1, la aplicación de nicardipina en el medio de perfusión reduce el número de picos de sincronía en la red neocortical, sin embargo, no reduce significativamente el número de células activas. Varias células involucradas en la actividad sincrónica generada por NMDA continuaron activas durante la presencia de nicardipina (**Figura 16B1 y 2**; círculos grises). Pero ya no fue posible que se sincronizaran para generar estados funcionales en la red. Concluimos que los potenciales *plateau* que resultan de la activación de los canales de calcio de tipo L son necesarios para la sincronización de la red neocortical (Vergara et al. 2003) y para la generación de patrones producida por

la actividad de diversos ensambles neuronales en las rebanadas tratadas con NMDA. Esto quiere decir que además de las propiedades sinápticas, la actividad generada por la red requiere de las propiedades intrínsecas de las neuronas.

Las interneuronas coordinan la actividad secuencial de los ensambles neuronales

En la mayoría de las rebanadas que tuvieron una dinámica de red multiestable (80%), encontramos un ensamble central (“core assembly”) de neuronas que formaban parte de todos los estados funcionales, dichas neuronas tenían un patrón de disparo característico por lo cual realizamos experimentos para registrar electrofisiológicamente estas células. Las neuronas de este tipo representaron el $8 \pm 2\%$ del total de neuronas activas en los estados funcionales de la red. Algunas de las neuronas del ensamble central exhibían señales de calcio periódicas tanto en condiciones control como en presencia de NMDA o CNQX. El bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida interrumpió el disparo periódico en estas células. Para caracterizar las propiedades electrofisiológicas en estas células realizamos registros de célula entera en la configuración de fijación de corriente o medimos las corrientes extracelulares generadas por el disparo en ráfagas (**Figura 17A**). Gracias a ello encontramos que el 40% de las neuronas del ensamble central eran interneuronas GABAérgicas que presentan disparo en ráfagas de alta frecuencia (Plenz y Aertsen, 1996; Tepper et al. 2004) y actividad periódica de tipo marcapaso (**Figura 17**).

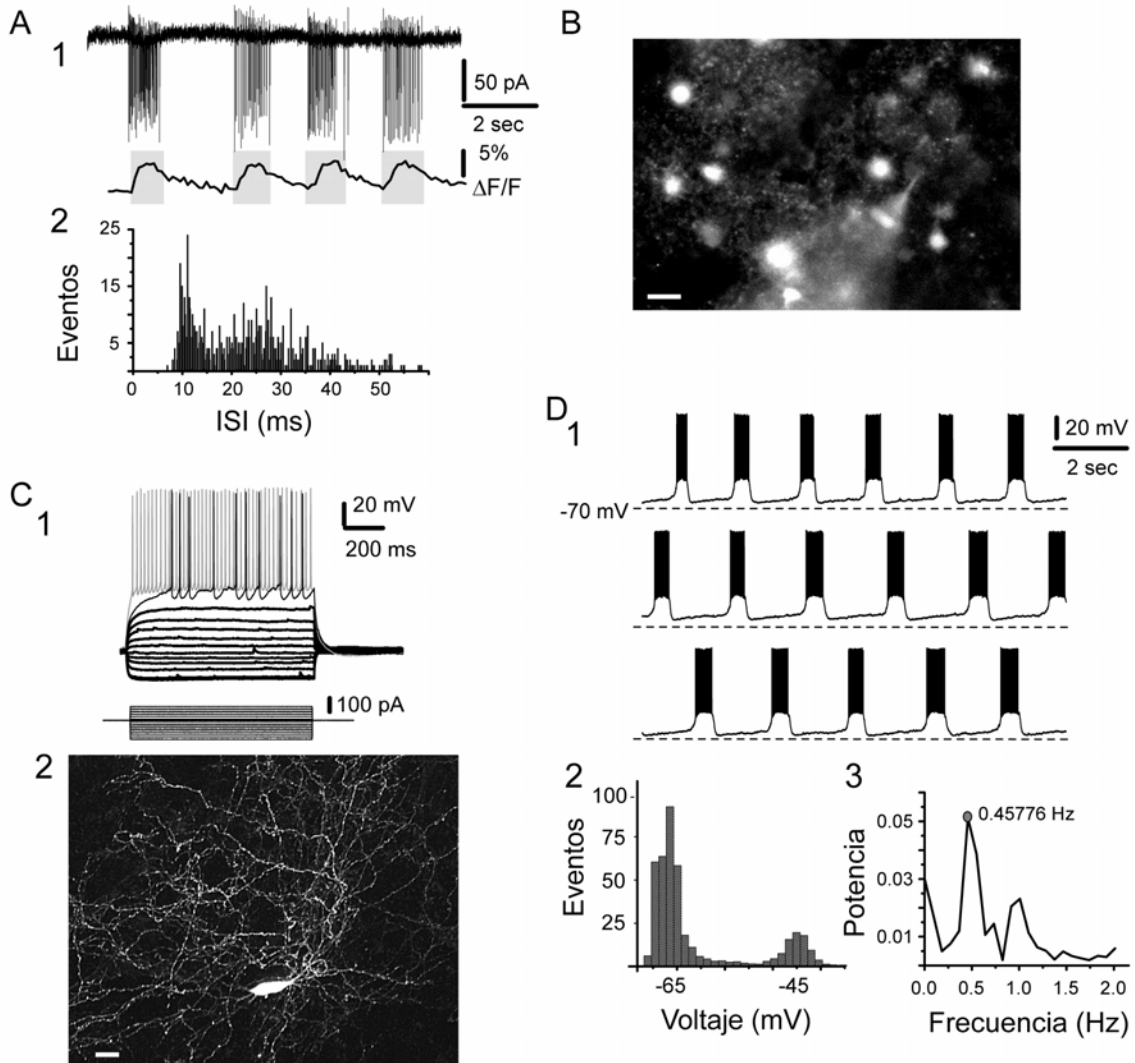


Figura 17. Las interneuronas GABAérgicas coordinan la actividad de los ensambles neuronales. A: Registro extracelular (arriba) e imágenes de calcio (abajo) de una neurona que presentaba actividad marcapaso en presencia de NMDA. Los registros muestran el disparo de alta frecuencia en ráfagas de potenciales de acción y sus señales de calcio correspondientes. Nótese el pico en el histograma alrededor de 11 ms. B: Imagen de fluorescencia de la célula registrada en A. Escala: 15 μ m. C1: Respuestas de voltaje ante comandos de corriente registrados en otra neurona que tenía actividad marcapaso. C2: La misma neurona cargada con biocitina. La imagen corresponde a una interneurona GABAérgica. Escala: 15 μ m. D1: La misma célula mostrada en C mostró actividad marcapaso en presencia de NMDA. Nótese la periodicidad de las oscilaciones. D2: Histograma que muestra el comportamiento biestable del potencial de membrana. D3: Espectro de potencia de la misma neurona. Existe una actividad periódica de 0.46 Hz.

Sin embargo por medio de la fijación de las señales fluorescentes en las células activas durante un experimento dado mostramos que la mayoría de las células que forman parte de los ensambles neuronales eran neuronas espinosas medianas inmunoreactivas a sustancia P o encefalinas (**Figura 18**). Esto demuestra que a pesar de ser una minoría del total de las células activas, las interneuronas GABAérgicas podrían tener un papel determinante esculpiendo la actividad de los ensambles neuronales a través del tiempo (Berke et al. 2004).

Por lo tanto, concluimos que además de las propiedades sinápticas y de las propiedades intrínsecas de las neuronas principales del circuito, la actividad generada por la red requiere de la especialización neuronal, esto es, de diferentes tipos de neuronas cumpliendo roles específicos en el microcircuito.

Estos experimentos permitieron demostrar que la actividad generada por la adición de NMDA en el microcircuito estriatal no es estocástica, es decir, no se debe a un simple aumento de la excitabilidad. Tampoco es resultado del seguimiento simple de la actividad generada en otros núcleos (e.g., la corteza). Sino que el aumento en la excitabilidad generado por la entrada excitadora tónica activa un microcircuito con conexiones establecidas y con neuronas especializadas coordinadas entre sí. Esto hace que una entrada no correlacionada en sí misma produzca una salida estructurada. En otras palabras, podemos estudiar el procesamiento del microcircuito neostriatal ante diferentes estímulos.

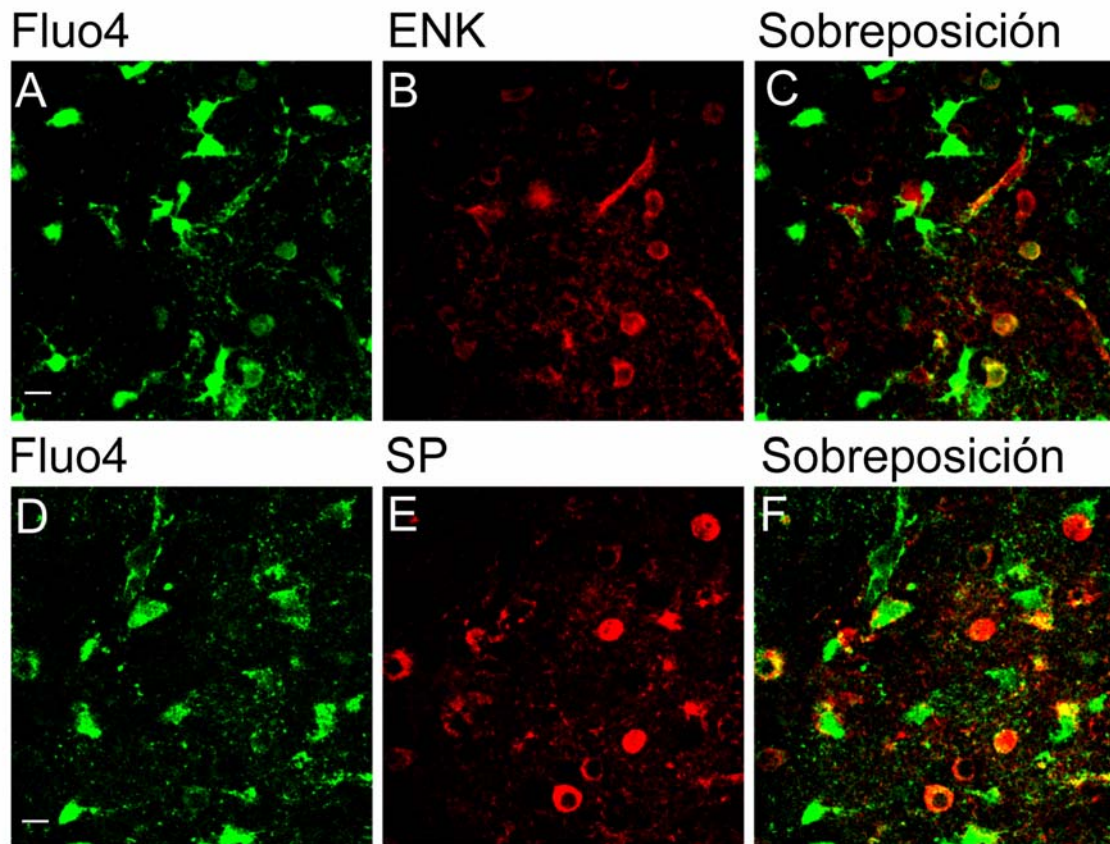


Figura 18. La mayoría de las células activas en los ensambles neuronales son neuronas espinosas medianas. A: Imagen confocal del estriado dorsal que muestra las células cargadas con fluo4 AM que estuvieron activas durante el experimento. Escala: 10 μ m. B: Imagen confocal del mismo campo que muestra que varias de las neuronas activas fueron inmunoreactivas a encefalias (ENK), un marcador específico de neuronas espinosas medianas. C: Sobreposición de A y B. D: Imagen confocal del estriado dorsal que muestra las neuronas activas cargadas con fluo4 AM durante un experimento. Escala: 10 μ m. E: Imagen confocal del mismo campo que muestra que varias de estas células fueron inmunoreactivas a sustancia P (SP), otro marcador específico de neuronas espinosas medianas. F: Sobreposición de D y E.

Modulación colinérgica en el disparo correlacionado de los elementos del microcircuito neocortical

La aplicación de NMDA induce dinámicas de red en el microcircuito neocortical, esto es, grupos de neuronas con disparo en ráfagas correlacionado que alternan su actividad de manera recurrente a lo largo del tiempo. Lo cual está representado por diferentes estados de la red que cambian formando secuencias que se repiten una y otra vez (Ikegaya et al. 2004; Lee y Wilson, 2002). Una vez establecidos los mecanismos básicos que generan la actividad de red en el microcircuito neocortical, la siguiente pregunta consistió en investigar si este comportamiento es susceptible de ser modulado por diferentes neurotransmisores. Por lo tanto como paso siguiente estudiamos los efectos de la activación del sistema colinérgico sobre la actividad generada por la red cortical e inducida por NMDA.

En primer lugar investigamos la modulación colinérgica sobre los patrones de disparo en ráfagas de potenciales de acción en las neuronas espinosas medianas, para ello realizamos registros de célula entera en la configuración de fijación de corriente y al mismo tiempo seguimos la actividad de la red con imágenes de calcio.

La figura 19 muestra que la activación de los receptores muscarínicos en las neuronas espinosas medianas genera un cambio en el patrón de disparo inducido por la aplicación de NMDA (**Figura 19A**). La frecuencia y el nivel de

despolarización en las oscilaciones del potencial de membrana se encuentran incrementados (n=26 células). Este cambio está asociado con el incremento de la región de conductancia con pendiente negativa y la reducción del rectificador entrante mostrados en la relación corriente voltaje de las neuronas espinosas medianas (**Figura 19B**). La aparición de una zona de conductancia con pendiente negativa habilita a las neuronas con propiedades no lineales (Izhikevich, 2007; Schiller y Schiller, 2001), lo cual da lugar a varios comportamientos en la dinámica de la red. El incremento en las transiciones del potencial de membrana es bloqueado por APV, un antagonista de los receptores a NMDA. Esto sugiere que la participación de mecanismos intrínsecos como la zona de conductancia con pendiente negativa en las neuronas estriatales es determinante para el establecimiento de actividad generada por la red (Vergara et al. 2003).

De manera interesante, el incremento en la zona de conductancia con pendiente negativa provocado por la activación de los receptores muscarínicos sólo puede ser observado en presencia de NMDA; la activación de los receptores muscarínicos en condiciones control únicamente reduce la cantidad de corriente debida al rectificador entrante en las neuronas espinosas medianas (Figueroa et al. 2002).

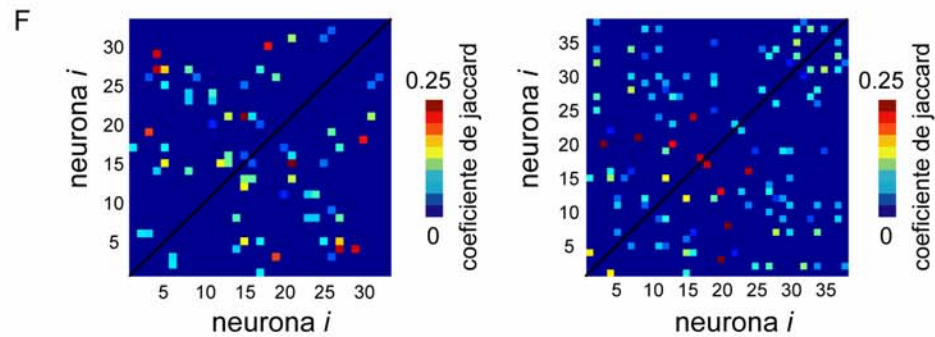
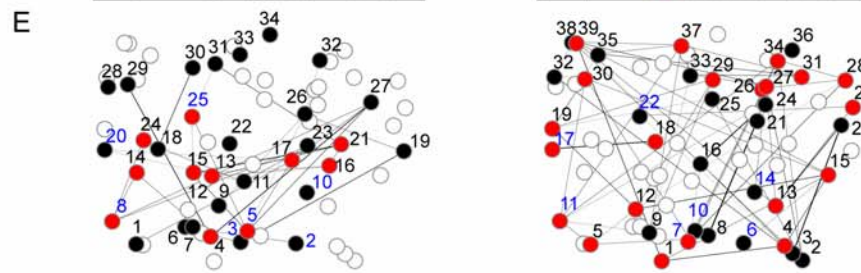
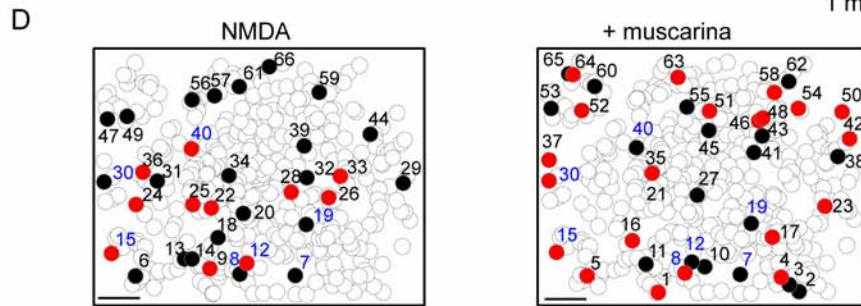
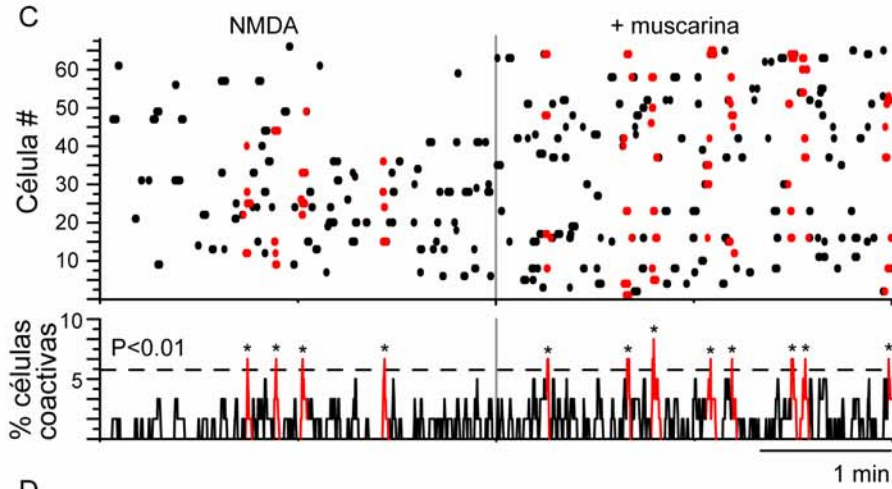
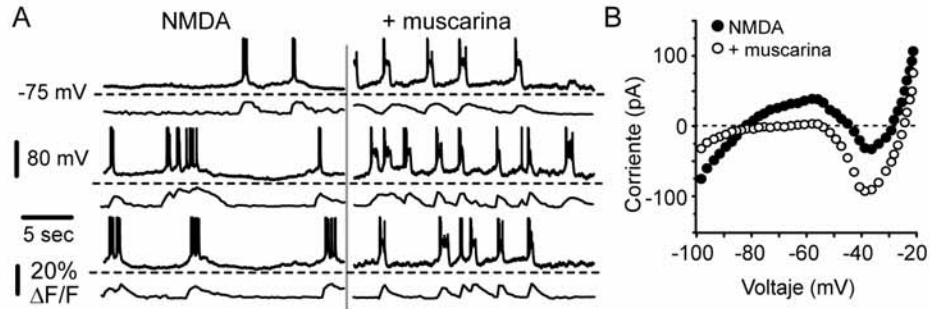


Figura 19. Modulación colinérgica de la actividad de red del microcircuito neoestriatal.

A: Registros electrofisiológicos realizados de manera simultánea con imágenes de calcio, en presencia de NMDA (izquierda) y muscarina (derecha). B: Relación corriente-voltaje medida en fijación de voltaje. La activación de los receptores NMDA produce una zona de conductancia con pendiente negativa en las neuronas espinosas medianas. La activación de los receptores muscarínicos incrementa la zona de conductancia con pendiente negativa y reduce la rectificación entrante. C: Gráficas de actividad global en presencia de NMDA y muscarina. La frecuencia de los picos de sincronía (asteriscos) aumenta durante la aplicación de muscarina. D: Mapas espaciales de las neuronas activas. Las neuronas que tuvieron actividad antes y después de la aplicación de muscarina están indicadas con números azules. La numeración corresponde a las gráficas de actividad global. E: Mapas de correlación de la actividad de red. F: Mapas de pseudocolor de todos los posibles pares de células activas. El número de neuronas con actividad correlacionada aumenta significativamente durante la aplicación de muscarina (35 vs. 64 líneas). Sin embargo no existe un incremento significativo en el número de células activas (34 vs. 39 células)

Para estudiar el efecto del sistema colinérgico sobre la actividad de la red neoestriatal utilizamos imágenes de calcio con resolución de célula única. Realizamos secuencias de imágenes (180 segundos) bajo diferentes condiciones farmacológicas y por medio de la actividad global de la red seguimos el disparo en ráfagas de varias neuronas simultáneamente (**Figura 19C**). La activación de los receptores muscarínicos incrementó considerablemente las correlaciones entre los elementos del microcircuito neoestriatal (**Figura 19E**) así como el número de picos de actividad sincrónica (**Figura 19C**; 2.8 picos durante NMDA contra 12.2 picos en presencia de muscarina; $P < 0.001$). La duración de los picos de actividad sincrónica corresponde con la duración de las transiciones en el potencial de membrana de

las neuronas espinosas medianas medidos electrofisiológicamente (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003).

Las neuronas activas durante el experimento están marcadas con círculos llenos en los mapas espaciales de la figura 18D. Las letras azules indican células que estuvieron activas antes y después de la exposición a muscarina. Los círculos rojos indican células que estuvieron activas durante los picos de actividad sincrónica. Las líneas conectan pares de neuronas que presentaron correlación a lo largo de los experimentos. De forma análoga a la utilizada en los experimentos anteriores construimos matrices de correlación en pseudo color antes y después de la exposición a muscarina, utilizando el coeficiente de correlación de Jaccard (**Figura 19F**). La modulación colinérgica incrementó considerablemente el disparo correlacionado entre las células (**Figuras 19C-F**; 35 líneas en la condición de NMDA contra 64 líneas durante la exposición a muscarina), sin embargo el número de células activas no se encuentra incrementado significativamente (34 células durante la aplicación de NMDA contra 39 células en la condición de muscarina). Sin embargo, no todas las células que presentan disparos correlacionados participaron en los picos de sincronía lo cual sugiere que el disparo correlacionado entre pares de células no es una condición suficiente para afirmar que un par de células pertenecen a un mismo ensamble neuronal (Carrillo-Reid et al. 2008; Hebb, 1949).

Para comparar las acciones del agonista exógeno (muscarina) con las provocadas por la liberación endógena de acetilcolina, utilizamos eserina, que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa, por lo cual el tono basal de acetilcolina en el estriado se eleva. La elevación de la concentración endógena de acetilcolina produjo de manera similar un incremento en la aparición de picos de sincronía y disparo correlacionado en todos los experimentos realizados (n = 12 rebanadas). El incremento en la sincronización es mediado por los receptores muscarínicos ya que la adición de atropina en el medio de perfusión redujo el aumento en la sincronía regresando la dinámica de la red a la condición inicial (NMDA, pre-eserina; NMDA: 2.3 picos/periodo, 37 células, 36 líneas; eserina: 12.5 picos/periodo, 39 células, 58 líneas; atropina: 2.8 picos/periodo, 36 células, 33 líneas; **Figura 20**). En resumen, estos experimentos demuestran que la activación del sistema colinérgico en el neostriado induce el incremento en la correlación de las células activas, este incremento es reversible y específico ya que puede ser bloqueado por la exposición de la rebanada a un antagonista muscarínico (atropina).

Ya mencionamos que la característica cardinal que identifica la dinámica de una red neuronal sostenida por ensambles neuronales consiste en que la aplicación de una entrada tónica excitadora puede ser transformada en patrones de actividad generados por diversos estados de la red. Dicha actividad estereotipada se caracteriza por la aparición de varios grupos de neuronas con actividad sincrónica, alternante y recurrente (Hebb, 1949; Lorente de Nó, 1938).

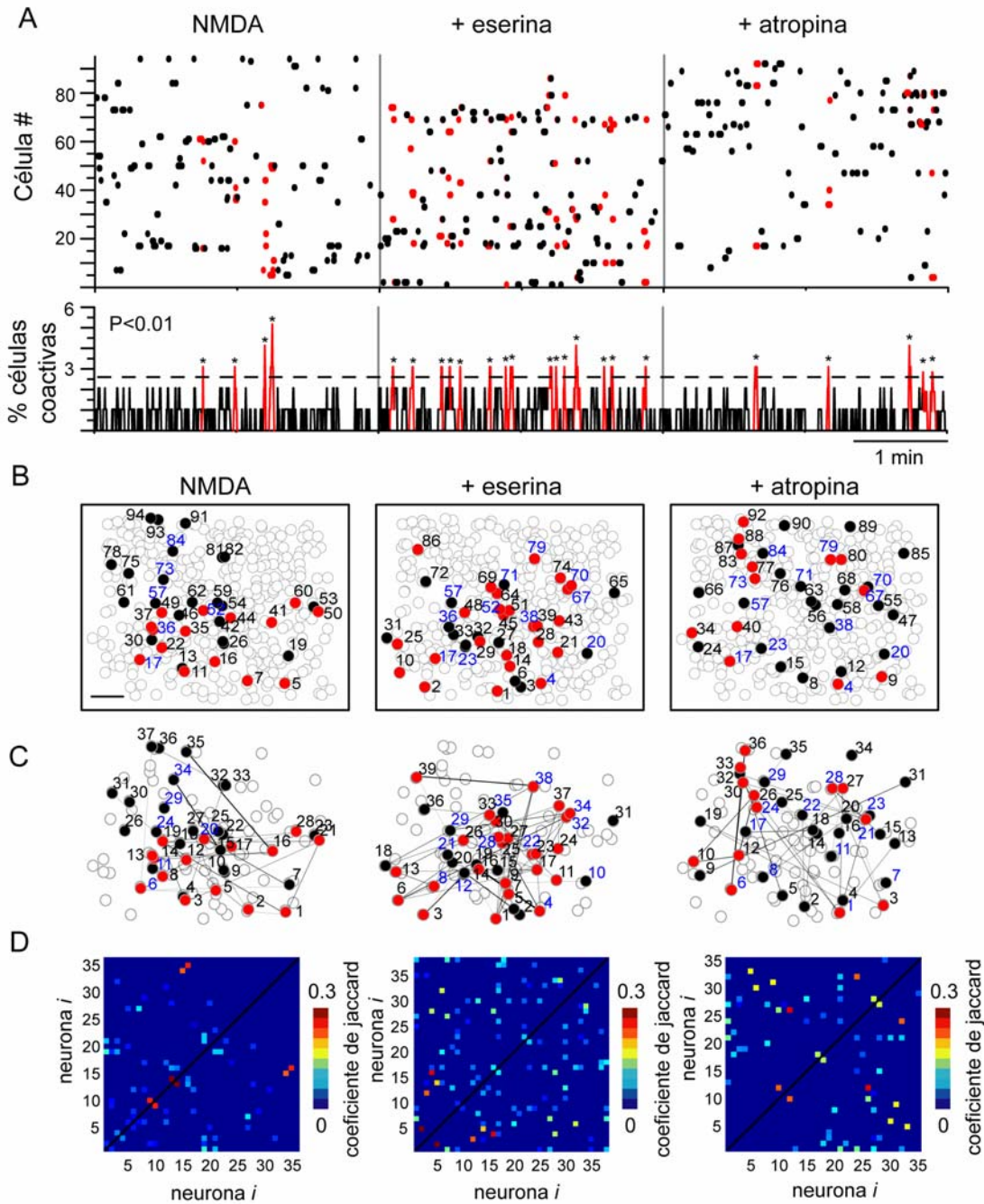


Figura 20. La modulación colinérgica de la actividad de la red es específica y reversible. A: Gráficas de actividad global en diferentes condiciones experimentales. B: Mapas espaciales de las células involucradas en la actividad de red. C: Mapas de correlación de las neuronas activas. D: Mapas de pseudocolor de todas las posibles correlaciones entre las células activas. El número de neuronas con disparo correlacionado se incrementa significativamente durante la presencia de eserina. Sin embargo no hay un incremento significativo en el número de células activas.

Basados en los resultados descritos con anterioridad pensamos que la activación del sistema colinérgico podría habilitar a los ensamblajes neuronales del microcircuito neoestriatal con propiedades más complejas que aquellas conferidas únicamente por la aplicación de NMDA (Carrillo-Reid et al. 2008).

Modulación colinérgica de los estados funcionales en la red neoestriatal

Para estudiar las acciones del sistema colinérgico en el comportamiento global de la red, realizamos distintas secuencias de imágenes separadas por intervalos de tiempo durante periodos largos (más de una hora; n=15 rebanadas), después vectorizamos la actividad de red construyendo pequeñas ventanas de tiempo del comportamiento global de las células (Sasaki et al. 2007). Obtuvimos los mismos resultados para diferentes ventanas de tiempo. La vectorización nos permitió realizar una comparación rigurosa entre los picos de sincronía que aparecieron antes y después de la aplicación de muscarina en el medio de perfusión (Brown et al. 2005; Carrillo-Reid et al. 2008; Sasaki et al. 2007).

El producto interno de todos los posibles pares de vectores graficado como una matriz de pseudocolor permite distinguir la similitud entre los diferentes estados de la red (**Figura 21A**). La aparición de estructuras agrupadas distribuidas a través del tiempo en la matriz de similitud demostró que existían cambios radicales en la dinámica de la red neoestriatal después de la activación del sistema colinérgico.

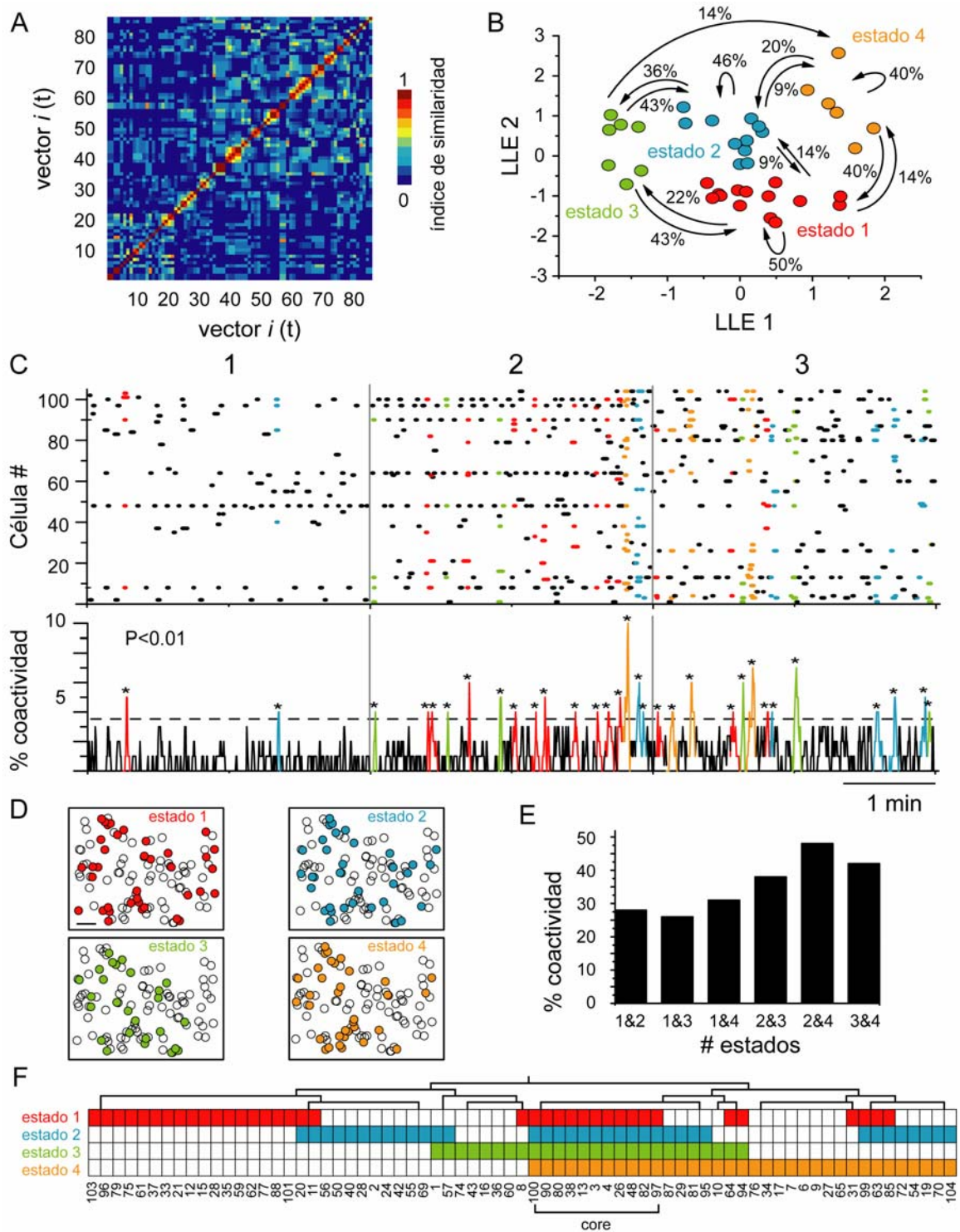


Figura 21. Generación de rutas alternas en los estados de la red **debido a la modulación colinérgica.**

A: Índices de similitud del arreglo multidimensional de los vectores que representan la dinámica de la red. B: Reducción multidimensional de los diferentes estados encontrados por LLE. C: Gráfica de la actividad global de la red. Los colores señalan los diferentes estados del microcircuito neocortical. D: Mapas espaciales de los ensambles neuronales que sostienen la actividad de la red. E: Porcentaje de células coactivas en dos estados. F: Agrupamiento jerárquico de las neuronas que participan en la dinámica de red. La activación del sistema colinérgico genera la división de los ensambles neuronales en pequeños subgrupos relacionados entre sí que presentan la propiedad conocida como “sincronía distribuida”.

Para confirmar dichos cambios redujimos las dimensiones del sistema con LLE, lo cual nos permitió observar la presencia de varios estados representados por distintos grupos de vectores (**Figura 21B**). Los puntos en estas gráficas representan la actividad sincrónica vectorizada, y los grupos de puntos demuestran la existencia de vectores con dinámicas similares a través del tiempo. Las flechas conectan los diferentes estados de la red e indican la activación secuencial de grupos de neuronas específicos que tienen actividad sincrónica. Se puede observar que los grupos neuronales alternan su actividad y siguen rutas cerradas que se repiten a lo largo del tiempo (Abeles, 2003; Hammer, 2003; Harris, 2005; Hebb, 1949). Esta dinámica difiere drásticamente de la inducida solamente por la aplicación de NMDA en la perfusión, tanto en el número de picos de sincronía como en la predisposición de la red para cambiar de un estado a otro (Carrillo-Reid et al. 2008). La figura 21C muestra el curso temporal de los picos de actividad sincronizada. El histograma representativo de

la actividad global de la red (**Figura 21C**, panel inferior) muestra el porcentaje de células coactivas como función del tiempo y de la condición experimental.

La figura 20D muestra la distribución espacial de los grupos neuronales que subyacen a los estados de la red. El porcentaje de células coactivas en varios estados se muestra en la figura 20E. El análisis jerárquico de grupos nos reveló la existencia de células que pertenecen a diferentes grupos y que participan en distintos estados del sistema (**Figura 21F**). De manera interesante, después de la activación de los receptores muscarínicos, los grupos de neuronas que sostienen cada estado fueron divididos en subgrupos, lo cual generó un mayor número de rutas entre los diferentes estados. Esto sugiere que el microcircuito neocortical puede adquirir la propiedad de “sincronía distribuida” después de la activación del sistema colinérgico (Levy et al. 2001). El incremento del tono colinérgico también produjo que más elementos fueran compartidos por varios estados (**Figura 21E**; $22 \pm 2\%$ de neuronas compartidas) a comparación de la condición generada por la aplicación de NMDA ($12 \pm 2\%$ de neuronas compartidas; **Figura 14E**).

Estos experimentos demuestran que, bajo ciertas condiciones, la activación de los receptores muscarínicos genera un cambio fundamental en la dinámica de la red neocortical. Se promueve un incremento en el nivel de sincronía de la red así como la creación de nuevas rutas entre los estados del sistema. Los cambios observados en la dinámica de la red podrían ser

interpretados teóricamente como un incremento en la capacidad de almacenar y combinar la información codificada en la actividad celular, lo cual ha sido relacionado con procesos de memoria (Hammer, 2003; Luczak et al. 2007; Roudii y Latham, 2007), o con la habilidad de cambiar con mayor facilidad entre diferentes estados de la red que podrían estar asociados con funciones específicas (Barnes et al. 2005).

Nuestra siguiente pregunta fue investigar si las rutas establecidas entre los distintos estados de la red seguían trayectorias específicas, es decir, si los ensambles neuronales podían disparar de manera cíclica o recursiva. Esto representaría la formación de ensambles neuronales como los propuestos por Hebb para una red neuronal recurrente capaz de guardar distintos trazos de memoria (Abeles, 2003; Hammer, 2003; Hebb, 1949; Levy et al. 2001).

El incremento de la actividad colinérgica promueve la organización de los ensambles neuronales en ciclos cerrados recursivos

Las figuras 22A1-3 muestran los patrones de actividad inducidos durante diferentes condiciones farmacológicas. La activación alternada entre los vectores que representan la dinámica de la red fue observada durante la aplicación de eserina o muscarina en la perfusión (n=11/15 rebanadas; ver **Figura 22**). El uso de LLE nos permitió distinguir un incremento en la generación de rutas alternas o ciclos cerrados de actividad durante la activación del sistema colinérgico, a diferencia de la condición control con NMDA (**Figuras 22B1-3**). Debido a que el

curso temporal seguido por las transiciones entre los diferentes estados de la red parecía exhibir trayectorias repetidas a través del tiempo, construimos “enunciados” entre las transiciones de los estados, para seguir la evolución de las rutas formadas a lo largo del tiempo. (**Figuras 22C1-3**; números negros). Cada enunciado fue construido como una secuencia formada por la transición entre los diferentes estados de la red a través del tiempo (Lee y Wilson, 2002). Una vez obtenidos, analizamos los enunciados buscando trayectorias o ciclos cerrados. Cada ciclo cerrado, que empieza y termina en el mismo punto, forma una “palabra” (secuencia de números; e.g. “14321”), dichas palabras se encuentran embebidas en los enunciados que describen cada experimento. Secuencias parecidas en la activación de grupos neuronales han sido asociadas con trazos de memoria que representan una función específica (Kim et al. 2007). Las mismas secuencias pueden ser encontradas durante diferentes episodios y pueden estar comprimidas o expandidas en el tiempo (Ikegaya et al. 2004; Lee y Wilson, 2002).

En nuestra representación, cada palabra está representada como una secuencia de números del mismo color. Las palabras del mismo color denotan secuencias similares, las cuales pueden empezar en puntos diferentes, pero una vez que comienzan siempre siguen, exactamente, el mismo recorrido. De esta forma identificamos códigos de secuencias en la red neocortical. Encontramos que algunas secuencias se repetían después de varios minutos (e.g. **Figura 22C2**: “13241” y “24132”; **Figura 22C3**: “2412” y “1241”).

Para visualizar claramente las rutas formadas por las transiciones de los estados de la red utilizamos métodos analíticos tomados de la Teoría de Gráficas (Diestel, 2005). Cada estado pudo entonces ser representado como el vértice de una gráfica dirigida (gráficas isomórficas dirigidas o “digrafos”; ver Métodos), y cada trayectoria puede ser representada como un segmento dirigido en la gráfica correspondiente (**Figura 22D**). De acuerdo a ello dos gráficas dirigidas G y H , son isomórficas si es posible encontrar una función $\alpha:V_G \rightarrow V_H$ tal que cada vértice de G tenga una correspondencia única con cada vértice de la gráfica H . Las gráficas isomórficas tienen las mismas propiedades teóricas y pueden generar las mismas figuras planas (Diestel, 2005). De esta forma representamos los segmentos formados por las transiciones entre estados como gráficas dirigidas identificadas con su palabra correspondiente. Las gráficas dirigidas pueden ser a su vez representadas por una matriz adyacente (**Figura 23**). La representación de dichas gráficas como matrices permite estudiarlas a través de métodos empleados en el álgebra lineal.

Desde hace más de 50 años, los ciclos cerrados han sido propuestos en muchas ocasiones como el mecanismo que permite el almacenamiento de trazos de memoria en una red neuronal; la formación de estas rutas debe representar la manera más eficiente para seguir un camino dado para dicha actividad (Hebb, 1949; Lorente de No, 1938).

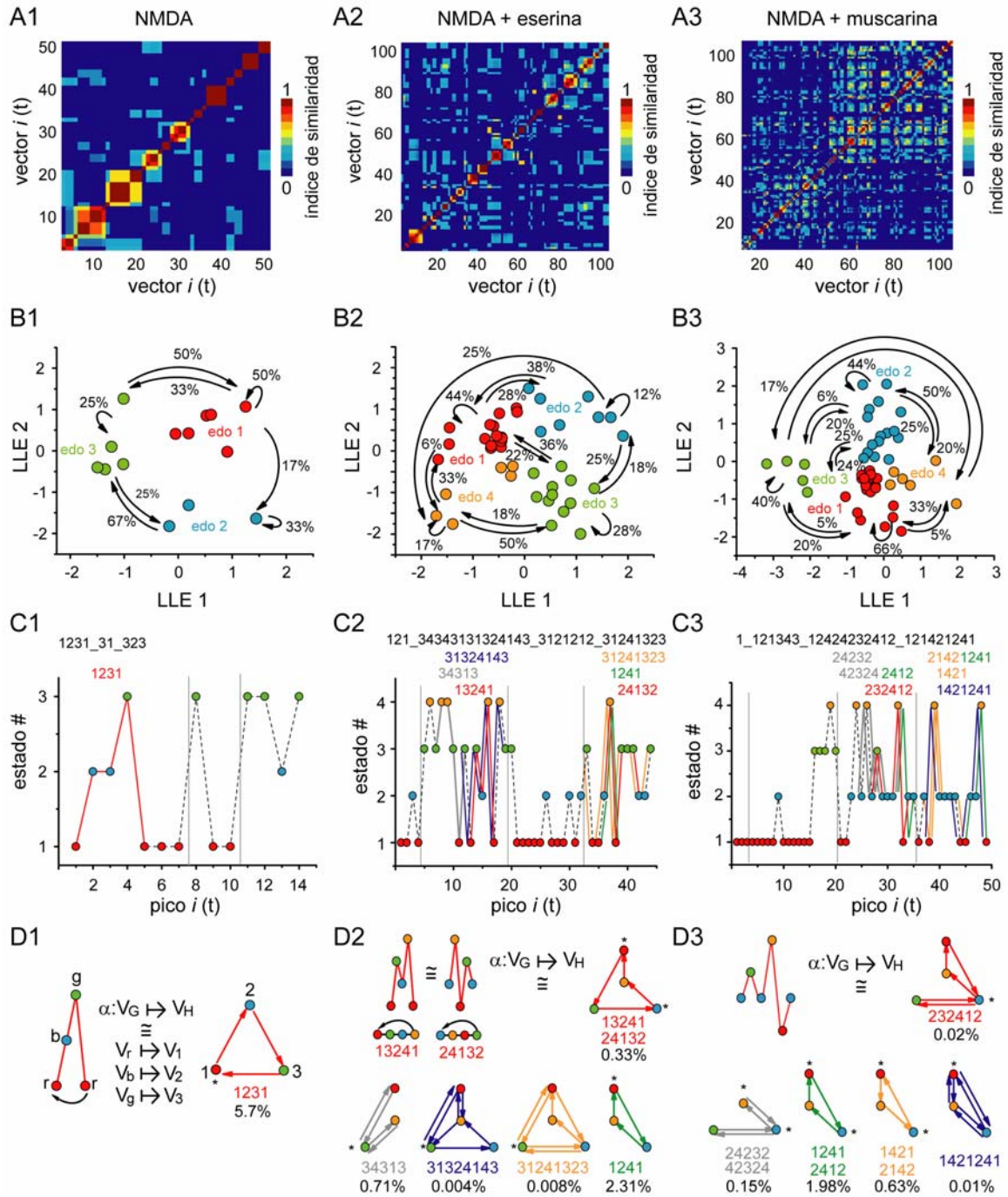


Figura 22. Organización de ciclos cerrados de actividad recursiva.

A: Índices de similitud de los vectores que representan la dinámica de la red bajo diferentes condiciones experimentales. B: Trayectorias seguidas por la dinámica de la red en las mismas condiciones mostradas arriba. La presencia de eserina o muscarina genera rutas alternas en las trayectorias seguidas por los diferentes estados. C: Transiciones entre estados en las mismas condiciones experimentales mostradas anteriormente. Los números negros indican el enunciado de cada experimento, en los cuales es posible observar ciclos cerrados de actividad recursiva. El mismo color representa un ciclo que sigue exactamente el mismo recorrido pero que puede empezar en un punto distinto. La activación del sistema colinérgico aumenta el número de ciclos y la coexistencia de varias rutas. D: Gráficas isomórficas dirigidas de las transiciones entre los estados de la red en las mismas condiciones experimentales. Algunos ciclos pueden iniciar su actividad en puntos diferentes, sin embargo la trayectoria sigue los mismos pasos. Los asteriscos indican el punto de inicio. La probabilidad condicional de que ocurra un ciclo dado está indicada en negro.

Por ello, únicamente analizamos las gráficas dirigidas que formaran ciclos de Hamilton o de Euler; los cuales representan la manera más eficiente para realizar un recorrido entre ciertos puntos (**Figura 23**). Las figuras 22D1-3 muestran las gráficas dirigidas formadas después de la activación del sistema colinérgico. Es importante resaltar que durante el tratamiento con eserina o muscarina, la mayoría de los ciclos se encuentran sobrelapados, es decir, varios ciclos pequeños se combinan para formar ciclos más complejos siguiendo reglas específicas de composición (n=35/50 videos; **Figuras 22C2 y C3; Figura 24**), lo cual demuestra que después de la activación del sistema colinérgico los ensamblajes neuronales del microcircuito neocortical adquieren propiedades de composición, lo que les permite formar arreglos complejos a partir de módulos o

unidades elementales (“composicionalidad”) (Bienenstock y Geman, 1995; Hammer, 2003).

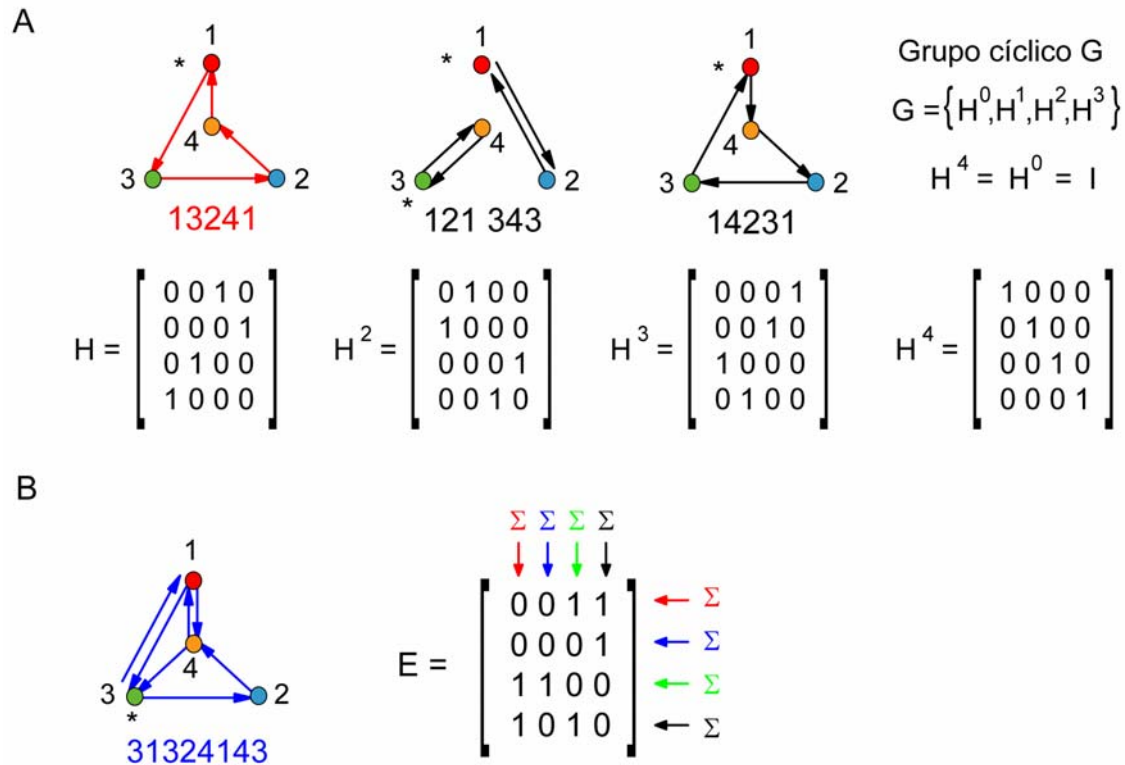


Figura 23. Propiedades matemáticas de las trayectorias que siguen ciclos cerrados.

A: En rojo se muestra un ciclo Hamiltoniano compuesto por cuatro vértices. La matriz adyacente de dicho ciclo es H . Es importante resaltar que la matriz H elevada al cuadrado y al cubo también genera ciclos Hamiltonianos. H elevada al número de vértices que contiene la gráfica dirigida da como resultado la matriz identidad. Un grupo formado por dichos elementos se conoce como Grupo cíclico y el elemento H recibe el nombre de generador del grupo. B: En azul se muestra un ciclo de Euler. La característica principal de los ciclos de Euler es que la suma de los elementos de la columna i es igual a la suma de los elementos del renglón i (letras del mismo color).

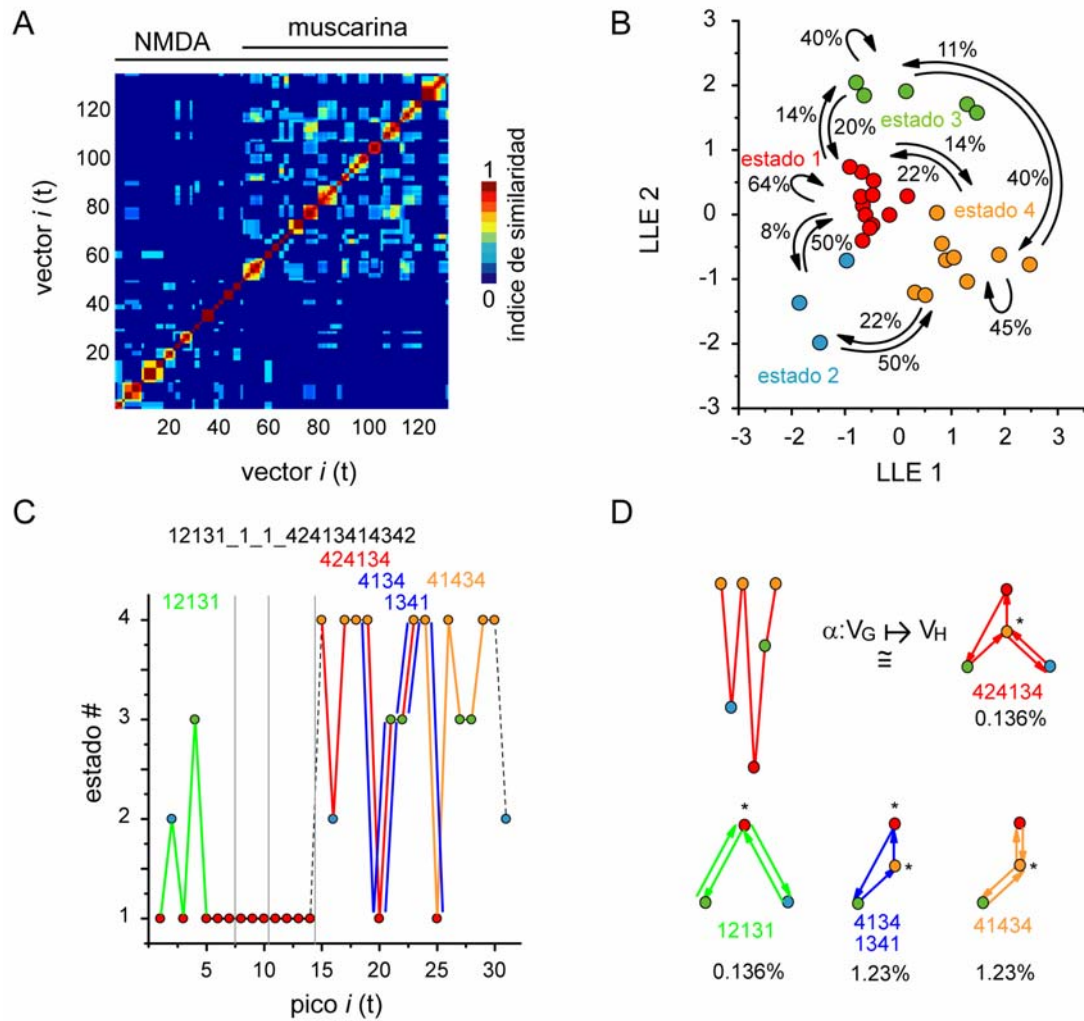


Figura 24. Cambio en la dinámica de la red mediado por la activación de los receptores muscarínicos. La figura representa el mismo experimento mostrado en la figura 22A1, B1, C1, D1; mostrando el efecto de la aplicación de muscarina sobre la dinámica de la red. A: Índices de similitud de los vectores que representan la dinámica de la red en diferentes condiciones experimentales. Es importante resaltar el cambio en la dinámica debido a la activación de los receptores muscarínicos (actividad recurrente). B: Reducción multidimensional de los vectores que representan los estados de la red. C: Transiciones de estado a través del tiempo. Las líneas verticales separan diferentes condiciones experimentales. Sólo el último periodo representa la condición de NMDA + muscarina. Existe un incremento en el número de ciclos y la composición de ciclos más complejos durante la aplicación de muscarina. D: Gráficas isomórficas dirigidas de los ciclos de actividad mostrados en C.

El incremento del tono colinérgico induce la propiedad de composición en los ensambles neuronales del neocórtex

La propiedad de composición es un tema central en el estudio de los procesos cognitivos. Ésta se refiere a la capacidad de cualquier sistema para construir representaciones complejas organizadas jerárquicamente a partir de elementos básicos y reglas específicas de composición (Bienenstock y Geman, 1995; Hammer, 2003). Existen muchos sistemas que pueden ser explicados a partir de sus propiedades de composición, como el lenguaje, que a partir de 27 letras y unos cuantos signos puede formar un infinito número de composiciones tales como novelas y cuentos, como los hábitos que determinan nuestra vida cotidiana y que están formados por la composición de varias rutinas elementales, etc. (Bienenstock y Geman, 1995). La organización de los ensambles neuronales en jerarquías modulares es uno de los requisitos para poder guardar y utilizar cualquier tipo de información compuesta (Hammer, 2003). Dicha organización, permitiría la representación de diversos objetos o tareas por medio de la composición de sus partes elementales (Abeles, 2003; Bienenstock y Geman, 1995; Grillner, 2006). Nos dimos a la tarea de encontrar alguna evidencia que nos permitiera demostrar que el microcircuito estriatal es capaz de organizarse de esta manera. Utilizando algoritmos de agrupamiento conceptual jerárquico basados en gráficas (Jonker et al. 2001), mostramos que los ciclos cerrados de actividad que aparecen en el estriado pueden ser descompuestos en unidades más pequeñas las cuales representarían los módulos elementales (o “átomos semánticos”) para generar la dinámica de red

(Abeles et al. 2003; Hebb, 1949). La figura 25 ilustra el diagrama de organización jerárquica de algunos ciclos de actividad representativos encontrados en el microcircuito. En el presente trabajo llamamos a estos ciclos “ciclos desplegables” (en inglés: “*cyclic folds*”), debido a que constituyen ciclos modulares que se despliegan o repliegan para formar, transitoriamente, ciclos más complejos.

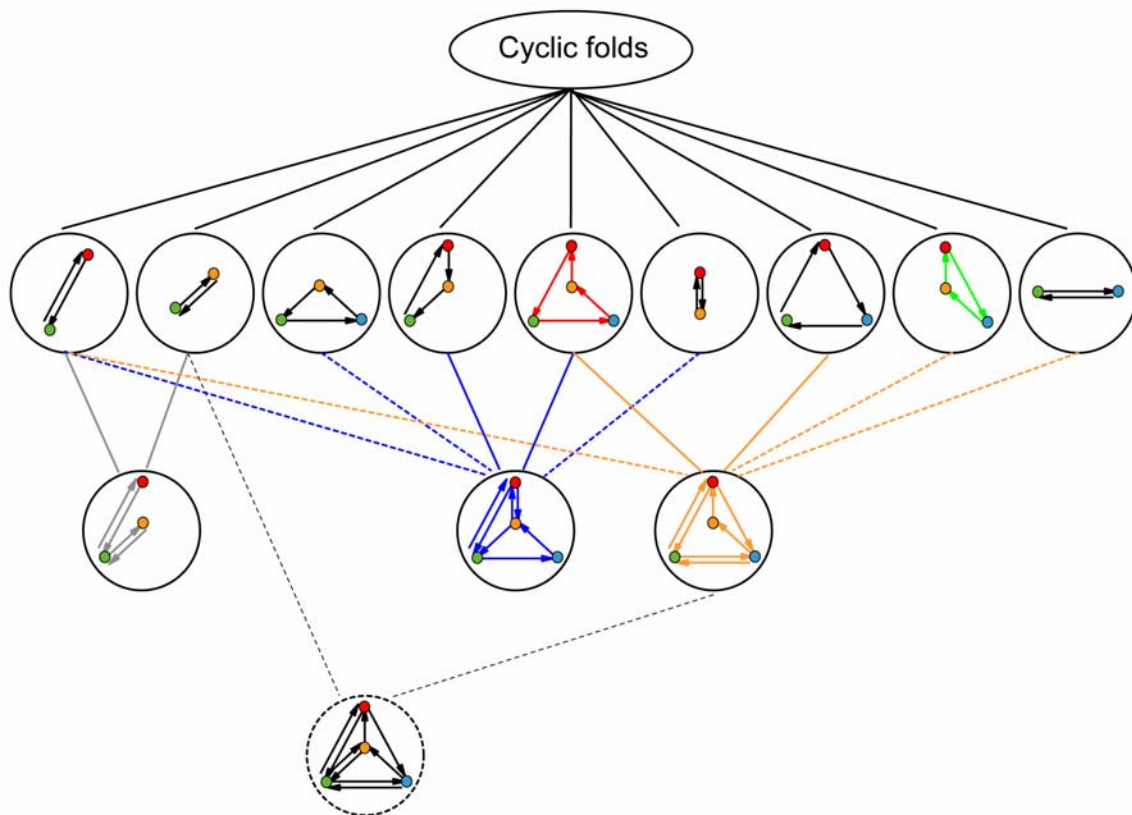


Figura 25. Organización jerárquica y reglas de composición en los ciclos cerrados del microcircuito neocortical.

La figura muestra el diagrama de clasificación generado por un algoritmo de agrupamiento jerárquico basado en teoría de grafos. Las unidades más pequeñas componen el primer nivel del diagrama, la restricción en este primer nivel es que las rutas formen ciclos Hamiltonianos. Cada punto representa un estado de la red, las flechas indican la transición entre estados. Los siguientes niveles están compuestos por las unidades básicas, que únicamente pueden combinarse para generar ciclos de Euler. Existen reglas específicas de composición para formar un ciclo cerrado, lo cual implica que no todas las combinaciones de elementos pueden componer una entidad válida (ciclos de Hamilton o de Euler).

Dichos ciclos siguen ciertas reglas de composición, lo cual significa que no es posible unir cualesquiera para formar un ciclo más complejo. Es importante resaltar que la coactivación de varios ciclos representaría una entidad semántica más compleja. Nótese que la existencia de pequeñas unidades elementales permite la composición de muchos otros ciclos a través de diferentes rutas (líneas punteadas). La coexistencia de varios de estos ciclos nos sugirió que los ensambles neuronales estriatales podrían tener la capacidad de realizar procesamiento en paralelo, es decir varias tareas al mismo tiempo. De esta forma, la actividad que se lleva a cabo en un nivel de fondo en el sistema podría ser capaz de iniciar la ejecución de alguna tarea específica (Abeles, 2003), dotando a los ensambles neuronales con la propiedad de “cebado” (en inglés: “priming”).

Propiedad de priming en los ciclos cerrados neoestriatales

La propiedad de *priming* se refiere, por ejemplo, a la capacidad de formar una representación mental completa con base en una pequeña parte de dicha representación. Supongamos que nos encontramos en una conferencia que habla del uso de teoría de gráficas para la aplicación en neurociencias, y en la primera diapositiva aparece el título “Teoría de gráficas para la aplicación en neurociencias”, automáticamente damos por hecho que faltan dos letras para formar la palabra “gráficas”, a eso se refiere la propiedad de priming: con información parcial podemos adquirir la representación completa del objeto o rutina.

Debido a que las transiciones secuenciales entre los estados de la red siguen ciclos cerrados recursivos (tal como “14231”), la actividad de los ensambles neuronales sugería fuertemente la existencia de mecanismos que determinaban relaciones específicas en el disparo de las células que formaban los diferentes estados. Esta forma de organización debería tender a la activación selectiva de las mismas secuencias a través del tiempo (Dragoi y Buzsaki, 2005; Harris, 2005).

Para investigar si los ensambles neuronales del estriado tenían la propiedad de *priming* buscamos en la actividad no sincronizada de células individuales la posible aparición de las secuencias formadas por los picos de sincronía. Si fuera posible encontrar las mismas secuencias antes de que aparecieran de manera sincrónica en un vector neuronal significaría que existe una preactivación organizada de los grupos neuronales que formarán, en un momento dado, la dinámica explícita del sistema. La figura 26 muestra la existencia de ciclos cerrados observados en la actividad de células únicas desincronizadas; antes de aparecer en un pico de sincronía estadísticamente significativo. Es interesante resaltar que dichas secuencias pueden estar expandidas o comprimidas en el tiempo (Ikegaya et al. 2004; Lee y Wilson, 2002). Lo cual demuestra que la activación del sistema colinérgico habilita a los ensambles neuronales del estriado con la capacidad de realizar el procesamiento paralelo de la información, una condición necesaria para cualquier proceso que implique funciones de memoria.

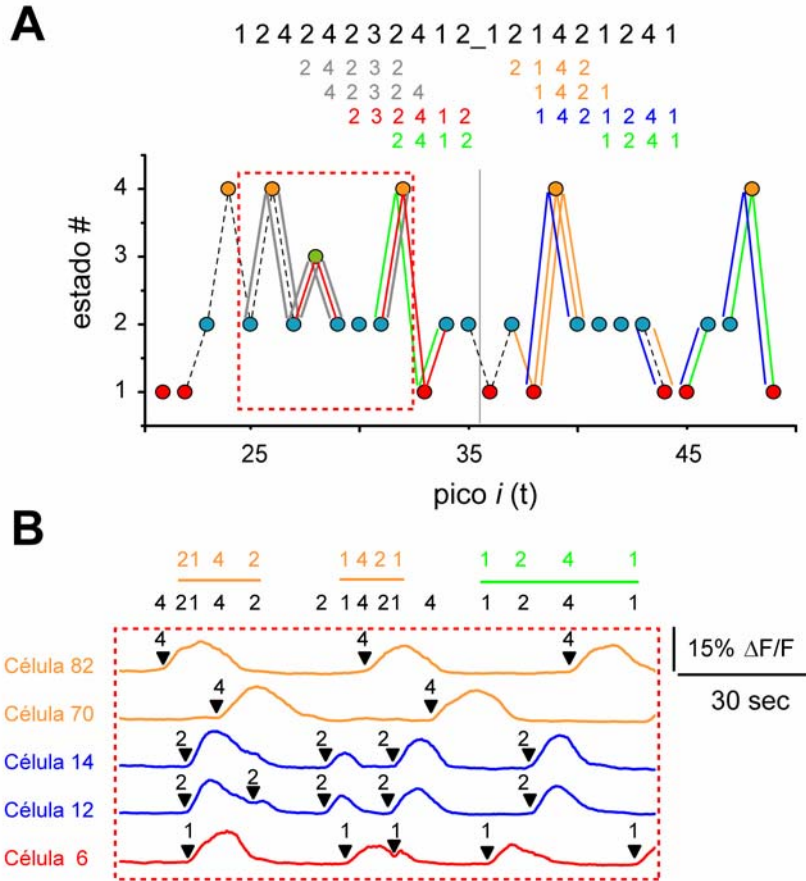


Figura 26. Procesamiento en bajo nivel realizado por ensambles neuronales.

A: Transiciones de estado mostradas en la figura 22C3. La línea punteada representa el segmento utilizado para buscar la propiedad de priming en los ciclos cerrados de actividad recurrente. B: Registros de calcio de células individuales que pertenecen a los ciclos mostrados en la línea punteada de A. Los colores indican células que pertenecen a diferentes estados. Estado 1: rojo. Estado 2: Azul. Estado 4: Naranja. Existen secuencias anticipadas que aparecerán en el siguiente video exactamente en el mismo orden. Para buscar las secuencias en células individuales utilizamos el comienzo de las señales de calcio (flechas) las cuales indican el estado al que pertenece la célula y que formará el enunciado del experimento (números negros). Las secuencias “2142”, “1421” y “1241” aparecen como en las transiciones de estado de los picos 37 a 49. Estas palabras fueron encontradas antes de que las células sean reclutadas en los patrones sincrónicos.

De hecho, los ciclos mostrados en la figura 26B no aparecen en los picos de sincronía (líneas punteadas en la figura 26A) sino hasta 10 minutos después. Este hallazgo implica que la actividad reverberante es capaz de sincronizar y

desincronizar a los ensambles neuronales a lo largo del tiempo, permitiendo la aparición de las mismas secuencias durante las transiciones de estados, las cuales dependen de la actividad pasada de la red. Ha sido propuesto que el procesamiento en paralelo de diversas funciones llevadas a cabo por un microcircuito neuronal puede ser un mecanismo de gran utilidad para prevenir el malfuncionamiento del sistema durante condiciones patológicas (Hebb, 1949), debido a la creación de rutas alternas que generan actividad redundante.

Cambio en la zona de conductancia con pendiente negativa producido por la activación de los receptores muscarínicos

Nuestra siguiente pregunta consistió en investigar algún mecanismo que pudiera estar relacionado con las propiedades generadas por la activación del sistema colinérgico en el microcircuito neoestriatal. Debido a que como mostramos anteriormente, la activación de los receptores muscarínicos induce un incremento en la zona de conductancia con pendiente negativa producida por la activación de los receptores NMDA, decidimos estudiar la contribución de las propiedades intrínsecas de las neuronas en la sincronización del microcircuito neoestriatal.

La activación de los receptores a NMDA habilita a las neuronas con una gran variedad de propiedades no lineales. Dichas propiedades no lineales facilitan las operaciones en las redes neuronales y están relacionadas con procesos de memoria (Izhikevich, 2007). En las neuronas espinosas medianas,

la activación de los receptores NMDA produce una zona de conductancia con pendiente negativa en la relación corriente voltaje medida en la configuración de fijación de voltaje (**Figuras 27B y C**). Debido a que el sistema colinérgico modula la actividad de los receptores NMDA en el neocórtex (Calabresi et al. 1998), decidimos investigar la modulación muscarínica sobre la zona de conductancia con pendiente negativa.

Como se mencionó con anterioridad, la activación de los receptores muscarínicos incrementa la conductancia con pendiente negativa inducida por la aplicación de NMDA en la perfusión (**Figura 27C**; ver Schiller y Schiller, 2001). Este cambio se refleja como un incremento en la excitación de las neuronas espinosas medianas. De hecho, la despolarización inducida por un comando de corriente es capaz de producir la inactivación de los potenciales de acción generados en las neuronas espinosas medianas (**Figura 27D**). Incluso en los estados activos espontáneos, la activación de los receptores muscarínicos inactiva los potenciales de acción (**Figura 19A**). La activación del sistema colinérgico ha sido propuesta como indispensable para realizar cualquier proceso involucrado con la memoria (Pisani et al. 2007; Jensen et al. 2007), sin embargo, las propiedades intrínsecas que generan este comportamiento no han recibido mucha atención. Por lo tanto nuestro siguiente paso fue investigar las corrientes iónicas, moduladas por el sistema colinérgico, que promueven el incremento en la zona de conductancia con pendiente negativa generada por la activación de los receptores a NMDA.

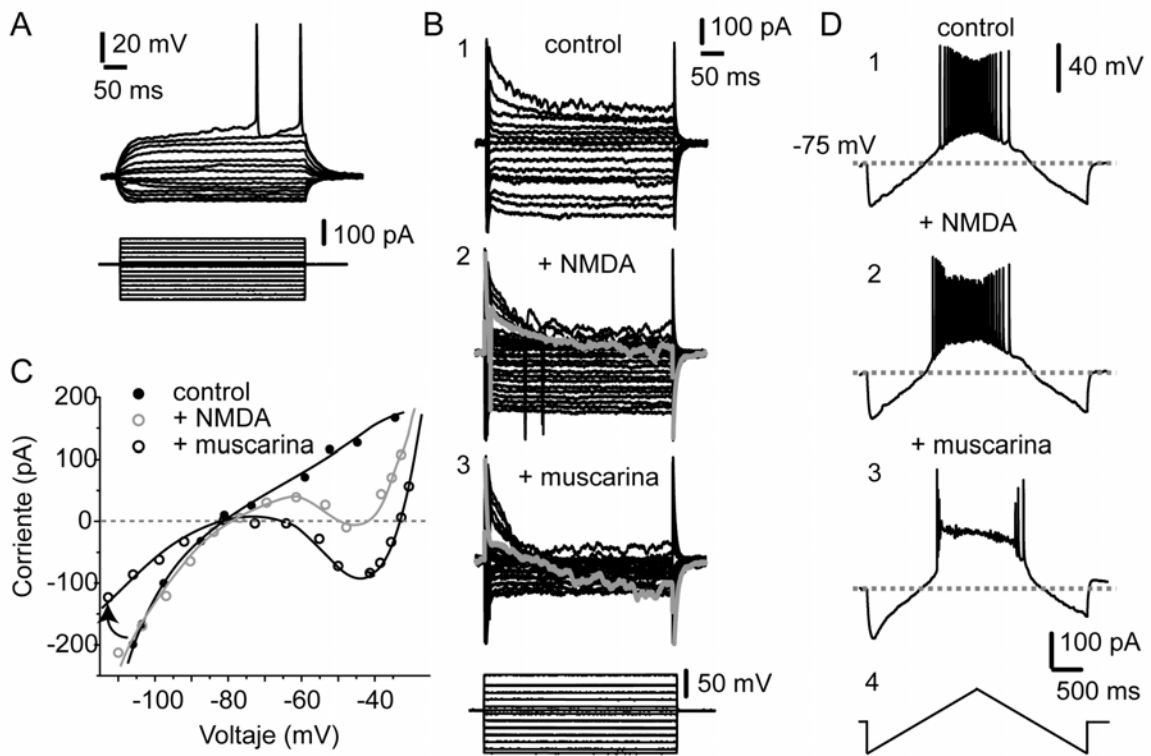


Figura 27. La modulación muscarínica cambia la zona de conductancia con pendiente negativa en las neuronas espinosas medianas.

A: Registros en fijación de corriente representativos de una neurona espinosa mediana.

B: Respuestas de corriente ante comandos de voltaje en diferentes condiciones farmacológicas. Existe un bloqueo del rectificador entrante así como una activación de una corriente entrante persistente.

C: Relaciones corriente-voltaje en el estado estable de los trazos mostrados en B. La activación de los receptores NMDA genera una zona de conductancia con pendiente negativa. La activación de los receptores muscarínicos incrementa la zona de conductancia con pendiente negativa y reduce la corriente de potasio del rectificador entrante (flecha).

D: Respuestas de voltaje a un comando de corriente en forma de rampa triangular en diferentes condiciones experimentales. Existe un incremento en la despolarización y en la frecuencia de disparo inducido por NMDA. La activación de los receptores muscarínicos provoca una despolarización mayor que es capaz de inactivar los potenciales de acción induciendo oscilaciones de alta frecuencia en el potencial de membrana.

Corrientes entrantes que mantienen la conductancia con pendiente negativa generada por la modulación muscarínica

Para investigar los mecanismos intrínsecos que promueven la facilitación de la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por la modulación muscarínica, realizamos experimentos en la configuración de fijación de voltaje, en neuronas espinosas medianas bajo diferentes condiciones farmacológicas. Utilizamos comandos cuadrados o rampas de voltaje para obtener la relación corriente voltaje en el estado estable.

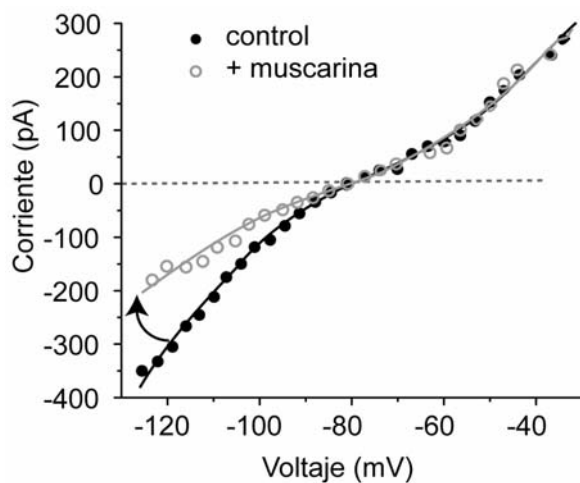


Figura 28. La activación de los receptores muscarínicos reduce el rectificador entrante en las neuronas espinosas medianas.

La figura muestra la relación corriente-voltaje en el estado estable de una neurona espinosa mediana. La activación de los receptores muscarínicos únicamente reduce la rectificación entrante sin generar una zona de conductancia con pendiente negativa.

La activación de los receptores muscarínicos en condiciones control bloquea la corriente de potasio debida al rectificador entrante en las neuronas espinosas medianas (Figuroa et al. 2002; Galarraga et al. 1999; Shen et al. 2007) sin embargo, no genera una zona de conductancia con pendiente negativa (n=10 células; **Figura 28**). Para probar que la modulación muscarínica de la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA no está generada por

un efecto indirecto utilizamos un antagonista muscarínico (atropina) en presencia de NMDA y muscarina. El bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina revirtió el efecto de la muscarina en la zona de conductancia con pendiente negativa (n=12 células; **Figura 29B**).

Para investigar la participación de una corriente de sodio persistente en la zona de conductancia con pendiente negativa utilizamos veratridina, la cual incrementa las corrientes de sodio si estas están presentes (Hsiao et al. 1998; Leibowitz et al. 1986; Sutro, 1986, Tian et al. 1995). La veratridina produjo un aumento en la conductancia con pendiente negativa generada por la aplicación de NMDA, lo que es indicativo de la participación de las corrientes de sodio en la misma (n=8 células; **Figura 29C**). Para confirmar la participación de la corriente de sodio en la modulación muscarínica de la zona de conductancia con pendiente negativa, utilizamos un bloqueador de dicha corriente (vinpocetina 50 μ M) en la presencia de NMDA y muscarina. Esta maniobra revirtió la facilitación de la conductancia con pendiente negativa producida por la muscarina, demostrando que la activación de los receptores muscarínicos modula la corriente de sodio en las neuronas espinosas medianas (n=12 células; **Figura 29D**). La aplicación de bloqueadores de la corriente de sodio persistente no provocó ningún cambio en la zona de conductancia con pendiente negativa en presencia de NMDA, muscarina y atropina (n=6 células).

Ya se sabe que los canales de calcio participan en la generación de la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA en las neuronas espinosas medianas (Vergara et al. 2003).

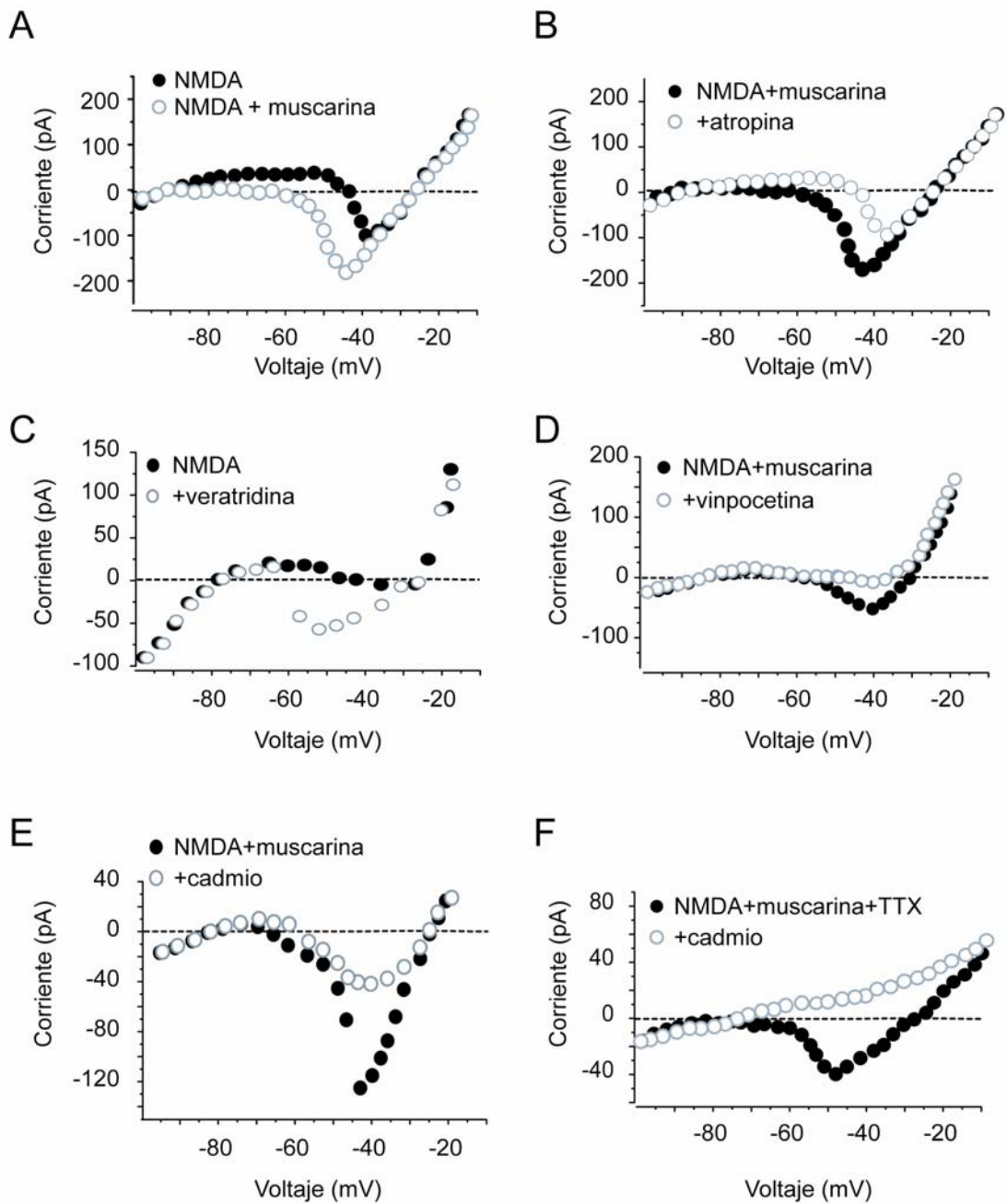


Figura 29. Corrientes entrantes que participan en la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por la aplicación de NMDA y la modulación muscarínica. A: La activación de los receptores muscarínicos incrementa la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA en las neuronas espinosas medianas. B: La modulación muscarínica es reversible ya que es bloqueada por atropina. C: El incremento en la corriente de sodio persistente facilita la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA. D: El bloqueo de la corriente de sodio persistente revierte el incremento en la zona de conductancia con pendiente negativa inducido por la activación de los receptores muscarínicos. Lo cual demuestra la modulación muscarínica de la corriente de sodio persistente en las neuronas espinosas medianas. E: En contraste con la dopamina, el aumento en la conductancia con pendiente negativa inducido por la activación de los receptores muscarínicos no es debido a corrientes de calcio. El bloqueo de las corrientes de calcio con cadmio no bloquea completamente la zona de conductancia con pendiente negativa. F: La adición de cadmio en presencia de NMDA, muscarina y TTX bloquea completamente la zona de conductancia con pendiente negativa. La participación de otra corriente en el incremento de la zona de conductancia con pendiente negativa queda descartada.

La zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA y muscarina se redujo al bloquear las corrientes de calcio con cadmio (100 μM) en todas las células probadas (n=7 células; **Figura 29E**), lo cual nos sugirió la participación de varios componentes en la zona de conductancia con pendiente negativa. Finalmente, para eliminar la participación de otra corriente en la zona de conductancia con pendiente negativa, añadimos cadmio en presencia de NMDA, muscarina y bloqueadores de la corriente de sodio persistente. Bajo estas condiciones la zona de conductancia con pendiente negativa fue bloqueada completamente (n=6 células; **Figura 29F**). La presencia de cadmio en el medio de perfusión también bloqueó completamente la zona de conductancia con pendiente negativa en presencia de NMDA, muscarina y atropina.

Estos experimentos demuestran la participación de dos componentes principales en la zona de conductancia con pendiente negativa; uno mediado por canales de calcio que es independiente de la modulación muscarínica, y otro mediado por la corriente de sodio persistente el cual es el blanco de la modulación muscarínica presentada en este trabajo. El cambio en la zona de conductancia con pendiente negativa mediado por la corriente de sodio persistente podría también estar implicado en el cambio de la actividad de la red del microcircuito neocortical que mostramos con anterioridad. Por lo tanto con la siguiente serie de experimentos investigamos la repercusión del bloqueo de la corriente de sodio persistente en la modulación muscarínica del comportamiento de red en el microcircuito neocortical.

El bloqueo de la corriente de sodio persistente revierte el incremento en la sincronía generado por la modulación muscarínica

El surgimiento de grupos de neuronas que disparan de manera sincrónica es una característica que demuestra dinámicas de red (Carrillo-Reid et al. 2008; Cossart et al. 2003; Harris, 2005). La activación de los receptores NMDA produce una actividad sincronizada y recurrente en el microcircuito neocortical. La activación de los receptores muscarínicos incrementa la zona de conductancia con pendiente negativa inducida por NMDA en las neuronas espinosas medianas lo cual se ve reflejado como un aumento en la sincronía de la red (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003). Utilizando imágenes de calcio demostramos que la activación del sistema colinérgico incrementa el

número de picos de actividad sincrónica en el neocórtex (n=20 rebanadas; $P < 0.01$; **Figura 30**). El aumento en la sincronía de la red está mediado por el sistema colinérgico debido a que el bloqueo de los receptores muscarínicos con atropina desincroniza la red regresándola a las condiciones iniciales (n=12 rebanadas; **Figura 30**).

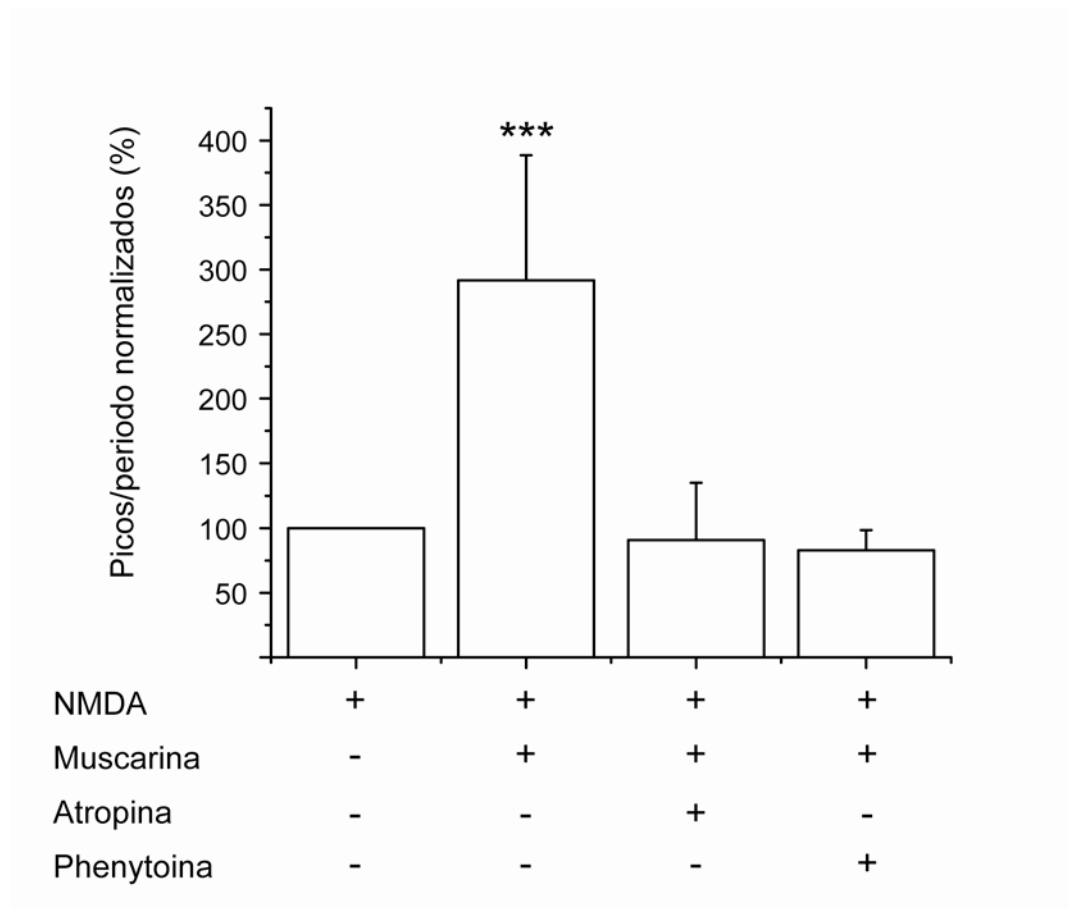


Figura 30. La corriente de sodio persistente participa en el aumento de sincronía inducido por el sistema colinérgico.

La figura muestra la normalización del número de picos por periodo en diferentes condiciones farmacológicas. Cada barra representa la normalización del número de picos por periodo tomando la condición de NMDA como control (100%). Los asteriscos indican la existencia de una diferencia significativa con respecto a la condición de NMDA ($P < 0.01$). El bloqueo de la corriente de sodio persistente revierte el incremento en la sincronía inducido por la activación del sistema colinérgico.

El bloqueo de la corriente de sodio persistente revierte el incremento en la zona de conductancia con pendiente negativa a las condiciones iniciales. Por lo tanto, para investigar el papel de la corriente de sodio persistente en la sincronización de la red generada por la activación del sistema colinérgico, utilizamos distintos bloqueadores de dicha corriente (fenitoína 50 μ M o riluzole 50 μ M, además de la ya mencionada vinpocetina). Bajo estas condiciones el incremento en la sincronía producido por la activación de los receptores muscarínicos fue suprimido (n=8 rebanadas; **Figura 30**). Estos experimentos nos demostraron que la corriente de sodio persistente modulada por el sistema colinérgico es un factor intrínseco fundamental en el incremento de la sincronía en el microcircuito neostriatal.

Dinámica de la red en rebanadas de animales hemiparkinsonianos

Para estudiar la dinámica de la red neostriatal en un modelo de la enfermedad de Parkinson, obtuvimos rebanadas de ratas lesionadas unilateralmente con 6-hydroxi-dopamina (6-OHDA) en la substantia nigra pars compacta. Bajo estas condiciones existe un incremento dramático en la actividad de la red neostriatal sin añadir ningún tipo de agonista ni utilizar estímulos eléctricos. Encontramos un incremento, tanto en el número de células activas como en el número de células correlacionadas con respecto a las condiciones mostradas anteriormente (control, NMDA, NMDA + muscarina). La reducción dimensional de la actividad global del neostriado denervado nos mostró la existencia de un estado dominante (**Figura 31B**). Es decir, existe una gran probabilidad de permanecer

en dicho estado (parecido a lo encontrado al bloquear la inhibición GABAérgica, **Figura 15**, ver arriba).

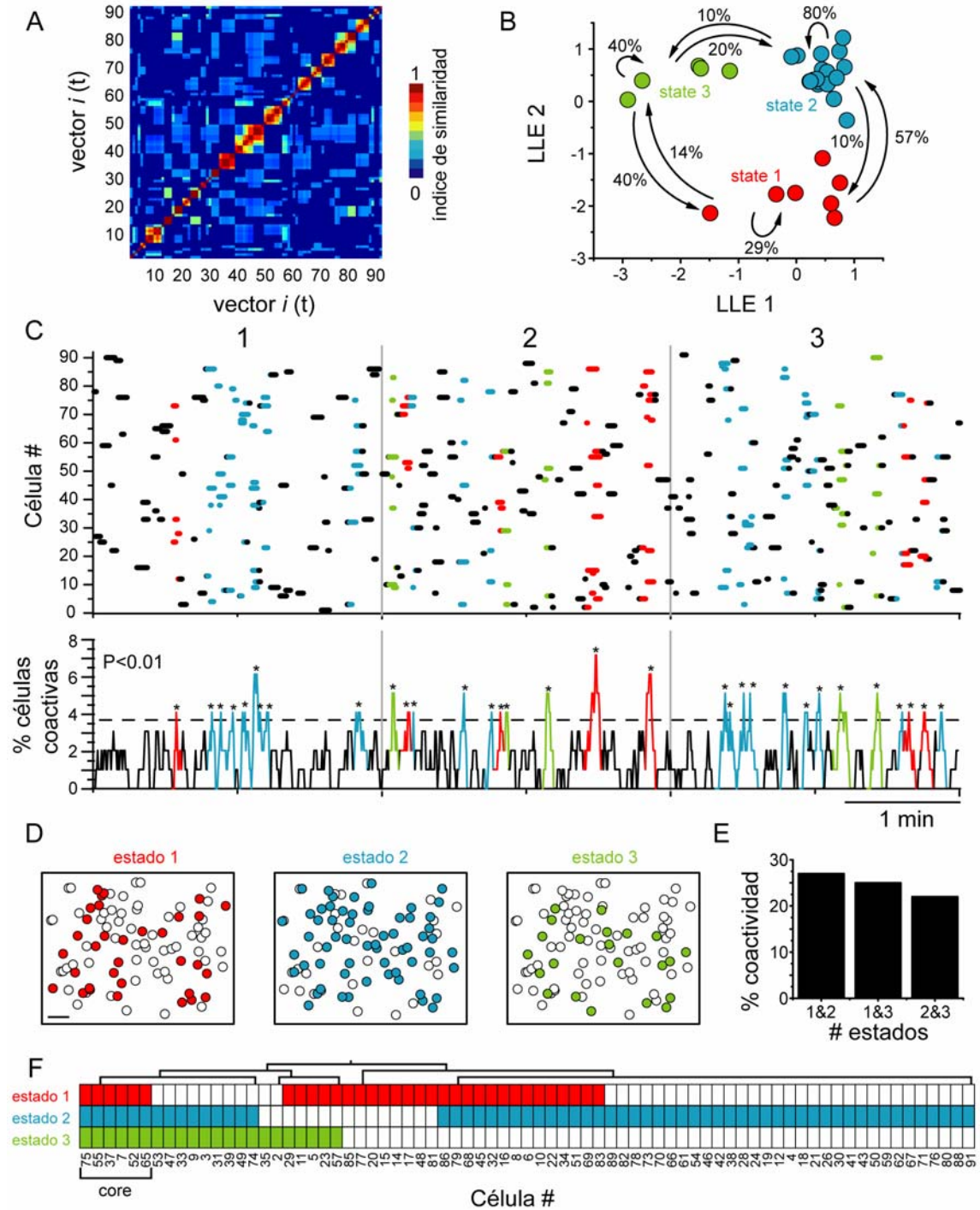


Figura 31. Dinámica del microcircuito neostriatal en rebanadas de animales hemiparkinsonianos.

A: Matriz de los índices de similitud de una rebanada representativa de una rata tratada con 6-OHDA (sin fármacos en el medio de perfusión). Nótese la recurrencia de estructuras cuadrículas a través del tiempo, lo cual indica la similitud entre diferentes vectores.

B: La reducción multidimensional de los estados de la red con LLE, muestra un estado dominante (círculos azules) con una alta probabilidad de recurrencia.

C: Gráfica del comportamiento global del microcircuito neostriatal denervado. Los picos de sincronía están indicados con asteriscos. Los colores indican estados de la red diferentes. Existe una sincronía incrementada y la preferencia por permanecer en un estado.

D: Mapa espacial que muestra los ensambles neuronales estriatales que mantienen los diferentes estados. Escala: 100 μm .

E: Células coactivas en diferentes estados. Existe un incremento en la participación de algunas células en varios estados.

F: Ensambls neuronales encontrados por el análisis jerárquico de grupos. Es importante resaltar la existencia de un ensamble central (core assembly) que participa en todos los estados.

Las gráficas de actividad global muestran el aumento en la frecuencia de aparición de los picos de sincronía con respecto a la condición control (**Figura 31C**) y aun respecto de la condición con NMDA. Sin embargo, el número de picos de actividad sincrónica es similar con respecto a la condición de NMDA+muscarina. La figura 31E muestra el porcentaje de células coactivas entre diferentes estados. Es interesante resaltar el incremento en el porcentaje de células coactivas con respecto a la condición con NMDA pues en el caso del tejido obtenido del animal lesionado no agregamos ningún estímulo, ni farmacológico ni eléctrico. Nuevamente, dicho porcentaje es similar al encontrado en la condición de muscarina. El análisis jerárquico de grupos nos mostró la existencia de diferentes grupos de neuronas que subyacen a los

diversos estados (**Figura 31F**). De manera interesante, el número de neuronas compartidas por todos los estados de la red (“core assembly”) es similar en el estriado denervado de dopamina y en la condición de NMDA ($8 \pm 2\%$ de las células que participan en los picos de sincronía).

Estos experimentos demuestran que es posible estudiar en un modelo *in vitro* el efecto de diferentes neurotransmisores sobre la actividad del microcircuito neostriatal. Utilizando diferentes análisis matemáticos es posible encontrar diferencias significativas entre diversas condiciones farmacológicas y un modelo de la enfermedad de Parkinson, lo cual abre una nueva línea de investigación para probar fármacos que regresen la actividad de la red a un estado semejante al control.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis demostramos que una rebanada de tejido cerebral aislado tiene las conexiones necesarias para transformar una entrada tónica excitadora en una actividad secuencial y recurrente de grupos de células sincronizadas que muestran las características de los ensambles neuronales propuestos por Hebb, así como de algunas propiedades de microcircuitos presentes desde el nacimiento (CPGs) (Grillner, 2006). El neocórtex es reconocido por los electrofisiólogos sistémicos como un “núcleo silente”, es decir, que presenta muy baja actividad basal, en condiciones normales o control. Sin embargo, la estimulación cortical o la aplicación de NMDA inducen actividad en ráfagas de potenciales de acción en varias células simultáneamente aunque se encuentren anatómicamente dispersas. Los ensambles neuronales generan diferentes estados funcionales que alternan su actividad; a semejanza de los CPGs (Carrillo-Reid et al. 2008; Grillner, 2006).

La generación de los patrones de actividad durante los estados funcionales depende de los mecanismos sinápticos e intrínsecos de las neuronas del microcircuito neocortical. La actividad de los ensambles neuronales está orquestada por un grupo ensamblado central de neuronas compartidas (core assembly) formado principalmente por interneuronas GABAérgicas.

En resumen, este trabajo demuestra que se puede observar la dinámica generada por la red en el microcircuito neostriatal *in vitro*, identificando los mecanismos básicos y algunos de los elementos involucrados. También mostramos el efecto de diferentes condiciones experimentales sobre la actividad de los ensambles neuronales, como la activación del sistema colinérgico o la generación de un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Finalmente, mostramos que la modulación muscarínica de la corriente de sodio persistente podría representar una solución terapéutica para contrarrestar el incremento en la sincronía de los ensambles neuronales del microcircuito neostriatal.

La forma en que se establecen las conexiones y el efecto de la modulación de diferentes neurotransmisores en la dinámica de la red aún requieren ser investigados con detalle, ya que podrían revelar los principios básicos que regulan el funcionamiento del microcircuito neostriatal. Estos hallazgos abren la posibilidad de comenzar a entender el vínculo entre la actividad neuronal y las funciones realizadas por núcleos específicos del cerebro.

Transiciones del potencial de membrana en las neuronas neostriatales

Tanto *in vivo* como *in vitro* las neuronas del neostriado exhiben transiciones espontáneas en el potencial de membrana que sostienen el disparo en ráfagas. Dichas transiciones ocurren entre un estado inactivo o hiperpolarizado (-80 mV) y un estado activo o despolarizado (-55 mV) que puede presentar potenciales de

acción (Bargas et al. 1991; Carrillo-Reid et al. 2008; Wilson, 1993). Hasta el presente trabajo, se desconocía totalmente como dichas transiciones reflejan la actividad de la red y como es que se propagan a través del microcircuito neoestriatal. Es probable que existan diferentes clases de oscilaciones en el potencial de membrana, las cuales podrían estar asociadas con estados funcionales diferentes como sueño o movimiento (Vautrelle et al. 2008). En el trabajo presentado a lo largo de esta tesis utilizamos una entrada excitadora tónica (NMDA) para inducir dichas transiciones debido a que ha sido mostrado que la activación de los receptores NMDA en el estriado (Ossowska, 1995) y en otros microcircuitos (Guertin y Hounsgaard, 1998; Hsiao et al. 1998) produce actividad neuronal relacionada directamente con el movimiento. De acuerdo con ello, demostramos que la aplicación de NMDA en el medio de perfusión induce actividad correlacionada que evoluciona con el tiempo. En contraste con las condiciones control en las cuales el estriado se encuentra casi silente con pocas células activas y no correlacionadas, tanto la estimulación cortical como la entrada tónica excitadora producida por la exposición a NMDA es capaz de reclutar grupos de neuronas anatómicamente dispersos. En la condición experimental provocada por la aplicación de NMDA, dichos grupos tienen una dinámica espacio-temporal muy característica, lo cual sugiere que el microcircuito neoestriatal *in vitro*, preserva un conjunto de CPGs unitarios (Grillner, 2006): conexiones con pesos sinápticos establecidos y neuronas especializadas cumpliendo roles específicos. Esto significa que a pesar de que muchas conexiones han sido cortadas al obtener las rebanadas, los

microcircuitos que permanecen aún mantienen las características que podrían encontrarse en módulos mayores de CPGs *in vivo*. Esta idea está apoyada por distintas evidencias en la corteza cerebral que demuestran la preservación de diferentes módulos a lo largo de varias escalas espaciales (Plenz y Thiagarajan, 2007).

Mecanismos que producen la dinámica de red en el microcircuito neoestrial

Las condiciones que generan la dinámica del microcircuito residen tanto en las propiedades intrínsecas como en las propiedades sinápticas de las neuronas neoestrialas. La entrada tónica producida por NMDA genera picos de actividad sincrónica que surgen de la activación recurrente de diversos ensambles neuronales que alternan sus patrones de actividad formando secuencias que siguen trayectorias determinadas. Estos resultados sugieren la presencia de mecanismos robustos que mantienen y estabilizan la actividad de las células que participan en la formación de los ensambles neuronales.

En particular, la transmisión glutamatérgica de tipo AMPA (proveniente de otros núcleos) parece ser un requerimiento necesario para la activación de la dinámica de la red. De hecho, el número de células activas disminuye drásticamente cuando la transmisión de tipo AMPA se encuentra bloqueada. Debido a que todas las sinapsis glutamatérgicas en el neoestrialdo provienen de aferencias corticales o talámicas, dichas aferencias podrían ser la fuente de la

entrada excitadora tónica (en condiciones fisiológicas) que promueve la actividad sincrónica (Grillner et al. 1981). La interpretación más simple de estos resultados es que las aferencias cortico-talámicas son esenciales para la aparición de la dinámica de red neostriatal. Es decir, la actividad de red está comandada por la corteza o el tálamo (Kasanetz et al. 2006; Magill et al. 2001). Sin embargo, aún es necesario investigar más sobre el papel que desempeñan las aferencias glutamatérgicas en la dinámica de red presentada en este trabajo. Es conocido que la activación de los receptores NMDA es suficiente para inducir un comportamiento biestable en las neuronas espinosas medianas del neostriado, lo cual amplifica el efecto de la entrada tónica proveniente de las aferencias glutamatérgicas (Schiller y Schiller, 2001; Vergara et al. 2003).

Por otro lado, patrones de actividad semejantes a los mostrados en el presente trabajo sólo han podido ser originados en la corteza cerebral prefrontal por medio de la aplicación de NMDA y agonistas dopaminérgicos (Tseng y O'Donnell, 2005). La sola presencia de NMDA en la corteza produce únicamente una despolarización tónica de las neuronas sin generar oscilaciones espontáneas en el potencial de membrana. Otra de las razones que indican que la actividad observada en el estriado no es sólo un reflejo de los ensambles neuronales corticales radica en que la mayoría de las aferencias han sido destruidas en el momento de realizar las rebanadas (Parthasarathy y Graybiel, 1997). Sin embargo, no excluimos la posibilidad de que bajo ciertas condiciones (con la activación del sistema dopaminérgico) los ensambles neuronales

corticales puedan comandar, o incluso generar, a los ensamblajes neuronales del neocóstriado. Por lo tanto los ensamblajes neuronales neocóstriales podrían representar la actividad coordinada entre diferentes áreas corticales; de manera que una vez que se han formado los ensamblajes neuronales del neocóstriado únicamente es necesario un comando cortical o sólo una parte del estímulo original para activarlos nuevamente.

Además, nuestros datos muestran que el neocóstriado no es únicamente un seguidor de la actividad cortical. El papel de las conexiones dentro del microcircuito neocóstriatal pudo ser dilucidado gracias a la inhibición de la transmisión GABAérgica rápida. El bloqueo de los receptores GABA_A no sólo incrementó la actividad global de la red, sino que produjo un cambio en la dinámica de las transiciones de estados en el microcircuito, generando un estado preferido que “absorbió” a la mayoría de las neuronas en nuestra ventana de observación. Sin inhibición, el microcircuito neocóstriatal se engancha en un estado dominante que ya no permite la alternancia entre diferentes estados. La conclusión de estos resultados es que las conexiones inhibitorias pre-establecidas en el microcircuito neocóstriatal son las responsables de la transformación de los comandos corticales en secuencias de actividad recurrente y alternante observadas en los ensamblajes neuronales del neocóstriado (Ossowska, 1995; Wickens y Oorschot, 2000). Aunado a ello, el bloqueo de los canales de calcio de tipo L también interrumpe la actividad sincrónica en la red neocóstriatal. Lo cual confirma que las conductancias intrínsecas, al generar

potenciales *plateau*, pueden funcionar como ventanas temporales que permiten la sincronización en una red neuronal (Carrillo-Reid et al. 2008; Kiehn, 2006; Vergara et al. 2003; Yuste et al. 2005). Por lo tanto, la dinámica generada por la red inducida por la activación de los receptores a NMDA en el neocórtex requiere la participación de mecanismos sinápticos propios del microcircuito estriatal.

Gracias a la combinación de los registros electrofisiológicos con las señales de calcio demostramos que la mayoría de las neuronas que participaban en los ensambles neuronales eran neuronas espinosas medianas. Este hecho fue confirmado a través de técnicas de inmunocitoquímica (**Figura 34**). Sin embargo, un conjunto de las neuronas que participaban en todos los estados funcionales (*core assembly*) tenían señales de calcio periódicas y presentaban el disparo característico de interneuronas GABAérgicas con propiedades marcapaso (Berke et al. 2004; Plenz y Aertsen, 1996; Tepper et al. 2004). Este tipo de interneuronas constituye del 2-5% de la población total de las neuronas estriatales (Bolam y Bennett, 1995), sorprendentemente formaron el 40% de las neuronas del ensamble central, lo cual sugiere que dicho tipo de interneuronas participan en la orquestación de los grupos neuronales que generan la dinámica de red multiestable (Berke et al. 2004). Es importante resaltar que la actividad de las neuronas marcapaso es una característica fundamental hallada en los CPGs (Grillner, 2006; Yuste et al. 2005).

Probables procesos de memoria originados por la asociación de ensambles neuronales

Un tema central para las neurociencias consiste en conocer la manera en la cual las redes neuronales pueden almacenar información. Hebb (1949) propuso que la actividad reverberante de grupos celulares llamados ensambles neuronales podría funcionar como el sustrato de los trazos de memoria. Sin embargo, para poder almacenar cualquier tipo de Información compleja, los ensambles neuronales deberían tener la capacidad de formar jerarquías, es decir, pequeños circuitos que al unirse podrían componer módulos con propiedades diferentes (Bienenstock y Geman, 1995; Hammer, 2003). La composición se refiere a la propiedad de cualquier sistema de construir representaciones organizadas jerárquicamente, en términos de módulos fundamentales y las relaciones que se establecen entre ellos (Bienenstock y Geman, 1995). Un sistema de memoria debe estar compuesto por módulos interconectados entre sí; dicha estructura modular podría ser la base del incremento combinatorio en las capacidades de memoria en un sistema (Huyck, 2001).

De las dos hipótesis Hebbianas concernientes a los procesos de memoria, únicamente la que se refiere a la plasticidad sináptica de largo plazo cuenta con un exhaustivo soporte experimental, gracias al trabajo desencadenado en muchos laboratorios a raíz de los resultados de Bliss y Lomo (1973). Sin embargo, la segunda hipótesis referente a la existencia de ciclos de actividad reverberante formados por redes neuronales recurrentes – que serían

el verdadero trazo de la memoria (Hammer, 2003), y que son producto, precisamente, de esa plasticidad sináptica de largo plazo, únicamente ha sido tratada indirectamente. En el presente trabajo, registramos microcircuitos neuronales en el neocórtex *in vitro*, de manera directa y demostramos claramente que las propiedades adscritas a los ensamblajes neuronales y propuestas por Hebb están presentes en el microcircuito. La metodología utilizada nos permitió seguir la actividad de varias neuronas con resolución de célula única en un pequeño segmento de la red. Distintas dinámicas de red con propiedades similares han sido registradas en la corteza y en otras estructuras cerebrales (Cossart et al. 2003; Ikegaya et al. 2004). Sin embargo, los análisis realizados en otros laboratorios no han demostrado directamente la existencia de ensamblajes neuronales recurrentes con actividad alternante.

Construcción de microcircuitos compuestos

Cualquier acción motora compleja puede ser descompuesta en un conjunto de acciones motoras simples, hasta llegar a las unidades fundamentales (Bienenstock y Geman, 1995; Grillner, 2006). Dichas unidades básicas pueden ser recombinadas para generar una gran variedad de salidas (Grillner, 2006). Las unidades fundamentales o los átomos semánticos (Abeles, 2003; Hebb, 1949), podrían ser equivalentes a los CPGs unitarios propuestos por Grillner, esto es, grupos de neuronas con actividad recurrente que se encargan de los comportamientos motores básicos en diferentes especies. El sistema nervioso está dotado con un número determinado de CPGs unitarios los cuales pueden

ser reclutados de diversas formas para generar una gran cantidad de comportamientos (Carrillo-Reid et al. 2008; Grillner, 2006). De forma interesante, mientras la aplicación de NMDA promueve la formación de una dinámica de red semejante a los CPGs unitarios (Carrillo-Reid et al. 2008b), la activación del sistema colinérgico habilita a los ensambles neuronales del estriado con propiedades computacionales relacionadas con la composición de secuencias de actividad complejas (Bienenstock y Geman, 1995; Hammer, 2003).

La habilidad de los grupos neuronales para componer secuencias de actividad sincronizadas y complejas es la principal diferencia entre los resultados de este trabajo de tesis en comparación con los hallazgos de otros grupos. La actividad de las “synfire chains” reportadas por otros laboratorios están basadas en la activación secuencial de células individuales (Ikegaya et al. 2004); nuestros resultados están basados en el disparo secuencial de grupos de neuronas sincronizados a lo largo del tiempo. Estos grupos neuronales forman ciclos de actividad organizados jerárquicamente, los cuales pueden combinarse con otros ciclos creando una actividad más compleja que podría representar diferentes niveles conceptuales. Incluso, dichos ciclos cerrados pueden repetirse a lo largo del tiempo siguiendo exactamente las mismas secuencias, lo cual sugiere que el sistema colinérgico habilita a la dinámica del microcircuito neostriatal con varios puntos semiestables que pueden representar trazos de memoria, dicha actividad también difiere de la metaestabilidad reportada recientemente en redes neuronales de la región CA3 del hipocampo (Sasaki et al. 2007).

Organización de ciclos cerrados de actividad recurrente

La demostración del cambio secuencial y recurrente de la actividad sincronizada a través de los estados de la red indica un mecanismo robusto entre diferentes grupos neuronales. Estos grupos se encuentran dispersos anatómicamente (Carrillo-Reid et al. 2008; Cossart et al. 2003; Hebb, 1949; Ikegaya et al. 2004; Lorente de No, 1938). La dinámica de red generada por la activación del sistema colinérgico puede ser observada en un pequeño segmento del neocórtex *in vitro*. Incluso, la activación recursiva de patrones de actividad espacio-temporales que forman trayectorias cerradas fue propuesta al observar preparaciones histológicas del mismo tamaño que las preparaciones fisiológicas mostradas en este trabajo (Hebb, 1949; Lorente de No, 1938). A pesar de que no pudimos encontrar una organización anatómica específica para los ensamblajes neuronales, ello no significa que no se encuentren estructurados. Quizá su estructura espacial dependa de las proyecciones glutamatérgicas que el córtex recibe tanto de la corteza cerebral como del tálamo. Otra posible explicación de este aparente caos anatómico observado en los ensamblajes neuronales podría ser la redundancia en la información de manera que si se genera un daño en alguna región específica del núcleo, sea posible recuperar la función gracias a que el procesamiento de la información se realizaba de manera paralela en varios lugares anatómicamente dispersos. Debido a que las técnicas para registrar varias células de manera simultánea con resolución de célula única han sido desarrolladas recientemente (Cossart et al. 2003; Ikegaya et al. 2004; Mao et al. 2001), no es tan sorprendente encontrar hasta ahora

todas estas propiedades computacionales en pequeños segmentos del tejido cerebral en condiciones *in vitro*.

Mecanismos que sostienen la formación de los ciclos cerrados neostriatales

Dinámicas de red que exhiben patrones de actividad secuenciales han sido reportadas en animales jóvenes (PD 13-22) y adultos (Ikegaya et al. 2004; Lee y Wilson, 2002); tanto *in vivo* como *in vitro*, lo cual demuestra que la actividad de red es intrínseca a diversos núcleos y se preserva en un amplio rango de edades (Carrillo-Reid et al. 2008).

Por otro lado, podría parecer que cualquier tratamiento que incrementara la actividad global de la red neostriatal podría provocar el mismo efecto generado por la activación del sistema colinérgico. Sin embargo, como demostramos con anterioridad (Carrillo-Reid et al. 2008) el bloqueo de la transmisión GABAérgica rápida también incrementa la actividad global de la red, sin afectar el disparo de las neuronas, mas produce diferencias dramáticas en las transiciones de estado. Finalmente, el hecho de que los antagonistas colinérgicos hayan revertido el incremento en la sincronía generado por la activación de los receptores muscarínicos demuestra que la modulación colinérgica de la actividad de la red se trata de un efecto específico.

Las aferencias córtico-talámicas son esenciales para la aparición de la dinámica de red neocortical. En muchas condiciones los ensamblajes neuronales corticales podrían comandar a los ensamblajes del neocórtex. Sin embargo, podría ser que diferentes neurotransmisores sean capaces de cambiar las capacidades del microcircuito por medio de la modulación de factores presinápticos e intrínsecos, de tal suerte que bajo ciertas circunstancias el neocórtex podría comportarse sólo como un seguidor o un filtro de la actividad cortical, pero en otras condiciones el neocórtex podría estar desacoplado de la dinámica cortical generando actividad autónoma independiente de otros núcleos.

En el presente trabajo demostramos que la activación del sistema colinérgico promueve la formación de patrones de actividad reverberante que forman secuencias cerradas con una estructura modular y que están organizadas en jerarquías. La formación de ciclos cerrados que se activan en paralelo demuestra que los ensamblajes neuronales del neocórtex tienen la propiedad de *priming* (Abeles, 2003). Todas estas propiedades han sido propuestas teóricamente en la generación de procesos de memoria, en el control de movimientos y en la planeación de comportamientos (Abeles, 2003; Beiser et al. 1997; Harris, 2005; Hebb, 1949; Lewis et al. 2005; Roudi y Latham, 2007). Resulta interesante que las propiedades descritas en el presente trabajo estén generadas por un microcircuito que está compuesto principalmente de neuronas inhibitorias.

Corrientes iónicas involucradas en el comportamiento biestable

La corriente de sodio persistente está asociada con diferentes comportamientos motores tales como: los ritmos respiratorios (Peña et al. 2004), el nado, la masticación, etc (Rekling y Feldman, 1997; Rekling y Laureen, 1989). Por otro lado, también han sido reportadas propiedades biestables mediadas por corrientes de calcio en distintas estructuras como el cerebelo (Llinás y Sugimori, 1980a, b), la substantia nigra pars reticulata (Ibáñez-Sandoval et al. 2007), la médula espinal (Guertin y Hounsgaard, 1998) y el neocórtex (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003).

La activación del sistema dopaminérgico ha sido asociada con procesos de reforzamiento y mejoramiento en la ejecución de diversas tareas (Schultz, 1994), mientras que la activación del sistema colinérgico se asocia más con procesos de memoria y aprendizaje (Calabresi et al. 2000; Kim et al. 2007). También es sabido que la dopamina reduce las corrientes de sodio persistentes en las neuronas espinosas medianas (Cepeda, 1995) y que la muscarina por el contrario reduce las corrientes de calcio en estas células (Perez-Rosello et al. 2005).

El hecho de que diferentes estados funcionales puedan ser manejados por corrientes iónicas específicas, y que dichas corrientes estén moduladas por neurotransmisores distintos tiene implicaciones terapéuticas muy relevantes, ya

que crea la posibilidad de restaurar el flujo normal de la información en condiciones patológicas por medio del uso de antagonistas selectivos.

Las corrientes de calcio y de sodio persistentes participan en la generación de la zona de conductancia con pendiente negativa en las neuronas espinosas medianas. Sin embargo, debido a que la facilitación de la conductancia negativa producida por la activación de los receptores muscarínicos es bloqueada por bloqueadores de la corriente de sodio persistente, las corrientes de calcio no juegan un papel determinante en los efectos muscarínicos presentados en este trabajo.

Implicaciones funcionales y perspectivas

La actividad recurrente en ráfagas de disparo que se alterna entre distintos grupos de células es una característica principal de los ensamblajes neuronales que constituyen CPGs tanto *in vivo* como *in vitro* (Barnes et al. 2005; Grillner, 2006; Ikegaya et al. 2004). La actividad sincrónica de dichos módulos tiene propiedades en la dinámica de sistemas de puntos estables conocidos como atractores (Cossart et al. 2003). Éstos proveen una descripción unificada para explicar procesos de codificación, almacenamiento y utilización de diversos trazos de memoria. La reactivación de los mismos grupos neuronales a través del tiempo sugiere la formación de atractores en el microcircuito neocortical. La formación de los ensamblajes neuronales está mediada por las conexiones recurrentes que se establecen en el circuito, ya sea a través del desarrollo o por

medio del aprendizaje. La dinámica de dichos microcircuitos puede ser modificada por la acción de diferentes neurotransmisores (Yuste et al. 2005).

Aparentemente, los microcircuitos con las características presentadas en el presente trabajo podrían ser el punto intermedio entre pequeñas redes funcionales y las capacidades globales del cerebro (Plenz y Thiagarajan, 2007). Las anomalías en el funcionamiento de dichos microcircuitos provocan procesos anormales en la sincronía de la red que están asociados con distintas enfermedades como la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson (Schnitzler y Gross, 2005; Uhlhaas y Singer, 2006). Nuestros experimentos muestran que un pedazo de tejido aislado, *in vitro*, puede presentar diferentes comportamientos asociados con la acción de neurotransmisores específicos.

Mientras este trabajo tiene como objetivo principal extender nuestro conocimiento acerca del funcionamiento normal del neostriado, también puede servir para entender la actividad del microcircuito en distintas condiciones patológicas, como demostramos con los experimentos realizados en el modelo de la enfermedad de Parkinson. Es conocido que los niveles basales de acetilcolina se incrementan durante la enfermedad de Parkinson y que diferentes fármacos anticolinérgicos se usan frecuentemente en la clínica para el tratamiento de dicha enfermedad (Pisan et al. 2007). Algunas teorías acerca de la enfermedad de Parkinson también sugieren la aparición de una sincronía excesiva en los ganglios basales (Beiser et al. 1997), generada en parte por la

elevación crónica del tono colinérgico producida por la falta de dopamina (Pisan et al. 2007). La elevación crónica de la sincronía causada por la sobre activación del sistema colinérgico podría ser la causa de la aparición de un estado preferido que se encuentra trabado, en los experimentos con animales hemiparkinsonianos, lo cual limita la habilidad de los ensambles neuronales para formar trayectorias y asociarse en módulos distintos, restringiendo las capacidades de composición (Levy et al. 2001). Sin duda, los procesos que generan la dinámica de la red neostriatal y el papel de los mecanismos intrínsecos y sinápticos involucrados en la sincronización anormal del neostriado en condiciones patológicas necesitan ser investigados con mayor detalle.

El neostriado es la principal entrada de los ganglios basales. Ha sido propuesto que las neuronas neostriatales optimizan la ejecución de programas motores por medio del procesamiento y filtrado de los comandos corticales (Graybiel, 2000; Stern et al. 1997; Wilson, 1993). Sin embargo las neuronas espinosas medianas no son únicamente seguidores pasivos de la actividad cortical, debido a que la expresión de propiedades bistables en ellas las habilita con características no lineales permitiendo la generación de diferentes dinámicas de red (Carrillo-Reid et al. 2008; Vergara et al. 2003). Dichas dinámicas pueden ser evocadas por una entrada excitadora tónica que tiene un correlato directo con comportamientos fisiológicos (Ossowska y Wolfarth, 1995). Los comportamientos motores son producidos por medio de un conjunto de

CPGs actuando en paralelo (Carrillo-Reid et al. 2008; Grillner, 2006; Hsiao et al. 1998). La pregunta es entender cómo estos módulos funcionales se combinan para realizar tareas específicas durante la influencia de diferentes neurotransmisores. El poder entender la respuesta del microcircuito neocortical ante diferentes condiciones farmacológicas ayudará a proponer nuevas soluciones terapéuticas para enfermedades neurodegenerativas.

Los hallazgos descritos en el presente trabajo demuestran que la combinación de diferentes técnicas y métodos analíticos pueden ser muy útiles para descifrar el efecto que tienen distintos neurotransmisores en microcircuitos cerebrales *in vitro*. Este trabajo representa un método novedoso para investigar de manera simultánea tanto los mecanismos de red como los celulares que sostienen la dinámica cerebral en condiciones normales y patológicas.

El estriado recibe señales provenientes de la corteza y del tálamo que contienen información acerca del estado actual o futuro de distintos eventos (tanto acciones como pensamientos). Bajo condiciones normales dichas señales producen memorias de procedimientos o movimientos secuenciales (Graybiel, 2008; Kim et al. 2007). En situaciones patológicas el mismo circuito puede generar estados repetitivos, como balismos o desórdenes obsesivo-compulsivos; o puede producir limitaciones en el pensamiento y problemas para realizar movimientos aprendidos (Graybiel, 2000). El reto es encontrar soluciones que permitan regresar los estados patológicos a una condición funcional.

Los experimentos realizados en el presente trabajo muestran que existen microcircuitos con diversas propiedades computacionales, los cuales pueden encontrarse en pequeños pedazos de cerebro aislado *in vitro* y estudiarse con detalle. De esta manera, los microcircuitos neuronales, así como cualquier sistema, pueden ser estudiados de acuerdo con sus elementos básicos y sus reglas de composición; permitiéndonos entender desde la forma en la cual nos comunicamos hasta los hábitos que determinan nuestra vida cotidiana. Los hallazgos experimentales aquí descritos podrían sentar las bases para entender tanto los estados cerebrales normales como los patológicos, con lo cual será posible proponer soluciones para distintas enfermedades neurodegenerativas que tienen un gran impacto en la sociedad.

BIBLIOGRAFÍA

Abeles M. Synfire chains. In: *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, edited by Arbib, MA. Cambridge MA: The MIT Press, 2003.

Abeles M, Hayon G, Lehmann D. Modeling compositionality by dynamic binding of synfires. *J Comp Neurosci* 17: 179-201, 2004.

Aosaki T, Tsubokawa H, Ishida A, Watanabe K, Graybiel AM, Kimura M. Responses of tonically active neurons in the primate's striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J Neurosci* 14: 3969-3984, 1994.

Bargas J, Galarraga E, Aceves J. Dendritic activity on neostriatal neurons as inferred from somatic intracellular recordings. *Brain Res* 539: 159-163, 1991.

Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM. Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437: 1158-1161, 2005.

Beiser DG, Hua SE, Houk JC. Network models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 7: 185-190, 1997.

Berke JD, Okatan M, Skurski J, Eichenbaum HB. Oscillatory entrainment of striatal neurons in freely moving rats. *Neuron* 43: 883-896, 2004.

Bezdek JC, Li WQ, Attikiouzel Y, Windham M. A geometric approach to cluster validity for normal mixtures. *Soft Computing* 1: 166-179, 1997.

Bienenstock E, Geman S. Compositionality. In: *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, edited by Arbib, MA. Cambridge MA: The MIT Press, 1995.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232: 331-356, 1973.

Brown SL, Joseph J, Stopfer M. Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nat Neurosci* 8: 1568-1576, 2005.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M₁-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10: 2887-2895, 1998.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23(3):120-6, 2000.

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99: 1435-1450, 2008.

Cepeda C, Chandler SH, Shumate LW, Levine MS. Persistent Na⁺ conductance in medium-sized neostriatal neurons: characterization using infrared videomicroscopy and whole cell patch-clamp recordings. *J Neurophysiol* 74(3): 1343-8, 1995.

Cossart R, Aronov D, Yuste R. Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423: 283-288, 2003.

Cools AR. Role of the neostriatal dopaminergic activity in sequencing and selecting behavioural strategies: facilitation of processes involved in selecting the best strategy in a stressful situation. *Behav Brain Res* 1: 361-378, 1980.

Costa RM, Lin SC, Sotnikova TD, Cyr M, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA. Rapid alterations in corticostriatal ensemble coordination during acute dopamine-dependent motor dysfunction. *Neuron* 52: 359-369, 2006.

Czubayko U, Plenz D. Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15764-15769, 2002.

DeLong AJ. Phenomenological space-time: toward an experiential relativity. *Science* 213: 681-683, 1981.

Diaz del Guante MA, Cruz-Morales SE, Prado-Alcalá, RA. Time-dependent effects of cholinergic blockade of the striatum on memory. *Neurosci Lett* 122: 79-82, 1991.

Dickson CT, Biella G, de Curtis M. Evidence for spatial modules mediated by temporal synchronization of carbachol-induced gamma rhythm in medial entorhinal cortex. *J Neurosci* 20(20): 7846-54, 2000.

Diestel R. *Graph Theory*. New York: Springer-Verlag Heidelberg, 2005.

Dragoi G, Buzsáki G. Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron* 50: 145-157, 2005.

Figuroa A, Galarraga E, Bargas J. Muscarinic receptors involved in the subthreshold cholinergic actions of neostriatal spiny neurons. *Synapse* 46: 215-223, 2002.

Froemke RC, Kumar VS, Czkwianianc P, Yuste R. Analysis of multineuronal activation patterns from calcium-imaging experiments in brain slices.

Trends Cardiovasc Med 12: 247-52, 2002.

Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J. Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19: 3629-3638, 1999.

Gordon IT, Whelan PJ. Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *J Exp Biol* 209: 2007-2014, 2006.

Graybiel AM. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 5: 733-741, 1995.

Graybiel AM. The basal ganglia. *Curr Biol* 10: R509 –R511, 2000.

Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52: 751-766, 2006.

Grillner S, Hellgren J, Menard A, Saitoh K, Wikstrom MA. Mechanisms for selection of basic motor programs – roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci* 28: 364-370, 2005a.

Grillner S, Markram H, De Schutter E, Silberberg G, LeBeau F.E. Microcircuits in action-from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci* 28: 525-533, 2005b.

Grillner S, McClellan A, Sigvardt K, Wallen P, Wilen M. Activation of NMDA-receptors elicits "fictive locomotion" in lamprey spinal cord in vitro. *Acta Physiol Scan.* 113: 549-551, 1981.

Guertin PA, Hounsgaard J. NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol* 80: 3380-3382, 1998.

Hammer B. Compositionality in neural systems. In: *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*, edited by Arbib, MA. Cambridge MA: The MIT Press, 2003.

Harris KD. Neural signatures of cell assembly organization. *Nature Rev Neurosci* 6: 399-407, 2005.

Hasselmo ME, Giocomo LM. Cholinergic modulation of cortical function. *J Mol Neurosci* 30: 133-135, 2006.

Hebb DO. *The Organization of Behavior.* New York: John Wiley & Sons, 1949.

Herrling PL, Morris R, Salt TE. Effects of excitatory amino acids and their antagonists on membrane and action potentials of cat caudate neurones. *J Physiol* 339: 207–222, 1983.

Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Revs* 80: 953-978, 2000.

Holt DJ, Graybiel AM, Saper CB. Neurochemical architecture of the human striatum. *J Comp Neurol* 384: 1-25, 1997.

Hsiao C, del Negro CA, Trueblood PR, Chandler SH. Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* 79: 2847-2856, 1998.

Hutchinson WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, Brown P. Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24: 9240-9243, 2004.

Huyck CR. Cell assemblies as an intermediate level model of cognition. In: *Emerging Neural Architectures based on Neuroscience*, edited by Wermter, S. Austin, J. & Willshaw, O. Berlin: Springer, 2001.

Ibáñez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gómora JC, Aceves J, Bargas J. Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol* 98: 2311-2323, 2007.

Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R. Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52:132-138: 2005.

Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304: 559-564, 2004.

Izhikevich EM. Dynamical Systems In Neuroscience. MIT Press. Cambridge MA, 2007.

Jensen O, Kaiser J, Lachaux JP. Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory. *Trends Neurosci* 30(7): 317-24, 2007.

Jonyer I, Cook DJ, Holder LB. Graph-Based Hierarchical Conceptual Clustering
J Machine Learning Res 2: 19-43, 2001.

Kasanetz F, Riquelme LA, O'Donnell P, Murer MG. Turning off cortical ensembles stops striatal up states and elicits phase perturbations in cortical and striatal slow oscillations in rat in vivo. *J Physiol* 577: 97-113, 2006.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC. Intracellular recording of identified neostriatal patch and matrix spiny cells in a slice preparation preserving cortical inputs. *J Neurophysiol* 62:1052-1068, 1989.

Kepecs A, Raghavachari S. Gating information by two-state membrane potential fluctuations. *J Neurophysiol* 97(4): 3015-23, 2007.

Kerr JN, Plenz D. Dendritic calcium encodes striatal neuron output during up-states. *J Neurosci* 22:1499-1512, 2002.

Kerr JN, Plenz D. Action potential timing determines dendritic calcium during striatal up-states. *J Neurosci* 24: 877-885, 2004.

Kiehn O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29: 279–306, 2006.

Kim YB, Huh N, Lee H, Baeg EH, Lee D, Jung MW. Encoding of action history in the rat ventral striatum. *J Neurophysiol* 98(6): 3548-56, 2007.

Koos T, Tepper JM, Wilson CJ. Comparison of IPSCs evoked by spiny and fast-spiking neurons in the neostriatum. *J Neurosci* 24: 7916-7922, 2004.

Lee AK, Wilson MA. Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron* 36: 1183-94, 2002.

Leibowitz MD, Sutro JB, Hille B. Voltage-dependent gating of veratridine-modified Na channels. *J Gen Physiol* 87: 25-46, 1986.

Lemus-Aguilar I, Bargas J, Tecuapetla F, Galarraga E, Carrillo-Reid L. Modular design of virtual instrumentation for the manipulation and analysis of electrophysiological signals. *Rev Mex Ing Biomed* 27: 82-92, 2006.

Levy N, Horn D, Meilijson I, Ruppin E. Distributed synchrony in a cell assembly of spiking neurons. *Neural Networks* 14: 815-824, 2001.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312-324, 2005.

Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305: 197-213, 1980a.

Llinas R, Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J Physiol* 305: 171-195, 1980b.

Lorente de No R. Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J Neurophysiol* 1: 207–244, 1938.

Luczak A, Barthóf P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD. Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 347-352, 2007.

Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD. Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106: 313-330, 2001.

Mahon S, Vautrelle N, Pezard L, Slaght SJ, Deniau JM, Chouvet G, Charpier S. Distinct patterns of striatal medium spiny neuron activity during the natural sleep-wake cycle. *J Neurosci* 26: 12587-12595, 2006.

Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, Froemke RC, Yuste R. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32: 883-898, 2001.

Marder E, Calabrese RL. Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76: 687–717, 1996.

Morris G, Arkadir D, Nevet A, Vaadia E, Bergman H. Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* 43: 133-143, 2004.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307: 462-465, 1984.

Ossowska K. Interaction between striatal excitatory amino acid and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the turning behaviour of rats. *Neurosci Lett* 202: 57-60, 1995.

Ossowska K, Wolfarth S. Stimulation of glutamate receptors in the intermediate/caudal striatum induces contralateral turning. *Eur J Pharmacol* 273: 89–97, 1995.

Parthasarathy HB, Graybiel AM. Cortically driven immediate-early gene expression reflects modular influence of sensorimotor cortex on identified striatal neurons in the squirrel monkey. *J Neurosci* 17: 2477-2491, 1997.

Peña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM. Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43: 105-117, 2004.

Perez-Burgos A, Perez-Rosello T, Salgado H, Flores-Barrera E, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J. Muscarinic M₁ modulation of N and L types of calcium channels is mediated by protein kinase C in neostriatal neurons. *Neuroscience* doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.047, 2008

Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galarraga E, Bargas J. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of Ca_v2.1 and Ca_v2.2 Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* 93: 2507-2519, 2005.

Peterlin ZA, Kozloski J, Mao BQ, Tsiola A, Yuste R. Optical probing of neuronal circuits with calcium indicators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3619-3624, 2000.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 45: 45-56, 2003.

Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30: 545–553, 2007.

Plenz D, Aertsen A. Neural dynamics in cortex-striatum co-cultures--II. Spatiotemporal characteristics of neuronal activity. *Neuroscience* 70: 893-924, 1996.

Plenz D, Thiagarajan TC. The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci* 30: 101-110, 2007.

Rekling JC, Laursen AM. Evidence for a persistent sodium conductance in neurons from the nucleus prepositus hypoglossi. *Brain Res* 500: 276-286, 1989.

Rekling JC, Feldman JL. Calcium-dependent plateau potentials in rostral ambiguous neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* 78: 2483-2492, 1997.

Reyes AD. Synchrony dependent propagation of firing rates in iteratively constructed networks in vivo. *Nat Neurosci* 6: 593-599, 2003.

Romo R, Scarnati E, Schultz W. Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. II. Movement-related activity in the anterior striatum. *Exp Brain Res* 91: 385-95,1992.

Roudi Y, Latham PE. A Balanced Memory Network. *PLoS Comput Biol* 3: 1679-1700, 2007.

Roweis S, Saul LK. Nonlinear dimensionality reduction by locally linear embedding. *Science* 290: 2323–2326, 2000.

Sasaki T, Kimura R, Tsukamoto M, Matsuki N, Ikegaya Y. Integrative spike dynamics of rat CA1 neurons: a multineuronal imaging study. *J Physiol* 574: 195-208, 2006.

Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y. Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 27: 517-528, 2007.

Schiller J, Schiller Y. NMDA receptor-mediated dendritic spikes and coincident signal amplification. *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 343-8, 2001.

Schnitzler A, Gross J. Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nat. Rev. Neurosci* 6: 285-296, 2005.

Schreiber S, Fellous JM, Whitmer D, Tiesinga P, Sejnowski TJ. A new correlation-based measure of spike timing reliability. *Neurocomputing* 52–54: 925 – 931, 2003.

Schultz W, Apicella P, Ljungberg T, Romo R, Scarnati E. Reward-related activity in the monkey striatum and substantia nigra. *Prog Brain Res* 99: 227-235, 1993.

Schultz W. Behavior-related activity of primate dopamine neurons. *Rev Neurol (Paris)* 150: 634-639, 1994.

Schwartz TH, Rabinowitz D, Unni V, Kumar VS, Smetters DK, Tsiola A, Yuste R. Networks of coactive neurons in developing layer 1. *Neuron* 20: 541-552, 1998.

Shen W, Hamilton SE, Nathanson NM, Surmeier DJ. Cholinergic suppression of KCNQ channel currents enhances excitability of striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 25: 7449-7458, 2005.

Stern EA, Kincaid AE, Wilson CJ. Spontaneous subthreshold membrane potential fluctuations and action potential variability of rat corticostriatal and striatal neurons in vivo. *J Neurophysiol* 77: 1697–1715, 1997.

Stopfer M, Jayaraman V, Laurent G. Intensity versus identity coding in an olfactory system. *Neuron* 39: 991-1004, 2003.

Sutro JB. Kinetics of veratridine action on Na channels of skeletal muscle. *J Gen Physiol* 87: 1-24, 1986.

Takakusaki K, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, Habaguchi T. Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Prog Brain Res* 143: 231-237, 2004a.

Takakusaki K, Saitoh K, Harada H, Kashiwayanagi M. Role of basal ganglia-brainstem pathways in the control of motor behaviors. *Neurosci Res* 50: 137-151, 2004b.

Tepper JM, Koos T, Wilson CJ. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27: 662-669, 2004.

Tian LM, O'toom S, Alkadhi KA. Endogenous bursting due to altered sodium channel function in rat hippocampal CA1 neurons. *Brain Res* 680:164-172, 1995.

Tseng KY, O'Donnell P. Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D₁-NMDA co-activation. *Cereb Cortex* 15: 49-57, 2005.

Tsodyks M. Attractor neural networks and spatial maps in hippocampus. *Neuron* 48: 168-169, 2005.

Tunstall MJ, Oorschot DE, Kean A, Wickens JR. Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88: 1263-1269, 2002.

Uhlhaas PJ, Singer W. Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology. *Neuron* 52: 155-168, 2006.

Vautrelle N, Carrillo-Reid L, Bargas J. Diversity of up-state voltage transitions during different network states. In: *Cortico-subcortical dynamics in Parkinson Disease, Chapter 5.* (Ed.: Tseng KY). Humana / Springer Press, New York, USA, 2008.

Vergara R, Rick C, Hernández-López S, Laville JA, Guzman JN, Galarraga E, Surmeier DJ, Bargas J. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J Physiol (Lond)* 553: 169-182, 2003.

Wickens JR, Oorschot DE. Neural dynamics and surround inhibition in the neostriatum: a possible connection. In: *Brain Dynamics and the Striatal Complex.*

Wilson CJ. The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99: 277-297, 1993.

Yuste R, MacLean JN, Smith J, Lansner A. The cortex as a central pattern generator. *Nature Reviews* 6: 477-483, 2005.

Zhu ZT, Munhall A, Shen KZ, Johnson SW. Calcium-dependent subthreshold oscillations determine bursting activity induced by N-methyl-D-aspartate in rat subthalamic neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 19: 1296-1304, 2004.