



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIA COGNITIVA

CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON
Y LA DISCINESIA EN EL CONECTOMA FUNCIONAL DEL MICROCIRCUITO
ESTRIATAL

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ING. JESÚS ESTEBAN PÉREZ ORTEGA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO. JUNIO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Para investigar la verdad es
preciso dudar al menos una vez
en la vida, en cuanto sea posible,
de todas las cosas.”

RENÉ DESCARTES

A mi madre **CELIA ORTEGA** que siempre
ha estado conmigo y que nunca podría
devolverle tanto que me ha dado.

A mi gran mentor **JOSÉ BARGAS** por sus
vastas enseñanzas y por ser mi guía en
este proceso integral de mi formación.

Agradecimientos

A mis padres, mi hermana y toda mi familia por ser mi gran soporte.

A **TZITZITLINI ALEJANDRE** por todo su apoyo e inmensa motivación que en mí inspira.

A todos mis amigos del laboratorio y del instituto con los que he aprendido y he disfrutado ampliamente durante todo el camino del doctorado.

A mis amigos de la vida por seguir al pendiente de mí a pesar de la convivencia limitada.

A mis alumnos que me han impulsado a mejorar y que me han brindado tantas satisfacciones.

A mis tutores **ARTURO HERNÁNDEZ** y **MIGUEL MORALES** que me estuvieron evaluando y alentando semestre a semestre para mejorar mi formación.

A mis revisores de la presente tesis **RANULFO ROMO**, **HUGO MERCHANT**, **SALVADOR HERNÁNDEZ** y **FERNANDO PEÑA**, por dedicarle tiempo a examinar el presente trabajo.

Índice

Resumen	ix
Abstract	x
1 Introducción	1
1.1 Microcircuitos cerebrales: ensambles neuronales y CPGs.....	2
1.2 Ganglios basales y el núcleo estriado	5
1.3 Desórdenes del movimiento	8
1.3.1 Enfermedad de Parkinson y el modelo murino con 6-OHDA.....	8
1.3.2 Discinesia y el modelo de LID	9
1.4 Teoría de redes y sus aplicaciones en las neurociencias	11
1.4.1 Conectoma funcional.....	12
2 Planteamiento del problema	14
2.1 Preguntas	16
2.2 Hipótesis	16
2.3 Objetivos	17
3 Metodología	19
3.1 Preparación de las rebanadas de cerebro para el registro in vitro	20
3.2 Imagenología de Ca ²⁺	21
3.3 Electrofisiología	21
3.4 Análisis de imágenes.....	22
3.5 Detección de la actividad neuronal.....	22
3.6 Definición de estados de la red.....	23
3.7 Conectividad funcional.....	24
3.8 Análisis de la red neuronal	25

3.8.1 Mundo pequeño.....	25
3.8.2 Escala libre	26
3.8.3 Arquitectura jerárquica.....	26
3.9 El modelo murino de hemiparkinsonismo con 6-OHDA.....	27
3.10 Modelo de discinesia inducida por L-DOPA	28
4 Resultados	30
4.1 Principales hallazgos.....	31
4.2 El NMDA sirve como estímulo excitador al microcircuito del estriado control	32
4.3 Las secuencias temporales de activación entre los microcircuitos del estriado control frente a los patológicos son diferentes	36
4.4 Conectoma funcional del estriado	42
4.4.1 La relevancia de las neuronas hub cambia en condiciones patológicas.....	47
4.4.2 La estructura jerárquica en microcircuitos del estriado control y patológicos.....	52
4.5 Los microcircuitos del estriado control pueden distinguirse funcionalmente de los patológicos de manera significativa	55
5 Discusión	58
5.1 Los microcircuitos del estriado generan estados de coactividad neuronal en los cuales sus neuronas están comunicadas por un grupo de neuronas hub	60
5.2 En los microcircuitos patológicos se afectan las conexiones entre los ensambles de las neuronas de proyección y las neuronas hub	63
5.3 Transición al nuevo paradigma a nivel de microcircuito	67
Conclusiones	68
Bibliografía	71
Anexo	

Índice de figuras y tablas

Resumen	ix
Abstract	x
1 Introducción	1
Figura 1. Actividad de un microcircuito neuronal observado mediante imagenología de calcio	5
Figura 2. Diferentes poblaciones neuronales en el estriado	7
Figura 3. Modelo tradicional de las dos vías en condiciones control y patológicas	10
Figura 4. Conectoma funcional de un microcircuito neuronal	13
2 Planteamiento del problema	14
3 Metodología	19
4 Resultados	30
Figura 5. Esquema de un experimento: adquisición simultánea del registro de potenciales de acción (electrofisiología) y de los transitorios de calcio intracelular que estos provocan (imagenología)	33
Figura 6. El microcircuito del estriado está formado por grupos de neuronas que alternan su actividad siguiendo rutas Eulerianas	35
Figura 7. Secuencias temporales de actividad características en microcircuitos control y patológicos	38
Figura 8. Secuencias temporales cerradas y abiertas de los microcircuitos del estriado.	41
Tabla 1. Parámetros de la dinámica del microcircuito estriatal en condiciones control y patológicas.....	42
Figura 9. Propiedades de red de “mundo pequeño” del microcircuito del estriado	43
Figura 10. Conectoma funcional del microcircuito del estriado en una visualización circular.....	45
Figura 11. Registros electrofisiológicos de las neuronas hub identificadas mediante imagenología.....	47

Figura 12. Fisiopatología: visualización circular del conectoma de los microcircuitos del estriado y su distribución de conexiones mostrando la relevancia de las neuronas altamente conectadas.....	49
Figura 13. Fisiopatología: visualización circular del conectoma de los microcircuitos del estriado para denotar la arquitectura jerárquica medida a través del coeficiente de agrupamiento	54
Figura 14. Comparación estadística de los parámetros de red entre los microcircuitos del estriado control y los patológicos	56
Tabla 2. Parámetros de red del microcircuito estriatal en condiciones control y patológicas	57
5 Discusión	58
Figura 15. Teoría cognitiva: modelo de la activación de los ensambles neuronales en el microcircuito neuronal del estriado	63
Figura 16. Panorama de los conectomas funcionales de microcircuitos del estriado en base a sus propiedades estructurales	66
Conclusiones	68
Bibliografía	71

Resumen

El gran reto actual en la Neurociencia Cognitiva es conectar la brecha que existe entre los estudios a nivel celular y sistémico, es decir, explicar los procesos cerebrales y el comportamiento a nivel histológico —o microcircuito neuronal—. Actualmente, no se sabe cómo es que decenas de neuronas organizan su actividad y sus interacciones dentro de un microcircuito o un módulo a escala histológica. En esta tesis proponemos una manera de cuantificar cómo las neuronas organizan su actividad en el microcircuito del estriado. Primero, obtuvimos el conectoma funcional del estriado mediante la aplicación de la Teoría de Redes utilizando imagenología de calcio con resolución de neurona única. Después, comparamos tejidos del núcleo estriado de ratas en condiciones control frente a condiciones patológicas: estriado decorticado, parkinsoniano y discinético. En condiciones control, el conectoma funcional revela que el estriado posee propiedades de redes complejas tales como: mundo pequeño, de escala libre y de red jerárquica. Estas propiedades se pierden en condiciones patológicas, de tal manera que pueden ser potencialmente cuantificables para describir la fisiopatología. Los microcircuitos del estriado decorticado revelan que las interacciones neuronales dependen de conexiones privilegiadas entre la corteza y un grupo de neuronas altamente conectadas (o *hubs*). En el modelo de parkinsonismo de la 6-OHDA en roedores observamos un decremento en el número de neuronas *hub*; sin embargo, las pocas neuronas *hub*, que permanecieron activas, estuvieron conectadas a grupos de neuronas que conformaban estados dominantes de la red. En el modelo de discinesia inducida por L-DOPA se pierde la estructura jerárquica del conectoma funcional. Cada una de estas condiciones genera distintas secuencias temporales en la actividad de los ensambles neuronales del microcircuito. Estas secuencias temporales aparecen como características particulares de los procesos patológicos. Lo cual brinda la posibilidad de crear, en un futuro, una fisiopatología cuantitativa a escala histológica —biopsias—, así como ensayos bioensayos farmacológicos.

Abstract

A current major challenge in Cognitive Neuroscience is to connect the bridge between cellular and systemic level, that is, to explain the cerebral processes and behavior at the histologic level —or neural microcircuit—. At present, it is not known how dozens of neurons organize their activity and their interactions within a microcircuit or module at histologic scale. In this dissertation we propose a way to quantify how neurons organize their activity in the striatal microcircuit. First, we obtained the functional connectome of the striatum by applying Network Theory and the technique of calcium imaging with single neuron resolution. Then, we compared striatal tissue of different rats in control versus pathologic conditions: decorticated, parkinsonian and dyskinetic striatum. In control conditions, the functional connectome revealed that striatum possess complex network properties such as small world, scale-free and network hierarchy. These properties were lost in pathologic conditions, so these could be potentially quantifiable to describe the pathophysiology. The decorticated striatal microcircuits revealed that neural interactions depend on privileged connections between cortex and a group of highly connected neurons (*or hubs*). In the rodent 6-OHDA model of parkinsonism a decrement of the number of hubs was observed; however, the few hub neurons remained were linked to a dominant network states. L-DOPA induced dyskinesia model provoked a loss in the hierarchical structure of the functional connectome. Each condition generate different temporal sequences in the activity of the microcircuit neural assemblies. Temporal sequences appeared as particular signatures of disease process thus bringing the possibility of a future quantitative pathophysiology at a histological scale.

1 Introducción

El paradigma de la Neurociencia Cognitiva sostiene que la conciencia, los pensamientos, las percepciones, la memoria, el aprendizaje y el comportamiento son el resultado del procesamiento de la actividad neuronal embebido en los microcircuitos del sistema nervioso (Ilardi y Feldman, 2001). Por lo tanto, uno de los problemas fundamentales de la Neurociencia Cognitiva es saber cómo se organizan las neuronas para representar, procesar y codificar la información.

Aunque frecuentemente se utiliza como metáfora el procesamiento de la información en una computadora para describir funciones del cerebro, no quiere decir que los neurocientíficos lo estudien así. Más bien, en cada ocasión y en cada núcleo cerebral, es preciso combinar teorías biológicas, físicas y matemáticas de tal manera que aporten al entendimiento del procesamiento neuronal.

La biología sostiene que el sistema nervioso del mamífero tiene una estructura modular y cada uno de los módulos está conformado por neuronas de proyección e interneuronas que se activan de manera coordinada (Eichenbaum y Davis, 1998; Kumar et al., 2010; Mountcastle, 1998; Shepherd y Grillner, 2010). En varios estudios se han descrito diferentes tipos de códigos neuronales (códigos temporales, poblacionales, de ensambles, etc.), y se ha demostrado que éstos se pueden procesar en paralelo para mantener una señal de transferencia de información robusta entre los microcircuitos neuronales (Beatty et al., 2015; Eichenbaum y Davies, 1998; Hatsopoulos et al., 1998; Kumar et al. 2010; Reyes, 2003; Tauste Campo et al. 2015).

1.1 Microcircuitos cerebrales: ensambles neuronales y CPGs

Shepherd y Grillner (2010) definen a los **microcircuitos cerebrales** como la forma en la cual las células nerviosas están organizadas para llevar a cabo operaciones dentro de una región del sistema nervioso. En la historia de las ideas en neurociencias, destacan dos teorías de la organización de la actividad neuronal: los ensambles neuronales (Hebb, 1949), y los centros generadores de pautas (Central Pattern Generators o CPGs, en inglés; Grillner, 1985).

Introducción

La teoría de los ensambles neuronales fue propuesta por Hebb en 1949, en donde define a un **ensamble neuronal** como una estructura compuesta de conjuntos de células cerebrales capaces de promover la activación de otros conjuntos. De manera que en la red neuronal fluye la actividad conjunta de grupos de neuronales que tienen como blanco otros grupos neuronales. A la serie de estos eventos les nombró *secuencias de fase*, o el “proceso del pensamiento” (Hebb, 1949). Esta teoría postula que dichas secuencias de activación son generadas por cambios en los pesos sinápticos —plasticidad sináptica— dependiendo de su uso en el tiempo. Unas sinapsis se refuerzan (LTP: *long term potentiation*, en inglés) mientras que otras se debilitan (LTD: *long term depression*, en inglés), promoviendo la creación de circuitos preferentes para el flujo de actividad neuronal. Estos circuitos preferentes serían los circuitos dedicados a realizar ciertas tareas después del proceso de aprendizaje o condicionamiento (Hebb, 1949). Los ensambles neuronales tenderían a tener una organización y agrupamiento de alto orden, en donde los microcircuitos producirían reverberaciones y se activarían de manera coordinada cuando sea necesario realizar rutinas o computaciones (Eichenbaum y Davies, 1998). Estos ensambles pueden seleccionar grupos de neuronas que forman circuitos recurrentes que se adaptan mediante cambios sinápticos durante una acción o comportamiento (este proceso es considerado en la teoría llamada darwinismo neuronal por Edelman, 1993).

Por otra parte, Grillner y colaboradores muestran que hay grupos de neuronas con actividad recurrente que se encargan de comportamientos motores básicos innatos, a los cuales les llamó **Centros Generadores de Pautas (CPGs)** (Grillner, 1985). Esta teoría sostiene que nacemos con una gran variedad de CPGs y que la organización motora se debe a la versatilidad de combinación y recambio de éstos para la generación de movimientos complejos. Este tipo de microcircuitos neuronales subyace a los comportamientos motores innatos tales como la succión, la locomoción, el nado, la respiración, los ritmos cardiacos y los gestos faciales, entre otros (Shepherd y Grillner, 2010).

Introducción

Los experimentos biológicos han demostrado que, efectivamente, varios microcircuitos neuronales exhiben recurrencia y alternancia generando flujos de actividad neuronal que producen secuencias espacio-temporales y reverberaciones que se correlacionan con el comportamiento (Bakhurin et al., 2016; Carrillo-Reid et al., 2015a, 2008; Cui et al., 2013; Harris, 2005; Huyck, 2001; Lansner, 2009; Markram et al., 2015; Miller et al., 2014). En el aprendizaje de una tarea estereotipada se promueve la generación de circuitos reverberantes, manteniendo un trazo de memoria transitoria, que puede ser la memoria de trabajo durante una tarea (Romo et al., 1999), o puede continuar reverberando hasta realizar un cambio en las sinapsis y generar una memoria permanente (Tegnér et al., 2002). Estos microcircuitos promueven grupos de neuronas coactivas y la aparición de rutas preferidas para el flujo de actividad entre ensambles neuronales (Harris, 2005; Hebb, 1949; Huyck, 2001; Frégnac, 2003; Lansner, 2009). Las propiedades de los ensambles neuronales tales como la alternancia y la reverberación, pueden observarse dentro de pequeñas áreas de tejido en microcircuitos del estriado, la corteza y el hipocampo, entre otros núcleos (Carrillo-Reid et al., 2015a, 2009a, 2008; Frégnac, 2003; Hatsopoulos et al., 1998; Lansner, 2009; Markram et al., 2015). Se ha mostrado que la recurrencia o la alternancia entre ensambles neuronales podría depender de la dinámica de corto plazo que poseen las conexiones sinápticas (Carrillo-Reid et al., 2015b) y de la inervación recíproca entre estos ensambles (Einchenbaum, 2002).

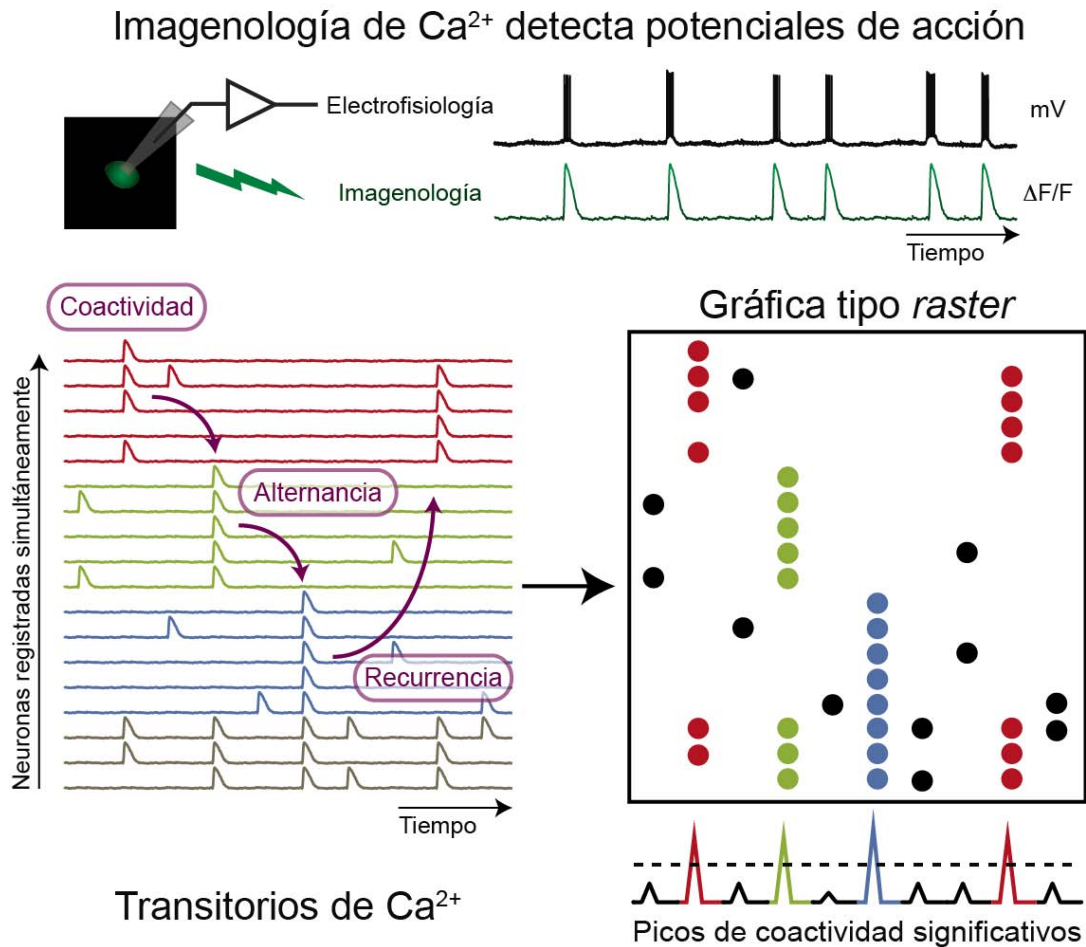


Figura 1. Actividad de un microcircuito neuronal observado mediante imagenología de calcio

Con la técnica de imagenología de calcio se pueden obtener las señales transitorias de la elevación en la concentración de calcio intracelular asociada con el disparo de potenciales de acción de varias neuronas de manera simultánea. Los ensambles neuronales se caracterizan por exhibir coactivación (o correlación), alternancia y recurrencia de grupos de neuronas activos durante la dinámica del microcircuito neuronal. Estudios previos han mostrado que esto sucede en el microcircuito del estriado. Para poder estudiar la dinámica del microcircuito, se obtienen gráficas de tipo *raster*, en las cuales se extraen los momentos de actividad neuronal vista a través de los transitorios de Ca^{2+} obteniendo gráficas de coactividad, en algunos casos de coactividad hay significancia estadística. La figura mostrada está basada en la dinámica descrita en [Carrillo-Reid et al., 2008](#).

1.2 Ganglios basales y el núcleo estriado

Los **ganglios basales** son un conjunto de núcleos cerebrales subcorticales que participan en la codificación motora: generación, aprendizaje y control de los movimientos (Graybiel, 1995). Los núcleos que componen este conjunto son: el estriado, el globo pálido externo e interno, la *substantia nigra reticulata y compacta*, y el núcleo subtalámico. El núcleo de entrada principal a los ganglios basales es el **estriado**, el cual recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza y del tálamo, así como de las terminales dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* (Gerfen y Bolam, 2010).

El estriado contiene diferentes tipos neuronales. La clasificación más general separa las neuronas de proyección de las interneuronas. Las neuronas espinosas de proyección (Spiny Projection Neuron o SPN, en inglés) conforman alrededor del 95% de la población total del estriado y tienen un soma de tamaño promedio de 13 μm (Gerfen y Bolam, 2010). Las sinapsis físicas entre las colaterales de estas neuronas de proyección ocurren con mayor probabilidad a distancias $\leq 100 \mu\text{m}$ (Czubayko y Plenz, 2002; Taverna et al., 2008; Tunstall et al., 2002). Las neuronas de proyección se dividen en dos vías: las SPNs de la **vía directa**, que conectan de manera monosináptica a los núcleos de salida de los ganglios basales (globo pálido interno y *substantia nigra reticulata*) y expresan el receptor a dopamina tipo D1; y las SPNs de la **vía indirecta**, que envían sus axones al globo pálido externo y que expresan el receptor a dopamina del tipo D2. De manera simplificada el **modelo tradicional** de estas dos vías propone que la activación de la **vía directa promueve** los movimientos mientras que la activación de la **vía indirecta reprime** los movimientos (Albin et al., 1989; Kravitz et al. 2010).

Todas las SPNs normalmente poseen poca actividad espontánea, hasta que se requiere realizar alguna actividad, generalmente motora, son activadas por un **estímulo excitador** (*excitatory drive*, en inglés; definido como aferentes, agonistas de transmisores o moduladores que conducen a la red a producir actividad alternante; Grillner, 2006). Al ser activadas, estas neuronas muestran un patrón temporal de actividad que oscila entre dos estados distintos: uno con potencial de membrana hiperpolarizado cercano al reposo (-80 mV, *down state*, en inglés) y

otro con potencial de membrana despolarizado (-50 mV, *up state*, en inglés) (Wilson y Kawaguchi, 1996).

Por otra parte, las interneuronas conforman el 5% restante de la población (Gerfen y Bolam, 2010). Dentro de las interneuronas se encuentran las gigantes colinérgicas, que expresan acetiltransferasa de colina (choline acetyltransferase o ChAT, en inglés), con tamaño somático de 20 a 50 μm y axones de más de 1 mm de diámetro. También se encuentran las interneuronas GABAérgicas, que se clasifican en diferentes géneros: las de disparo rápido, que expresan parvalbúmina (PV) con un soma de 10 a 25 μm y una arborización axonal de hasta 1 mm de diámetro; otros tipos son las que presentan disparo de bajo umbral de activación (*low threshold spike* o LTS, en inglés) o disparo irregular con adaptación, que poseen somas de 12 a 35 μm y axones de más de 1 mm de diámetro. Estas últimas pueden expresar diversos marcadores moleculares: NPY (neuropéptido Y), SOM (somatostatina), 5-HT₃ (un receptor a serotonina), NOS (óxido nítrico sintasa) y calretinina. También hay neuronas neurogliaformes (NGF) que tienen un soma de 13 μm y axón de hasta 800 μm de diámetro y cuya transmisión GABAérgica llega a ser extra-sináptica; entre otras (Kawaguchi et al. 1995; Tepper y Bolam 2004; Ibáñez-Sandoval et al., 2011).

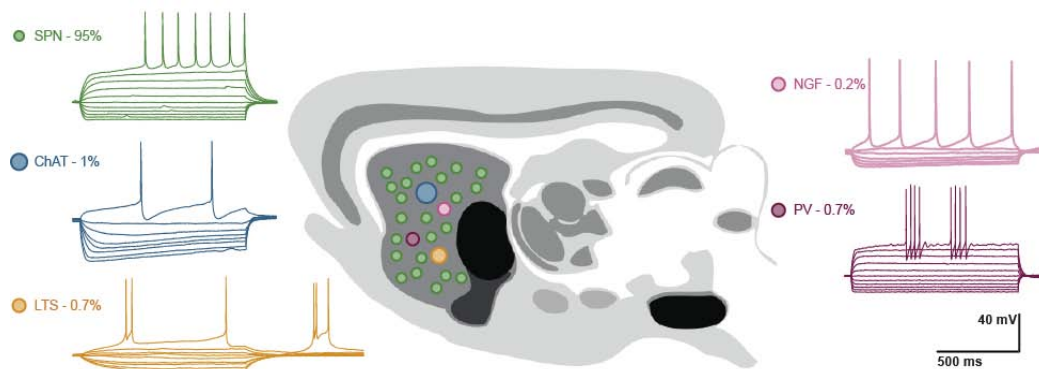


Figura 2. Diferentes poblaciones neuronales en el estriado

La figura representa la población neuronal del núcleo estriado en un corte sagital del cerebro. Se muestran los registros electrofisiológicos que son característicos de las poblaciones neuronales del estriado. Las neuronas espinosas de proyección SPN (ver texto); las ChAT o interneuronas gigantes colinérgicas; las LTS o interneuronas con potenciales de bajo umbral; las NGF o interneuronas neurogliaformes; y las PV o interneuronas de disparo rápido. Las neuronas de proyección conforman el 95% de

la población y las interneuronas el restante 5% (Tepper et al., 2010; Ibáñez-Sandoval et al., 2011). Los registros mostrados son del autor de la presente tesis.

1.3 Desórdenes del movimiento

En el año 1912, por primera vez, Samuel Wilson mostró que los ganglios basales están involucrados en el origen de los desórdenes del movimiento (Obeso et al., 2014). Particularmente, mencionó que el mal funcionamiento del núcleo estriado producía desórdenes en la regulación del tono muscular y la aparición de movimientos involuntarios. Entre otros, existen dos desórdenes fundamentales de la activación muscular relacionados con los ganglios basales: la enfermedad de Parkinson idiopática y la discinesia inducida por la medicación de su tratamiento, generalmente **levodopa** o **L-DOPA** (*levodopa-induced dyskinesia* o *LID*, en inglés).

1.3.1 Enfermedad de Parkinson y el modelo murino con 6-OHDA

La **enfermedad de Parkinson** fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, de quien lleva el nombre. Las principales características de esta enfermedad son el temblor en reposo, la rigidez muscular, la dificultad para realizar movimientos, y la inestabilidad de la postura, entre otras (Obeso et al., 2000).

La enfermedad de Parkinson afecta al 1% de la población, y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después del Alzheimer (Dauer y Przedborski, 2003). Los síntomas motores que caracterizan la enfermedad de Parkinson son en parte resultado de la ausencia de dopamina en los ganglios basales. La ausencia de dopamina se debe a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta*, la cual es esencial para el buen funcionamiento de los ganglios basales (Jenner, 2008).

Las causas de la enfermedad del Parkinson son aún desconocidas. Se aducen tanto factores ambientales tóxicos como genéticos. Se han desarrollado modelos neurotóxicos animales para estudiarla mejor. Uno de los modelos más utilizados

es el de la lesión unilateral de la *substantia nigra compacta* con la toxina 6-hidroxidopamina (**6-OHDA**) en roedores. Otro es el modelo con la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en primates no humanos. En el caso del modelo de 6-OHDA, se realiza una lesión unilateral y no bilateral, porque los animales con lesión bilateral no sobreviven. Así, con este modelo se obtiene un roedor hemiparkinsoniano, el cual se puede evaluar por medio de la conducta de giro inducida por agonistas dopaminérgicos (Ungerstedt, 1968; Schwarting y Huston 1996; Simola et al., 2007). Este modelo ha sido utilizado para describir algunas características del tejido estriatal parkinsoniano en ratas (Jáidar et al., 2010).

1.3.2 Discinesia y el modelo de LID

La **discinesia** es un desorden del movimiento caracterizado por la presencia de movimientos anormales e involuntarios que aparecen de manera desordenada. Hay diferentes formas de discinesia, por ejemplo: la enfermedad de Huntington, el hemibalismo, las discinesias tardías, entre otras.

Una forma muy particular de discinesia ocurre a causa del tratamiento para aliviar la enfermedad de Parkinson mediante agonistas dopaminérgicos. Esta discinesia suele ser sumamente incapacitante. El 50% de los pacientes la presenta entre los 4 y 5 años después de iniciar el tratamiento, y al rededor del 75% después de 10 años (Bargiotas y Konitsiotis, 2013; Obeso et al., 2014).

Para producir el modelo animal se elevan las concentraciones de dopamina, que es escasa en los ganglios basales durante el Parkinson, mediante dosis elevadas del fármaco L-DOPA. El primer reporte de LID experimental fue realizado en 1969 (Cotzias et al., 1969).

Una explicación simple de la generación de LID es que ocurre un desbalance de actividad entre las vías directa e indirecta del estriado, contrario a lo que ocurre con la privación de dopamina. Es decir, hay un decremento de actividad en la vía indirecta, que a su vez produciría movimientos involuntarios. Desafortunadamente, esta simple explicación de discinesia no se sostiene con

algunos experimentos en monos, en donde no se observa dicho decremento (Jenner, 2008).

Para poder avanzar en el conocimiento de este tipo de discinesia se usa el modelo animal. Una vez que se evalúa el modelo hemiparkinsoniano, se realiza un tratamiento con dosis altas de L-DOPA durante varios días, y la evaluación del modelo discinético se realiza mediante el conteo de movimientos anormales involuntarios (abnormal involuntary movements o **AIMs**, en inglés), que incluyen movimientos locomotores, axiales, orolinguales y de las extremidades (Cenci y Lundblad, 2007).

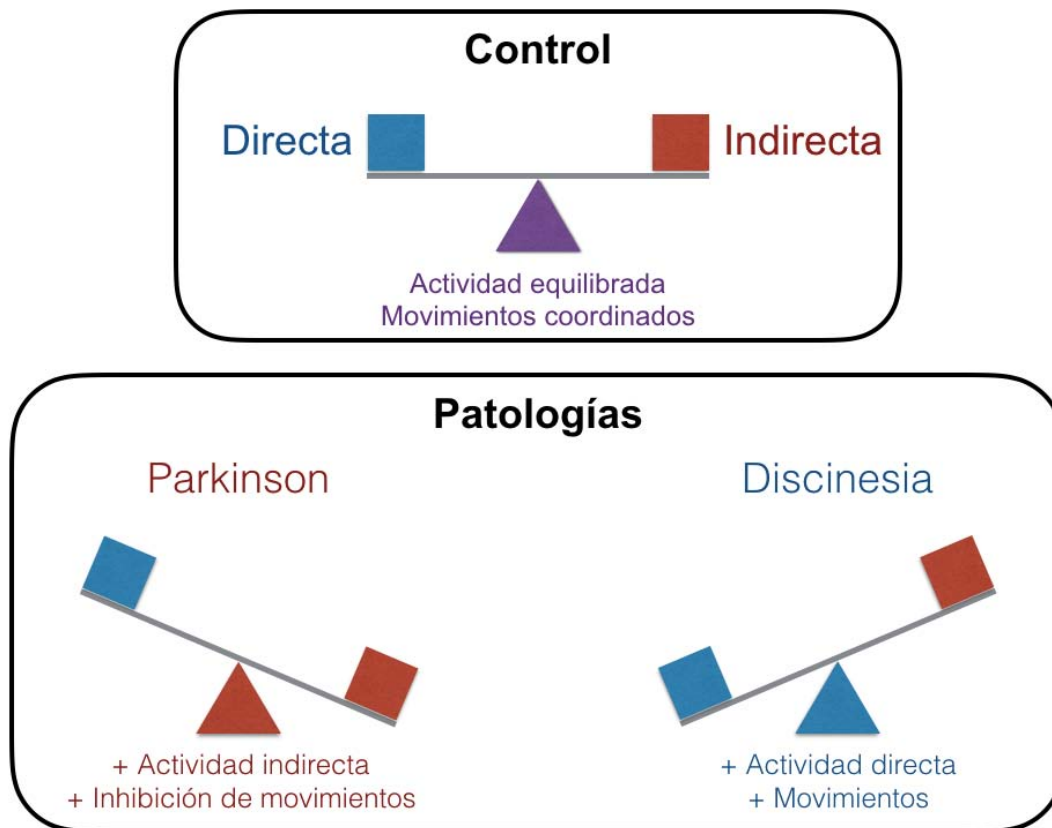


Figura 3. Modelo tradicional de las dos vías en condiciones control y patológicas

El modelo de las dos vías propone que en condiciones control hay un equilibrio entre la actividad de las neuronas espinosas de proyección (SPNs) tanto de la vía directa, que promueve los movimientos, como de la vía indirecta, que inhibe los movimientos. Y por lo tanto, la activación equilibrada de ambas vías produce movimientos coordinados. En la enfermedad de Parkinson hay mucho más actividad en la vía indirecta que en la directa, produciendo mayor inhibición de los movimientos. En el caso de la discinesia inducida por L-DOPA, hay un desequilibrio

contrario a la enfermedad de Parkinson, en este caso hay más actividad en la vía directa que en la indirecta, debido a esto se promueve un incremento en los movimientos. La figura es una metáfora de la actividad de las dos vías de neuronas de proyección en el estriado (Albin et al., 1989; Kravitz et al. 2010).

A pesar de los avances que se han realizado, hay poca información acerca de la fisiología de los microcircuitos neuronales implicados en las alteraciones de la enfermedad de Parkinson y las discinesias. Por lo tanto, proponemos que es necesario tener nuevos métodos experimentales y perspectivas de análisis a nivel del microcircuito —escala histológica— para estudiar los cambios que se dan en las redes neuronales y probablemente realizar ensayos farmacológicos que los reviertan.

1.4 Teoría de redes y sus aplicaciones en las neurociencias

El estudio de las redes es una rama de las matemáticas discretas conocida como **teoría de grafos** que nace en 1736 gracias al matemático Leonhard Euler. Los primeros logros importantes de la aplicación de esta teoría fueron en el área de las ciencias sociales mostrando análisis cuantitativos para entender las relaciones sociales las de familiares, de negocios, de colaboración, etc. (Boccaletti et al., 2006). Básicamente, un **grafo** consiste en un conjunto de nodos y los enlaces entre ellos. Los nodos pueden ser personas, animales, genes, páginas web, etc. Los enlaces pueden significar alguna relación entre los nodos: relaciones humanas, predador-presa, reacciones químicas, hipervínculos, etc. En los últimos 15 años, ha nacido un nuevo campo de interés: el estudio de las **redes complejas**, las cuales se caracterizan por tener una estructura irregular, compleja y dinámicamente envuelta en el tiempo (Boccaletti et al., 2006). Una propiedad interesante observada en las redes complejas del mundo real es el comportamiento de escala libre que presentan las características estructurales o dinámicas de estas redes (Markovic y Gross, 2014), es decir, que mantienen sus propiedades a pesar de cambiar de escala —espacial, temporal, etc.—.

El estudio de las redes complejas se ha expandido ampliamente a través de los diferentes campos científicos —estudio interdisciplinario—, abarca desde las

ciencias sociales hasta las ciencias naturales, como la biología y las neurociencias (Sporns, 2011). El estudio de la **conectividad del cerebro**, anatómica o funcional, ha abierto nuevas formas teóricas y de experimentación en diferentes áreas de las neurociencias: neuroanatomía, neurodesarrollo, neurociencia cognitiva, entre otras (Sporns, 2011).

La **aplicación** de la teoría de redes **en las neurociencias** nos puede conducir a dilucidar varios de los problemas que corresponden a las funciones de la actividad cerebral. Por ejemplo, mediante registros de potenciales de campo con electrodos múltiples en el tejido cerebral se han observado distribuciones de cola en las conexiones funcionales, sugiriendo propiedades de escala libre y organizaciones jerárquicas (Beggs y Plenz, 2003). Estas propiedades también se han encontrado en circuitos de mayor tamaño (Sadovsky y MacLean, 2013; Sporns y Bullmore, 2014) así como entre estructuras del cerebro completo (Sporns, 2016).

1.4.1 Conectoma funcional

El concepto de conectoma proviene de manera simultánea e independiente de Olaf Sporns y Patric Hagman. En sus trabajos proponen nombrar **conectoma** a la red de elementos y conexiones anatómicas que conforman al cerebro (Sporns et al., 2005; Hagmann, 2005). Pocos años después, este concepto fue extendido para incluir la conectividad funcional, llamándole así **conectoma funcional** (Biswal et al., 2010). La conectividad funcional se refiere a las asociaciones que relacionan la actividad entre los elementos de la red cerebral —que no son anatómicas—, por ejemplo, la coactividad, las correlaciones o la coherencia entre la actividad de diversos núcleos cerebrales (Zuo et al., 2011; Sporns, 2016).

La caracterización mediante parámetros cuantificables del conectoma funcional podría permitirnos comparar la complejidad de las interacciones neuronales en condiciones control frente a las diferentes condiciones patológicas y/o farmacológicas.

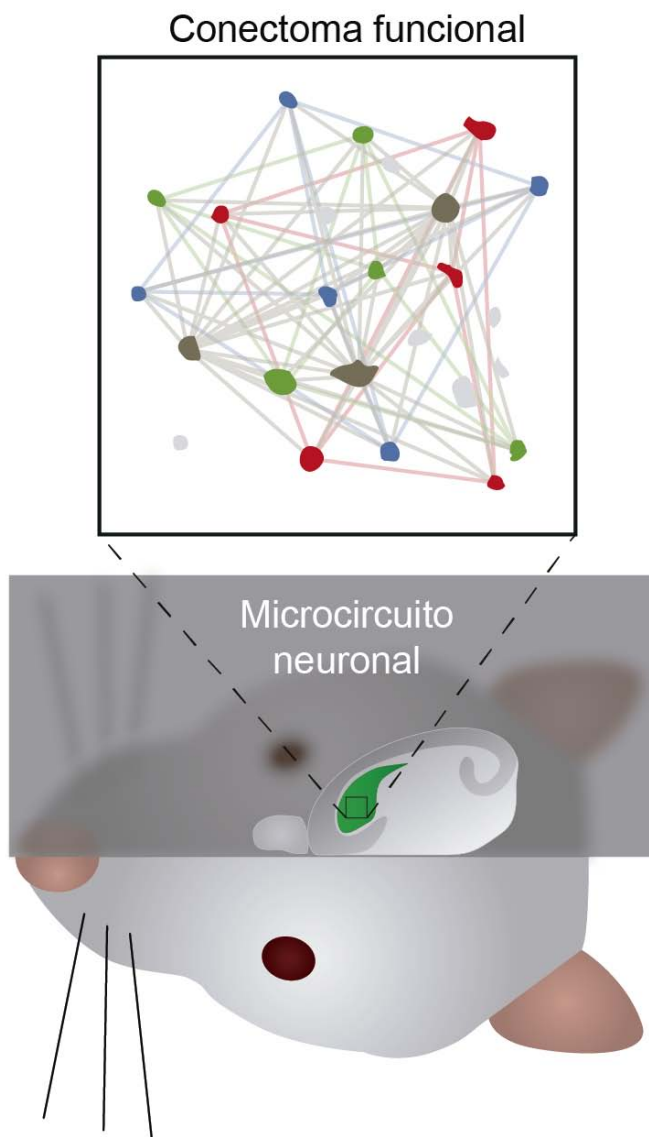


Figura 4. Conectoma funcional de un microcircuito neuronal

Ejemplo de la representación del conectoma funcional de un microcircuito neuronal, en el núcleo estriado de la rata. Las neuronas son los nodos de la red y los enlaces son la relación funcional entre la actividad de cada par de neuronas. Esta representación está basada en el concepto de conectoma funcional por [Biswal et al., 2010](#).

2 Planteamiento del problema

Durante las últimas décadas, el estudio de las neurociencias se ha desarrollado en dos niveles. El primero es el nivel celular/molecular: la biología de las células nerviosas y sus sinapsis, considerando la genética y las vías de señalización que subyacen a la función neuronal. El otro nivel es el sistémico: la localización de dónde se llevan a cabo diferentes procesos cerebrales como la sensación, la codificación motora, las emociones, entre otros. Sin embargo, hasta el momento no se pueden conectar ambos niveles de manera causal, sino que los modelos y los conceptos se basan en correlaciones. Por ejemplo, la plasticidad sináptica de una determinada conexión en un circuito se correlaciona con el aprendizaje y la memoria de un animal. Pero persiste una brecha muy grande. Es necesaria la etapa intermedia, por ejemplo, entender cómo se comportan los microcircuitos conformados por varios tipos de neuronas y sinapsis, esto puede observarse mediante el registro de la actividad simultánea de decenas o centenas de neuronas durante la provocación de fenómenos neuronales específicos *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, un **reto actual** de las neurociencias es acortar la brecha que existe entre los niveles celular/molecular y sistémico mediante el estudio a **nivel de microcircuito**: identificar los elementos y sus interacciones para dilucidar su participación (Grillner, 2014).

Actualmente, hay tecnología que permite registrar simultáneamente la actividad de varios elementos en circuitos de diversa escala. El interés de la presente Tesis es el nivel de microcircuito, o escala histológica, es decir, el nivel utilizado por los patólogos al analizar biopsias. Un cuestionamiento es si se puede caracterizar a los microcircuitos de manera que revelen diversas patologías en tejido vivo y de manera funcional. Una forma es utilizar imagenología de calcio, con la que se pueden caracterizar microcircuitos del estriado con grupos de neuronas dispersos dentro de una pequeña área de tejido ($\sim 1 \text{ mm}^2$) que se activan de manera conjunta (**coactividad**) configurando breves eventos de red o estados neuronales que se alternan y que conforman secuencias recurrentes (Carrillo-Reid et al., 2009a; 2008). Continuando con esta línea de investigación, en esta Tesis nos interesan las relaciones funcionales entre las neuronas que conforman el microcircuito del estriado. Por esta razón, es necesario caracterizar la conectividad funcional a escala histológica en condiciones control y en

condiciones patológicas: parkinsonismo experimental y la discinesia inducida por L-DOPA.

2.1 Preguntas

1. ¿La actividad neuronal registrada mediante imagenología de calcio permitirá describir un conectoma funcional en el microcircuito del estriado?
2. En caso de obtener un tipo de conectoma funcional, ¿qué propiedades de red presentaría este?
3. ¿Se podrá tener evidencia de que las conexiones funcionales observadas reflejan las conexiones sinápticas entre las neuronas?
4. ¿Cuál es el rol que juegan las neuronas de proyección y las interneuronas en la organización funcional del microcircuito?
5. Una de las principales aferencias a este núcleo es la corteza, entonces ¿el conectoma funcional del estriado depende de las conexiones corticales?
6. ¿Cómo cambia el conectoma funcional en condiciones patológicas tales como el parkinsonismo experimental o la discinesia inducida por L-DOPA? ¿se podrán correlacionar los cambios con las características fisiopatológicas?

2.2 Hipótesis

1. Por medio de la coactividad, o actividad conjunta, de grupos de neuronas en un tiempo corto, se podrá describir la conectividad funcional —conectoma funcional— del microcircuito del estriado.
2. Se podrán definir y cuantificar algunas propiedades de red del conectoma funcional del estriado, por ejemplo, si tiene propiedades de mundo pequeño, de escala libre y de jerarquía, como otras redes complejas de la naturaleza.

Planteamiento del problema

3. Las conexiones funcionales mantendrán relación con las conexiones sinápticas ya conocidas, sean monosinápticas o polisinápticas.
4. Las interneuronas tendrán un rol en la organización funcional del microcircuito del estriado participando en la organización de secuencias temporales de actividad y reverberaciones.
5. Las aferencias de la corteza tendrán relevancia en la organización del conectoma funcional del estriado.
6. El conectoma funcional del microcircuito estriatal mostrará cambios característicos en condiciones patológicas.

2.3 Objetivos

Objetivo general:

Estudiar las interacciones que se llevan a cabo en la dinámica neuronal del estriado a nivel de microcircuito en condiciones control y patológicas. En consecuencia, acortar la brecha de conocimiento que existe entre los niveles celular y sistémico de la neurociencia cognitiva.

Objetivos particulares:

1. Obtener una descripción de la conectividad funcional del microcircuito del estriado, es decir, un conectoma funcional.
2. Calcular las medidas de red que caracterizan al conectoma funcional del estriado, determinar el tipo de red que forma y sus propiedades que tiene.
3. Identificar si las distancias entre las conexiones funcionales de las neuronas corresponden a la distancia probables, de acuerdo a la literatura, a conexiones monosinápticas y polisinápticas.

Planteamiento del problema

4. Identificar, si existe, algún tipo de neuronas que tengan un rol relevante en la estructura funcional del microcircuito del estriado.
5. Obtener la dinámica neuronal y el conectoma funcional del estriado en una preparación que no contenga a la corteza y comparar frente a la preparación control.
6. Obtener y comparar la dinámica neuronal y el conectoma funcional del microcircuito del estriado de los modelos patológicos: 6-OHDA y LID.

3 Metodología

3.1 Preparación de las rebanadas de cerebro para el registro *in vitro*

Se utilizaron rebanadas cerebrales de ratas Wistar de 20 a 36 días postnatales (*postnatal days* o PD, en inglés) como previamente se ha descrito (Carrillo-Reid et al., 2008). Las rebanadas se obtienen mediante cortes horizontales de 300 μm de espesor en donde se mantiene la corteza y el núcleo estriado, con el fin de preservar la vía córtico-estriatal. La actividad del microcircuito del estriado se induce con N-metil-D-aspartato (NMDA) a una concentración de 5 a 8 μM , este fármaco es utilizado como un *excitatory drive* o estímulo excitador. En algunas rebanadas fue separada la corteza del estriado, obteniendo así rebanadas decorticadas. También fueron obtenidas rebanadas de modelos patológicos que se describen más adelante.

Para la realización de los experimentos en animales se siguieron las normas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio en México (NOM-062-ZOO-1999) y la guía *National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals* (NIH Publications No. 8023, revisada en 1978). Se realizaron experimentos con el mínimo número de animales para lograr la significancia estadística y evitando así el sufrimiento animal. Los animales fueron anestesiados con ketamina (85 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg), después sus cerebros fueron extraídos rápidamente y colocados en solución salina fría (4 °C) conteniendo (en mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO₃, 1.0 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 11 glucose, 300 mOsm/L, pH = 7.4, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂. Las rebanadas permanecieron en esta solución a temperatura ambiente (21-25 °C) por al menos 1 hora antes de los experimentos. Esta solución salina favorece la aparición de transiciones de voltaje *in vitro* conocidas como *up states* y *down states* — estados activos o inactivos— (Sánchez-Vives y McCormick, 2000; Vergara et al., 2003; Wilson y Kawaguchi, 1996). No obstante, la actividad del microcircuito puede activarse y permanecer de manera similar por varios minutos a partir de la estimulación cortical, talámica o mediante otros fármacos utilizados como *excitatory drive* (Pérez-Ramírez et al., 2015).

3.2 Imagenología de Ca²⁺

Las rebanadas fueron incubadas en la oscuridad por 20 a 25 min a temperatura ambiente (21-25 °C) en presencia de 1-10 μ M fluo 4-AM (Molecular Probes®, Life technologies, Ciudad de México) en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) con la misma solución salina. Se utilizó un microscopio equipado con un objetivo 20X de inmersión de agua y 0.95 NA (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA). Para observar los cambios espontáneos en la fluorescencia, se estimuló la preparación con pulsos de luz a 488 nm (15-50 ms de exposición) con una fuente de iluminación Lambda LS (Sutter instruments, Petaluma, CA) conectada al microscopio mediante fibra óptica. El campo de la imagen tuvo un tamaño de 750 \times 750 μ m, dentro del estriado dorsal. Se adquirieron secuencias de imágenes o videos breves, de \sim 180 s por periodo, con una herramienta de software personalizada y diseñada en el ambiente de LabView, a intervalos de 5-10 min con duraciones \geq 60 min mediante una cámara digital con enfriamiento (CoolSnap K4, Photometrics, Tucson, AZ) a una tasa de 100-250 ms/imagen. Al final del experimento se utilizó una solución de alto potasio para contabilizar el número de neuronas que captaron el indicador de calcio dentro del campo de registro. La actividad observada se observa por medio de los transitorios de calcio espontáneamente generados por las neuronas. El conjunto de neuronas que subyacen a un estado de la red son las neuronas que se activan en una misma imagen del video. No todas las neuronas pertenecientes al mismo grupo estuvieron activas en cada ocasión. En algunos experimentos se obtuvieron registros de voltaje de manera simultánea utilizando electrofisiología de célula entera (*whole-cell patch clamp*, en inglés), sin embargo, la descripción electrofisiológica no es el objetivo principal de este proyecto.

3.3 Electrofisiología

Con el mismo software personalizado se realizaron los registros simultáneos de adquisición de imagenología de calcio con los registros electrofisiológicos usando la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula entera (*whole cell*, en inglés),

en el estriado dorsal. Se utilizó un amplificador Cornerstone (DBVC-700A, Dagan, Minneapolis, MN) para realizar los registros de célula entera. Las señales fueron filtradas a 3 kHz y digitalizadas a 6 kHz con una tarjeta BNC-2110 (National Instruments, Austin, TX). Las pipetas para registro (3-6 M Ω) fueron llenadas con (en mM): 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP, 0.5% de biocitina y 25 μ M fluo-4 salt.

3.4 Análisis de imágenes

Se utilizó el módulo de análisis de imágenes del software personalizado para el procesamiento inicial de las imágenes. Una imagen resumen consiste en la desviación estándar de todas las imágenes obtenidas en cada video. A partir de esta imagen, se detectan automáticamente las coordenadas de todas las neuronas activas durante la adquisición del video mediante un algoritmo de reconocimiento de patrones —plantillas circulares de tamaño variable de 10 a 30 μ m de diámetro—. Los transitorios de calcio de cada region de interés fueron recolectados a lo largo del tiempo. El fotoblanqueo, el fenómeno de discos de Airy y el ruido fueron corregidos al restar el fondo local de cada neurona de interés (4 veces el diámetro de la neurona de interés) a la señal cruda de la misma, imagen por imagen. Después, se aplicó un filtro pasa bajas de promedio móvil.

3.5 Detección de la actividad neuronal

Previamente se ha reportado que los incrementos en la señal fluorescente de calcio coinciden con registros electrofisiológicos de trenes de potenciales de acción. Esto es, a cada tren de dos o más potenciales de acción de estados despolarizados —llamados *up-states*— corresponde un transitorio en la señal de calcio fluorescente (Carrillo-Reid et al., 2008). Específicamente, la parte positiva de la derivada de la señal de calcio tiene la misma duración que los trenes de potenciales de acción registrados electrofisiológicamente (Carrillo-Reid et al., 2009a). De las derivadas en el tiempo de estas señales de calcio se obtiene un

vector fila binario $1 \times F$, en donde F es el número de imágenes. Estas señales son aproximaciones de la actividad eléctrica de esas neuronas en el tiempo. Para el análisis solamente fueron considerados los eventos de amplitudes mayores a 2.5 veces la desviación estándar del ruido —con esto se asegura que menor a este umbral se encuentre más del 98% de la señal de ruido—. Este procedimiento fue hecho para cada neurona. Por lo tanto, se obtiene una matriz binaria $N \times F$, en donde N representa el número de neuronas activas en el *eje y* (gráfica tipo *raster*). El *eje x* en la matriz representa el tiempo (número de imágenes de un video convertido a segundos). En esta matriz, 1 representa actividad y 0 representa inactividad de la neurona en una imagen y una neurona de interés dada. La suma de las neuronas coactivas a lo largo de todos los cuadros del video forman un vector que representa la actividad de las N neuronas durante el experimento. Todos los registros fueron examinados manualmente para remover artefactos y transitorios de calcio lentos, los cuales probablemente corresponden a células gliales (Ikegaya et al., 2005).

3.6 Definición de estados de la red

Después de obtener la matriz experimental con la actividad de varias neuronas a lo largo del tiempo, se realizaron análisis con otra herramienta personalizada de software desarrollada en el ambiente de MatLab (Math-Works). Este programa incluye algunos algoritmos de Brain Connectivity Toolbox (<https://sites.google.com/site/bctnet/>). Primero se obtiene un vector $1 \times F$ con la suma de las células coactivas a lo largo de las F imágenes. Después determinamos un umbral de significancia de coactividad neuronal utilizando permutaciones de Monte Carlo (1000 veces) de diferentes maneras. La hipótesis nula es que las neuronas coactivas son independientes de cada una y que la coactividad ocurre aleatoriamente. Por tanto, la actividad binaria se permuta revolviendo la actividad de cada neurona en la matriz manteniendo los niveles de actividad (revolver dentro de las células). También, se intercambian los intervalos de tiempo derivados de los transitorios de calcio entre dos posiciones seleccionadas aleatoriamente del primero al último intervalo y este procedimiento se itera

(revolver los intervalos de los transitorios de calcio). Además, se desplazan temporalmente los transitorios de calcio agregando intervalos aleatorios para cada célula. Finalmente, los intervalos de los transitorios de calcio fueron asignados a células seleccionadas aleatoriamente. Como resultado, la tasa de actividad de la población en la matriz simulada permanece igual que en la matriz original (revolver a través del tiempo los transitorios de calcio). Así se obtiene la probabilidad de que un vector de coactividad aparezca al azar. Consideramos significativos los picos de coactividad con $P < 0.05$ (Carrillo-Reid et al., 2015a, b).

Para los análisis, utilizamos los picos estadísticamente significativos de coactividad neuronal, definiéndolos como **eventos** o **estados de la red**. Cada pico de coactividad es un vector neuronal columna $N \times 1$. Extraemos una matriz de picos $A \times P$, en donde A es el número de neuronas activas en los picos de coactividad y P es el número de picos. Para encontrar si los vectores neuronales fueron similares, o diferentes, medimos el coeficiente de similitud de Jaccard (Carrillo-Reid et al., 2008). Después, utilizamos estos valores en un análisis de agrupamiento jerárquico para identificar los diferentes grupos de neuronas que subyacen los picos de coactividad. En cada experimento, calculamos la fidelidad de la consistencia en el árbol jerárquico (Jain y Duves, 1988). Para validar la diversidad y el número de grupos utilizamos el algoritmo de Girvan y Newman (Girvan y Newman, 2002; Boccaletti et al., 2006), un método basado en buscar y progresivamente eliminar enlaces con un gran índice de *betweenness*, hasta que la red se rompa en componentes. En nuestras manos, este método fue suficiente para separar los grupos de neuronas que subyacen a los picos de coactividad. Nótese que no todas las neuronas que pertenecen a un grupo dado participan en cada uno de los picos de coactividad.

3.7 Conectividad funcional

Para realizar el análisis de la red de neuronas, cada neurona activa es tomada como un nodo y su coactividad con otras neuronas es tomada como sus conexiones funcionales (enlaces). Se utilizan las conexiones funcionales entre

todas las neuronas pertenecientes a cada uno de todos los estados de la red. Después, se obtiene la matriz adyacente ponderada de la red neuronal obtenida (Figura 2), para posteriormente extraer una matriz binaria adyacente a partir de colocar un umbral para determinar las conexiones significativas entre las neuronas basados en las simulaciones de Monte Carlo (1000 simulaciones, $P < 0.05$) utilizando la matriz de picos significativos de coactividad. Las matrices adyacentes binarias son utilizadas para los siguientes análisis. La matriz adyacente binaria de cada experimento representa a la red neuronal, o el conectoma funcional del microcircuito.

3.8 Análisis de la red neuronal

3.8.1 Mundo pequeño

Para verificar si las redes neuronales observadas y adquiridas experimentalmente tienen propiedades potenciales de “mundo pequeño” (Watts y Strogatz, 1998) es necesario generar redes equivalentes simuladas, tanto regulares como aleatorias, con el mismo número de nodos y enlaces para cada experimento. Después se comparan dos propiedades: la **longitud característica** (L) y el **coeficiente de agrupamiento** (C) de las redes simuladas y de las experimentales. Las redes aleatorias fueron generadas con el modelo de Erdős-Rényi (ER) con el mismo número de nodos y enlaces vistos en cada experimento analizado. Las redes regulares (RN) fueron construidas basadas en un modelo de anillo entramado, también manteniendo el número de nodos y enlaces. Las medidas de mundo pequeño que se comparan son L y C de una red obtenida de un experimento con sus equivalentes de las redes simuladas ER y RN, respectivamente. La región para considerar una red de mundo pequeño es $|\omega| \leq 5$ (Telesford et al., 2011), en donde $\omega = L_r/L_s - C_s/C_l$. L_r es la *longitud característica* de una red aleatoria y L_s la medida correspondiente del microcircuito del estriado experimental. C_s es el *coeficiente de agrupamiento* del microcircuito del estriado experimental y C_l el de la red regular. Los valores cercanos a cero son más probables a tener propiedades de mundo pequeño.

3.8.2 Escala libre

Para verificar si una red neuronal experimental es de “escala libre” (*scale-free*, en inglés), primero se obtiene su distribución de grados $P(k)$: esto es, la probabilidad de que un nodo tenga k conexiones funcionales (o grado k). Cuando $P(k)$ es una distribución con cola larga, significa que pocos nodos tienen muchas conexiones y que la mayoría de los nodos tienen pocas, es decir, las conexiones no son ni regulares ni aleatorias, sino que hay grupos de neuronas que están conectados a través de nodos altamente conectados (Barabási y Oltvai, 2004). Algunas distribuciones de cola larga pueden ser ajustadas razonablemente a una función potencia genérica de la forma: $P(k) \propto k^{-\gamma}$ (Barabási y Albert, 1999; Boccaletti et al., 2006). Sin asumir si las distribuciones encontradas en los presentes experimentos fueron funciones potencia u de otro tipo, provisionalmente, ajustamos las distribuciones de conexiones obtenidas experimentalmente a funciones potencia genéricas. Esto sería una primera aproximación para observar qué tan bien se ajustan mediante la medición del coeficiente de correlación de Pearson (R^2), y por lo tanto, describir lo que consideramos hallazgos experimentales relevantes y así ilustrar las diferencias encontradas entre los microcircuitos control y patológicos. El análisis estadístico más detallado sobre la función utilizada no fue el objetivo del presente trabajo.

3.8.3 Arquitectura jerárquica

Para verificar si los microcircuitos observados experimentalmente obtenidos tienen una arquitectura jerárquica, se calcula el *coeficiente de agrupamiento* en función del grado $C(k)$, esto es, obtener el *coeficiente de agrupamiento local* de cada nodo con sus k conexiones. En la medida que la forma de esta función es también una función de cola larga y que puede ser aproximada con una función potencia genérica de la forma $C(k) \propto k^{-\alpha}$, podemos hipotetizar que el microcircuito tiene una estructura jerárquica (Barabási y Oltvai, 2004; Ravasz y Barabási, 2003).

3.9 El modelo murino de hemiparkinsonismo con 6-OHDA

Los detalles de los procedimientos para obtener un modelo de la enfermedad de Parkinson inducido con 6-OHDA en roedores, tanto como las anomalías observadas en este modelo, han sido previamente publicadas (Barroso-Flores et al., 2015; Jáidar et al., 2010; Lopez-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a y 2013b; Prieto et al., 2011). De manera breve, ratas Wistar de 15-20 PD fueron profundamente anestesiadas con una mezcla de ketamina (85 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg) e inmovilizadas sobre un aparato estereotáxico. Cada una fue inyectada con 2 μ L de 6-OHDA (Sigma; 4 μ g/ μ L en 0.2 μ L de 0.9% NaCl, con 0.2 mg/mL de ácido ascórbico) dentro de la *substantia nigra compacta* a 1 μ L/min en las coordenadas estereotáxicas siguientes: anteroposterior 3.9; mediolateral 1.8 con respecto a bregma y dorsoventral 6.7 mm con respecto a la dura (Dunnett et al., 1981). La jeringa fue colocada en el lugar durante 10 minutos para permitir la difusión y maximizar la retención de la solución en el tejido. Luego de este procedimiento, las ratas fueron colocadas sobre colchonetas calientes para su recuperación y después se llevaron de regreso con sus respectivas madres y camadas. Con la finalidad de conocer la eficacia de la lesión, todas las ratas fueron evaluadas, 8 días después de la cirugía (PD > 23), mediante la conducta de giro. En esta prueba las ratas son colocadas en un rotómetro automatizado durante 10 minutos para aclimatarlas. La conducta de giro se mide con rotaciones contralaterales al estriado carente de dopamina después de una inyección de apomorfina (0.05 mg/kg). Los giros fueron monitoreados por 70 min y los animales que rotaron 450 veces o más fueron seleccionados para los siguientes experimentos. Este comportamiento corresponde al agotamiento de al menos el 90% de la concentración de dopamina estriatal (Hudson et al., 1993). En algunos animales, se realizó una inmunoreacción a TH en el estriado (ver Barroso-Flores et al., 2015). Los registros de imagenología de calcio se realizaron en las rebanadas obtenidas de siete animales diferentes que pasaron por todos los criterios anteriores.

3.10 Modelo de discinesia inducida por L-DOPA

Para este modelo se seleccionan animales con hemiparkinsonismo severo, el cual incrementa el riesgo de desarrollar discinesia inducida por L-DOPA (LID; [Santini et al., 2007](#)). Se utilizan éster metílico de levodopa (L-DOPA) y el inhibidor de la DOPA-descarboxilasa periférica —benserazida HCl (Sigma Aldrich)— disueltos ambos en una solución salina fisiológica inmediatamente antes de su uso. Los fármacos fueron inyectados a un volumen de 1 mL/kg diario de manera intraperitoneal. El tratamiento crónico con L-DOPA fue administrado por 15 días y consistió en 3 fases. Fase 1: la L-DOPA fue administrada a una dosis de 6 mg/kg/día por 3 días. Fase 2: la L-DOPA fue incrementada a 15 mg/kg/día hasta el día 7. Fase 3: la L-DOPA fue incrementada a 25 mg/kg/día en los días 7-15. La dosis de L-DOPA fue combinada con una dosis fija (15 mg/kg) de benserazida HCl. El desarrollo de movimientos anormales involuntarios (AIMs) fue monitoreado durante 10 días del tratamiento con L-DOPA de acuerdo a los principios previamente reportados ([Cenci and Lundblad, 2007](#); [Cenci et al., 1998](#); [Winkler et al., 2002](#)). Brevemente, las puntuaciones fueron realizadas de la siguiente manera: las ratas se colocaron individualmente en una caja transparente de plástico y fueron observadas por 1 min (tiempo de monitoreo) cada 20 min durante 240 min (sesión) después de la inyección de L-DOPA. Las puntuaciones fueron dadas por cuatro diferentes subtipos de AIMs: axial, extremidad anterior, orolingual y locomotora. Cada subtipo fue puntuado en una escala de severidad de 0 a 4 (0 = sin discinesia; 1 = discinesia ocasional mostrada el 50% del tiempo de observación; 2 = discinesia sostenida mostrada el 50% del tiempo de observación; 3 = discinesia continua; 4 = discinesia continua no interrumpible por un estímulo externo). Las puntuaciones de los subtipos de AIMs fueron sumados por periodo de monitoreo. Cada animal puede lograr un máximo teórico de 192 puntos en una sesión (puntuación máxima por periodo de monitoreo = 16; número de periodos monitoreados por sesión = 12). Los movimientos que fueron puntuados han sido descritos con detalle ([Cenci and Lundblad, 2007](#); [Winkler et al., 2002](#)). Los animales fueron sacrificados en los días 11-15 del tratamiento con L-DOPA durante el pico del estado discinético visto

Metodología

con los AIMS, esto es, entre 40 y 80 minutos después de la inyección de L-DOPA. Se obtuvieron rebanadas de siete diferentes animales que incluyen los criterios anteriores y la solución salina de perfusión contenía 50 μM de L-DOPA durante la obtención de las rebanadas cerebrales, la incubación con el indicador de calcio y los experimentos de imagenología de calcio. Es necesario un trabajo futuro para correlacionar la severidad de los AIMS con la incidencia en los parámetros descritos en el presente trabajo.

Además de los análisis estadísticos descritos arriba, y a menos de indicar otra cosa, los parámetros de las distribuciones entre las diferentes muestras fueron comparadas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La significancia fue tomada como $P < 0.05$ o menor. Los números en cada muestra representan preparaciones obtenidas de diferentes animales.

4 Resultados

4.1 Principales hallazgos

- El conectoma funcional del microcircuito del estriado exhibe propiedades de mundo pequeño y escala libre, además posee una estructura jerárquica con neuronas altamente conectadas o *hubs*.
- Las propiedades de red del microcircuito revelaron características diferentes en condiciones control frente a las patológicas.
- La decorticación del estriado revela que hay conexiones privilegiadas entre las aferentes piramidales y las neuronas altamente conectadas o *hubs*.
- Las neuronas altamente conectadas disminuyen significativamente en el modelo de 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson. Las neuronas *hub* que se mantienen se ven asociadas con los estados dominantes de la red.
- La discinesia inducida por L-DOPA provoca una pérdida de la estructura jerárquica del microcircuito.

En general, los resultados muestran que se puede revelar una estructura de conectividad funcional a escala histológica que cobra sentido fisiológico al observarse que posee propiedades de otras redes complejas encontradas en la naturaleza, incluyendo la del cerebro completo estudiado mediante técnicas como fMRI. Sin embargo, es intrigante el alcance de una característica: la escala libre. ¿Esto quiere decir que propiedades similares se pueden observar desde escala histológica hasta el cerebro completo?

También, se observa una organización modular formada por grupos de neuronas conectadas funcionalmente a relativamente largas distancias a escala histológica. Con esta representación del microcircuito del estriado control se pueden revelar reglas internas de funcionamiento que la actividad de los ensambles neuronales poseen. De manera interesante, esta organización de conectividad funcional cambia radicalmente en condiciones patológicas, brindando la posibilidad de que

pueda desarrollarse, en un futuro, una fisiopatología funcional en tejido vivo — o escala histológica—.

4.2 El NMDA sirve como estímulo excitador al microcircuito del estriado control

Previamente, se ha descrito una forma de estudiar experimentalmente los microcircuitos a escala histológica (Carrillo-Reid et al., 2011, 2009a, 2008). Brevemente (Figura 5), el microcircuito del estriado se activa utilizando 6-8 μM de NMDA como *excitatory drive* (Grillner, 2006; Vergara et al., 2003). Se registra un plano visual del estriado dorsal de $750 \times 750 \mu\text{m}$ con decenas de neuronas incubadas —o pre-llenadas— con el indicador de calcio fluo-4 AM (esquema en la Figura 5A; ver Metodología). En la Figura 5B se muestra una imagen resumen de las neuronas activas durante un breve periodo de tiempo (3 min). Se realiza una localización automática de las neuronas activas para identificar sus coordenadas en el tejido (Figura 5C). Cada grupo de neuronas que presenta coactividad puede estar distribuido en todo el campo de visión. En algunos experimentos, las neuronas identificadas como *hubs* (ver más adelante) fueron el blanco para realizar registros electrofisiológicos, y así observar su anatomía y disparos (Figura 5D-E). Sin embargo, las neuronas registradas mediante electrofisiología no son el objetivo principal del presente trabajo, aunque algunas fueron identificadas anatómica y funcionalmente (ver más adelante en la Figura 11). En el ejemplo mostrado en la Figura 5D-E la neurona es similar a las clasificadas como neurogliaformes (Ibáñez-Sandoval et al., 2011). Durante la actividad del microcircuito, esta neurona estuvo disparando trenes de potenciales de acción (Figura 5F trazo superior). Los trazos de en medio en la Figura 5F muestran los incrementos transitorios de Ca^{2+} intracelular adquiridos simultáneamente como consecuencia de los disparos de potenciales de acción. En el trazo de abajo se muestra la derivada con respecto del tiempo de los transitorios de Ca^{2+} . Nótese la coincidencia entre la duración de la parte positiva de la derivada y la duración de los trenes de potenciales de acción obtenidos en los registros electrofisiológicos (columnas sombreadas). Utilizando este método,

la imagenología de Ca^{2+} puede ser entonces utilizada como una aproximación de la actividad eléctrica y así registrar la actividad de varias neuronas a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la parte positiva de la derivada, o la parte activa, es dibujada como puntos activos en una gráfica tipo *raster* (Figura 6; ver Metodología). En 12 de 14 neuronas identificadas como *hubs* (ver más adelante Figura 11) se registró algún tipo de interneurona (ver más adelante y Carrillo-Reid et al., 2008).

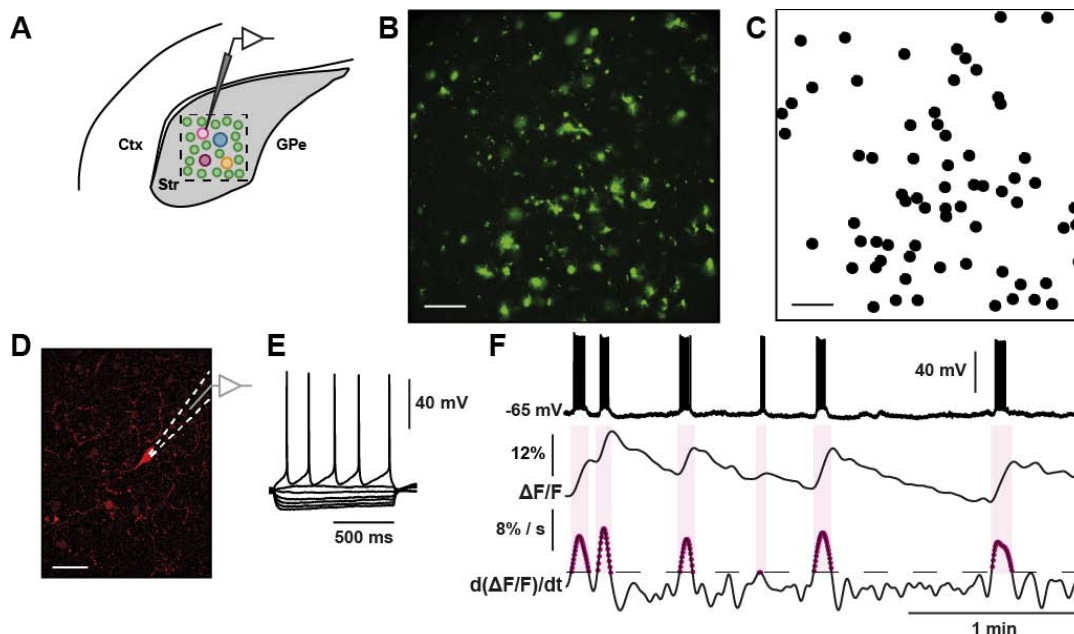


Figura 5. Esquema de un experimento: adquisición simultánea del registro de potenciales de acción (electrofisiología) y de los transitorios de calcio intracelular que estos provocan (imagenología)

A: En el esquema se muestra una rebanada horizontal que preserva las conexiones de la corteza (Ctx) y el globo pálido externo (GPe) con el estriado (Str). Con líneas punteadas se muestra el área de visualización, un cuadrado de $750 \times 750 \mu\text{m}$ dentro del estriado accesible al registro mediante imagenología. Se realizaron registros simultáneos de imagenología de calcio y registros electrofisiológicos con la técnica de *patch-clamp* en modalidad de célula entera. **B:** Imagen resumen de la actividad neuronal en un área del estriado durante un registro de 3 min. La rebanada fue incubada con fluo-4 AM y el microcircuito se activó con $8 \mu\text{M}$ NMDA (barra de escala = $100 \mu\text{m}$). **C:** Selección automática de los somas neuronales de las neuronas activas y sus coordenadas en el tejido cerebral durante el experimento. **D:** Ejemplo de una neurona registrada y llenada con biocitina intracelular (barra de escala: $50 \mu\text{m}$). **E:** Respuestas en voltaje de la neurona mostrada en D evocadas por inyecciones rectangulares de corriente intracelular (no se muestran) hiperpolarizantes y despolarizantes. El disparo celular es característico de una interneurona neurogliaforme (NGF). **F:** Registro electrofisiológico de los disparos neuronales de trenes de potenciales de acción (arriba), los incrementos transitorios de calcio intracelular que estos conllevan (en medio), y la derivada de los transitorios

de calcio con respecto del tiempo (abajo). Note que la parte positiva de la derivada se corresponde con la duración de los trenes de potenciales de acción registrados electrofisiológicamente. De esta forma, las derivadas de los transitorios de muchas neuronas pueden tomarse como la actividad electrofisiológica de las mismas. Ésta es representada como puntos en las gráficas tipo *raster* que se presentarán a continuación (ver [Figura 6](#)). Figura modificada del artículo del autor de la tesis ([Pérez-Ortega et al., 2016](#)).

Un experimento representativo se muestra en una gráfica tipo *raster* con más de 60 neuronas activas ([Figura 6A](#)). En esta gráfica los puntos de cada fila representan la actividad de cada neurona en el tiempo. Las líneas verticales separan secuencias de imágenes (o videos) de 3 min cada una (al separar las tomas de videos con intervalos de tiempo sin registrar se evita el fenómeno de blanqueamiento). Solamente se ilustran algunas secuencias de imágenes de cada experimento. El histograma en la [Figura 6B](#) muestra la actividad acumulada de cada neurona a lo largo de los videos seleccionados. Note que pocas neuronas muestran mucho más actividad que las demás. El histograma de la [Figura 6C](#) muestra la actividad sumada de las diferentes neuronas a lo largo del tiempo (ver Metodología). Nótese que algunas neuronas exhiben picos significativos de coactividad de manera espontánea (en %; regiones del trazo a color). La significancia estadística de los picos de coactividad fue estimada utilizando diferentes tipos de permutaciones de Monte Carlo (ver Metodología). Los picos de coactividad fueron extraídos como vectores neuronales columna y después fueron separados en diferentes grupos utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard entre todos los pares de vectores ([Figura 6D](#)), en conjunto con el análisis de agrupamiento jerárquico ([Figura 6E](#)). Los grupos denotados por diferentes colores ([Figura 6E](#)) constituyen grupos de neuronas que recurrentemente generan los picos de coactividad significativa ([Figura 6C](#)). Los diferentes colores indican que las neuronas pertenecen a distintos grupos de neuronas que pueden ser coactivas. El histograma en la [Figura 6C](#) muestra que la actividad del microcircuito puede ser descrita como una activación alternante de diferentes grupos de neuronas. Los diferentes grupos o ensambles neuronales pueden activarse de manera recurrente o alternante formando secuencias de actividad ([Brown et al., 2005](#); [Carrillo-Reid et al., 2015a, 2015b, 2009a; 2008](#); [Ikegaya et al., 2004](#); [Miller et al., 2014](#); [Schreiber et al., 2004](#)). Así, tomando todos los picos de

coactividad, se obtiene una secuencia temporal que muestra las transiciones entre las diferentes configuraciones de neuronas activas (eventos o estados de la red; **Figura 6F** arriba). Esta dinámica de red puede ser ilustrada como un microcircuito reverberante que puede ser construido con rutas Eulerianas (**Figura 6F** abajo). Dibujamos las rutas para las series de imágenes completas (videos) de 3 min de actividad del microcircuito. La transición inicial es denotada con color amarillo. Algunas transiciones fueron bidireccionales indicando que hay una inervación recíproca entre los ensambles. No todas las neuronas activas en un experimento participaron en los picos significativos de coactividad. La mayoría de las neuronas involucradas en un pico de coactividad fueron únicas al grupo de neuronas subyacente. Sin embargo, hubo unas pocas neuronas que fueron compartidas por diferentes grupos.

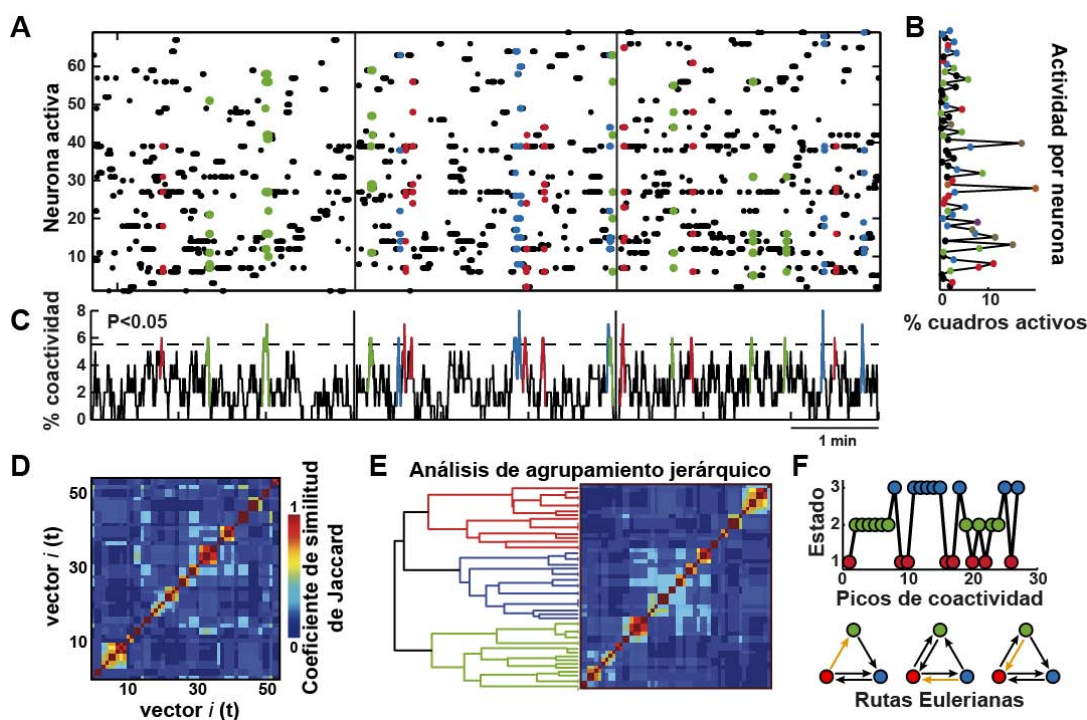


Figura 6. El microcircuito del estriado está formado por grupos de neuronas que alternan su actividad siguiendo rutas Eulerianas

A: Gráfica tipo *raster* extraída de la actividad de más de 60 neuronas registradas simultáneamente (8 μ M NMDA): las filas representan la actividad de las células individuales, las columnas son imágenes o cuadros del video convertidas a escala de minutos, los colores denotan la coactividad de grupos de neuronas en las mismas imágenes (vector neuronal columna). Las líneas verticales separan diferentes series de tiempo (720 imágenes o 3 min cada una, en este caso). **B:** La actividad sumada de

las neuronas individuales a lo largo del tiempo. Nótese que algunas neuronas fueron más activas que otras. **C:** La actividad sumada de los grupos de neuronas muestra coactivación espontánea a lo largo del tiempo, indicando eventos o estados de la red. Los picos de coactividad estadísticamente significativos están indicados con diferentes colores pues pertenecen a diferentes grupos de neuronas. **D:** El coeficiente de similitud de Jaccard de todos los vectores neuronales columna significativos como función del tiempo. **E:** El análisis de agrupamiento jerárquico (izquierda) muestra 3 diferentes grupos principales que subyacen a los estados o eventos de la red de coactividad dentro del microcircuito. Los coeficientes de Jaccard fueron ordenados de acuerdo al agrupamiento jerárquico (derecha). **F:** Arriba, picos de coactividad indicados por círculos de colores, en donde se puede apreciar la secuencia alternante de la actividad del microcircuito. Estas transiciones generan una secuencia temporal (dinámica). Abajo, la dinámica puede ser trazada como rutas Eulerianas para cada video de 3 min. Estas secuencias frecuentemente mostraron reverberaciones o rutas cerradas, así como enlaces bidireccionales. Las flechas anaranjadas indican el punto de comienzo a diferentes momentos durante la secuencia. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Aunque el NMDA fue utilizado como *excitatory drive* en este estudio y otros estudios previos (Carrillo-Reid et al., 2011, 2009a, 2008; Jáidar et al. 2010; López-Huerta et al. 2013; Vergara et al. 2003), los microcircuitos también pueden activarse con estímulos eléctricos desde la corteza o desde el tálamo así como con diferentes fármacos (Pérez-Ramírez et al., 2015). En contraste, sin excitación de ningún tipo, el microcircuito del estriado es generalmente silente y los picos de coactividad son muy escasos (Jáidar et al., 2010; Plata et al., 2013a). Como se muestra más adelante, el microcircuito del estriado en estados patológicos no es silente, sino muy activo en ausencia de excitaciones o *excitatory drives* (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013b).

4.3 Las secuencias temporales de activación entre los microcircuitos del estriado control frente a los patológicos son diferentes

El mismo método utilizado para extraer las secuencias temporales de la actividad de los microcircuitos del tejido control (Figuras 6 y 7A) fue también utilizado para extraer las secuencias temporales de actividad de las muestras patológicas en microcircuitos del estriado. En la Figura 7A-D el eje x denota tiempo para una

mejor comparación de los paneles en cada gráfica de A a D: en el panel superior, la gráfica tipo *raster* muestra la actividad neuronal; en medio, el histograma de la actividad neuronal sumada imagen por imagen, en donde los picos de coactividad significativos están en colores; abajo, la gráfica denota el tiempo de residencia en un estado de la red con círculos de colores. Las condiciones control son ilustradas en la **Figura 7A** (n = 12). Nótese que las transiciones entre los estados de la red (ilustrados en rojo, verde y azul) están distribuidos de manera similar (**Figura 7A** abajo).

Las condiciones patológicas fueron 3. La primera fue con los microcircuitos del estriado decorticado (n = 11) en los cuales la corteza fue separada del estriado en rebanadas horizontales. En esta preparación se sigue utilizando NMDA como activador de la red (**Figura 7B**; Grillner, 2006). La razón que motiva estos experimentos es que hay reportes de alteraciones de transmisión córtico-estriatal durante el parkinsonismo (Hammond et al., 2007). Por lo tanto, es una oportunidad para comparar el tejido decorticado y el tejido parkinsoniano con esta metodología, a pesar de que una preparación es aguda y otra crónica. Las transiciones entre los diferentes estados de la red en las preparaciones decorticadas fueron significativamente menos que en condiciones control ($P < 0.001$).

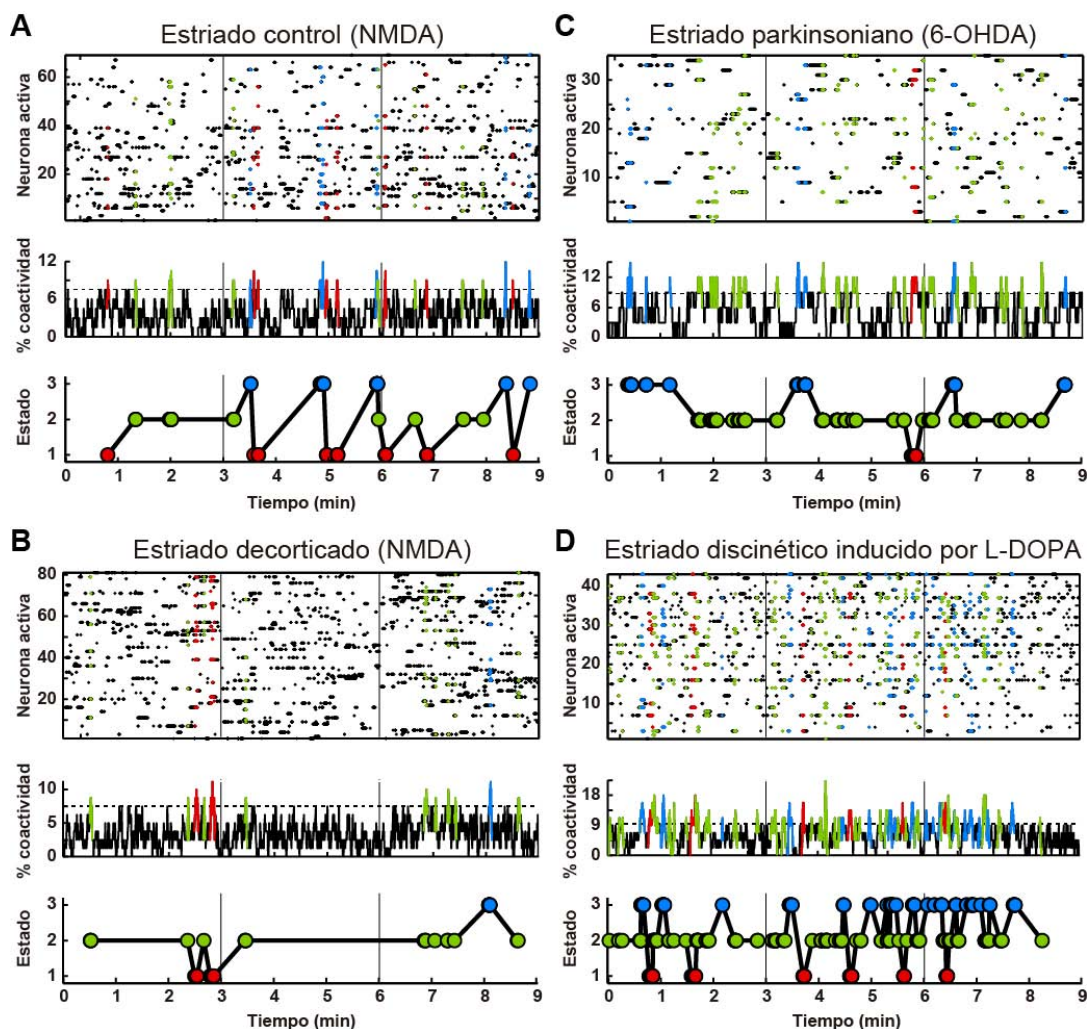


Figura 7. Secuencias temporales de actividad características en microcircuitos control y patológicos

A: Arriba, la gráfica tipo *raster* de la actividad del estriado en condiciones control ($8 \mu\text{M}$ NMDA), las filas representan la actividad de las células individuales en este y los otros *rasters*. En medio, el histograma muestra la actividad sumada de todas las neuronas disparando a lo largo del tiempo, los colores identifican los picos significativos de coactividad de diferentes grupos neuronales, en algunas imágenes del video. Los diferentes colores definen diferentes grupos neuronales de acuerdo al índice de similitud Jaccard y el agrupamiento jerárquico. Las líneas verticales separan diferentes series de tiempo (3 min cada uno). Abajo: secuencias temporales de la actividad de los estados de la red. Nótese la similitud en los tiempos de residencia de los diferentes estados de la red indicados con colores de acuerdo al histograma de en medio. **B:** Arriba, *raster* de la actividad del estriado después de la decorticación *in-vitro* ($8 \mu\text{M}$ NMDA). Note que a simple vista no se observan diferencias. En medio, el histograma muestra la actividad sumada a lo largo del tiempo. Abajo: secuencia temporal de los estados de la red. Nótese que hay menos transiciones comparadas con las condiciones control ($P < 0.001$) y más tiempo de residencia en un estado de la red (el verde). **C:** Arriba, *raster* de la actividad del estriado en una rebanada *ex-vivo* en ausencia de dopamina. La actividad espontánea fue registrada de una rebanada cerebral obtenida de una rata hemiparkinsoniana

Resultados

siguiendo el modelo de 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson. El NMDA está ausente. En medio, el histograma muestra la actividad de las neuronas sumada a lo largo del tiempo. Abajo: la secuencia temporal de la actividad de los estados de la red. Nótese que hay pocas transiciones entre estados de la red en comparación con el control ($P < 0.01$) y que el mayor tiempo de residencia pertenece a un estado dominante de la red (el verde). **D:** Arriba, *raster* de la actividad del estriado en una rebanada *ex-vivo* de una rata discinética. El modelo de discinesia inducido por L-DOPA fue provocado en animales hemiparkinsonianos inducidos por 6-OHDA unilateralmente. En medio, el histograma muestra la actividad neuronal sumada a lo largo del tiempo. Abajo, la secuencia temporal de los estados de la red. Nótese que aunque el mayor tiempo de residencia pertenece a un estado de la red (el verde), las transiciones son más frecuentes entre estados, mostrando significativamente más transiciones que en condiciones control ($P < 0.01$). Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

La segunda condición fue la de los microcircuitos del estriado parkinsoniano ($n = 7$). Estas preparaciones fueron obtenidas del estriado de ratas lesionadas ipsilateralmente en la *substantia nigra compacta* con 6-OHDA (Figura 7C; ver Metodología). Previamente se ha demostrado que la actividad espontánea de preparaciones parkinsonianas es mucho más alta que en condiciones control en ausencia de una estimulación activadora (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a, 2013b). Los microcircuitos parkinsonianos exhibieron varios picos de coactividad significativa. No obstante, las transiciones entre los estados de la red de estos microcircuitos fueron también menores que en condiciones control y hubo mayor tiempo de residencia en un estado dominante (verde, en la ilustración; $P < 0.01$); confirmando hallazgos previos (Jáidar et al., 2010). En estas preparaciones se comprobó la privación de dopamina mediante el comportamiento (conducta de giro) y técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-TH (ver Metodología). De manera interesante, no hubo diferencias significativas en el número de transiciones cuando fueron comparados los microcircuitos decorticados y parkinsonianos.

Finalmente, la tercera condición fue con los microcircuitos del estriado de animales discinéticos por el tratamiento con L-DOPA ($n = 7$) siguiendo de cerca la metodología propuesta por Cenci y colaboradores (Cenci et al. 2007; Figura 7D; ver Metodología). Estas preparaciones también fueron registradas sin impulso excitador. En estos microcircuitos hubo más transiciones entre los estados de la red que en las redes control, decorticadas o parkinsonianas ($P < 0.01$).

A simple vista parecería que las secuencias de actividad son una característica particular de los microcircuitos, éstas son muy diferentes. Para apreciar mejor las diferencias en las secuencias de actividad obtenidas experimentalmente en cada tipo de microcircuito construimos las secuencias entre los estados de red para cada video de 3 min de diferentes experimentos y observamos si había rutas de actividad reverberantes en forma de rutas Eulerianas (Figura 8A). Las rutas Eulerianas pueden ser cerradas (en otras palabras, secuencias con reverberación) o no: desde una ruta simple ($a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow a$, Figura 8A cian) o con algunos enlaces bidireccionales (Figura 8A marrón). Sin embargo, también se presentan las rutas abiertas (Figura 8A púrpura). Indicativo, según la hipótesis de Hebb y Lorente de Nó (Hebb, 1949; Lorente de Nó, 1938) que una acción, posiblemente motora, no se completa.

En microcircuitos control la mayoría de las secuencias temporales fueron cerradas. Característica esperada de los microcircuitos vistos como ensamblajes neuronales, partiendo de que este tipo de organización permite mayor estabilidad para crear memoria de trabajo en intervalos de tiempo relativamente largos (minutos). Además de mantener la estimulación de las neuronas por largo tiempo, permite tener mejor propagación de la información, entre otras características (Huyck, 2001; Tegnér et al., 2002). Se ha demostrado que las neuronas estriatales tienen corrientes iónicas intrínsecas y sinápticas necesarias para disparar por tiempos relativamente largos (Hernández-López et al., 1997; Vergara et al., 2003; Carrillo-Reid et al., 2009b) tal como se observa en los llamados *up states* (Wilson y Kawaguchi, 1996), razón por la cual la imagenología de calcio es suficiente para captar la actividad del microcircuito (Carrillo-Reid et al., 2008).

Sin embargo, nótese que la mayoría de las rutas Eulerianas de los microcircuitos patológicos del estriado (decorticado, parkinsoniano y discinético) se mantienen abiertas en la mayoría de los videos de 3 min (Figura 8C-E; se muestran secuencias representativas y las gráficas de pastel insertas denotan estadísticas de las muestras de las diferentes preparaciones; $P < 0.01$; prueba de Kruskal-Wallis preparaciones control vs. patológicas). Para concluir, cada condición patológica

es acompañada por un decremento de rutas Eulerianas cerradas o reverberantes, las cuales son consideradas fundamentales por la teoría modificada de los ensambles de tipo modular (Beggs y Plenz, 2003; Carrillo-Reid et al., 2015a, b; 2008; Eichenbaum y Davis, 1998; Hebb, 1949; Huyck, 2001; Tegnér et al., 2002).

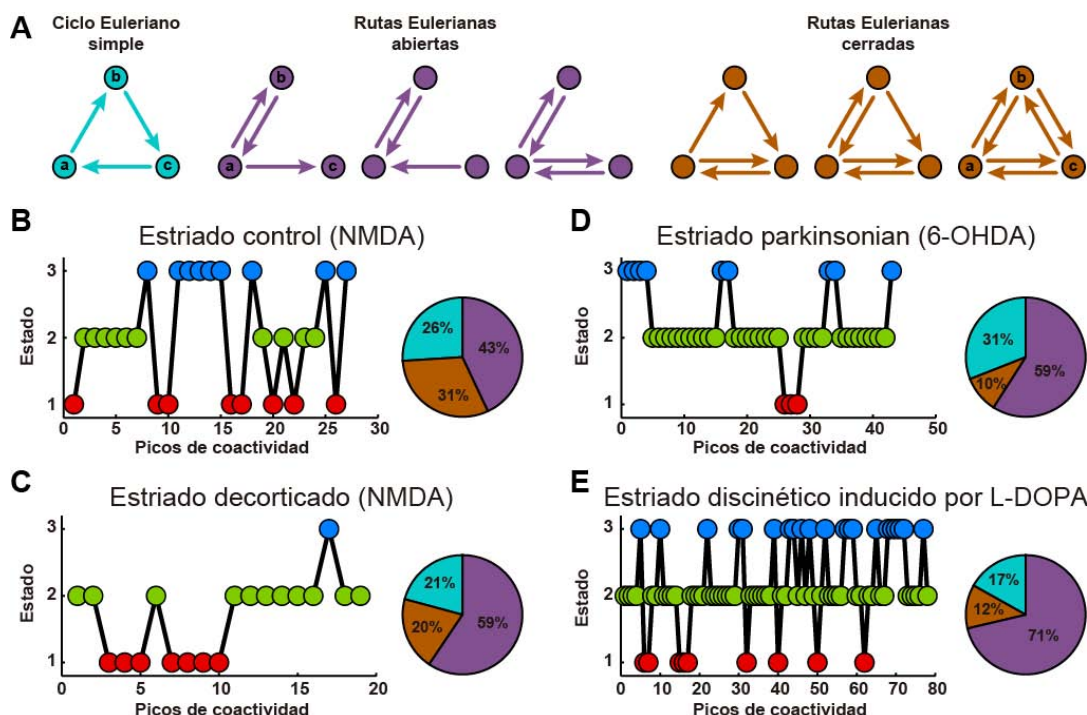


Figura 8. Secuencias temporales cerradas y abiertas de los microcircuitos del estriado.

A: Las secuencias temporales de la actividad del microcircuito pueden reverberar siguiendo rutas Eulerianas, comúnmente entre 3 estados de la red. Se pueden observar 3 diferentes clases de rutas. Del lado izquierdo, un ciclo Euleriano formado por una secuencia de estados ($a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow a$, cian). En medio (púrpura), rutas Eulerianas que no forman reverberaciones cerradas, evitando transiciones entre algún par de estados. A la derecha (marrón): rutas Eulerianas que conforman ciclos cerrados incluyendo transiciones bidireccionales. **B:** El microcircuito del estriado control alterna su actividad entre los estados de la red formando rutas Eulerianas. Más del 50% de las secuencias temporales fueron reverberaciones cerradas (marrón y cian; inserto: gráfica de pastel de las clases de transiciones). **C-E:** Las secuencias que forman rutas eulerianas abiertas en microcircuitos del estriado patológico — decorticado, parkinsoniano (6-OHDA) y discinético (LID)— fueron significativamente mayores en porcentaje que en condiciones control ($P < 0.01$; púrpura). De manera interesante, aunque hay más transiciones en los microcircuitos LID, no se refleja de manera proporcional en más secuencias cerradas, las cuales fueron una baja proporción. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Resultados

	Número de picos	Número de transiciones	Ciclos simples	Rutas cerradas	Rutas abiertas	Sin rutas
Control (NMDA)	20 ± 3	8 ± 1	27 ± 7%	33 ± 7%	40 ± 9%	0 ± 0%
Decorticado (NMDA)	7 ± 1	3 ± 0	11 ± 7%	11 ± 6%	33 ± 14%	45 ± 16%
Parkinsoniano (6-OHDA)	14 ± 5	4 ± 1	32 ± 18%	7 ± 7%	61 ± 19%	0 ± 0%
Discinético inducido por L-DOPA	59 ± 11	20 ± 3	17 ± 8%	12 ± 6%	72 ± 14%	0 ± 0%

Tabla 1. Parámetros de la dinámica del microcircuito estriatal en condiciones control y patológicas

Los valores representan la media ± el error estándar de la media de todos los experimentos analizados en este trabajo: estriado control con NMDA (n = 12), estriado decorticado con NMDA (n = 11), estriado parkinsoniano (6-OHDA, n = 7) y estriado discinético inducido por L-DOPA (n = 7). El número de picos y de transiciones en condiciones control fue significativamente diferente que en todas las condiciones patológicas (P < 0.05). El porcentaje de rutas eulerianas cerradas fue significativamente mayor (P < 0.01) en condiciones control que en todas las condiciones patológicas. Note que en el caso del estriado discinético inducido por L-DOPA aunque hay más picos de sincronía y más transiciones entre estados de la red, no significa que las secuencias de actividad conforman mayor número de rutas eulerianas cerradas.

4.4 Conectoma funcional del estriado

Utilizamos conexiones funcionales definidas como coactividad (ver Metodología) entre todas las neuronas que pertenecen a todos y cada uno de los estados de la red de un microcircuito dado y que son representados en una matriz adyacente ponderada (**Figura 9A**). Los pesos de la matriz adyacente corresponden al número de veces que se activan de manera conjunta un par de neuronas. Después, de esta matriz se extrae otra, que es la matriz adyacente binaria (**Figura 9B**) colocando un umbral a la primera para determinar las conexiones significativas (P < 0.05) basado en simulaciones de Monte Carlo (ver Metodología). Las matrices adyacentes binarias contienen las conexiones significativas y fueron utilizadas para los siguientes análisis. Las coordenadas originales de las neuronas en un microcircuito representativo control que

producen las matrices adyacentes son ilustradas en la **Figura 9C**. Cada neurona activa durante un experimento es un nodo y cada enlace entre dos neuronas representa una conexión funcional significativa. Los colores denotan los grupos de neuronas que subyacen a los picos de coactividad (**Figura 6**).

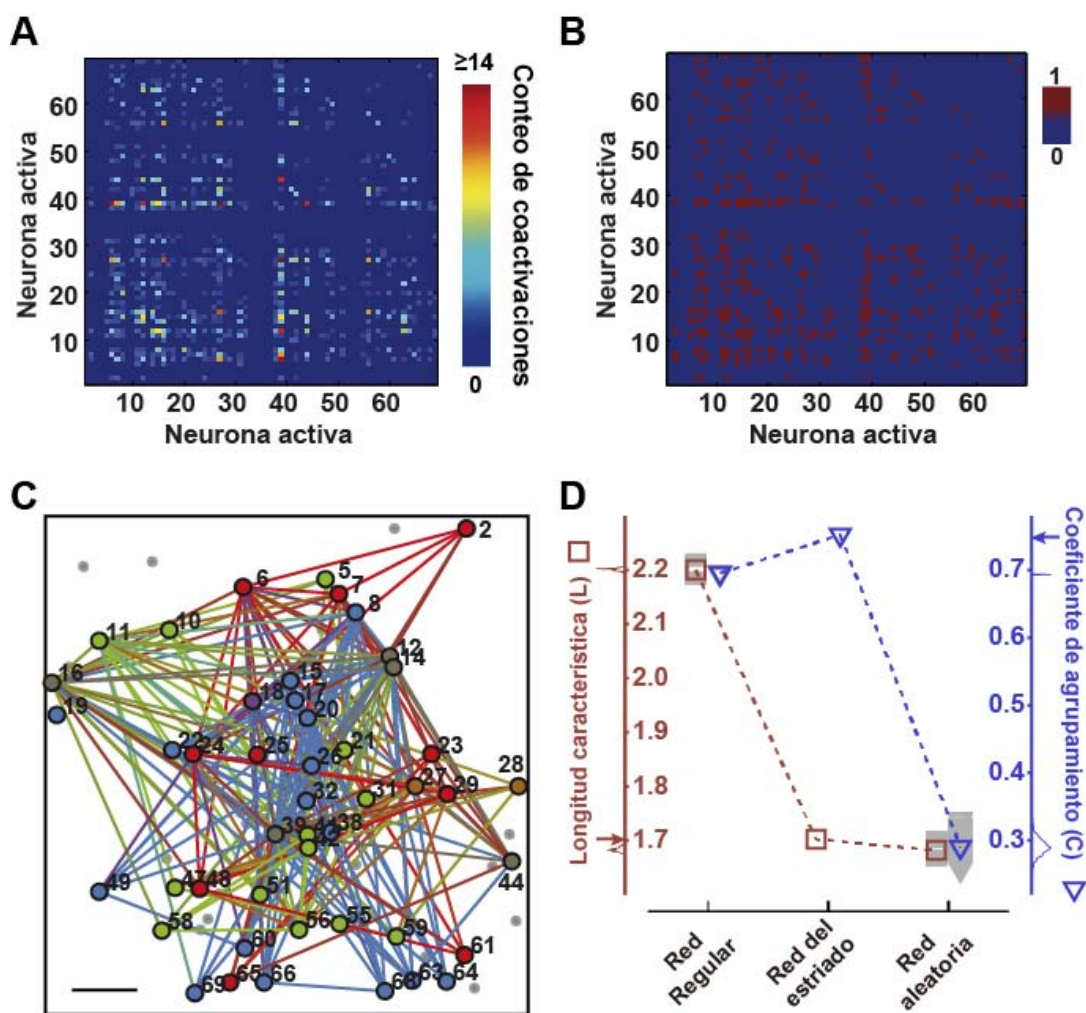


Figura 9. Propiedades de red de "mundo pequeño" del microcircuito del estriado

A: Matriz adyacente ponderada que muestra el disparo coactivo entre todos los pares de neuronas activas durante el experimento. **B:** Matriz adyacente binaria obtenida de la matriz adyacente ponderada (ver Metodología) con un umbral significativo de $P < 0.01$. Las matrices binarias fueron utilizadas para las subsecuentes mediciones de red. **C:** Red del microcircuito preservando las coordenadas espaciales originales en el tejido (barra de escala: 100 μm), cada neurona (círculos) es un nodo, los enlaces son trazados entre dos neuronas cuando éstas disparan en el mismo cuadro del video (coactividad o disparo correlacionado positivamente). Los círculos y enlaces de colores indican grupos de neuronas que subyacen el mismo estado de la red. Nótese que las neuronas de diferentes grupos están entremezcladas y que los conjuntos (*clusters*, en inglés) locales del mismo grupo están separados por distancias largas (mayores a 300 μm) que muestran que

Resultados

los contactos monosinápticos no necesariamente son reflejo en la coactividad. **D:** Comparación de los microcircuitos del estriado con redes simuladas de estructura regular y aleatoria con el mismo número de nodos y enlaces del microcircuito real. Nótese que la *longitud característica* (L = promedio del número de enlaces para conectar dos nodos cualesquiera dentro de la red) de la red del estriado (cuadrado marrón vacío) fue ligeramente mayor que la L obtenida de las redes simuladas aleatoriamente (cuadrados grises vacíos). El promedio de $n = 1000$ redes aleatorias simuladas fue $L = 1.68 \pm 0.0001$ frente a $L = 1.7$ de la red del estriado experimental control mostrada en la ilustración ($P > 0.01$, el promedio de las redes del estriado experimentales de $n=12$ fue $L = 1.8 \pm 0.05$). La L de las redes simuladas regulares fue más grande. El *coeficiente de agrupamiento* C —mide la tendencia de las neuronas a formar grupos locales o *clusters*— de la red del estriado (triángulo azul) fue significativamente mayor que las obtenidas de las redes simuladas regulares y aleatorias (triángulos grises): $C = 0.75$ para la red del estriado ilustrada frente a $C = 0.69 \pm 0.00001$ como promedio de las $n = 1000$ simulaciones de redes regulares ($P < 0.01$), aunque el agrupamiento de las redes aleatorias es mucho menor (el promedio de $n = 12$ redes del estriado experimentales fue $C = 0.71 \pm 0.02$). Estos resultados son evidencia que el microcircuito del estriado es similar a una red de mundo pequeño con una pequeña tendencia hacia una red regular. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Medimos la *longitud característica* (L) y el *coeficiente de agrupamiento* (C) de los microcircuitos del estriado como se ilustra en la **Figura 9D**. Estos valores fueron comparados con los obtenidos de dos tipos de redes simuladas (ver Metodología): una red de tipo aleatoria y otra regular. Las redes aleatorias fueron generadas con el modelo de Erdős-Rényi para cada microcircuito experimental. Las redes regulares fueron construidas basadas en un modelo de anillo entramado. Estas redes fueron simuladas para cada microcircuito experimental, en cada condición, manteniendo el número de nodos y enlaces encontrados en cada experimento. Los microcircuitos del estriado tuvieron en promedio $L = 1.8 \pm 0.05$ (promedio \pm EEM, $n = 12$), lo que significa que 2 o menos enlaces tienen que ser atravesados, en promedio, para conectar cualquier par de nodos en el microcircuito. Esta medida es más similar a la de una red aleatoria que a la de una regular (cuadrados en la **Figura 9D**, en donde se ilustra un ejemplo representativo comparado con las simulaciones de redes regulares y aleatorias con la misma cantidad de nodos y enlaces; las figuras grises debajo de los símbolos de las redes simuladas representan 1000 simulaciones de Monte Carlo). El agrupamiento de los microcircuitos del estriado control fue $C = 0.71 \pm 0.02$ (promedio \pm EEM, $n = 12$) el cual fue cercano al de una red regular. Los triángulos en la **Figura 9D** ilustran un ejemplo comparado con simulaciones de

redes regulares y aleatorias con el mismo número de nodos y enlaces; las figuras grises debajo de los símbolos de las redes simuladas representan 1000 simulaciones de Monte Carlo. Estos resultados sugieren que los microcircuitos del estriado control tienen una L similar a la de las redes aleatorias y un C similar a la de las redes regulares, esto es, una configuración de mundo pequeño con una ligera tendencia a ser red regular de acuerdo a la siguiente medición: $\omega = -0.17 \pm 0.03$ (promedio \pm EEM, $n = 12$; ver Metodología y [Telesford et al., 2011](#)).

Estos resultados nos hicieron hipotetizar que las relaciones internas del microcircuito pueden ser reveladas después de un reordenamiento espacial de los nodos de la red. Por lo tanto, ordenamos y juntamos gráficamente a los grupos de neuronas que pertenecieron a los distintos picos de coactividad en una visualización circular, preservando sus conexiones mientras se pierden sus coordenadas originales ([Figura 10](#)). De esta forma, se revelan las relaciones funcionales entre los elementos del microcircuito: claramente un grupo de neuronas altamente conectadas (grises) pueden ser el sustrato de las conexiones reciprocas entre los ensambles, que permitiría postular los mecanismos para que suceda la alternancia en su actividad ([Eichenbaum, 2002](#)).

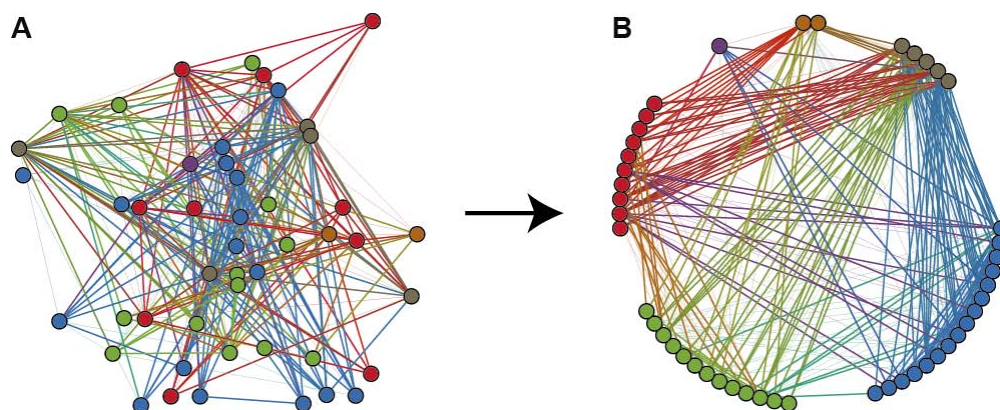


Figura 10. Conectoma funcional del microcircuito del estriado en una visualización circular

A: Conectoma funcional del microcircuito del estriado preservando las coordenadas espaciales originales en el tejido, cada neurona es un nodo de la red y los enlaces son trazados entre dos neuronas cuando disparan juntas de manera significativa. Nótese que las neuronas de diferentes grupos están entremezcladas. **B:** El mismo conectoma, pero pasando de las coordenadas originales a una visualización circular que junta los diferentes grupos de neuronas que disparan juntas y subyacen a los estados de la red (por ejemplo, rojo, azul y verde). Esta visualización separa las

Resultados

neuronas que participan en los diferentes estados de la red de las neuronas más conectadas o *hubs* (por ejemplo, gris) y permite ver que estas últimas son el sustrato de la inervación recíproca entre los distintos grupos. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Las neuronas observadas en sus coordenadas espaciales originales dentro del tejido están entremezcladas en un campo de $750 \times 750 \mu\text{m}$, confirmando estudios previos (Carrillo-Reid et al., 2011, 2009a, 2008). Las sinapsis entre las neuronas de proyección del estriado pueden ser encontradas solamente en distancias $< 100 \mu\text{m}$ (Czubayko y Plenz, 2002; Tunstall et al., 2002; Taverna et al., 2008). Por tanto, podemos inferir que las conexiones funcionales entre grupos de neuronas ocurren a través de conexiones disinápticas o polisinápticas que involucran neuronas de axón largo que abarcan el área ocupada por las neuronas del microcircuito como la visualización circular sugiere. Esto es, las neuronas altamente conectadas, o *hubs*, pueden ser hipotetizadas como interneuronas (Surmeier et al., 2011) puesto que ellas conectan a muchos y muy distantes grupos de neuronas (Tepper et al., 2004). Algunos registros individuales de célula entera confirmaron esta inferencia (Figura 11; $n = 12$ de 14 registros), pero la muestra de registros electrofisiológicos es pequeña en comparación con el número de neuronas activas observadas en los microcircuitos. Por lo tanto, actualmente se están realizando análisis similares utilizando ratones transgénicos con neuronas identificadas genéticamente mediante un reportero fluorescente (Figura 11D) y que además se pueden estimular optogenéticamente por medio del canal de rodopsina 2 (channelrhodopsin-2 o ChR2, en inglés, Figura 11E-F; Boyden et al., 2005). Esta investigación aún está en proceso y está fuera del alcance de este proyecto.

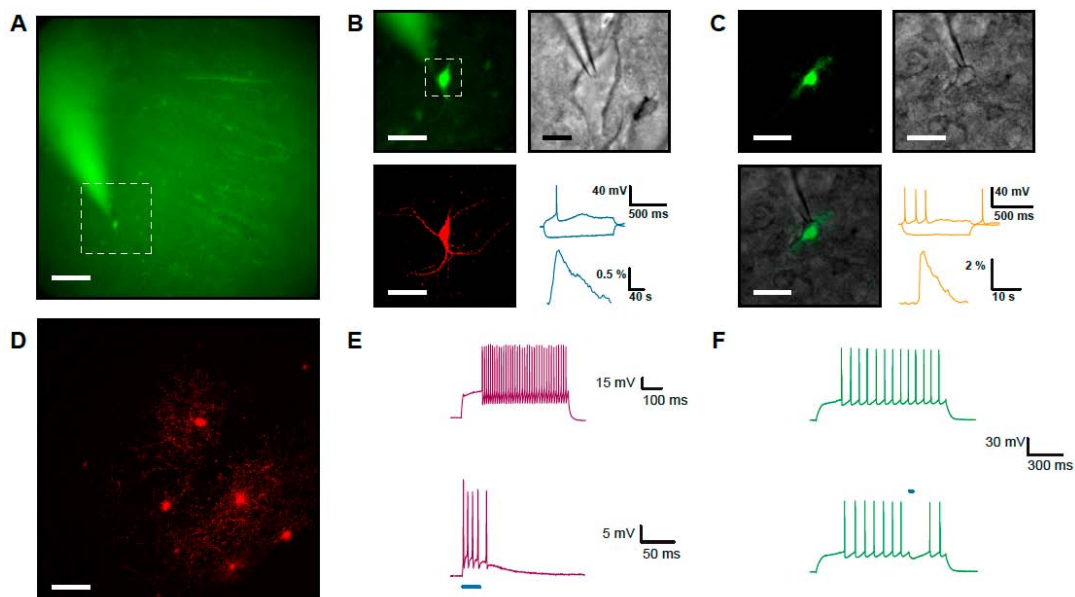


Figura 11. Registros electrofisiológicos de las neuronas *hub* identificadas mediante imagenología

A: Registro electrofisiológico de una neurona objetivo, identificada mediante imagenología de calcio. El área punteada indica el lugar de la neurona objetivo, esto es, una neurona altamente conectada o con mayor actividad (ver **Figura 6B**; barra de escala: 100 μ m). **B:** Amplificación de la neurona objetivo (arriba-izquierda, barra de escala: 50 μ m); campo claro de la amplificación de la misma célula (arriba-derecha, barra de escala: 10 μ m); la misma neurona llenada con biocitina (abajo-izquierda, barra de escala: 50 μ m); respuesta en voltaje y el transitorio de calcio (abajo-derecha). Esta neurona fue una interneurona colinérgica (ChAT). **C:** Amplificación de imagenología de calcio de otra neurona objetivo (arriba-izquierda, barra de escala: 100 μ m); imagen en campo claro de la misma neurona (arriba-derecha); fusión del campo claro y la imagenología de calcio (abajo-izquierda); respuesta en voltaje de la neurona objetivo y su transitorio de calcio (abajo-derecha). La neurona resultó ser una interneurona del tipo LTS. **D:** Células PV-Cre muestran el campo de las interneuronas PV, que además están expresando el canal ChR2 (barra de escala: 100 μ m). **E:** Respuestas en voltaje de la célula PV-Cre con estimulación eléctrica en el soma (arriba) y con un pequeño pulso de estimulación optogenética (línea azul, abajo). **F:** Respuestas en voltaje de una neurona de proyección ante la inyección de corriente intracelular (arriba). Misma respuesta pero estimulando optogenéticamente a las interneuronas PV+ (línea azul, abajo). Note la inhibición del disparo de la neurona de proyección.

4.4.1 La relevancia de las neuronas *hub* cambia en condiciones patológicas

Una de las preguntas que causan mayor curiosidad es el rol de las interneuronas en un microcircuito modular, más allá de una simple inhibición para producir un

supuesto balance entre la inhibición y la excitación. Para contestar la pregunta realizamos histogramas de conexiones funcionales, basadas en la coactividad. Nos preguntamos si esta distribución es del tipo de “cola larga” (Figura 12A en medio). Lo que observamos fue que sí lo es, y que está muy alejada de ser una distribución normal, la cual corresponde a una red aleatoria. Esto es de esperar cuando hay pocos elementos con muchas conexiones, que son precisamente los que están debajo de la cola de la distribución. Después, graficamos los valores del histograma en escala logarítmica (log-log) y nos preguntamos qué tanto se aproxima esta distribución a una función potencia de la forma: $P(k) \propto k^{-\gamma}$ (Figura 12A abajo), esto es, si se ajusta razonablemente a una línea recta. En los microcircuitos experimentales control el exponente de la función potencia fue $\gamma = 1.67 \pm 0.13$ (promedio \pm EEM, $n = 12$; $P = 0.65$) con un rango de coeficientes de correlación (Pearson al cuadrado; R^2) entre 0.8 y 0.9, sugiriendo que las neuronas *hub* tienen un rol relevante en los microcircuitos control (Barabási y Oltvai, 2004). Para confirmar estos resultados, graficamos las neuronas pertenecientes a la cola del histograma apartadas de las neuronas pertenecientes a los picos de coactividad (Figura 12A arriba; los nodos de diámetro mayor que no son azules, rojos o verdes). Se observó que las neuronas con una alta conectividad, o *hubs*, interconectan a los grupos que subyacen los picos de actividad (Figura 12A arriba), siendo el sustrato de la inervación recíproca que explica la actividad secuencial y alternante. Un hallazgo relevante es que las neuronas *hub* tienen un rol en proveer una $L \leq 2$ en los microcircuitos control, ya que una neurona de algún grupo puede conectar directamente a otra neurona de otro grupo a través de las neuronas altamente conectadas o *hubs*. Esto es, la eficiencia en la conectividad entre las neuronas de un módulo se debe gracias a las *hubs*.

Resultados

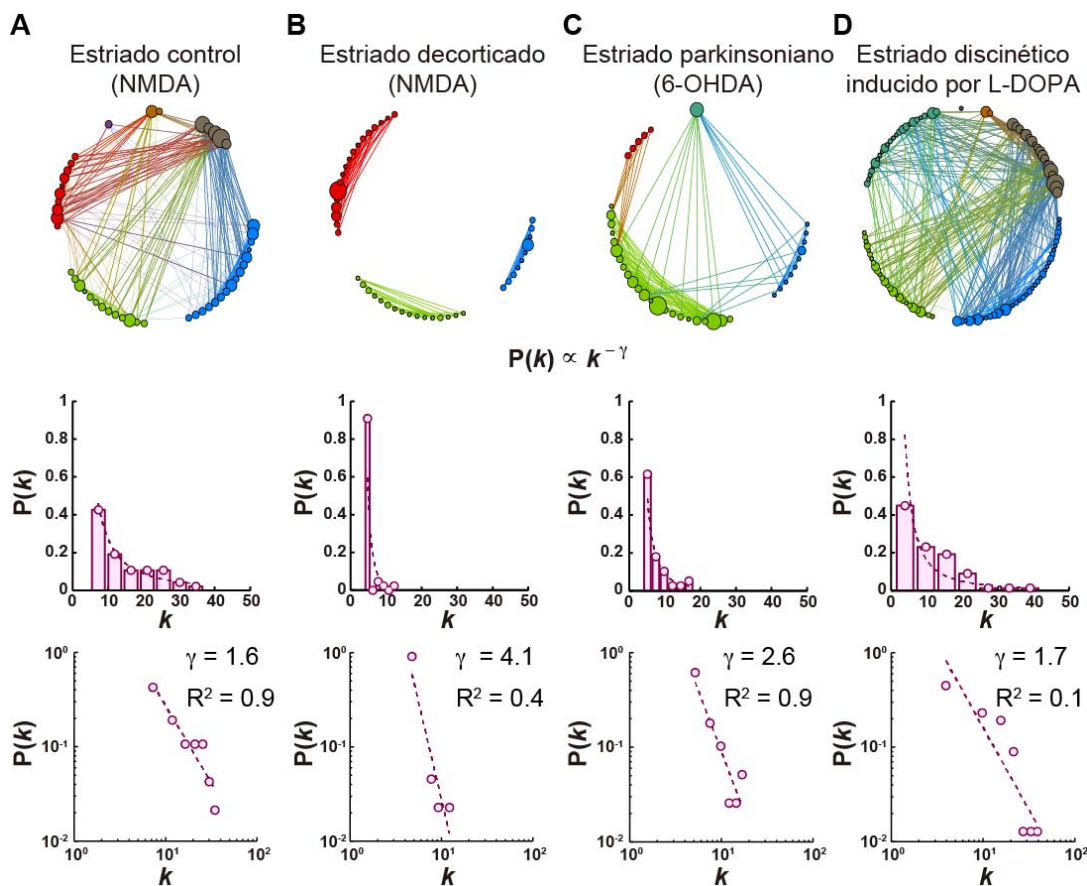


Figura 12. Fisiopatología: visualización circular del conectoma de los microcircuitos del estriado y su distribución de conexiones mostrando la relevancia de las neuronas altamente conectadas

Los microcircuitos fueron transformados de sus coordenadas originales a una visualización circular, el tamaño de los nodos es proporcional al grado (número de conexiones). **A:** Arriba, el microcircuito del estriado control representativo mostrado en la [Figura 9C](#) y reordenado circularmente para observar mejor la estructura interna de las conexiones funcionales. Nótese que la mayoría de las conexiones entre diferentes grupos de neuronas, que subyacen los estados de la red, tienen lugar a través de unas pocas neuronas altamente conectadas o *hubs*, que pueden explicar el valor pequeño de la *longitud característica* L y los disparos coactivos a pesar de las grandes distancias físicas entre los pequeños grupos de células (comunicación disináptica o polisináptica). Los microcircuitos control tuvieron un promedio de 9 ± 2 *hubs* (mean \pm SEM, $n = 12$). La distribución de grado $P(k)$ o conexiones de los mismos microcircuitos es de cola larga, lo cual confirma que son pocas las neuronas que tienen muchas conexiones (*hubs*). Abajo, la gráfica log-log de $P(k)$ se aproxima a una línea recta. Por tanto, se realizó un ajuste de la función potencia que tuvo como exponente $\gamma = 1.6$, confirmando una estructura jerárquica en la cual pocas *hubs* mantienen juntos a los demás nodos (ver arriba). **B:** Arriba, microcircuito del estriado decorticado representativo reordenado circularmente para revelar la estructura interna de las conexiones funcionales. Note que se pierden las conexiones con los nodos *hub*, sugiriendo que existe una conexión privilegiada entre las aferentes piramidales de la corteza y las neuronas *hub* que producen una L corta y la eficiencia de las interconexiones en el módulo. En medio, la distribución de grado ha

Resultados

perdido la distribución de cola larga. Abajo, la gráfica log-log de $P(k)$ difícilmente se ajusta a una línea recta. El exponente $\gamma = 4.1$ confirma que se ha perdido la actividad de las neuronas *hub* que conectan a los diferentes grupos (Barabási y Oltvai, 2004). La mayoría de los microcircuitos decorticados tuvo entre 0 y 4 *hubs* ($n = 11$; $P < 0.001$). **C:** Arriba, el microcircuito del estriado parkinsoniano reordenado circularmente revela la estructura de las conexiones funcionales internas. Note las similitudes con la preparación decorticada. La cola larga se ha perdido en gran medida. En el caso ilustrado un solo *hub* está conectado principalmente a un estado dominante de la red que contiene la mayoría de la neuronas (Jáidar et al., 2010). Los microcircuitos parkinsonianos tuvieron entre 1 y 6 *hubs* ($n = 7$; $P < 0.05$). En medio: las distribuciones de grado mostraron colas cortas. Abajo, la gráfica log-log de $P(k)$ tuvo un exponente $\gamma = 2.6$ sugiriendo que el número de *hubs* se ha reducido. **D:** Arriba, el microcircuito representativo de un animal que presentó discinesia inducida por L-DOPA reordenado circularmente. Note la reaparición de *hubs* y un incremento en las conexiones funcionales. Los microcircuitos discinéticos tienen 25 ± 4 *hubs* ($n = 7$; $P < 0.01$). En medio, la distribución de grado muestra un cola larga. Abajo, sin embargo, la gráfica log-log de $P(k)$ muestra que la distribución de grado es difícilmente una función potencia simple ($\gamma = 1.7$). Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Los microcircuitos del estriado decorticados preservan picos de actividad inducidos por NMDA (Figuras 7B y 8C). Sin embargo, cuando las conexiones se ordenan circularmente se observa que las neuronas altamente conectadas disminuyen o están ausentes (Figura 12B arriba), lo que coincide con la supresión de la cola de la distribución de conexiones funcionales (Figura 12B en medio). De hecho, la función potencia no tiene un buen ajuste en los microcircuitos decorticados (Figura 12B abajo) y el exponente promedio es de $\gamma = 3.09 \pm 0.18$ ($n = 11$; $P = 0.36$) con un rango de R^2 entre 0.5 y 0.9, sugiriendo que las neuronas *hub* pierden relevancia en la organización del microcircuito después de la decorticación (Barabási y Oltvai, 2004). Este resultado sugiere que las aferentes piramidales de la corteza sostienen una conectividad privilegiada con las neuronas *hub* del estriado, probablemente interneuronas (ver Figura 11), para organizar la actividad en los microcircuitos del estriado control. Dado que las entradas polisinápticas en las neuronas de proyección han sido caracterizadas y se sabe que contienen entradas glutamatérgicas y GABAérgicas, se infiere que la inhibición de proalimentación (*feed-forward*, en inglés) forma parte de la activación cortical sobre las células de proyección (Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013).

De la misma manera, al analizar los microcircuitos parkinsonianos obtenidos con el modelo en rata de la enfermedad de Parkinson de 6-OHDA (Figura 12C) observamos que la actividad espontánea del microcircuito está incrementada sin necesidad de un estímulo excitador. Sin embargo, hay menos transiciones entre los estados de la red. Uno de los estados se vuelve dominante y recluta a la mayoría de las neuronas activas (Figura 12C arriba). Coincidentemente la cola de la distribución de grados se pierde en gran medida (Figura 12C en medio) y los microcircuitos se quedan con menos neuronas *hub*. Como resultado, el exponente promedio de la función potencia ajustada fue de $\gamma = 2.05 \pm 0.2$ ($n = 7$; $P = 0.41$) con un rango de coeficientes de correlación entre 0.3 y 0.9, reflejando un decremento en la relevancia de las neuronas *hub*. Notablemente, las neuronas *hub* que permanecen se encuentran conectadas principalmente al grupo de neuronas que subyacen al estado dominante, en donde el microcircuito reside la mayor parte del tiempo (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a), lo que refleja de manera metafórica lo que sucede en la clínica: los pacientes se quedan trabados sin poderse mover. Estos resultados sugieren que la mayoría de las *hubs* son eliminadas funcionalmente durante la privación de dopamina y que las que permanecen se asocian o ayudan a mantener el grupo dominante de neuronas. Se ha visto que las corrientes sinápticas de algunas interneuronas se potencian de manera aberrante en el estado parkinsoniano (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009). También se conoce que durante los estados de parkinsonismo temprano la L-DOPA y otros fármacos pueden regresar el microcircuito a las condiciones control (Plata et al., 2013a, 2013b), sugiriendo que las neuronas *hub* no son eliminadas físicamente. Este es el primer reporte acerca del posible rol de las interneuronas en el estado parkinsoniano a nivel de microcircuito, ya que en estudios previos no lo han considerado (Hout et al., 2013).

Análisis similares fueron realizados en microcircuitos del estriado discinéticos inducidos por L-DOPA. La actividad del microcircuito se mantiene incrementada en la ausencia de algún estímulo excitador (Figura 12D). Al mismo tiempo se incrementó el número de transiciones entre los estados de la red (Figura 8E) lo que se refleja en un aumento en el número de conexiones funcionales (Figura

12D arriba). La distribución de conexiones funcionales regresa a ser de cola larga, reflejando una recuperación e incluso un aumento en el número de neuronas *hubs* en el microcircuito (Figura 12D en medio). Esto sugiere que un cierto número de *hubs* es necesario para que haya movimiento. Sin embargo, la distribución ya no se ajusta bien a una función potencia: $\gamma = 0.82 \pm 0.23$ ($n = 7$; $P = 0.31$) con un rango de R^2 entre 0.1 y 0.9. El incremento en el número de conexiones y transiciones refleja de manera metafórica el exceso de movimientos generados durante la discinesia. Nuevamente, ésta es la primera descripción de los cambios del microcircuito del estriado durante la discinesia inducida por L-DOPA, incluyendo un posible rol de las interneuronas (Hout et al., 2013).

En resumen, se encontraron varias diferencias en la conectividad funcional entre las neuronas de microcircuitos del estriado en condiciones control y patológicas: los microcircuitos decorticados y parkinsonianos tienen un número reducido de *hubs* mientras que los microcircuitos discinéticos exhiben un exceso de conectividad y varias *hubs*. Para una mejor aproximación del significado de estos hallazgos realizamos un análisis del agrupamiento (*clustering*, en inglés) de la red.

4.4.2 La estructura jerárquica en microcircuitos del estriado control y patológicos

La parte superior de la Figura 13A-D muestra los mismos microcircuitos de la Figura 12A-D, a excepción de que el diámetro de los nodos ahora denota su pertenencia a un grupo interconectado de neuronas (*coeficiente de agrupamiento local*), esto es, los grupos de neuronas que subyacen los estados de la red. El *coeficiente de agrupamiento local* de cada nodo es graficado en función de su número de conexiones como se muestra en medio de la Figura 13A-D, y las mismas gráficas se muestran en escala logarítmica en la parte inferior de la Figura 13A-D. En los microcircuitos del estriado control (Figura 13A), la gráfica del agrupamiento en función del grado de los nodos tiene cola larga, y puede ser aproximada a una función potencia genérica de la forma: $C(k) \propto k^{-\alpha}$ (Figura 13A

en medio). En los microcircuitos control el exponente promedio fue $\alpha = 0.66 \pm 0.02$ ($P = 0.55$) con un rango de coeficientes de correlación entre 0.86 y 0.95, sugiriendo que los microcircuitos del estriado tienen una estructura jerárquica (Barabási y Oltvai, 2004; Ravasz y Barabási, 2003). Estos resultados confirman la modularidad de los microcircuitos de escala histológica; cada módulo posee elementos con papeles diferentes dentro del microcircuito y la actividad de unos depende de los otros. Ésta es la razón por la cual en cada módulo existen diferentes tipos de neuronas con propiedades intrínsecas y sinápticas diferentes.

En contraste, en las preparaciones decorticadas el *coeficiente de agrupamiento local* en función del número de enlaces no se ajustó bien a una función potencia (Figura 13B). El exponente promedio fue $\alpha = 0.84 \pm 0.03$ ($n = 11$; $P = 0.46$) con un rango de coeficiente de correlación entre 0.46 y 0.92. Este resultado significa que la estructura jerárquica de la actividad del microcircuito depende de las conexiones córtico-estriatales que, como se ha mostrado, activa de manera preferente a las neuronas *hub*. Esto quiere decir que la conexión principal con las neuronas *hub* de núcleo a núcleo determina la activación fisiológica. Normalmente, la conectividad en el sistema nervioso se modela como si las neuronas de proyección fueran las únicas que importan entre un núcleo y otro.

El agrupamiento en función de las conexiones fue también calculado para microcircuitos privados de dopamina (Figura 13C). La aproximación de una función potencia tampoco fue buena, el exponente promedio fue $\alpha = 0.61 \pm 0.03$ ($n = 7$; $P = 0.41$) con un rango de coeficientes de correlación entre 0.6 y 0.9. Los resultados sugieren que la ausencia de suficientes *hubs* debida a la privación de dopamina causa una pérdida en la estructura jerárquica de los microcircuitos. Debido a que estos resultados son similares a los obtenidos con los microcircuitos decorticados, se sugiere que en este modelo animal de la enfermedad de Parkinson hay una “lectura” inhabilitada de las aferentes córtico-estriatales por los microcircuitos del estriado (Hammond et al., 2007), y que las conexiones con la corteza ahora solo ocurren a través de ciertas clases de neuronas *hub* (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009), quizás incrementando la probabilidad de

que el microcircuito permanezca preferentemente en ciertos estados de la red (Jáidar et al., 2010).

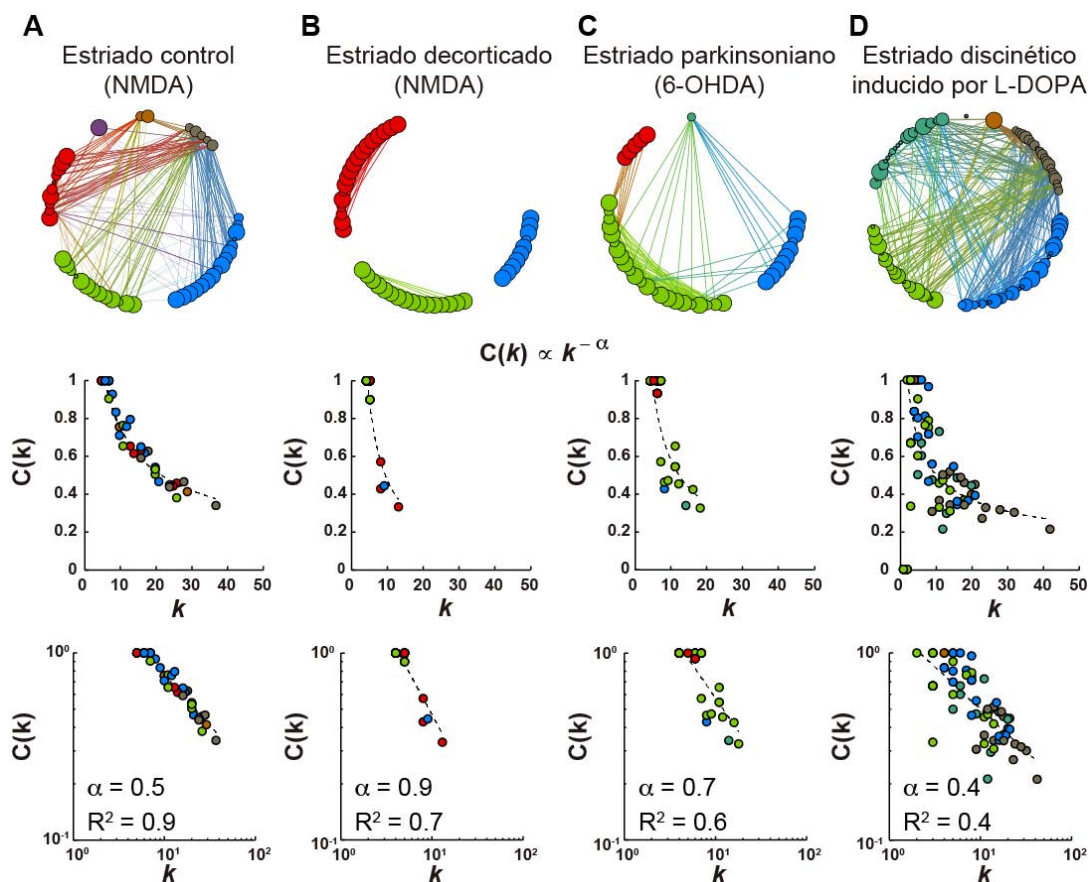


Figura 13. Fisiopatología: visualización circular del conectoma de los microcircuitos del estriado para denotar la arquitectura jerárquica medida a través del coeficiente de agrupamiento

El diámetro de los nodos indica el *coeficiente de agrupamiento local*. **A:** Arriba, como se esperaba, en las condiciones control del microcircuito del estriado las *hubs* exhiben bajo *coeficiente de agrupamiento local*, mientras que las neuronas dentro de los grupos neuronales exhiben altos *coeficiente de agrupamiento local*. En medio, el *coeficiente de agrupamiento local* en función de las conexiones $C(k)$, muestra que las neuronas de todos los grupos indicados en colores siguen la misma tendencia. Abajo: la gráfica log-log de $C(k)$ muestra la aproximación a una función potencia sugiriendo que la organización de la actividad neuronal en el microcircuito del estriado control tiene una estructura jerárquica. **B:** Arriba, el microcircuito del estriado decorticado mostró que la mayoría de las neuronas muestran coeficientes similares de agrupamiento local. En medio, la gráfica de $C(k)$ muestra que solo algunos nodos de los grupos siguen la curva. Abajo, la gráfica log-log de $C(k)$ muestra dispersión y no un buen ajuste a la función potencia, sugiriendo que la estructura jerárquica de la actividad se pierde. **C:** El microcircuito del estriado parkinsoniano presentó grupos de neuronas con alto *coeficiente de agrupamiento*. En particular, el grupo mayoritario de neuronas incluye tanto bajos como altos *coeficientes de agrupamiento local*. En medio,

la gráfica de $C(k)$ del microcircuito del estriado parkinsoniano muestra que solo los nodos del grupo mayoritario siguen la curva. Abajo, la gráfica log-log de $C(k)$ muestra dispersión y no un buen ajuste de la función potencia, sugiriendo una pérdida de jerarquía dentro del módulo. **D:** Arriba, el microcircuito del estriado discinético presenta un rango amplio de coeficientes de agrupamiento local para los nodos de todos los grupos. En medio, los microcircuitos discinéticos del estriado muestran nodos de todos los grupos dispersos en toda la gráfica $C(k)$. Abajo, la gráfica log-log de $C(k)$ muestra que los microcircuitos discinéticos exhibieron una gran dispersión y no muy buen ajuste a la función de ley potencia, sugiriendo una pérdida de la estructura jerárquica del módulo. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

Finalmente, el agrupamiento en función de los enlaces se estudió en los microcircuitos discinéticos inducidos por L-DOPA (Figura 13D). Fue muy variable, con una aproximación que falló demasiado en ajustar una función potencia de manera adecuada: $\alpha = 0.4 \pm 0.12$ ($n = 7$; $P = 0.1$) con un rango de coeficientes de correlación entre 0 y 0.7. Estos resultados indican que los microcircuitos del estriado tuvieron una sobre-activación de neuronas pero con una pérdida de la estructura jerárquica. Esta representación del microcircuito refleja el exceso de movimientos pero no coordinados que suceden en los sujetos discinéticos.

4.5 Los microcircuitos del estriado control pueden distinguirse funcionalmente de los patológicos de manera significativa

El hecho de que ni la distribución de conexiones ni el *coeficiente de agrupamiento local* en función de las conexiones pueda tener una buena aproximación a una función potencia genérica en las diversas condiciones patológicas, revela un cambio profundo en las relaciones funcionales que existen entre los elementos del microcircuito y, por ende, en su dinámica. Aunque es necesario un trabajo estadístico más detallado para encontrar el tipo de funciones que mejor describan las propiedades de los microcircuitos patológicos, la comparación de los parámetros obtenidos es muy ilustrativa. Los incrementos en el valor absoluto del exponente γ de las distribuciones de grado indican que las neuronas *hub* pierden su relevancia en la red, y esto es visto como el acortamiento de la cola de la distribución (Barabási y Oltvai, 2004). Esto sucedió tanto en los microcircuitos

Resultados

decorticados como parkinsonianos (Figura 14A; $P < 0.001$ y $P < 0.05$, respectivamente) sugiriendo que el parkinsonismo perturba la transmisión córtico-estriatal (Hammond et al., 2007), en particular, con las neuronas *hub* (Dehorter et al., 2009). En contraste, la presencia de neuronas *hub* no fue significativamente diferente entre microcircuitos del estriado discinéticos y control, sugiriendo que una colección de neuronas *hub* es necesaria para generar diversos movimientos.

La comparación del agrupamiento local también es ilustrativa: siendo mayor la jerarquía en una red cuando $\alpha = 1$ y mínima cuando $\alpha = 0$ (Ravasz y Barabási, 2003). Los microcircuitos tanto parkinsonianos como discinéticos tuvieron valores de α significativamente menores con respecto al control (Figura 14B; $P < 0.02$ y $P < 0.001$, respectivamente), también los coeficientes de correlación fueron significativamente bajos ($P < 0.05$ y $P < 0.0001$, respectivamente). Sin embargo, los microcircuitos del estriado decorticados tuvieron valores significativamente mayores que los controles, sugiriendo que los grupos siguen ahí pero que se aíslan los unos a los otros, quedan desconectados entre ellos. ($P < 0.001$).

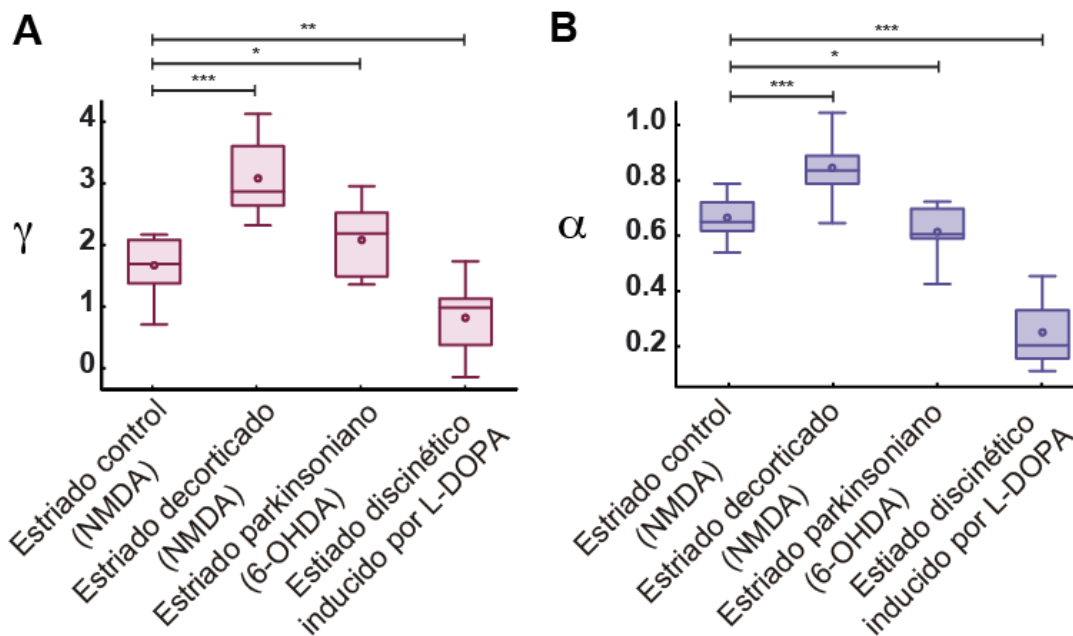


Figura 14. Comparación estadística de los parámetros de red entre los microcircuitos del estriado control y los patológicos

Resultados

Gráficas de caja que sintetizan la información de las distribuciones, los percentiles y el promedio (símbolo circular) de los parámetros de red. **A:** Comparación de los exponentes de las distribuciones de grado (γ) ajustadas a una función potencia genérica. Las *hubs* son menos relevantes cuando el valor absoluto de γ es grande. **B:** Comparación de los exponentes del *coeficiente de agrupamiento* en función de las conexiones (α) ajustadas a la función potencia. El valor de α mide qué tanta organización jerárquica existe en la red del microcircuito (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

	L	C	ω	Número de hubs	γ	R ² (γ)	α	R ² (α)
Control (NMDA)	1.8 ± 0.05	0.7 ± 0.02	-0.2 ± 0.03	10 ± 2	1.7 ± 0.13	0.81 ± 0.06	0.7 ± 0.02	0.90 ± 0.01
Decorticado (NMDA)	2.0 ± 0.13	0.9 ± 0.01	-0.6 ± 0.06	3 ± 1	3.1 ± 0.18	0.79 ± 0.04	0.8 ± 0.03	0.79 ± 0.05
Parkinsoniano (6-OHDA)	1.7 ± 0.14	0.8 ± 0.03	-0.3 ± 0.09	5 ± 2	2.1 ± 0.23	0.64 ± 0.17	0.6 ± 0.04	0.81 ± 0.05
Discinético inducido por L-DOPA	1.9 ± 0.09	0.6 ± 0.06	0.0 ± 0.07	25 ± 4	0.8 ± 0.23	0.18 ± 0.13	0.2 ± 0.05	0.40 ± 0.12

Tabla 2. Parámetros de red del microcircuito estriatal en condiciones control y patológicas

Los valores representan la media \pm el error estándar de la media de todos los experimentos analizados en este trabajo: estriado control con NMDA (n = 12), estriado decorticado con NMDA (n = 11), estriado parkinsoniano (6-OHDA, n = 7) y estriado discinético inducido por L-DOPA (n = 7). L es la longitud característica de la red, esto es, el promedio de enlaces mínimos necesarios para conectar cualquier par de nodos en la red. C es el coeficiente de agrupamiento global de la red, mide qué tanto una red se pueden agrupar en comunidades, mientras más alto sea el valor significa que mejor es el agrupamiento, el valor se encuentra entre 0 y 1. El valor de ω es una medición de mundo pequeño que se encuentra entre -1 y 1, mientras más cercano sea a 0, tiene propiedades de mundo pequeño; si se acerca a -1 tiene propiedades de red regular; y si se acerca a 1, tienen propiedades de red aleatoria. Note que el estriado decorticado y el estriado parkinsoniano tienden a formar redes más regulares mientras que el estriado discinético tiende a formar una red más aleatoria. El número de *hubs*, es el número de neuronas altamente conectadas, las cuales interconectan los diferentes grupos de neuronas. El exponente γ representa la relevancia de las neuronas *hubs*, mientras más grande sea el valor menos relevancia tienen éstas en la red. R²(γ) es el valor del coeficiente de correlación de ajuste a la función potencia con pendiente γ . El exponente α representa el agrupamiento y la jerarquía que existe en la red, mientras más pequeño sea el valor menor agrupamiento local y menor jerarquía habrá en la red. R²(α) es el valor del coeficiente de correlación de ajuste a la función potencia con pendiente α .

5 Discusión

El presente trabajo utiliza una metodología previamente descrita para visualizar la actividad de microcircuitos en el estriado (Carrillo-Reid et al., 2008). Se ha reportado previamente que la dinámica de estos microcircuitos permiten la alternancia, recurrencia y reverberancia dentro de pequeñas áreas de tejido (Carrillo-Reid et al., 2009a) en condiciones control y patológicas (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010). También se ha mostrado cómo la actividad de este microcircuito cambia debido a la acción de mensajeros neuromoduladores como los agonistas dopaminérgicos o colinérgicos (Carrillo-Reid et al., 2011, 2009a). Por lo tanto, en el presente trabajo nos enfocamos a la relación entre los elementos del microcircuito. Nos preguntamos si se podía obtener una estructura de conectividad funcional distinguible en los ensamblajes neuronales, y si se podían describir cambios específicos en condiciones patológicas.

La escala histológica es la preferida para numerosos estudios farmacológicos, inmunocitoquímicos, histopatológicos y de biología molecular. Sin embargo, la mayoría de los estudios fisiológicos se realizan a nivel celular/molecular o a nivel sistémico. Una de las razones puede ser que los métodos para registrar la actividad de decenas de células simultáneamente son relativamente recientes. Además, es necesario explorar un conjunto de parámetros que permitan comparar los microcircuitos modulares, similar al grupo de parámetros utilizado, por ejemplo, para comparar neuronas en neurofisiología celular: resistencia de entrada, constante de tiempo, tasa de disparo, etc. En el presente trabajo describimos un potencial grupo de parámetros para describir microcircuitos modulares a escala histológica: L , C , $P(k)$ y $C(k)$. Con estos parámetros obtenidos del conectoma funcional del microcircuito se muestran las relaciones entre sus elementos celulares en condiciones control y patológicas. Escogimos la coactividad dentro de un intervalo dado para definir conexiones funcionales. Sin embargo, podrían ser utilizadas otras mediciones, como diferentes tipos de correlación. Estudios preliminares, fuera del alcance de la presente Tesis nos han mostrado, que en el caso del estriado, se obtienen resultados similares. La perspectiva a futuro es la exploración de las diferentes formas posibles de medir las relaciones existentes entre los elementos de un microcircuito o módulo a escala histológica en diferentes regiones cerebrales.

5.1 Los microcircuitos del estriado generan estados de coactividad neuronal en los cuales sus neuronas están comunicadas por un grupo de neuronas *hub*

Los microcircuitos del estriado activos consisten en grupos de neuronas que disparan en conjunto produciendo picos espontáneos de coactividad que se alternan y producen secuencias temporales. Después de la visualización circular del conectoma funcional, la estructura del microcircuito revela un grupo de neuronas *hub* que comunica a los diferentes grupos de neuronas, y por lo tanto revela una estructura modular, que podría explicar la alternancia y las secuencias temporales. Pero esta estructura no es obvia cuando las neuronas son vistas en sus coordenadas espaciales originales, al menos a esta escala. Ya que los grupos de neuronas que subyacen a los picos de coactividad muestran una distribución heterogénea en el tejido (Figuras 5C y 9C): conjuntos pequeños con neuronas cercanas, de 2 a 3 neuronas, pero conectados con otros conjuntos similares a distancias que requieren conexiones disinápticas o polisinápticas (Surmeier et al., 2011).

La *longitud característica* promedio del microcircuito del estriado en condiciones control fue $L \leq 2$, indicando muchas conexiones funcionales disinápticas y una gran eficiencia en la comunicación entre sus elementos. Estas observaciones sugieren que las neuronas altamente conectadas poseen axones largos, estas serían las interneuronas que son capaces de conectar grupos de neuronas relativamente distantes (Tepper et al., 2004). De hecho, la distribución de conexiones en microcircuitos del estriado control puede ser aproximada a funciones potencia genéricas de cola larga, y los exponentes obtenidos sugieren que existe un rol relevante de las neuronas *hub* en la coordinación de la dinámica del microcircuito. Las interneuronas funcionando como *hubs* han sido corroboradas con una muestra pequeña de registros electrofisiológicos (Figura 11; Carrillo-Reid et al., 2008). Sin embargo, el camino está abierto para futuros estudios con animales transgénicos y con estos identificar qué clases de neuronas son *hubs* y bajo qué condiciones.

El valor pequeño de L es similar al encontrado en redes aleatorias simuladas con el mismo número de nodos y enlaces que los microcircuitos observados experimentalmente. Por otra parte, los grupos de neuronas que subyacen a los estados de red exhiben *coeficientes de agrupamiento* (C) similares a los de las redes regulares, sugiriendo una conectividad de tipo “mundo pequeño” (Boccaletti et al., 2006; Newman, 2003; Rubinov et al., 2011; Watts y Strogatz, 1998). Básicamente, las neuronas en los microcircuitos del estriado están distribuidas en grupos cercanos, aunque los estados de red pueden consistir en grupos que no están cerca entre ellos. Además, el *coeficiente de agrupamiento* como una función de conexiones también siguió una línea recta en escala log-log, sugiriendo que las relaciones entre los elementos del microcircuito tienen una jerarquía, o línea de comandos que involucran a las *hubs* y a los grupos altamente conectados (Barabási y Oltvai, 2004; Ravasz y Barabási, 2003) como es propuesto por la teoría cognitiva (Huyck, 2001; Newell, 1990). Estos hallazgos pueden explicar el orden y las secuencias temporales cerradas descritas en los microcircuitos del estriado control (Carrillo-Reid et al., 2008; Shepherd y Grillner, 2010).

De manera interesante, aunque la actividad en los microcircuitos del estriado decorticados puede ser provocada utilizando NMDA, como medio de activación (*excitatory drive*), se perdió la cola larga en la distribución de conexiones, lo que representa la pérdida funcional de las neuronas *hub* del microcircuito. Por lo tanto, una primera inferencia interesante a partir de estos resultados es que las aferentes córtico-estriatales tienen conexiones privilegiadas con un grupo de neuronas altamente conectadas que dirigen la dinámica de la red en microcircuitos del estriado control.

Por un largo tiempo se ha sabido que las neuronas piramidales preferentemente se conectan con grupos de interneuronas y no con las neuronas de proyección (las motoneuronas) en la médula espinal (Eichenbaum, 2002). Por tanto, los presentes hallazgos sugieren un principio de organización general que puede explicar cómo los mismos ensamblajes neuronales pueden ser usados en diferentes comportamientos dependiendo de las neuronas *hub* que son activadas mediante comandos corticales, esto es, las neuronas *hub* podrían trabajar como los

operadores y las neuronas de proyección como los **operandos**, que potencialmente inducen diferentes estructuras de conectividad funcional dependiendo del contexto (Huyck, 2001; Newell, 1990).

Esta hipótesis, apoyada por nuestros resultados, implica que las aferentes corticales organizan a grupos de interneuronas para inducir la actividad modular de una forma similar a cómo sucede en los procesos cognitivos primitivos descritos, por ejemplo, en la teoría cognitiva de Allen Newel (Huyck, 2001; Newell, 1990). Si las neuronas *hub* fueran los operadores y las neuronas de proyección los operandos (ver Figura 15), el procesamiento de alternancia, las secuencias y las reverberaciones podrían subyacer a acciones o rutinas motoras mínimas (Cui et al., 2013). Pero cada microcircuito podría asociarse con otros para producir otras acciones, dependiendo del grupo de operadores activado por la corteza. Esto ayuda a explicar por qué las transiciones entre los estados de la red disminuyen después de la decorticación (Figuras 7B y 8C), pues se cambia la dinámica de estos microcircuitos y las relaciones funcionales entre sus neuronas (Surmeier et al., 2011).

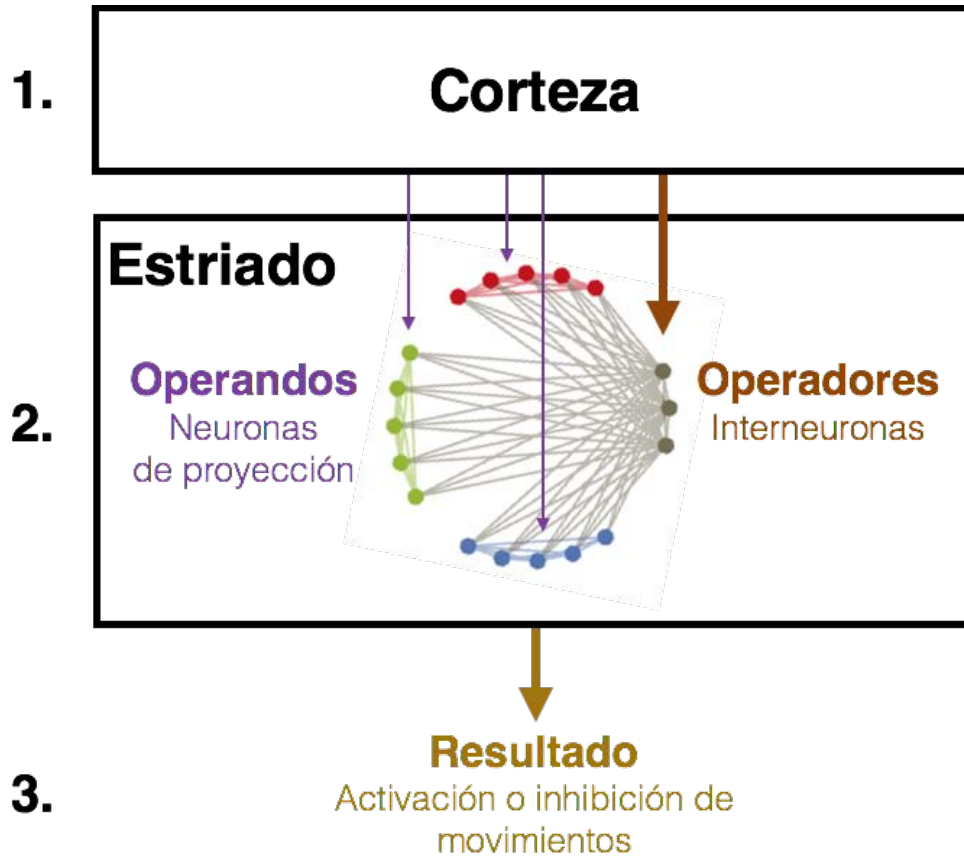


Figura 15. Teoría cognitiva: modelo de la activación de los ensamblajes neuronales en el microcircuito neuronal del estriado

De acuerdo a Huyck (2001) cualquier modelo a nivel de microcircuito neuronal debe cumplir al menos con los siguientes procesos primitivos: tener una entrada, seleccionar operadores, aplicar los operadores sobre los operandos, almacenar los resultados y generar una salida. En el estriado, la hipótesis es: la entrada proveniente de la corteza selecciona los operadores, y éstos aplican una operación sobre los operandos, después se almacenan los resultados y se genera una salida del estriado que es el resultado de toda la operación: activación e inhibición de músculos agonistas y antagonistas en secuencia.

5.2 En los microcircuitos patológicos se afectan las conexiones entre los ensamblajes de las neuronas de proyección y las neuronas *hub*

Los microcircuitos del estriado parkinsonianos muestran distribuciones de conexión de cola corta, revelando que solo unas pocas neuronas permanecen después de la privación de dopamina. La ausencia de la mayoría de las *hubs* se asemeja a la preparación decorticada sugiriendo una alteración en la

comunicación córtico-estriatal (Hammond et al., 2007; Stephens et al., 2005). Previamente, hemos mostrado que el parkinsonismo causa que el microcircuito quede enganchado en un estado dominante de la red que recurre excesivamente, previniendo transiciones entre los estados del microcircuito (Jáidar et al., 2010). Ahora, mostramos que ciertas neuronas *hub* que permanecen después de la privación de dopamina y que están principalmente conectadas al estado dominante de la red, reforzando la hipótesis de que la “lectura” cortical está dañada durante la enfermedad de Parkinson (Hammond et al., 2007; Stephens et al., 2005). Estos resultados refuerzan la idea del rol de las interneuronas en el microcircuito, pues experimentos previos han revelado que algunas interneuronas del estriado adquieren propiedades tales como potenciales sinápticos gigantes, potenciados de manera aberrante, así como el incremento en la probabilidad de liberación después de la ausencia de dopamina (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009). Más aún, un decremento en el número de operadores podría directamente relacionarse con la disminución de funciones motoras (operaciones) que un paciente es capaz de realizar (Huyck, 2001). Si esto se confirma, las clases de neuronas que se encuentran conectadas al estado dominante parkinsoniano pueden ser aquéllas con propiedades de resonancia que hacen al microcircuito propenso a acoplarse a ritmos y patrones de disparo acinéticos (Beatty et al., 2015; Hammond et al., 2007; Hutchinson et al., 2004; Stein y Bar-Gad, 2013). De hecho, las transiciones entre los estados de red se vuelven infrecuentes en los microcircuitos parkinsonianos. Debido a que la enfermedad de Parkinson es multifactorial, porque involucra múltiples problemas celulares (Kalia y Lang, 2015), es importante observar las correlaciones a escala de microcircuito ya que pueden abarcar muchas y diferentes disfunciones celulares, sinápticas y moleculares. Esto es, la función del microcircuito puede ser evaluada cada vez que se cambie una propiedad molecular, sináptica o celular, y así saber el rol específico de esa propiedad. Por lo tanto, esta aproximación sugiere una vía para explicar los desórdenes del microcircuito desde el nivel celular. Por otra parte, el decremento en las transiciones del microcircuito está evidentemente correlacionado con un incremento de rigidez y dificultad para realizar acciones o rutinas motoras en los sujetos parkinsonianos.

Finalmente, los microcircuitos del estriado de animales con discinesia inducida por L-DOPA revelan un incremento en la conectividad y en el número de transiciones que se correlaciona con el aumento en los ritmos gamma o procinéticos que ha sido descrito en los sujetos discinéticos (Carrillo-Reid et al., 2009a; Dupre et al., 2015). Estas observaciones demuestran que las neuronas *hub* no se pierden durante los estados parkinsonianos, dado que un grupo de estas neuronas se vuelve otra vez importante para el microcircuito. Esto es, las neuronas altamente conectadas no fueron físicamente removidas por la ausencia de dopamina sino que solamente fueron perdidas funcionalmente durante el estado parkinsoniano. De hecho, su reaparición sugiere que éstas son necesarias en el microcircuito para generar movimientos. No obstante, el análisis de la distribución de grupos indica que los microcircuitos discinéticos sufren una pérdida en su arquitectura jerárquica. Este hallazgo puede ser visto como un correlato del exceso de movimientos desordenados en sujetos discinéticos. La diferencia entre el microcircuito parkinsoniano y el discinético es muy clara, y podemos estar seguros que los microcircuitos discinéticos se pueden preservar *in vitro*. Es importante recalcar que durante los experimentos fisiológicos celulares esto ha sido una materia de debate (Hout et al., 2013).

En resumen, el análisis a nivel de microcircuito del estriado patológico muestra estructuras de microcircuito muy diferentes a aquéllas encontradas en el estriado control (Figura 16). Se puede dilucidar que lo que pasa a este nivel es un correlato directo —prácticamente metafórico— de lo que sucede con los sujetos enfermos.

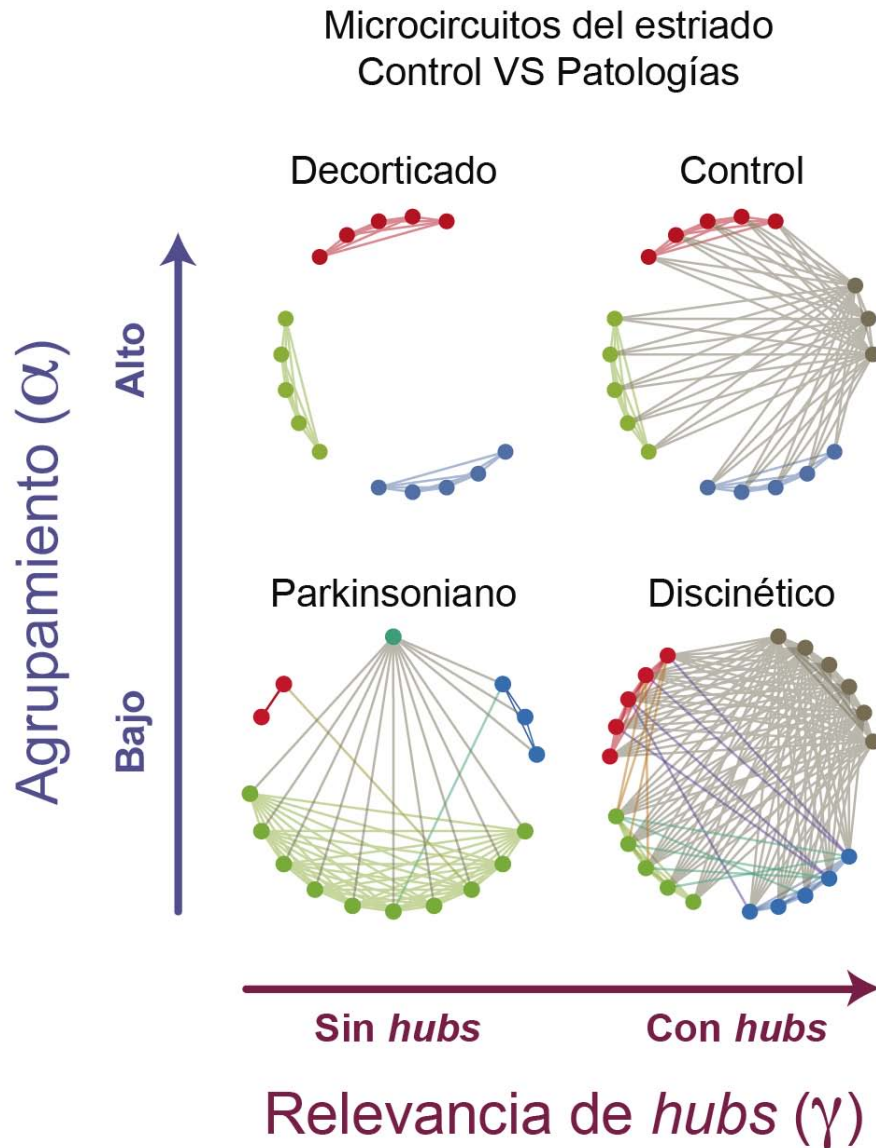


Figura 16. Panorama de los conectomas funcionales de microcircuitos del estriado en base a sus propiedades estructurales

El parámetro γ nos indica la relevancia que tienen las neuronas *hub* en la conectividad, se puede observar que el microcircuito decorticado y el parkinsoniano no poseen *hubs*, o son poco relevantes, mientras que en el microcircuito control y discinético es importante la participación de las neuronas *hub*. Por otra parte, el parámetro α nos indica qué tanta jerarquía existe en la red, partiendo del agrupamiento local. En el caso de los microcircuitos parkinsonianos y discinéticos se ha perdido la estructura de agrupamiento local y jerárquica, mientras que el microcircuito decorticado tiene grupos similares a los del microcircuito control, solo que desconectados entre sí. Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016). Figura modificada del artículo del autor de la tesis (Pérez-Ortega et al., 2016).

5.3 Transición al nuevo paradigma a nivel de microcircuito

Con multi-registros *in vivo*, mientras el animal realiza una tarea, se ha visto que las neuronas que participan en la tarea se distribuyen en un amplio volumen del estriado pero solo son el 10-20% de las neuronas activas, estando entremezcladas con otras (Bakhurin et al., 2016). Como hemos visto, la red del microcircuito modular es de escala libre. Se infiere entonces que subconjuntos de ese volumen estriatal que contienen a las neuronas que participan, mostrarán las mismas características. Esto es, la escala histológica podría darnos una ventana para saber qué sucede en volúmenes de tejido mayores. Esto resulta importante ahora que ya se cuenta con las técnicas para registrar muchas neuronas *in vivo* en pequeñas áreas.

El presente trabajo trata de superar la visión de registrar neuronas únicas, pares de neuronas o sinapsis predeterminadas para de ahí extrapolar lo que sucede a nivel sistémico. Si sabemos que la actividad registrada célula tras célula, por el fisiólogo sistémico en cada área del cerebro, es la salida determinada por una estructura modular, no sería necesario esperar propiedades intrínsecas diferentes en las neuronas de proyección de cada área (como realmente sucede; Arias-García et al., 2016, en preparación). Sin embargo, las diversas salidas encontradas son el producto de microcircuitos propios de cada área, no de neuronas o sinapsis determinadas, algo que se asume con el actual paradigma celular/molecular. Otro ejemplo común con el paradigma actual es encontrar que ciertas propiedades sistémicas se alteran por cambiar la función de un receptor. Si ese receptor se encuentra de manera ubicua, se estaría alterando la dinámica de los microcircuitos de muchas áreas, y se habrían que repetir los registros en muchas áreas para saber cómo quedaron las relaciones entre ellas por el cambio de ese receptor. Si se encuentra que los módulos de diversas áreas tienen dinámicas diferentes aunque usen ese mismo receptor, ya no es posible asociar lo que hace ese receptor en un área para explicar, por ejemplo, una patología. En otras palabras, hay demasiadas implicaciones al hacer un salto entre el nivel molecular/celular al nivel sistémico, y por lo tanto, es necesario comenzar a hacer la transición al paradigma a nivel de microcircuito.

Conclusiones

Conclusiones

En trabajos anteriores en el laboratorio de José Bargas se han realizado descripciones de la actividad del microcircuito estriatal, en donde muestran que grupos de neuronas se activan de manera conjunta, se alternan y son recurrentes, formando ciclos de actividad reverberante. Demuestran que esta actividad es debida a las sinapsis que forman el microcircuito, ya que si se activan o bloquean las sinapsis rápidas la actividad cambia. También han descrito el tejido estriatal parkinsoniano, en donde muestran principalmente que existe más actividad que en condiciones control y que presenta coactividad un grupo dominante que incluye la mayoría de las neuronas activas en el tejido. A diferencia de estos estudios previos, en este trabajo se utiliza teoría de redes para proponer parámetros cuantificables y comparables entre diferentes condiciones patológicas. Incluimos, aparte del modelo parkinsoniano, un modelo discinético, siendo este trabajo el primer análisis de discinesia a nivel de microcircuito. Además, incluimos el análisis de una condición de estriado decorticado para comprobar si la actividad es parecida al tejido parkinsoniano, debido a reportes de deficiencia de conexiones sinápticas entre la corteza y el estriado en la enfermedad de Parkinson. Este trabajo también extiende a los anteriores, ya que se identifica el rol de las neuronas que participan en la dinámica del microcircuito, principalmente entre neuronas de proyección e interneuronas putativas, y los cambios en la participación de éstas que se producen en las diferentes patologías.

Por lo tanto, en este trabajo proponemos analizar con teoría de redes dos parámetros y dos funciones que permiten comparar pequeños microcircuitos a escala histológica. Esta metodología podría ser utilizada para explorar diversos estados patológicos y el rol de las diferentes clases de neuronas en los microcircuitos o módulos cerebrales. Con esta metodología encontramos varios resultados originales:

1. Los microcircuitos del estriado tienen un conjunto de neuronas altamente conectadas, o *hubs*, que comunican diferentes grupos neuronales de manera muy eficiente con un parámetro $L \leq 2$. Estos grupos subyacen los picos de coactividad que se alternan y reverberan, produciendo transiciones entre

Conclusiones

grupos de neuronas. La estructura del microcircuito del estriado que encontramos fue modular, con propiedades de mundo pequeño, escala libre y jerárquico, como muchas otras redes encontradas en la naturaleza.

2. Los comandos corticales utilizan a las neuronas *hub* para organizar la dinámica del microcircuito y debido a las distancias entre los grupos neuronales que conforman los ensambles deducimos que las neuronas *hub* deben ser neuronas de axón largo, y por lo tanto, interneuronas.
3. Después de la decorticación o durante el modelo de 6-OHDA de la enfermedad de Parkinson las *hubs* funcionales disminuyen de manera significativa. Como consecuencia, las transiciones y la dinámica del microcircuito disminuye también, reflejando metafóricamente la hipocinesia, y apoyando a los estudios que muestran que la comunicación córtico-estriatal es disfuncional en la enfermedad de Parkinson.
4. En el tejido de animales en donde se indujo discinesia mediante L-DOPA, ocurrió lo opuesto: el número de *hubs*, las transiciones y la actividad del microcircuito incrementó. Aunque con una falta de coordinación vista como ausencia de jerarquía. De manera sorprendente, el propio tejido, analizado a escala histológica, otra vez, fue reminiscente de los signos de la enfermedad en los sujetos discinéticos.
5. Finalmente, mostramos que la fisiopatología del tejido nervioso puede realizarse a escala histológica por medio de la imagenología de calcio y el análisis de redes.

Bibliografía

Bibliografía

- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375. doi:10.1016/0166-2236(89)90074-X
- Bakhurin, K.I., Mac, V., Golshani, P., Masmanidis S.C. 2016. Temporal correlations among functionally specialized striatal neural ensembles in reward conditioned mice. *J Neurophysiol.* doi:10.1152/jn.01037.2015
- Barabási, A.-L., Albert, R., 1999. Emergence of scaling in random networks. *Science.* 286, 509–512. doi:10.1126/science.286.5439.509
- Barabási, A.-L., Oltvai, Z.N., 2004. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* 5, 101–113. doi:10.1038/nrg1272
- Bargiotas, P., Konitsiotis, S., 2013. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: emerging treatments. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 9, 1605–17. doi:10.2147/NDT.S36693
- Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M.A., Lopez-Huerta, V.G., Galarraga, E., Bargas, J., 2015. Diverse short-term dynamics of inhibitory synapses converging on striatal projection neurons: differential changes in a rodent model of parkinson's disease. *Neural Plast.* 2015, 1–13. doi:10.1155/2015/573543
- Beatty, J.A., Song, S.C., Wilson, C.J., 2015. Cell-type-specific resonances shape the responses of striatal neurons to synaptic input. *J. Neurophysiol.* 113, 688–700. doi:10.1152/jn.00827.2014
- Beggs, J.M., Plenz, D., 2003. Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J. Neurosci.* 23, 11167–11177.
- Biswal, B.B., Mennes, M., Zuo, X.-N., Gohel, S., Kelly, C., Smith, S.M., Beckmann, C.F., Adelstein, J.S., Buckner, R.L., Colcombe, S., Dogonowski, A.-M., Ernst, M., Fair, D., Hampson, M., Hoptman, M.J., Hyde, J.S., Kiviniemi, V.J., Kotter, R., Li, S.-J., Lin, C.-P., Lowe, M.J., Mackay, C., Madden, D.J., Madsen, K.H., Margulies, D.S., Mayberg, H.S., McMahon, K., Monk, C.S., Mostofsky, S.H., Nagel, B.J., Pekar, J.J., Peltier, S.J., Petersen, S.E., Riedl, V., Rombouts, S.A.R.B., Rypma, B., Schlaggar, B.L., Schmidt, S., Seidler, R.D., Siegle, G.J., Sorg, C., Teng, G.-J., Veijola, J., Villringer, A., Walter, M., Wang, L., Weng, X.-C., Whitfield-Gabrieli, S., Williamson, P., Windischberger, C., Zang, Y.-F., Zhang, H.-Y., Castellanos, F.X., Milham, M.P., 2010. Toward discovery science of human brain function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4734–4739. doi:10.1073/pnas.0911855107
- Boccaletti, S., Latora, V., Moreno, Y., Chávez, M., Hwang, D., 2006. Complex networks: structure and dynamics. *Phys. Rep.* 424, 175–308. doi:10.1016/j.physrep.2005.10.009
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–8. doi:10.1038/nn1525
- Brown, S.L., Joseph, J., Stopfer, M., 2005. Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nat. Neurosci.* 8, 1568–1576. doi:10.1038/nn1559
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2008. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450. doi:10.1152/jn.01131.2007
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Bargas, J., 2009a. Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737–749. doi:10.1152/jn.90975.2008

Bibliografía

- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., Bargas, J., 2009b. Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682–690. doi:10.1152/jn.00134.2009
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* 31, 14972–14983. doi:10.1523/jneurosci.3226-11.2011
- Carrillo-Reid, L., Miller, J.-E.K., Hamm, J.P., Jackson, J., Yuste, R., 2015a. Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *J. Neurosci.* 35, 8813–8828. doi:10.1523/jneurosci.5214-14.2015
- Carrillo-Reid, L., Lopez-Huerta, V.G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S., Arbuthnott, G.W., 2015b. Cell assembly signatures defined by short-term synaptic plasticity in cortical networks. *Int. J. Neural Syst.* 25, 1550026. doi:10.1142/S0129065715500264
- Cenci, M.A., Lee, C.S., Björklund, A., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2694–2706.
- Cenci, M.A., Lundblad, M., 2007. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 9, Unit 9.25. doi:10.1002/0471142301.ns0925s41
- Cotzias, G.C., Papavasiliou, P.S., Gellene, R., 1969. Modification of Parkinsonism — Chronic Treatment with L-Dopa. *N. Engl. J. Med.* 280, 337–345. doi:10.1056/NEJM196902132800701
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. doi:10.1038/nature11846
- Czubayko, U., Plenz, D., 2002. Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15764–9. doi:10.1073/pnas.242428599
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909. doi:10.1016/S0896-6273(03)00568-3
- Dehorter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., Hammond, C., 2009. Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776–7787. doi:10.1523/jneurosci.1527-09.2009
- Dunnett, S.B., Björklund, A., Stenevi, U., Iversen, S.D., 1981. Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 229, 209–217. doi:10.1016/0006-8993(81)90759-9
- Dupre, K.B., Cruz, A. V, McCoy, A.J., Delaville, C., Gerber, C.M., Eyring, K.W., Walters, J.R., 2015. Effects of L-dopa priming on cortical high beta and high gamma oscillatory activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 86, 1–15. doi:10.1016/j.nbd.2015.11.009.
- Edelman, G.M., 1993. Neural Darwinism: Selection and reentrant signaling in higher brain function. *Neuron* 10, 115–125. doi:10.1016/0896-6273(93)90304-A
- Eichenbaum H. 2002. *The Cognitive Neuroscience of Memory*. Oxford University Press. Boston.
- Eichenbaum, H.B., Davis, J.L., 1998. Biological neural networks, in: Eichenbaum, H.B., Davis, J.L. (Eds.), *Neuronal Ensembles: Strategies for Recording and Decoding*. Wiley-Liss, New York, pp. 1–15.

Bibliografía

- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Tapia, D., Bargas, J., Galarraga, E., 2010. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 4, 15. doi:10.3389/fnsys.2010.00015
- Frégnac, Y., 2003. Hebbian synaptic plasticity. In: Arbib, M. (Ed.), *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. The MIT Press, Cambridge, MA, pp. 515–522.
- Girvan, M., Newman, M.E.J., 2002. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7821–7826. doi:10.1073/pnas.122653799
- Gerfen, C.R., Bolam, J.P., 2010. The neuroanatomical organization of the basal ganglia, in: Steiner, H., Tseng, K.Y. (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Elsevier, London, pp. 3–28.
- Graybiel, A.M., 1995. Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 733–741. doi:10.1016/0959-4388(95)80100-6
- Grillner, S., 1985. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228, 143–149. doi:10.1126/science.3975635
- Grillner, S., 2006. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52, 751–766. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.008
- Grillner, S., 2014. Megascience efforts and the brain. *Neuron* 82, 1209–11. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.045
- Hagmann, P., 2005. From diffusion MRI to brain connectomics. EPFL. doi:10.5075/epfl-thesis-3230
- Hammond, C., Bergman, H., Brown, P., 2007. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30, 357–64. doi:10.1016/j.tins.2007.05.004
- Harris, K.D., 2005. Neural signatures of cell assembly organization. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 399–407. doi:10.1038/nrn1669
- Hatsopoulos, N.G., Ojakangas, C.L., Donoghue, J.P., Maynard, E.M., 1998. Detection and identification of ensemble codes in motor cortex, in: Eichenbaum, H.B., Davis, J.L. (Eds.), *Neuronal Ensembles: Strategies for Recording and Decoding*. Wiley-Liss, New York, pp. 161–175.
- Hebb, D.O., 1949. *The organization of behavior*. Wiley, New York.
- Hernandez-Lopez, S., Bargas, J., Surmeier, D.J., Reyes, A., Galarraga, E., 1997. D1 Receptor Activation Enhances Evoked Discharge in Neostriatal Medium Spiny Neurons by Modulating an L-Type Ca²⁺ Conductance. *J. Neurosci.* 17, 3334–3342.
- Hudson, J.L., Van Horne, C.G., Strömberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A., 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 626, 167–174. doi:10.1016/0006-8993(93)90576-9
- Huot, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2013. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* 65, 171–222. doi:10.1124/pr.111.005678
- Hutchison, W.D., Dostrovsky, J.O., Walters, J.R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J., Brown, P., 2004. Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J. Neurosci.* 24, 9240–9243. doi:10.1523/jneurosci.3366-04.2004

Bibliografía

- Huyck, C.R., 2001. Cell assemblies as an intermediate level model of cognition, in: Wermter, S., Austin, J., Willshaw, D. (Eds.), *Emergent Neural Computational Architectures Based on Neuroscience*. Springer, Berlin, pp. 383–397. doi:10.1007/3-540-44597-8
- Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J.M., 2011. A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *J. Neurosci.* 31, 16757–16769. doi:10.1523/jneurosci.2628-11.2011
- Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D., Yuste, R., 2004. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304, 559–564. doi:10.1126/science.1093173
- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., Yuste, R., 2005. Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* 52, 132–138. doi:10.1016/j.neures.2005.02.004
- Ilardi, S.S., Feldman, D., 2001. The cognitive neuroscience paradigm: a unifying metatheoretical framework for the science and practice of clinical psychology. *J. Clin. Psychol.* 57, 1067–88.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A., 2010. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326–11336. doi:10.1523/jneurosci.1380-10.2010
- Jain, A., Dubes, R., 1988. *Algorithms for clustering data*. Prentice Hall, New Jersey.
- Jenner, P., 2008. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 665–677. doi:10.1038/nrn2471
- Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., Emson, P.C., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18, 527–535. doi:10.1016/0166-2236(95)98374-8
- Kravitz, A. V., Freeze, B.S., Parker, P.R.L., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., Kreitzer, A.C., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626. doi:10.1038/nature09159
- Kumar, A., Rotter, S., Aertsen, A., 2010. Spiking activity propagation in neuronal networks: reconciling different perspectives on neural coding. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 615–27. doi:10.1038/nrn2886
- Lansner, A., 2009. Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations. *Trends Neurosci.* 32, 178–186. doi:10.1016/j.tins.2008.12.002
- López-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordelisio, T., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2013. The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 33, 4964–4975. doi:10.1523/jneurosci.4721-12.2013
- Lorente de Nó, R., 1938. Analysis of the activity of the chains of internuncial neurons. *J Neurophysiol* 1, 207–244.
- Marković, D., Gros, C., 2014. Power laws and self-organized criticality in theory and nature. *Phys. Rep.* 536, 41–74. doi:10.1016/j.physrep.2013.11.002
- Markram, H., Muller, E., Ramaswamy, S., Reimann, M.W., Abdellah, M., Sanchez, C.A., Ailamaki, A., Alonso-Nanclares, L., Antille, N., Arsever, S., Kahou, G.A.A., Berger, T.K., Bilgili, A., Buncic, N., Chalimourda, A., Chindemi, G., Courcol, J.-D., Delalondre, F., Delattre, V., Druckmann, S., Dumusc, R., Dynes, J., Eilemann, S., Gal, E., Gevaert, M.E., Ghobril, J.-P., Gidon, A., Graham, J.W., Gupta, A., Haenel, V., Hay, E., Heinis, T.,

Bibliografía

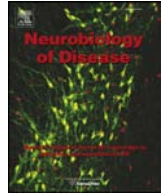
- Hernando, J.B., Hines, M., Kanari, L., Keller, D., Kenyon, J., Khazen, G., Kim, Y., King, J.G., Kisvarday, Z., Kumbhar, P., Lasserre, S., Le Bé, J.-V., Magalhães, B.R.C., Merchán-Pérez, A., Meystre, J., Morrice, B.R., Muller, J., Muñoz-Céspedes, A., Muralidhar, S., Muthurasa, K., Nachbaur, D., Newton, T.H., Nolte, M., Ovcharenko, A., Palacios, J., Pastor, L., Perin, R., Ranjan, R., Riachi, I., Rodríguez, J.-R., Riquelme, J.L., Rössert, C., Sfyraakis, K., Shi, Y., Shillcock, J.C., Silberberg, G., Silva, R., Tauheed, F., Telefont, M., Toledo-Rodriguez, M., Tränkler, T., Van Geit, W., Díaz, J.V., Walker, R., Wang, Y., Zaninetta, S.M., DeFelipe, J., Hill, S.L., Segev, I., Schürmann, F., 2015. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell* 163, 456–492. doi:10.1016/j.cell.2015.09.029
- Miller, J.-E.K., Ayzenshtat, I., Carrillo-Reid, L., Yuste, R., 2014. Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4053–E4061. doi:10.1073/pnas.1406077111
- Mountcastle, V.B., 1998. *Perceptual neuroscience: the cerebral cortex*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Newel, A., 1990. *Unified Theories of Cognition*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Newman, M.E.J., 2003. The structure and function of complex networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256.
- Obeso, J.A., Olanow, C.W., Nutt, J.G., 2000. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23, S2–S7. doi:10.1016/S1471-1931(00)00031-8
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Stamelou, M., Bhatia, K.P., Burn, D.J., 2014. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet* 384, 523–531. doi:10.1016/S0140-6736(13)62418-6
- Pérez-Ramírez, M.B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., Galarraga, E., 2015. KV7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plast.* 2015, 472676. doi:10.1155/2015/472676
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., Hernández-Cruz, A., Bargas, J., 2016. Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* 91, 347–361. doi:10.1016/j.nbd.2016.02.023
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Hernández-Martínez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2013a. Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 78. doi:10.3389/fnsys.2013.00078
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., Bargas, J., 2013b. Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of Parkinsonian tissue in vitro. *Biomed Res. Int.* 2013b, 519184. doi:10.1155/2013/519184
- Prieto, G.A., Perez-Burgos, A., Palomero-Rivero, M., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., Bargas, J., 2011. Upregulation of D2-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D3 receptors acting on CaV2.1 channels via PIP2 depletion. *J. Neurophysiol.* 105, 2260–2274. doi:10.1152/jn.00516.2010
- Ravasz, E., Barabási, A.-L., 2003. Hierarchical organization in complex networks. *Phys. Rev. E* 67, 026112. doi:10.1103/PhysRevE.67.026112
- Reyes, A.D., 2003. Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nat. Neurosci.* 6, 593–599. doi:10.1038/nn1056
- Romo, R., Brody, C.D., Hernández, A., Lemus, L., 1999. Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* 399, 470–3. doi:10.1038/20939

Bibliografia

- Rubinov, M., Sporns, O., Thivierge, J.-P., Breakspear, M., 2011. Neurobiologically realistic determinants of self-organized criticality in networks of spiking neurons. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002038. doi:10.1371/journal.pcbi.1002038
- Sadovsky, A.J., MacLean, J.N., 2013. Scaling of topologically similar functional modules defines mouse primary auditory and somatosensory microcircuitry. *J. Neurosci.* 33, 14048–14060. doi:10.1523/jneurosci.1977-13.2013
- Sanchez-Vives, M. V, McCormick, D.A., 2000. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.* 3, 1027–1034. doi:10.1038/79848
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.-A., Hervé, D., Greengard, P., Fisone, G., 2007. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 27, 6995–7005. doi:10.1523/jneurosci.0852-07.2007
- Schreiber, S., Fellous, J.-M., Tiesinga, P., Sejnowski, T.J., 2004. Influence of ionic conductances on spike timing reliability of cortical neurons for suprathreshold rhythmic inputs. *J. Neurophysiol.* 91, 194–205. doi:10.1152/jn.00556.2003
- Schwartz, R., Huston, J., 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50, 275–331. doi:10.1016/S0301-0082(96)00040-8
- Shepherd, G.M., Grillner, S., 2010. *Handbook of brain microcircuits*. Oxford University Press, Oxford.
- Simola, N., Morelli, M., Carta, A.R., 2007. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 11, 151–167. doi:10.1007/BF03033565
- Sporns, O., Tononi, G., Kötter, R., 2005. The human connectome: A structural description of the human brain. *PLoS Comput. Biol.* 1, 0245–0251. doi:10.1371/journal.pcbi.0010042
- Sporns, O., 2011. *Networks of the brain*. MIT Press.
- Sporns, O., Bullmore, E.T., 2014. From connections to function: the mouse brain connectome atlas. *Cell* 157, 773–775. doi:10.1016/j.cell.2014.04.023
- Sporns, O., Betzel, R.F., 2016. Modular Brain Networks. *Annu. Rev. Psychol.* 67, 613–640. doi:10.1146/annurev-psych-122414-033634
- Stein, E., Bar-Gad, I., 2013. β -oscillations in the cortico-basal ganglia loop during parkinsonism. *Exp. Neurol.* 245, 52–59. doi:10.1016/j.expneurol.2012.07.023
- Stephens, B., Mueller, A.J., Shering, A.F., Hood, S.H., Taggart, P., Arbuthnott, G.W., Bell, J.E., Kilford, L., Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Ingham, C.A., 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132, 741–754. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.007
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L., Vargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.08.051
- Tauste Campo, A., Martínez-García, M., Náchter, V., Luna, R., Romo, R., Deco, G., 2015. Task-driven intra- and interarea communications in primate cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 4761–4766. doi:10.1073/pnas.1503937112
- Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J., 2008. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 28, 5504–5512. doi:10.1523/jneurosci.5493-07.2008

Bibliografía

- Tegnér, J., Compte, A., Wang, X.-J., 2002. The dynamical stability of reverberatory neural circuits. *Biol. Cybern.* 87, 471–481. doi:10.1007/s00422-002-0363-9
- Telesford, Q.K., Joyce, K.E., Hayasaka, S., Burdette, J.H., Laurienti, P.J., 2011. The ubiquity of small-world networks. *Brain Connect.* 1, 367–375. doi:10.1089/brain.2011.0038
- Tepper, J.M., Bolam, J.P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 685–692. doi:10.1016/j.conb.2004.10.003
- Tepper, J.M., Koós, T., Wilson, C.J., 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662–669. doi:10.1016/j.tins.2004.08.007
- Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koós, T., Ibáñez-Sandoval, O., 2010. Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Front. Neuroanat.* 4, 150. doi:10.3389/fnana.2010.00150
- Tunstall, M.J., Oorschot, D.E., Kean, A., Wickens, J.R., 2002. Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J Neurophysiol* 88, 1263–1269.
- Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7
- Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, A., Guzman, J.N., Galarraga, E., Surmeier, D.J., Bargas, J., 2003. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553, 169–182. doi:10.1113/jphysiol.2003.050799
- Vizcarra-Chacón, B.J., Arias-García, M.A., Pérez-Ramírez, M.B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R., Bargas, J., Galarraga, E., 2013. Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci.* 14, 60. doi:10.1186/1471-2202-14-60
- Watts, D.J., Strogatz, S.H., 1998. Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* 393, 440–2. doi:10.1038/30918
- Wilson, C., Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 2397–2410.
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., Cenci, M.A., 2002. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson’s disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.* 10, 165–186. doi:10.1006/nbdi.2002.0499
- Zuo, X.-N., Ehmke, R., Mennes, M., Imperati, D., Castellanos, F.X., Sporns, O., Milham, M.P., 2012. Network centrality in the human functional connectome. *Cereb. Cortex* 22, 1862–1875. doi:10.1093/cercor/bhr269



Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits



Jesús Pérez-Ortega^a, Mariana Duhne^a, Esther Lara-González^a, Victor Plata^a, Deisy Gasca^b, Elvira Galarraga^a, Arturo Hernández-Cruz^a, José Bargas^{a,*}

^a División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, DF, Mexico

^b Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2016
Revised 19 February 2016
Accepted 24 February 2016
Available online 4 March 2016

Keywords:

Striatal microcircuit
Network properties
Parkinsonian circuit
Dyskinetic circuit
L-DOPA

ABSTRACT

A challenge in neuroscience is to integrate the cellular and system levels. For instance, we still do not know how a few dozen neurons organize their activity and relations in a microcircuit or module of histological scale. By using network theory and Ca^{2+} imaging with single-neuron resolution we studied the way in which striatal microcircuits of dozens of cells orchestrate their activity. In addition, control and diseased striatal tissues were compared in rats. In the control tissue, functional connectomics revealed small-world, scale-free and hierarchical network properties. These properties were lost during pathological conditions in ways that could be quantitatively analyzed. Decorticated striatal circuits disclosed that corticostriatal interactions depend on privileged connections with a set of highly connected neurons or “hubs”. In the 6-OHDA model of Parkinson's disease there was a decrease in hubs number; but the ones that remained were linked to dominant network states. L-DOPA induced dyskinesia provoked a loss in the hierarchical structure of the circuit. All these conditions conferred distinct temporal sequences to circuit activity. Temporal sequences appeared as particular signatures of disease process thus bringing the possibility of a future quantitative pathophysiology at a histological scale.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The mammalian nervous system is a modular structure. Each module is composed by neuronal ensembles conformed by projection neurons and interneurons that may activate nearly together in a given time interval (Eichenbaum and Davis, 1998; Kumar et al., 2010; Mountcastle, 1998; Shepherd and Grillner, 2010). Modeling and biological experiments have shown that such ensembles exhibit recurrence and alternation, generating a flow of activity that generates spatiotemporal sequences and reverberations that correlate with behavior (Carrillo-Reid et al., 2008, 2015a; Cui et al., 2013; Harris, 2005; Hebb, 1949; Huyck, 2001; Lansner, 2009; Markram et al., 2015; Miller et al., 2014). Similar activity has been observed in Central Pattern Generators (CPGs; Grillner, 2006, 1985), striatal, cortical and hippocampal circuits, among others (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2015a; Frégnac, 2003; Hatsopoulos et al., 1998; Lansner, 2009; Markram et al., 2015). Neuronal ensembles are thought to be the product of long term synaptic plasticity, the consequent modifications of synaptic weights that promote sets of coactive neurons and the appearance of preferred pathways for the flow of activity between

ensembles thus forming dedicated circuits (Harris, 2005; Hebb, 1949; Huyck, 2001; Frégnac, 2003; Lansner, 2009). It has been demonstrated that ensemble properties such as alternation and reverberation may occur within small tissue areas (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2015a). Ensembles recurrence or alternation may depend on the kind of short term dynamics that synaptic connections possess (Carrillo-Reid et al., 2015b) and on the reciprocal innervation between ensembles (Eichenbaum, 2002).

It has been described that different neural codes (temporal, population, and ensemble codes) may work in parallel to maintain robust signal transfer between circuits (Beatty et al., 2015; Eichenbaum and Davis, 1998; Hatsopoulos et al., 1998; Kumar et al., 2010; Reyes, 2003; Tauste Campo et al., 2015). Ca^{2+} imaging reveals neuron pools or clusters dispersed within small tissue areas of hundreds of microns that activate nearly together (coactivity) configuring brief network events or states (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a). Because physical synapses between striatal projection neurons most probably occur at distances $\leq 100 \mu\text{m}$ (Czubayko and Plenz, 2002; Taverna et al., 2008; Tunstall et al., 2002), it is inferred that coactive states may be formed by di- or polysynaptic functional connections. Here, we asked whether coactivity between neuron sets allows the description of the relations between neurons within the microcircuit. A related question is whether these relations form a discernable structure of connections. We show that a meaningful structure can be disclosed and that some inner rules that orchestrate the

* Corresponding author at: División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito ext. s/n, México City, 04510, Mexico.

E-mail address: jbargas@fci.unam.mx (J. Bargas).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

activity of neuronal ensembles could be revealed. We also show that in pathological microcircuits these relations are disrupted (Jáidar et al., 2010).

Networks may exhibit skewed or long-tailed distributions of their functional connections suggesting free-scale and hierarchical organizations (Marković and Gros, 2014). These properties have been observed in brain tissue while recording field potentials with multiple electrodes (Beggs and Plenz, 2003) and at larger circuitry scales (Sadovsky and MacLean, 2013; Sporns and Bullmore, 2014). However, whether these properties are present in small modules of histological scale taking individual neurons as the nodes of the network linked by functional connections, as defined by coactivity, is not known. To answer this question, it is important to observe how small the modules can be, even if immersed in larger circuits (Huyck, 2001; Bakhurin et al., 2016). The present experiments show that a minimal modular organization is present in the striatal microcircuit. Interestingly, this organization changes under pathological conditions (Jáidar et al., 2010), bringing the possibility of investigating functional pathophysiology.

2. Materials and methods

2.1. Slice preparation

Horizontal corticostriatal slices (300 μm thick) were obtained from postnatal day (PD) 20–36 Wistar rats as previously described (Carrillo-Reid et al., 2008). In some preparations the striatum was separated from the cortex (decorticated). Other preparations were obtained from pathological models as described below. Animal experimentation followed the technical specifications for the production, care and use of laboratory animals in Mexico (NOM-062-ZOO-1999) and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978), including minimizing the number of animals to achieve statistical significance and the avoidance of animal suffering. The animals were anesthetized with ketamine/xylazine. Their brains were quickly removed and placed into ice cold (4 °C) saline containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO₃, 1.0 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 11 glucose, 300 mOsm/L, pH = 7.4, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. Slices remained in this saline at room temperature (21–25 °C) for at least 1 h before the experiments. This saline favors the appearance of up and down voltage transitions *in vitro* (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Vergara et al., 2003; Wilson and Kawaguchi, 1996). Nonetheless, similar circuit activity, lasting several minutes, could be evoked by cortical or thalamic stimulation or with different drugs (not shown, but see Pérez-Ramírez et al., 2015).

2.2. Ca²⁺ imaging

Slices were incubated in the dark for 20–25 min at room temperature in the presence of 1–10 μM fluo 4-AM (Molecular Probes®, Life technologies, Mexico City, MX) in 0.1% dimethylsulphoxide in the same saline. The diffusion of the fluorophore reached a plane about 150 μm below the slice surface. A microscope equipped with a 20 \times , 0.95 NA water-immersion objective (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA) let us observe an image field was 750 \times 750 μm in size. To observe spontaneous changes in fluorescence, light pulses at 488 nm (15–50 ms exposure) were delivered to the preparation with a Lambda LS illuminator (Sutter instruments, Petaluma, CA) connected to the microscope via fiber optics. Brief image sequences or movies (~180 s per epoch) were acquired with custom-made software designed in the LabView environment (programmed by the first author of this article) at time intervals of 5–10 min during \geq 60 min with a cooled digital camera (CoolSnap K4, Photometrics, Tucson, AZ) and 100–250 ms/image frame. At the end of the experiment we used a high potassium solution to count how many neurons contained the fluorophore within the image field. Commonly, neurons that participated in a given experiment were between 10–20% of all loaded neurons: between 30 and 100

neurons in most experiments. Microcircuit activity in the control striatum was turned on by using 5–8 μM NMDA as the excitatory drive defined as afferents, transmitter agonists or modulators that drive the network into producing sequential activity (Grillner, 2006). Activity was seen as spontaneous neuronal Ca²⁺ transients. The arrangement of neurons underlying a network state is configured by the neurons active in the same frames. Not all neurons belonging to the same pool were active in every occasion. Sometimes voltage responses were obtained simultaneously using whole cell electrophysiology (Carrillo-Reid et al., 2008), however, description of electrophysiological recordings is not the main purpose of the present work.

2.3. Electrophysiology

The same software was used for Ca²⁺ imaging and simultaneous electrophysiological recordings in the dorsal striatum. A Cornerstone amplifier (DBVC-700A, Dagan, Minneapolis, MN) was used to perform whole cell recordings. Signals were filtered at 3 kHz and digitized at 6 kHz with a BNC-2110 board (National Instruments, Austin, TX). Patch pipettes (3–6 M Ω) were filled with (in mM): 115 KH₂PO₄, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 0.2 Na₂ATP, 0.2 Na₃GTP, biocytin 0.5%, and 25 μM fluo-4 salt.

2.4. Image analysis

The same software was used for initial image processing: a *summary image* (Fig. 1) consistent in the standard deviation of the whole image was obtained from each brief movie and kept for reference. Coordinates of active neurons during the experiment were automatically detected using pattern recognition on the *summary image* by using a circular template of variable size (10–30 μm , diameter). The intracellular Ca²⁺ signals (transients) from each region of interest were collected over time. Photo bleaching, noise and airy disks phenomena were corrected by subtracting the raw signals from the regions around the regions of interest (4 times the region of interest diameter) frame by frame. Thereafter, we applied a moving average low-pass filter.

2.5. Detection of neuronal activity

Previously we have reported that electrophysiologically recorded neuronal firing, corresponding to up-states with repetitive action potentials, match the increments on the intracellular Ca²⁺ signals (Carrillo-Reid et al., 2008). Specifically, the positive time derivative of the Ca²⁺ signal is similar to the duration of firing trains in most neurons (Carrillo-Reid et al., 2009a). Therefore, a row binary vector $1 \times F$ was obtained where F is the number of frames. Frames with active neurons as seen with the time derivative were taken as a proxy of the electrical activity of those neurons over time. Only event amplitudes 2.5 times above the standard deviation of the noise were considered for analysis. This procedure was done for each neuron. Then, a binary matrix $N \times F$, where N in the y-axis represents the number of active neurons was built (raster plot). The x-axis in the matrix represents time (number of image frames in a movie translated to seconds). In this matrix, 1 represents an active and 0 represents an inactive neuron in a given frame and row. Sum along frames corresponds to the column activity vector $N \times 1$ representing the coactivity of several neurons in the same frame. All recordings were examined manually to remove artifacts and minutes long or slowly rising Ca²⁺ transients, which are likely due to the activity of glial cells (Ikegaya et al., 2005).

2.6. Defining network states

After obtaining the experimental matrix of neuronal activity along time, off-line analyses were performed with a custom-made program written in MatLab (Math-Works) by the first author of this paper. This program included some algorithms from the Brain Connectivity Toolbox

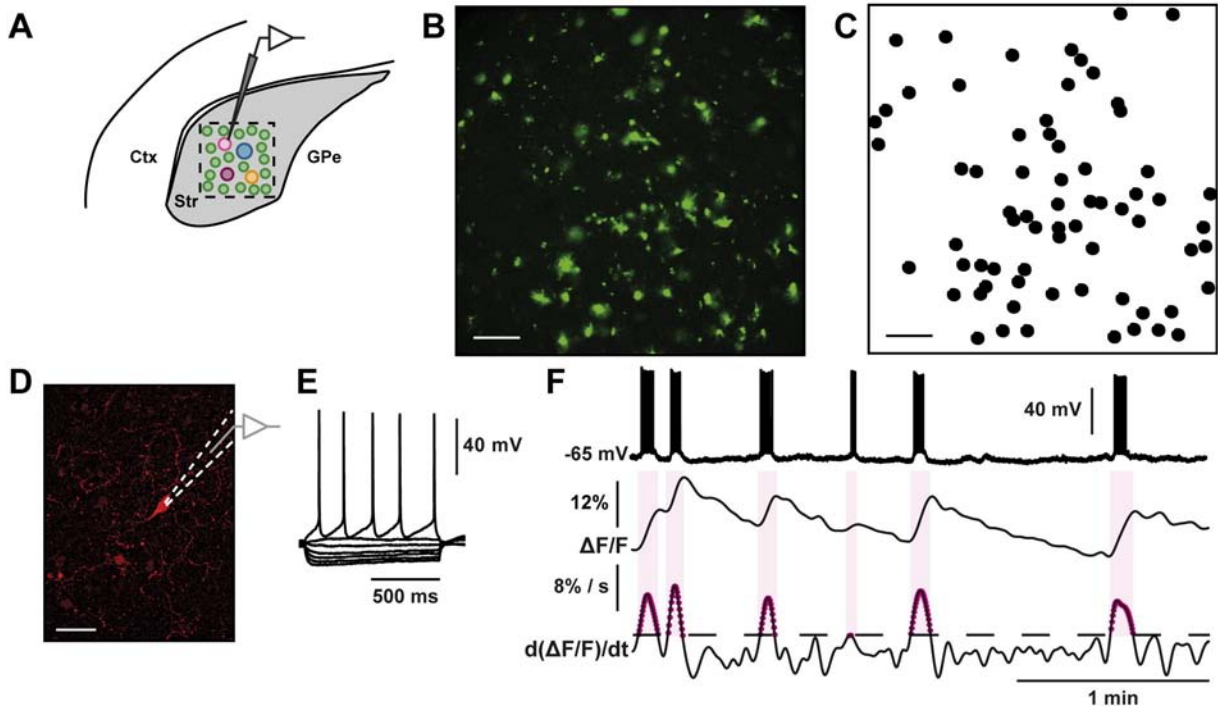


Fig. 1. Simultaneous calcium imaging and electrophysiology in a striatal slice. (A) The scheme depicts a striatal area (square, in real experiments = 750 × 750 μm) where simultaneous calcium imaging and whole cell patch-clamp recordings were performed. (B) Image summary of neuronal activity in a similar striatal area during 3 min recording. The slice was loaded with fluo-4 AM, the circuit was turned on by 8 μM NMDA (scale bar = 100 μm). (C) Automatic selection of neuronal somata of active neurons and their tissue coordinates during the experiment. (D) In the example the recorded neuron was filled with biocytin (scale bar: 50 μm). (E) Voltage responses of the neuron shown in D evoked by afterhyperpolarizing and depolarizing intracellular current steps. The cell exhibited firing characteristic of a neurogliaform (NGF) neuron. (F) Simultaneous electrophysiological recordings of neuronal discharge (top) and transient increases of calcium (middle) during firing of the neuron shown in D, E (ΔF/F). The time derivative of calcium transients seen as peaks at the bottom (d(ΔF/F)/dt) match the duration of electrophysiologically recorded firing episodes. Peaks obtained in this way are depicted as points in raster type of plots (see Fig. 2).

(<https://sites.google.com/site/bctnet/>). First, we obtained a vector $1 \times F$ with the sum of all coactive neurons from the experimental matrix. We then determined a threshold of significance for neuronal coactivity using Monte Carlo permutations (1000 times) in several ways, the null hypothesis being that coactive neurons were independent from each other and that coactivity occurs randomly. Thus, binary activity data were permuted by shuffling the activity of each neuron in the matrix maintaining their levels of activity (shuffling within cells). Then, time intervals of activity derived from first derivative of Ca^{2+} transients were exchanged between two randomly selected positions from the first to the last interval and this procedure was iterated (shuffling within differentiated Ca^{2+} transients). In addition, we temporally displaced the differentiated Ca^{2+} transients by adding random intervals for each cell. Finally, differentiated Ca^{2+} transients were assigned to randomly selected cells. As a result, the population activity rate in the simulated matrix remained the same as in the original time series (shuffling across time series of differentiated Ca^{2+} transients). The significance threshold was $P < 0.05$ (Carrillo-Reid et al., 2008, 2015a, 2015b).

For analysis we used the significant peaks of neuronal coactivity in the same movie frames defining them as network events or states (see Supplementary video). Each peak of coactivity is a neuronal column vector $N \times 1$. We extracted a matrix of peaks $A \times P$, where A is the number of active neurons in the peaks of coactivity and P is the number of peaks. To find whether neuronal vectors were similar, or different, we measured the Jaccard similarity coefficient (Carrillo-Reid et al., 2008). Thereafter, we used these values in a hierarchical cluster analysis to identify the different sets of neurons that underlie the peaks of coactivity. In each experiment, we computed the faithfulness of the consistency in the hierarchical tree (Jain and Dubes, 1988). To validate the diversity and number of clusters we used the algorithm by Girvan and Newman (2002) (Boccaletti et al., 2006), a method based in finding and progressively removing edges with the largest betweenness, until network breaks up into components. In our hands, this method

adequately separated the neuron sets that underlie the peaks of coactivity. Note that not all neurons belonging to a given set participate in each and every peak of coactivity. Nevertheless, besides the above method, we also measured the scalar product between neuronal column vectors (see Carrillo-Reid et al., 2008, 2015a, 2015b). We found that this alternative method produced similar results.

2.7. Functional connectivity

To perform network analysis each active neuron was taken as a node and its coactivity with other neurons was taken as its functional connections (edges). We used the functional connections between all neurons belonging to each and all network states. We then obtained the weighted adjacency matrix of the defined neuronal network. Thereafter, we extracted a binary adjacency matrix setting a threshold to determine significant connections between neurons ($P < 0.05$) based on Monte Carlo simulations (1000 simulations) using the matrix of significant peaks of coactivity. Binary adjacency matrices were used for further network analysis.

2.8. Network analysis

2.8.1. Small-world properties

To test whether the networks observed experimentally had “small-world” properties, it was necessary to generate regular and random equivalent networks with the same nodes and edges for each experiment. Then, we compared two properties: the characteristic path length (L) and the clustering coefficient (C). Random networks were generated with the Erdős-Rényi model (ER; Boccaletti et al., 2006) with the same number of nodes and links seen in each analyzed experiment. Regular networks (RN) were constructed based in a ring lattice model (Boccaletti et al., 2006) also maintaining the number of nodes and links. Small-world measurements compare L and C of a given network

with its equivalents from the ER and RN networks, respectively. The region to consider a small-world network is $|\Omega| \leq 5$ (Telesford et al., 2011), where $\Omega = Lr/Ls - Cs/Cl$. Lr is the characteristic path length of the random network and Ls the corresponding measure from the experimental striatal microcircuit. Cs is the clustering coefficient of the experimental striatal microcircuit and Cl that of the regular network. Values near to zero are more likely to have small-world properties.

2.8.2. Scale-free properties

To test whether an experimental modular network may be “scale-free”, its degree distribution $P(k)$ was obtained: that is, the probability of a node having k functional connections (or k degree). When $P(k)$ is a long-tailed distribution it means that a few nodes have many connections, while the majority of nodes only have a few. That is, connections are neither regular nor stochastic but network clusters are linked by highly connected nodes (see Barabási and Oltvai, 2004). Sometimes long-tailed distributions may be reasonably fit by a generic power function of the form: $P(k) \propto k^{-\gamma}$ (Boccaletti et al., 2006). Without assuming whether the distributions found in the present experiments were power or other type of functions, we provisionally fitted the experimentally obtained distributions of connections to a generic power function as a first approximation to observe how good was the fit by means of the squared Pearson correlation coefficient (R^2), as a way to describe what we considered relevant experimental findings and illustrate the differences between control and pathological experimental circuits. A more comprehensive statistical analysis is out of the scope of the present work.

2.8.3. Hierarchical architecture

To test whether the experimentally observed microcircuits as obtained with the present method, had hierarchical architectures (Barabási and Oltvai, 2004; Ravasz and Barabási, 2003), we computed the clustering coefficient as a function of node degree: $C(k)$. This function defines the local clustering coefficient of each node with k connections. To the extent that the shape of this function is also long-tailed and may be approximated to a generic power function of the form $C(k) \propto k^{-\alpha}$, we can hypothesize that the circuit has a hierarchical structure (Barabási and Oltvai, 2004; Ravasz and Barabási, 2003).

2.9. The 6-OHDA rodent model or Parkinsonism

Details of procedures to obtain a 6-OHDA model of Parkinson's disease in rodents, as well as several anomalies observed in this model, have been published by our group before (Barroso-Flores et al., 2015; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a,b; Prieto et al., 2011; Jáidar et al., 2010). Briefly, PD 15–20 Wistar rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (85 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) and immobilized on a stereotaxic frame. Each one was injected with 2 μ L of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Sigma; 4 μ g/ μ L in 0.2 μ L of 0.9% NaCl, with 0.2 mg/mL ascorbic acid) into the right substantia nigra compacta at 1 μ L/min at stereotaxic coordinates: anteroposterior 3.9; mediolateral 1.8 to bregma and dorsoventral 6.7 mm from the dura (Dunnett et al., 1981). The syringe was left in place for 10 min to allow diffusion and maximize tissue retention of the solution. After the procedure, rats were placed on a heated pad for recovery and then returned to their respective dams. In order to assess the efficacy of the lesion, all rats were tested for evoked turning behavior 8 days after the surgery at PD >23. Rats were placed in automated rotometer bowls during 10 min to acclimatize them. Turning behavior was measured as contralateral rotations to the dopamine depleted striatum after intraperitoneal injections of apomorphine (0.05 mg/kg). Turning behavior was monitored for 70 min and animals rotating 450 turns or more were selected for further studies. This behavior corresponds to at least 90% of dopamine depletion (Hudson et al., 1993). In some animals, TH immunoreactivity was observed in the striatum (see

Barroso-Flores et al., 2015). We performed Ca^{2+} -imaging in slices obtained from seven different animals that passed all the above criteria.

2.10. L-DOPA induced dyskinesia model

We selected animals with severe hemiparkinsonism, which increases the risk of development L-DOPA induced dyskinesia (LID; Santini et al., 2007). L-DOPA methyl ester and the peripheral DOPA decarboxylase inhibitor, benserazide HCl (Sigma Aldrich), were dissolved in physiological saline immediately before use. The drugs were intraperitoneally injected at a volume of 1 mL/kg daily. Chronic treatment with L-DOPA was administered for 15 days (Supplementary Fig. 1A) and consisted of three phases with incremental daily doses: phase 1: L-DOPA was given at the dose of 6 mg/kg/day for 3 days, phase 2: L-DOPA was scaled up to 15 mg/kg/day until the 7th day, phase 3: L-DOPA was further escalated to 25 mg/kg/day on days 7–15. L-DOPA dosage was combined with a fixed dose (15 mg/kg) of benserazide HCl. The development of Abnormal Involuntary Movements (AIMs) was monitored during 10 days of L-DOPA treatment according to the principles previously reported (Cenci and Lundblad, 2007; Cenci et al., 1998; Winkler et al., 2002). Briefly, the AIMs were scored as follows: the rats were placed individually in transparent plastic cages and observed for 1 min (monitoring period) every 20 min during 240 min (session) after the injection of L-DOPA. Scores were given to four different subtypes of AIMs: axial, forelimb, orolingual and locomotive. Each subtype was scored on a severity scale from 0 to 4 (0 = no dyskinesia; 1 = occasional dyskinesia displayed 50% of the observation time; 2 = sustained dyskinesia displayed 50% of the observation time; 3 = continuous dyskinesia; 4 = continuous dyskinesia not interruptible by outer stimuli). Scores from these AIMs subtypes were summed per monitoring period. Each animal could reach a theoretical maximum score of 192 in one session (maximum score per monitoring period = 16; number of monitoring periods per session = 12). Movements that are scored have been described with detail (Cenci and Lundblad, 2007; Winkler et al., 2002). Animals on days 11–15 of the L-DOPA treatment were sacrificed at the peak of dyskinetic state as seen with AIMs, that is between 40 and 80 min after L-DOPA injection (Supplementary Fig. 1B). We considered dyskinetic rats when they exhibited the four AIMs after chronic application of L-DOPA. We obtained slices from seven different animals that included the above criteria and superfusion saline during slicing, incubation and Ca^{2+} imaging experiments contained 50 μ M L-DOPA. Further work is needed to correlate the severity of AIMs with the incidence of the parameters described in the present work.

Besides the statistical analyses described above, and unless indicated otherwise, parameters distributions between the different samples were compared with the Kolmogorov–Smirnov test. Significance was taken at $P < 0.05$. Number in each sample represents preparations obtained from different animals.

3. Results

3.1. NMDA turns on control striatal microcircuits

Previously, we have described a way to study experimentally striatal microcircuits of histological scale with a few dozen neurons (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2011). Briefly (Fig. 1), the excitatory drive to increase activity in the striatal circuit was 6–8 μ M NMDA (Grillner, 2006; Vergara et al., 2003). The dorsal striatum was chosen to observe an area of 750 \times 750 μ m in a focal plane containing a few dozen neurons loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fluo-4 (scheme in Fig. 1A; Material and methods section). A summary image of active neurons during a brief period of time (3 min) is shown in Fig. 1B. An automatic localization of active neurons is used to figure out their coordinates in the plane of the tissue (Fig. 1C). Local clusters of neurons that presented activity can be seen distributed throughout the field of view. In some experiments, neurons identified as hubs

(see below) could be targeted for electrophysiological recordings to analyze their anatomy and evoked action potential firing (Fig. 1D, E). Neurons recorded electrophysiologically were not the focus of the present work although some hub neurons were anatomically and functionally identified. Up to now, main genres of interneurons have been identified as hub neurons: fast-spiking, low-threshold spiking and cholinergic interneurons (Bargas et al. unpublished). In the example shown in Fig. 1D, E the neuron was similar to those classified as neurogliaform (Ibáñez-Sandoval et al., 2011). During circuit activity this neuron was firing without overt stimulation (Fig. 1F top trace). Fig. 1F (middle trace) shows the simultaneously acquired intracellular Ca^{2+} increases as a consequence of firing and in the bottom trace shows the first time derivative of the Ca^{2+} transients. Note the tight coincidence between the duration of the positive part of the derivative and the duration of electrophysiological recordings (shaded columns). Using this method, Ca^{2+} imaging can be used as a proxy of the electrical activity of several imaged neurons over time. Thus, time derivatives were graphed as dots in a raster type of plot (Fig. 2; see *Material and methods* section). In 12 out of 14 neurons identified as hubs (see below), some type of interneuron was recorded in agreement with previous work (see above and Bakhurin et al., 2016; Carrillo-Reid et al., 2008).

A representative experiment is shown in Fig. 2A, with a raster plot comprising more than 60 active neurons. Rows represent the activity of single neurons and their firing extracted from Ca^{2+} imaging (Fig. 1) is indicated by dots. Vertical lines separate image sequences (or movies) of 3 min in duration each, separated by resting time intervals (without

recording) to avoid photobleaching. Only some image sequences from each experiment are illustrated. Histogram in Fig. 2B shows the cumulative activity of each neuron during a given movie: a few neurons clearly displayed more activity. Histogram in Fig. 2C shows the summed activity of different neurons along time (see *Material and methods* section). Note that some neurons spontaneously exhibited significant peaks of coactivity (in %; colored). Significance of coactivity peaks was estimated by using different types of Monte Carlo permutations (see *Material and methods* section). Peaks of coactivity were extracted as column vectors and then separated in different groups using the Jaccard similarity coefficient between all vector pairs (Fig. 2D) together with hierarchical cluster analyses (Fig. 2E). Similarity maps were also constructed in all experiments using the normalized scalar product between any pair of vectors as similarity index (not illustrated, but see Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a,b, 2015a, 2015b). In our hands, the results obtained by these different methods yielded similar information. Ensembles denoted by different colors (Fig. 2E) constitute the neurons that form the peaks of coactivity (Fig. 2C). Thus, different colors indicate distinct subsets of spontaneously coactive neurons. Histogram in Fig. 2C shows that microcircuit activity can be described as the alternating activation of different neuron sets. Some sets were activated recurrently (Brown et al., 2005; Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2015a, 2015b; Ikegaya et al., 2004; Miller et al., 2014; Schreiber et al., 2004). Taking the different peaks of coactivity, a temporal sequence shows transitions between different configurations of active neurons (network states or events; Fig. 2F top). This network dynamics can be illustrated as a reverberant

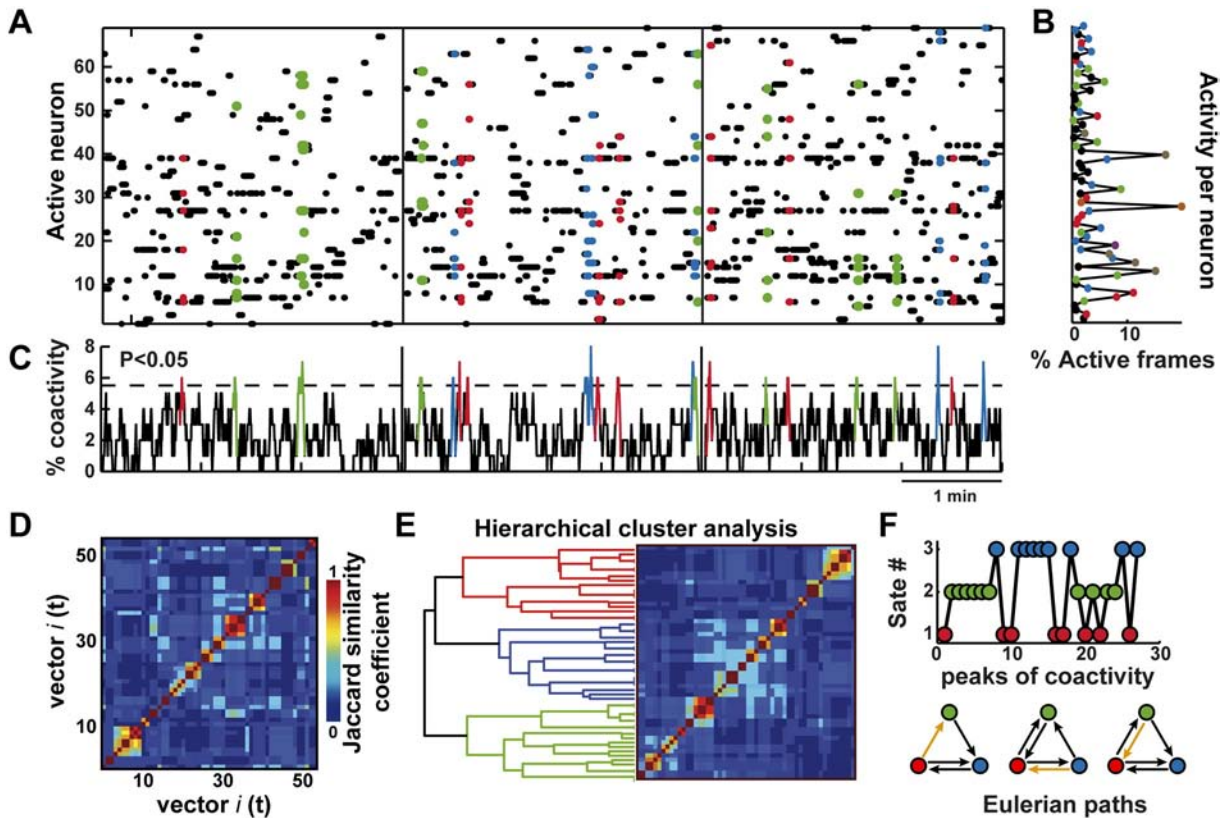


Fig. 2. The striatal microcircuit is formed by neuron sets that alternate their activity following Eulerian paths. (A) Raster type of plot depicting the activity ($8 \mu\text{M}$ NMDA) of more than 60 neurons recorded simultaneously: rows represent activity of individual cells, columns are movie frames converted to minutes scale, colors denote the coactivity of neuron sets in the same frames (neuronal column vectors). Vertical lines separate different time series (720 frames or 3 min each in this case). (B) Summed activity of individual neurons along time. Note that some neurons were more active than others. (C) Summed activity of neuron sets showing that spontaneous multicellular coactivation occurs along time denoting network states or events. Statistically significant peaks of coactivity indicated by different colors belong to different neuron pools. (D) The Jaccard similarity coefficient of all significant neuronal column vectors as a function of time. (E) Hierarchical cluster analysis (left) signaling three main neuron sets that underlie the network states or events of coactivity within the microcircuit. Jaccard coefficients were sorted according to clustering (right). (F) Top: Peaks of coactivity denoted by colored circles can be seen alternating their activity. These transitions generate a temporal sequence (dynamics). Bottom: dynamics can be traced as Eulerian paths for each 3 min movie. These sequences frequently showed closed reverberations and bidirectional edges. Orange arrows indicate the starting state at different moments during the sequence. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

circuit that can be constructed as an Eulerian path (Fig. 2F bottom). Paths were drawn for each 3 min movie segment of circuit activity. The initial transition is denoted with yellow color. Some transitions were bidirectional indicating that there is reciprocal innervation between ensembles. Not all active neurons in an experiment participate in the significant peaks of coactivity. The majority of neurons involved in a given peak of coactivity were unique to the underlying neuron pool (Fig. 2E). However, a few active neurons were shared by different pools.

Finally, although NMDA was used as excitatory drive in this and previous studies (see Material and methods section and Carrillo-Reid et al.,

2008, 2009a, 2011; Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Vergara et al., 2003) to turn on striatal microcircuits in control conditions, they can also be turned on, during several minutes, by electrical stimulation of the cortex or the thalamus, as well as with the application of different drugs (not shown; but see Pérez-Ramírez et al., 2015). These forms of activation yield similar results in control conditions. Without an excitatory drive, the striatal circuit is generally silent in the sense that significant peaks of coactive neurons are virtually absent (Jáidar et al., 2010; Plata et al., 2013a). However, in pathological states, the striatal microcircuit is very active in the absence of any excitatory drive (see below and Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013b).

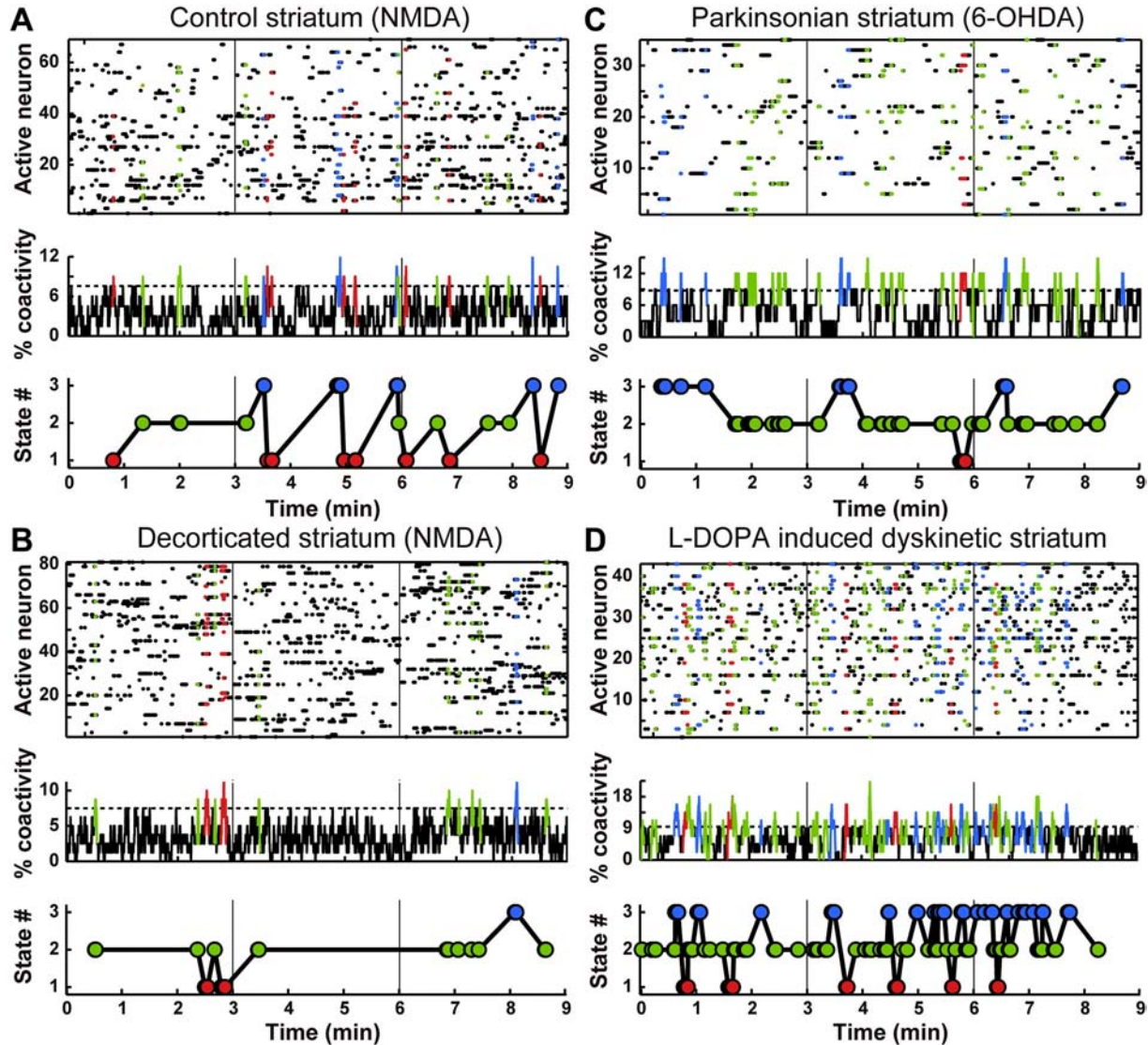


Fig. 3. Temporal sequences of activity as signatures of control and pathological microcircuits. (A) Top: raster plot of striatal activity in control conditions (8 μ M NMDA): rows represent activity of individual cells in these and other frames (neuronal row vectors). Middle: histogram showing the summed activity of all the neurons firing along time: colors denote significant peaks of coactivity of different neuron sets (neuronal column vectors) in some frames of the image sequence. Different colors denote different neurons pools in agreement with the Jaccard similarity coefficient and hierarchical clustering. Vertical lines separate different time series (3 min each). Bottom: temporal sequence of network states activity. Note similar residence times in different network states denoted by colors in agreement with the histogram at the middle. (B) Top: raster plot of striatal activity after in vitro decortication (8 μ M NMDA). Middle: histogram showing the summed activity of neurons along time. Bottom: temporal sequence of network states activity. Note scarce transitions between network states as compared with the controls ($P < 0.001$) and more residence time in one network state (green). (C) Top: raster plot of striatal activity in an ex-vivo slice depleted of dopamine (spontaneous activity in a slice obtained from the injured side of a hemiparkinsonian rat following the 6-OHDA model of Parkinson's disease. NMDA is absent). Middle: histogram showing the summed activity of neurons along time. Bottom: temporal sequence of network states activity. Note fewer transitions between network states as compared with the controls ($P < 0.01$) and that most residence time belongs to one network state (green). (D) Top: raster plot of striatal activity in an ex-vivo slice from a dyskinetic rat. The model of L-DOPA induced dyskinesia was provoked in hemiparkinsonian animals induced with unilateral 6-OHDA (LID; see Materials and methods section). Middle: histogram showing the summed activity of neurons along time. Bottom: temporal sequence of network states activity. Note that although most residence time belongs to one network state (green), frequent transitions to other states appear significantly more frequent than in the control ($P < 0.01$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. Pathophysiology: comparison of control and pathological striatal microcircuits revealed different temporal sequences

The same method to extract the temporal sequences of activity from control striatal microcircuits (Figs. 2 and 3A) was used to extract the temporal sequences of activity from pathological striatal microcircuits. In Fig. 3A–D the x-axis denotes time for a better comparison of the graphs in all three panels: top: raster plot showing neuronal activity, middle: histogram of summed neuronal activity frame by frame, significant peaks of coactivity are shown in color, bottom graph denotes residence time in a given network state with colored circles. Control conditions are illustrated in Fig. 3A (n = 12). Note that transitions between network states, colored red, green and blue, are similarly distributed (Fig. 3A bottom).

Pathological conditions employed here were: 1) Decorticated striatal microcircuits (n = 11) in which the cortex was detached from the striatum in horizontal slices. In these preparations NMDA was still used as excitatory drive (Fig. 3B; Grillner, 2006). The rationale behind these experiments was that there are reports of altered corticostriatal transmission during parkinsonism (Hammond et al., 2007). Thus, an opportunity to directly compare decorticated and parkinsonian tissue with this methodology was at hand; even though one preparation was acute and the other more chronic. Although activity was higher than in controls without NMDA, fewer transitions between different network states were observed in decorticated preparations compared to controls (P < 0.001). 2) Parkinsonian striatal microcircuits (n = 7). These preparations were obtained from the striata of rats injured ipsilaterally in the substantia nigra pars compacta with 6-OHDA (Fig. 3C; see Material and methods section). We previously demonstrated that in the parkinsonian

preparations, the activity is higher than in the controls in the absence of any excitatory drive (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a, 2013b). Parkinsonian circuits exhibited several peaks of coactivity. Nonetheless, transitions between network states in parkinsonian circuits were again fewer than in the NMDA-treated controls and there was more residence time in a dominant state (illustrated green; P < 0.01); confirming previous findings (Jáidar et al., 2010). These preparations were tested for dopamine depletion with behavioral and histochemical techniques (see Material and methods section). Finally, 3) L-DOPA induced dyskinetic striatal microcircuits (n = 7) by closely following the methodology proposed by Cenci and Lundblad (2007) (Fig. 3D; see Material and methods section). These preparations were also recorded in the absence of any excitatory drive. In the dyskinetic circuit there were more transitions between network states than in the control, decorticated or parkinsonian networks (P < 0.01). Interestingly, there were no significant differences in the number of transitions when decorticated and parkinsonian microcircuits were compared.

To better compare the experimentally obtained sequences of activity in each type of microcircuit, we built sequences between network states for each 3 min movie from different experiments and constructed reverberant pathways of activity as Eulerian paths (Fig. 4A). Eulerian paths could be closed (reverberation): either as a single path (a → b → c → a, Fig. 4A cyan) or with some bidirectional links (Fig. 4A brown). However, open paths could also be present (Fig. 4A purple). In control microcircuits the majority of temporal sequences were closed. This is an expected feature of microcircuits seen as neuronal ensembles, since this organization allows working memory and information spread, among other features (Huyck, 2001). Conversely, Eulerian paths from pathological striatal circuits (decorticated, parkinsonian and dyskinetic) were open for most of

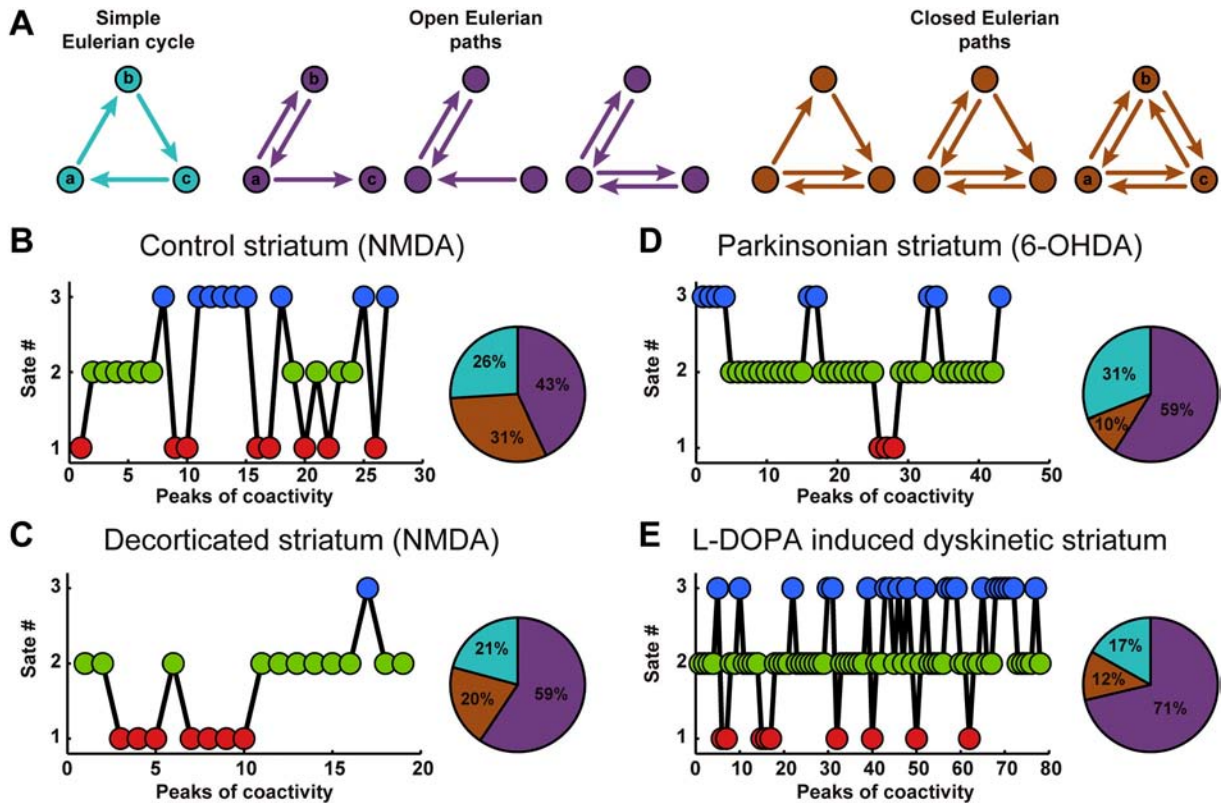


Fig. 4. Closed or open temporal sequences of striatal microcircuits. (A) Temporal sequences of microcircuit activity could reverberate following Eulerian paths, commonly between three network states. Different types of cycles can be observed: Left: a simple Eulerian cycle formed by the sequence of states a–b–c–a (cyan). Middle (purple): Eulerian paths may not form closed reverberations avoiding transitions between certain pairs of network states. Right (brown): Eulerian paths form closed cycles including bidirectional transitions. (B) Control striatum microcircuit (8 μM NMDA) alternates its activity between the three network states forming Eulerian paths of the three classes. But more than 50% of the temporal sequences were closed reverberations (brown and blue; insets: pie plots in each frame). (C–E) Most sequences in decorticated, parkinsonian (6-OHDA) and dyskinetic striatal microcircuits were open (P < 0.01; purple; insets: pie plots in each frame). Interestingly, more transitions in LID circuits were not translated in more closed sequences; which were minimal. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the 3 min movies studied. Representative sequences and pie graphs in Fig. 4C–E; denote statistics of the samples from the different preparations ($P < 0.01$; Kruskal–Wallis test for control vs. pathological preparations). In summary, each pathological condition was accompanied by a decrement of closed Eulerian paths or reverberations, which are thought to be the basis of cell assemblies and modular behavior (Hebb, 1949; Huyck, 2001; Beggs and Plenz, 2003; Carrillo-Reid et al., 2008, 2015a, 2015b; Eichenbaum and Davis, 1998).

3.3. Functional connectomics between the neurons of striatal microcircuits in control and pathological conditions

We used the functional connections defined as coactivity in the same movie frame (see Material and methods section) between all neurons belonging to each and all network states of a given microcircuit and represented them in a weighted adjacency matrix (Fig. 5A). The weights of the adjacency matrix correspond to the number of times each pair of neurons activated together. Thereafter, we extracted a binary adjacency matrix (Fig. 5B) by setting a threshold to determine significant connections ($P < 0.05$) based on Monte Carlo simulations (see Material and methods section). Binary adjacency matrices were used for further analysis. Original X–Y coordinates of the neurons in a representative control microcircuit that yields the adjacency matrices is illustrated in Fig. 5C. Each active neuron during an experiment is a node, and each link

between two neurons represents a functional connection. Colors denote neuron pools underlying peaks of coactivity (Fig. 2).

We then measured the characteristic path length (L) and the clustering coefficient (C) of striatal microcircuits such as that illustrated in Fig. 5D. These values were compared to those obtained from two simulated circuits (see Material and methods section): a regular and a random circuit. Random networks were generated with the Erdős–Rényi model for each experimental circuit. Regular networks were constructed based in a ring lattice model. These circuits were simulated for each experimental circuit, in each condition, maintaining the number of nodes and links found in each experiment. Control striatal microcircuits had an average $L = 1.8 \pm 0.05$ (mean \pm SEM, $n = 12$), that is, in average, two or less edges are needed to connect any two nodes within the microcircuit. This is more similar to the L of a random circuit than to the L of a regular one: Square symbols in Fig. 5D illustrate a representative example compared with simulations of random and regular circuits with the same nodes and links; shades behind the symbols of simulated circuits represent 1000 Monte Carlo simulations). Clustering of control striatal microcircuits was $C = 0.71 \pm 0.02$ (mean \pm SEM, $n = 12$) which was near to that of a regular network (triangles in Fig. 5D illustrate an example compared with simulations of random and regular circuits, with the same nodes and links; shades behind the symbols of simulated circuits represent 1000 Monte Carlo simulations). These results suggest that control striatal microcircuits have an L similar to that of random networks and a C similar to that of a regular network,

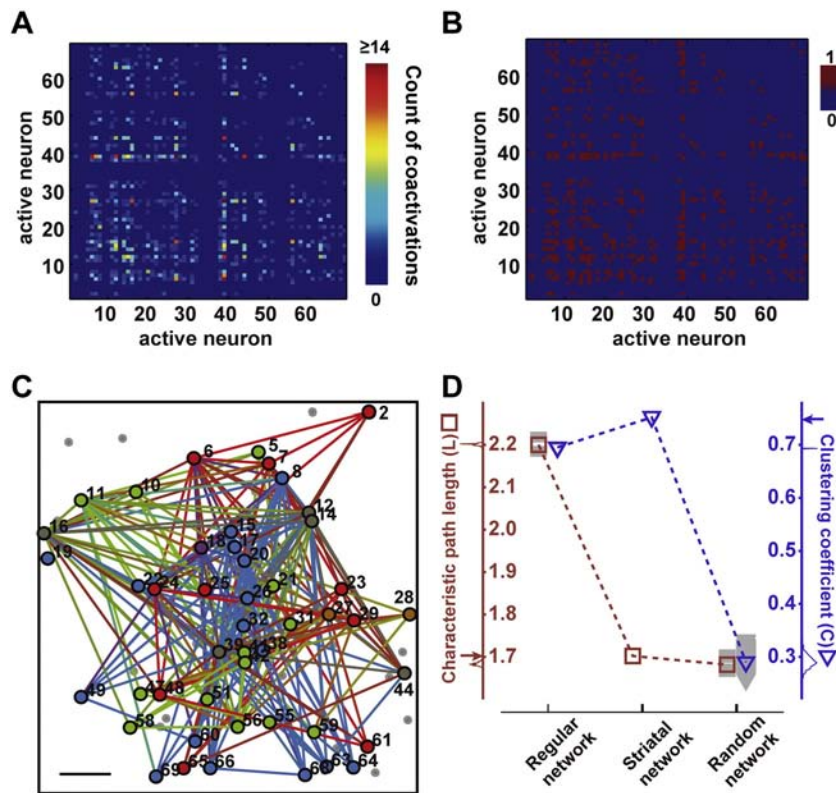


Fig. 5. Small world properties of the striatal microcircuit seen as sets of coactive neurons. (A) Weighted adjacency matrix showing coactive firing among all pairs of active neurons. (B) Binary adjacency matrix obtained from the weighted adjacency matrix (see Material and methods) with a significant threshold = $P < 0.01$. Binary matrices were used for subsequent network measurements. (C) Graph of the microcircuit preserving the original spatial coordinates in the tissue (scale bar: 100 μm); each neuron (circles) is a node, links or edges are traced between neurons when they fire in the same frame (coactivity or correlated firing). Colored circles and links denote pools of neurons underlying the same network states. Different colors denote different network states in the control circuit. Note that neurons of different pools are intermingled and that some local clusters of the same pool are separated by distances that forbid monosynaptic contact to explain coactivity. (D) Comparison of control striatal microcircuit with simulated regular and random networks with the same numbers of nodes and links. Note that characteristic path length (L = mean number of nodes to connect any two nodes within the network) of the striatal network (empty brown square) was slightly larger than the L obtained for simulated random networks (shaded square): $L = 1.68 \pm 0.0001$ for $n = 1000$ simulated random networks depicted as average and shade vs. average $L = 1.8 \pm 0.05$ for control experimental striatal networks; $n = 12$; $P > 0.01$). L for simulated regular networks was larger. The clustering coefficient (tendency of neurons to lump in local clusters) of the striatal network (top blue triangle) was larger than those obtained for random and regular networks (shaded triangles): $C = 0.71 \pm 0.02$ for striatal networks vs. $C = 0.69 \pm 0.00001$ for $n = 1000$ simulated regular networks ($P < 0.01$), clustering of random networks is much smaller. These results are evidence that the striatal microcircuit is similar to a “small-world” network with a slight tendency towards a regular network. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that is a “small-world” configuration with a slight tendency towards a regular network: $\Omega = -0.17 \pm 0.03$ (mean \pm SEM, $n = 12$; Telesford et al., 2011). These results made us hypothesize that inner relations among circuit neurons may be disclosed after network arrangement while preserving nodes and links. Therefore, we grouped together the neuron pools belonging to distinct peaks of coactivity in a circular arrangement, preserving their connections while losing their original coordinates (Fig. 6A top). This arrangement revealed the functional relations between circuit elements (see below): clearly a set of highly connected neurons (grey) could be the substrate for reciprocal connections between ensembles (Eichenbaum, 2002).

A histogram of functional connections based on coactivity was made to observe whether their distribution was long-tailed (Fig. 6A middle). Then, we plotted the values of the histogram bars in a log-log scale and asked how much the distribution approached a generic power function

of the form: $P(k) \propto k^{-\gamma}$ (Fig. 6A bottom). In control striatal microcircuits the exponent of the power function was $\gamma = -1.67 \pm 0.13$ (mean \pm SEM, $n = 12$; $P = 0.65$) with a range of squared correlation coefficients between 0.8 and 0.98, suggesting that “hubs” had a relevant role interconnecting control microcircuits (Barabási and Oltvai, 2004). To confirm these results, we plotted data from neurons belonging to the tail of the histogram separately from neurons belonging to the peaks of coactivity (Fig. 6A top; larger diameter nodes that are not blue, red or green). It was observed that highly connected neurons or hubs had several links with the neuron pools underlying the peaks of coactivity, suggesting that they interconnect these pools (Fig. 6A top). Thus, an important finding was that hubs have a role in providing an $L \leq 2$ to control circuits since a neuron of a given pool either connects directly to a neuron of another pool or connects with it through a highly connected neuron or hub. Neurons, as observed in their original spatial coordinates

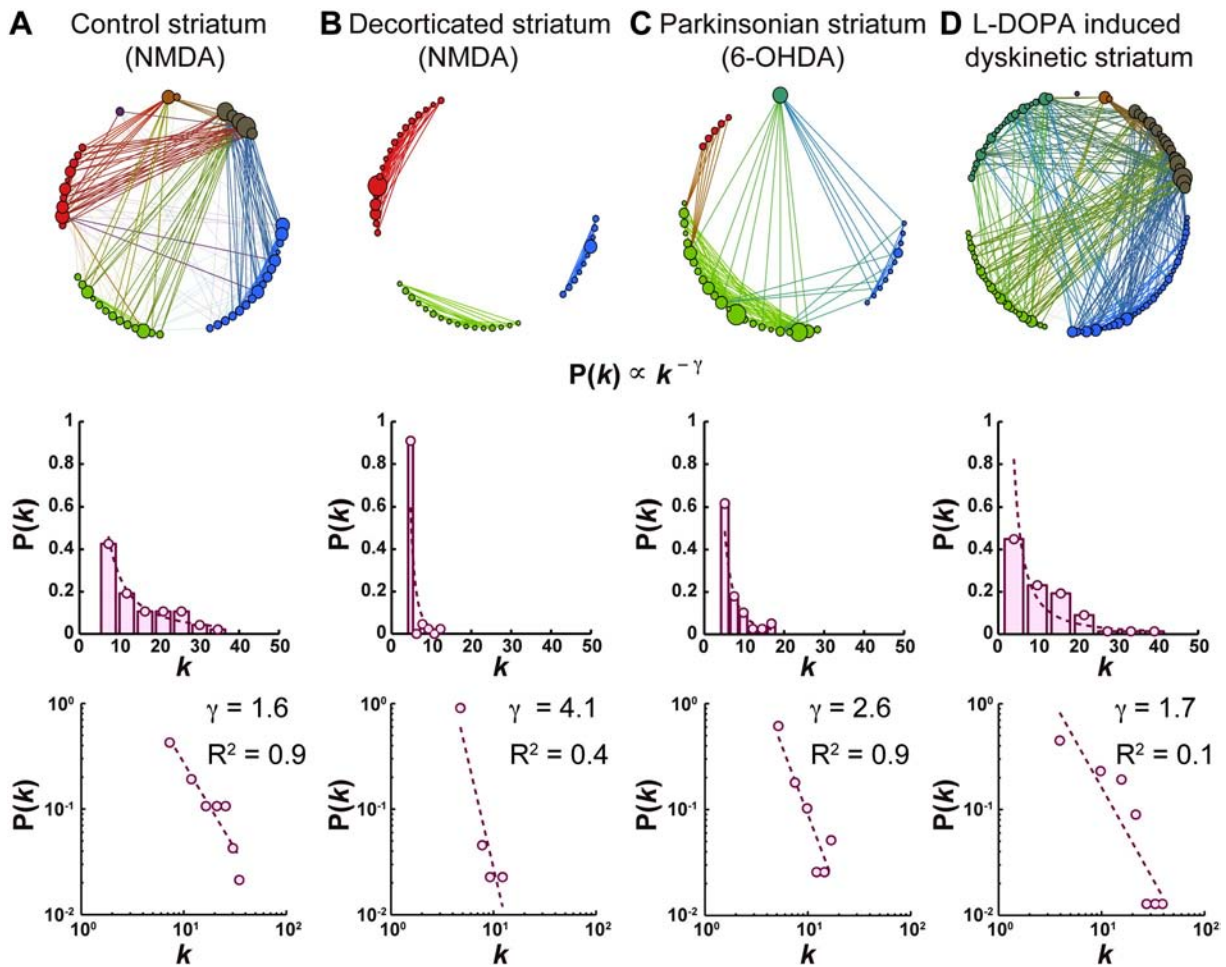


Fig. 6. Pathophysiology: circular visualization of striatal microcircuits allows observe their connectivity structure. Microcircuits were transformed from their original coordinates as seen in Fig. 5C to a circular architecture that groups the different pools of neurons underlying the network states (e.g., red, blue, and green). Size of the nodes is proportional to degree (number of connections). This visualization separates the neurons that participate in the various network states from the most connected neurons (e.g., brown, orange). (A) Top: representative control striatal microcircuit shown in Fig. 5C rearranged in a circle to reveal the inner structure of functional connections: note that most connections between different neuron pools underlying the network states took place via a few highly connected nodes (hubs), explaining both the short characteristic path length (L) and coactive firing despite long physical distances (direct or polysynaptic communication). Control circuits had an average of 9 ± 2 hubs (mean \pm SEM, $n = 12$). Middle: degree distribution $P(k)$ of the same striatal circuit: note a long-tailed distribution which confirms that a few neurons have many connections (hubs). Bottom: log–log plot of $P(k)$ approaches a straight line. A power function approximation yields an exponent of $\gamma = -1.6$, confirming a hierarchical architecture in which a few hubs hold together numerous nodes (see Top). (B) Top: representative decorticated striatal microcircuit rearranged in a circle to reveal the inner structure of functional connections: note that connections with hubs were lost, suggesting a privileged connectivity between the cortex and the hubs that orchestrate network dynamics in control circuits. Middle: degree distribution was not long-tailed. Bottom: log–log plot of $P(k)$ hardly fits to a straight line. The exponent, $\gamma = -4.1$, confirmed that hubs activity connecting different neuron pools was lost (Barabási and Oltvai, 2004). Most decorticated circuits had between 0 and 4 hubs ($n = 11$; $P < 0.001$). (C) Top: representative parkinsonian striatal microcircuit rearranged in a circle to reveal the inner structure of functional connections: note similarities with the decorticated preparation. A single hub was connected to a dominant network state that contains most neurons (Jáidar et al., 2010). Most parkinsonian circuits had between 1 and 6 hubs ($n = 7$; $P < 0.05$). Middle: degree distributions showed shorter tails. Bottom: log–log plot of $P(k)$ yields an exponent: $\gamma = -2.6$ suggesting that the number of hubs was reduced. (D) Top: representative circuit obtained from an animal that presented L-DOPA induced dyskinesia rearranged in a circular way. Note reappearance of hubs and an increase in functional connections. Dyskinetic circuits had 25 ± 4 hubs ($n = 7$; $P < 0.01$). Middle: degree distributions showed a long tail. Bottom: however, log–log plot of $P(k)$ showed that degree distribution of dyskinetic circuit could hardly be fitted by a single power function ($\gamma = -1.7$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

within the tissue show a heterogeneous and sparse distribution of clusters (Figs. 1C and 5C). Neurons activating in different peaks of coactivity are intermingled in a field $750 \times 750 \mu\text{m}$ (Carrillo-Reid et al., 2008, 2009a, 2011). In contrast, synapses between striatal projection neurons can only be found within distances $\leq 100 \mu\text{m}$ (Czubayko and Pleniz, 2002; Tunstall et al., 2002; Taverna et al., 2008). Therefore, it is reasonable to infer that functional connections between neuron clusters are done through di- or poly-synaptic pathways that involve neurons with long axons in order to span the area occupied by the neurons of the circuit, as the circular arrangement suggests. That is, highly connected neurons or hubs can be hypothesized to be interneurons (Surmeier et al., 2011) since they connect several and more distant clusters of projection neurons (Tepper et al., 2004). Individual whole-cell recordings have confirmed this inference so far ($n = 12$ out of 14 recordings, data not shown), but electrophysiological samples are necessarily small as compared with the number of active neurons that can be examined with Ca^{2+} imaging in microcircuits. Therefore, we are currently performing similar analyses using transgenic mice with genetically labeled neurons. This research is underway and is out of the scope of the present work.

Next, we analyzed decorticated striatal microcircuits which preserved peaks of coactivity induced by NMDA (Figs. 3B, 4C). Noticeably, highly connected neuron hubs decreased or were absent after circular arrangement (Fig. 6B top) because decortication suppressed the tail of the distribution of functional connections (Fig. 6B middle). In fact, a power function was not well fitted in decorticated circuits (Fig. 6B bottom) and the average exponent was $\gamma = -3.09 \pm 0.18$ ($n = 11$; $P = 0.36$) with a range of squared correlation coefficients between 0.5 and 0.9, suggesting that after decortication, hub neurons lost their importance in functionally organizing the microcircuit (Barabási and Oltvai, 2004). It is then inferred that cortical pyramidal afferents have a privileged connectivity with striatal hubs, probably interneurons (see above), and contribute importantly to organize the activity in control striatal microcircuits. Since the poly-synaptic entry of projection neurons has been characterized, and it is known to contain glutamatergic and GABAergic inputs, it is inferred that feed-forward inhibition forms a part of cortical activation of projection cells (Flores-Barrera et al., 2010; Vizcarra-Chacón et al., 2013). The working hypothesis that arises from these results is that cortical activation organizes interneuron sets to induce modular activity in a way similar to that proposed by cognitive theory: hub neurons would be the operators and projection neurons would be the operands (Huyck, 2001; Newel, 1990) during processing of alternations and reverberations that may underlie a motor routine (Cui et al., 2013). This may explain why the transitions between network states dropped after decortication (Figs. 3B, 4C), thus changing the dynamics of these circuits and the functional relations between their neurons (Surmeier et al., 2011).

We then analyzed striatal parkinsonian microcircuits from the 6-OHDA rodent model of Parkinson's disease (Fig. 6C). Besides increasing microcircuit activity and making transitions between network states less frequent, one network state possessed most of the neurons (Fig. 6C top), and the tail of the degree distribution became blunted (Fig. 6C middle) since the circuits were left with only one or very few hub neurons. As a result, the average exponent of a fitted power function became $\gamma = -2.05 \pm 0.2$ ($n = 7$; $P = 0.41$) with a range of squared correlation coefficients between 0.3 and 0.9, reflecting a decrease in hubs importance. Notably, the hubs that remained were connected to the neuron set that underlies the dominant network state, where the circuit resides most of the time (Jáidar et al., 2010; López-Huerta et al., 2013; Plata et al., 2013a). These results suggest that during dopamine deprivation most hubs are functionally eliminated and that the ones remaining may help to maintain a dominant neuron set (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009). It is known that during early parkinsonism L-DOPA and other drugs may return the circuit to control conditions (Plata et al., 2013a, 2013b), suggesting that hub neurons were not physically eliminated. To our knowledge this could be the first clear hint about the possible role of interneurons in the parkinsonian state at the microcircuit level (Huot et al., 2013).

The dyskinetic striatal microcircuits were analyzed in the same way. An obvious observation is that circuit activity increased drastically in the absence of any excitatory drive (Fig. 3D) and the microcircuit increased its number of transitions between network states (Fig. 4E). This was reflected by an increase in the number of functional connections (Fig. 6D top). The distribution of functional connections was long tailed reflecting a recovery in the number of hubs in the circuit (Fig. 6D top, middle). However, the data was not well fitted by a power function: $\gamma = -0.82 \pm 0.23$ ($n = 7$; $P = 0.31$) with a range of squared correlation coefficients between 0.1 and 0.9. An increase in the number of connections and transitions may reflect the excess of movements observed in patients with dyskinesia. Again, this is the first description of striatal microcircuit changes during L-DOPA induced dyskinesia, including the possible role of interneurons (Huot et al., 2013). Moreover, the contrast with the parkinsonian off-state is so obvious that one can be sure that in this preparation one is dealing with the dyskinetic circuit, this fact would again give a hint about how to correlate cellular with circuit experiments.

In summary, striking differences in functional connectomics were found between the neurons of control striatal microcircuits and pathological ones: decorticated and parkinsonian microcircuits had a reduced number of hubs while dyskinetic circuits exhibited an excess of connectivity and several hubs. To better assess the significance of these findings we turned to the analysis of clustering.

3.4. Hierarchical relations within striatal microcircuits: control and pathological conditions

Top of Fig. 7A–D shows the same circuits as those depicted in Fig. 6A–D, except that the diameter of the nodes now denotes their belonging to an interconnected cluster of neurons (clustering coefficient), that is, neuron pools that underlie the network states. The clustering coefficient of nodes graphed as a function of their number of connections are shown in Fig. 7A–D middle, and the same graphs are shown in a log–log scale in Fig. 7A–D bottom. In control striatal microcircuits (Fig. 7A) clustering as a function of nodes degree was a skewed or tailed function which could be approximated by a generic power function of the form: $C(k) \propto k^{-\alpha}$ (Fig. 7A middle). In control circuits the average of the exponent was $\alpha = 0.66 \pm 0.02$ ($P = 0.55$, Fig. 7A bottom) with a range of correlation coefficients between 0.86 and 0.95, suggesting that control striatal microcircuits have a hierarchical structure (Ravasz and Barabási, 2003; Barabási and Albert, 1999; Barabási and Oltvai, 2004). These results confirm modularity of microcircuits within a histological scale. In decorticated preparations, clustering coefficient as a function of links was not well fitted to a power function (Fig. 7B top to bottom). Average exponent was $\alpha = 0.84 \pm 0.03$ ($n = 11$; $P = 0.46$) with a range of correlation coefficients between 0.46 and 0.92. This result means that the hierarchical structure of microcircuit activity depends on corticostriatal connections activating hub neurons. Clustering as a function of connections was also computed for striatal microcircuits deprived of dopamine (Fig. 7C top to bottom). Fitting to a power function was not good, average exponent was $\alpha = 0.61 \pm 0.03$ ($n = 7$; $P = 0.41$) with a range of correlation coefficients between 0.6 and 0.9. These results suggest that in the absence of enough hubs due to dopamine deprivation the hierarchical structure of striatal microcircuits is partially lost. This result is similar to that obtained with decorticated microcircuits, suggesting that in this animal model of Parkinson's disease there is a disabled “reading” of corticostriatal afferents by the striatal microcircuits (Hammond et al., 2007) or that connections with the cortex occur preferentially through only some classes of hub neurons (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009), perhaps increasing the probability of the circuit to be driven into certain network states (Jáidar et al., 2010). Finally, clustering as a function of links in L-DOPA induced dyskinetic striatal microcircuits (Fig. 7D top to bottom) was very variable failing to fit a power function appropriately: $\alpha = 0.4 \pm 0.12$ ($n = 7$; $P = 0.1$) with a range of correlation coefficients between 0 and 0.7. These results indicate that dyskinetic

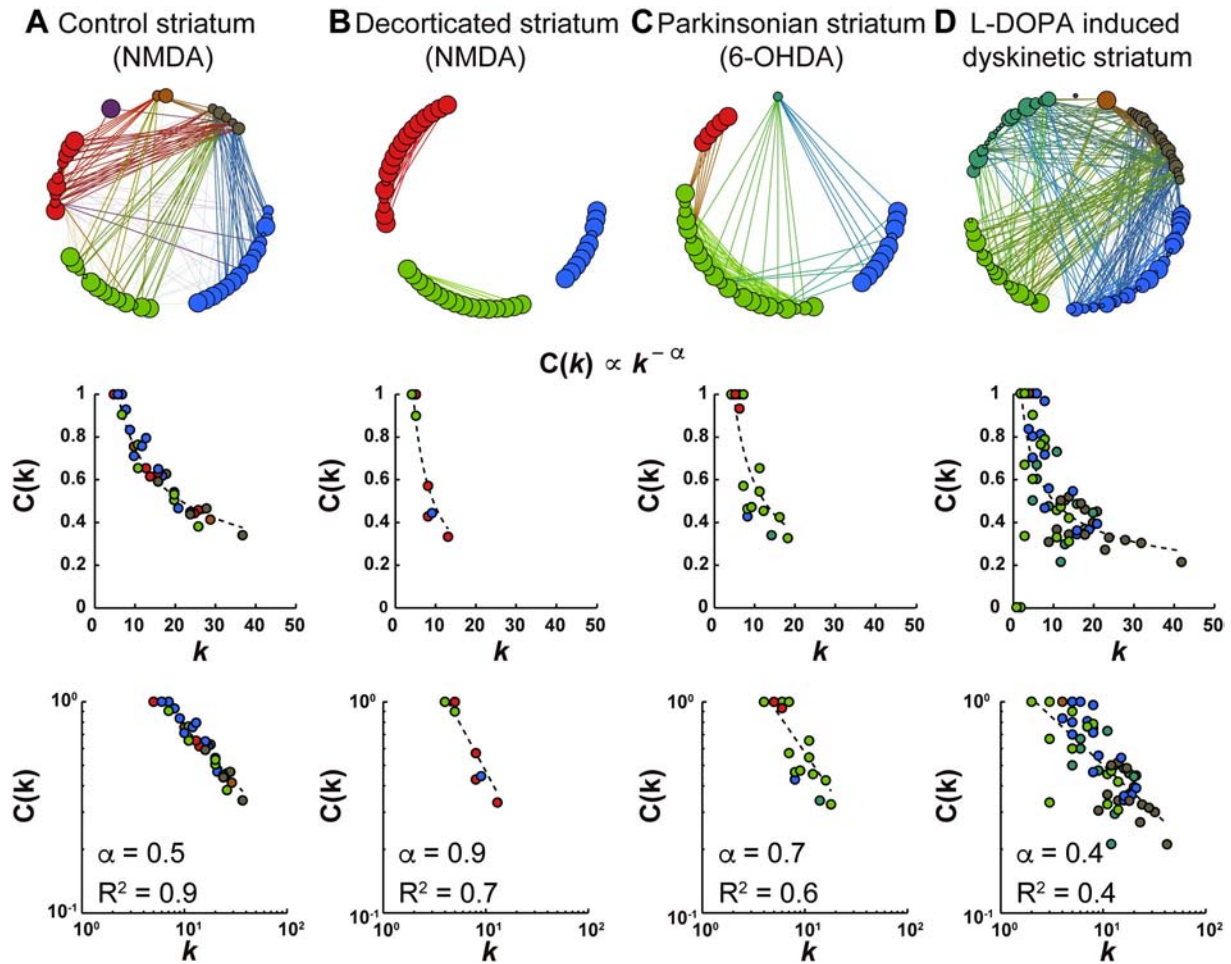


Fig. 7. Pathophysiology: circular visualization allows observe the hierarchical architecture of control and pathological microcircuits through the clustering coefficients of the neurons (nodes). Diameter of nodes denote local clustering coefficient. (A) Top: as expected, in the control striatal circuit hubs exhibited low local clustering, whereas the neurons inside the neuronal pools exhibited higher local clustering coefficients. Middle: Clustering coefficient, $C(k)$, as a function of connections (k) plot, showed that neurons from all pools, denoted by colors, followed the curve. Bottom: the log–log $C(k)$ plot approximates a power function suggesting that organization of neural activity in the control striatal microcircuit has a hierarchical architecture. (B) Top: the decorticated striatal microcircuit showed most neurons with similar local clustering coefficients. Middle: $C(k)$ plot from decorticated striatal microcircuit showed that only nodes from two neuron pools followed the curve. Bottom: the log–log $C(k)$ plot showed a dispersion and a bad fit of a power function, suggesting that hierarchical structure of activity was largely lost. (C) Top: the striatal Parkinsonian microcircuit presented neuron pools with high clustering coefficient. In particular, the largest pool included neurons with both high and low local clustering coefficients. Middle: the $C(k)$ plot of the striatal Parkinsonian microcircuit shows that only nodes from the largest pool followed the curve. Bottom: the log–log $C(k)$ plot showed a dispersion and a bad fit of a power function suggesting that hierarchical structure of activity was largely lost. (D) Top: the striatal microcircuit with L-DOPA induced dyskinesia presented a full range of local clustering coefficients for the nodes of all pools. Middle: the dyskinetic striatal microcircuit showed nodes from all pools scattered around the $C(k)$ plot. Bottom: the log–log $C(k)$ plot showed that the dyskinetic circuit exhibited the largest dispersion and a bad fit, suggesting that hierarchical structure was lost.

striatal microcircuits had an over-activation of neurons but with a loss of their hierarchical structure, resembling the excess of uncoordinated movements in dyskinetic subjects.

3.5. Control and pathological microcircuits can be functionally distinguished

The fact that neither the distribution of connections nor the clustering coefficient can be well approximated by a generic power function in diverse pathological conditions, disclose a profound change in the relations between circuit elements, and therefore in their dynamics. Further statistical work, is necessary to find out the type of functions that best describe pathological circuits. Also, other pathological circuits in this and other brain areas may be studied. Still, a comparison of obtained parameters is illustrative: increases in the absolute value of the “ γ ” exponent of degree distributions denote that hubs are less relevant to the network, and it is denoted by the shortening of the distribution tail (Barabási and Oltvai, 2004). This happened in both decorticated and parkinsonian microcircuits (Fig. 8A; $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively) suggesting that parkinsonism disrupts corticostriatal transmission

(Hammond et al., 2007), in particular, with certain classes of hub neurons (Dehorter et al., 2009). In contrast, the presence of hub neurons was not significantly different between dyskinetic and control striatal microcircuits, suggesting that a collection of hub neurons is necessary to generate movement diversity.

Comparison of clustering is also illustrative since hierarchy in a network is maximal when $\alpha = 1$ and minimal when $\alpha = 0$. Both parkinsonian and dyskinetic microcircuits had values significantly lower than the control (Fig. 8B; $P < 0.02$ and $P < 0.001$, respectively) and correlation coefficients were significantly lower ($P < 0.05$ and $P < 0.0001$, respectively). However, decorticated striatal microcircuits had α values significantly higher than controls, suggesting that clusters remain disconnected ($P < 0.001$).

4. Discussion

The present work uses a methodology previously described to visualize the activity of the striatal microcircuit (Carrillo-Reid et al., 2008). We have previously reported that the dynamics of this circuit allows for alternation, recurrence and reverberation within small tissue areas

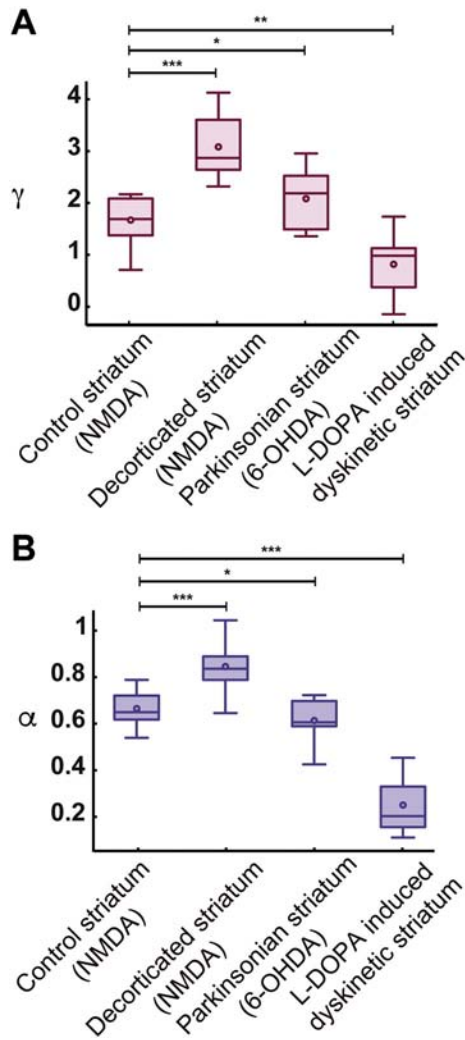


Fig. 8. Comparison of control and pathological striatal microcircuits. (A) Comparison of exponents (γ) of degree distributions as fitted to power functions. Hubs are less relevant when γ is larger. (B) Comparison of exponents (α) of the clustering coefficient function as fitted to power functions. α measures how much hierarchy is configured by neuronal clusters (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

(Carrillo-Reid et al., 2009a) both in control and pathological conditions (Carrillo-Reid et al., 2008; Jáidar et al., 2010). It has also been shown how this circuit activity changes by the action of neuromodulatory messengers such as dopaminergic or cholinergic agonists (Carrillo-Reid et al., 2009a, 2011). Therefore, in the present work we focused on the relationship between circuit elements. We asked whether a meaningful structure can be discerned between assemblies of neuronal elements and if specific changes can be described under pathological conditions.

Notably, although numerous immunocytochemical, pathological and molecular biology studies have been carried out at the histological scale, most physiological studies have been performed at either the cellular or systems levels. One reason may be that the methods to record the activity of dozens of cells simultaneously are relatively recent. In addition, the exploration of a set of parameters that allow compare modular microcircuits as a whole was needed, fulfilling the role of the set of parameters used in cellular neurophysiology to describe and compare neurons, such as input resistance, time constant and firing rate and pattern. In the present work we describe potentially useful set of parameters to describe modular microcircuits at histological scale: L , C , $P(k)$ and $C(k)$. We then showed that the relations between neurons in these experimentally observed circuits could be meaningfully described from network and pathophysiological perspectives. On the other hand, we choose coactivity within given intervals to define functional

connections. However, other measurements, such as correlations could be used. A further exploration of ways to measure circuit relations is needed.

4.1. Striatal microcircuits consist of neuron pools that generate alternating spontaneous peaks of coactivity whose neurons are communicated by a set of highly connected neurons

Striatal microcircuits consist of groups of neurons firing nearly together producing spontaneous peaks of coactivity that alternate thus producing temporal sequences. After arrangement, the circuit structure disclosed a set of neurons communicating to different neuron pools or clusters thus revealing a modular structure. This structure is not obvious when the neurons are seen in their original spatial coordinates, since the neuron pools that underlie the peaks of coactivity are intermingled in larger areas than those expected for monosynaptic connections among projection cells ($< 100 \mu\text{m}$; Czubayko and Pleniz, 2002; Taverna et al., 2008; Tunstall et al., 2002). However, the arrangement of the neuronal pools observed revealed a set of highly connected neurons or “hub neurons” that coincide with those under the long tail of the connectivity distribution. These results suggest scale-free properties of striatal circuits and open a path to investigate possible mechanisms for alternation and reverberation of coactivity peaks, or network states. In general, we found that neurons that underlie network states may be intermingled and separated by distances requiring di- or polysynaptic connections (Surmeier et al., 2011). Nevertheless, the average characteristic path length of the circuit was $L \leq 2$, suggesting many di-synaptic functional connections. These observations suggest that highly connected neurons possess long-axons, that is, interneurons capable of connecting relatively distant neuron clusters (Tepper et al., 2004). Indeed, the distribution of connections in control circuits could be approximated to generic power functions yielding exponents that suggest a relevant role for hub neurons in orchestrating the dynamics of the circuit. Interneurons functioning like hubs have been corroborated with a small sample of targeted electrophysiological recordings (Carrillo-Reid et al., 2008). However, the path is open for future studies with transgenic animals (underway) to identify what classes of neurons are hubs and under what conditions. A short L is similar to that found in simulated random networks with the same nodes and links as those circuits experimentally observed.

On the other hand, neurons pools underlying network states exhibited clustering coefficients (C) similar to those of regular networks, suggesting small-world connectomics (Rubinov et al., 2011; Newman, 2003; Boccaletti et al., 2006). Basically, neurons in striatal microcircuits are distributed in nearby clusters, although network states may consist in clusters that are not near to each other. Moreover, clustering coefficient as a function of connections also showed a straight line in log-log scale, suggesting that the relations between circuit elements follow a hierarchy, or line of command coming from the cortex and involving the hubs (Barabási and Oltvai, 2004; Ravasz and Barabási, 2003) as proposed by cognitive theory (Huyck, 2001; Newel, 1990). This finding could explain the ordered and closed temporal sequences described in the controls (Carrillo-Reid et al., 2008; Shepherd and Grillner, 2010).

Interestingly, although activity in decorticated striatal microcircuits could still be evoked using NMDA as excitatory drive, the long-tail in the distribution of connections was lost, which was manifested by the functional loss of hub neurons in the circuit and a larger absolute exponent. That is, hierarchy is missing in the decorticated striatal microcircuit (Barabási and Oltvai, 2004). Therefore, an interesting first inference from these results is that corticostriatal afferents have privileged connections with a set of highly connected neurons that orchestrate network dynamics in control striatal microcircuits or modules. For a long time it has been known that pyramidal neurons preferentially connect with interneuron pools in target nuclei, such as the spinal cord (Eichenbaum, 2002). Therefore, the present finding suggests a general organization principle that may explain how the same neuronal ensemble may be used for different behaviors depending on the hub neurons

that are activated by the cortical commands, that is, hub neurons would work as operators and projection neurons as operands potentially inducing different functional architectures depending on the context (Huyck, 2001; Newell, 1990).

4.2. Pathological microcircuits disrupt the connections between neuron pools and hub neurons

Parkinsonian striatal microcircuits showed distributions of connections with blunted tails, revealing that only a few hub neurons remained after dopamine deprivation. The absence of most hubs resembled the decorticated preparation suggesting an altered corticostriatal communication (Hammond et al., 2007; Stephens et al., 2005). Previously, we have shown that parkinsonism causes that the circuit gets trapped into a dominant network state that recurs excessively preventing circuit transitions (Jáidar et al., 2010). Now, we have shown that the hub neurons that remained after dopamine deprivation were mainly attached to the dominant network state, reinforcing the hypothesis that cortical “reading” is impaired during Parkinson’s disease (Hammond et al., 2007). These results reinforce the view of the role of interneurons in the circuit (see above): previous experiments had revealed that some striatal interneurons acquire striking properties such as gigantic IPSCs and increase in release probabilities after dopamine deprivation (Barroso-Flores et al., 2015; Dehorter et al., 2009). Moreover, a decrease in the number of operators would directly relate with the diminished motor functions (operations) that a patient is capable to perform (Huyck, 2001). If this is confirmed, the class of neurons that become attached to the dominant parkinsonian state may be those with resonant properties that make the circuit prone to engage in akinetic firing patterns and rhythms (Beatty et al., 2015; Hammond et al., 2007; Hutchison et al., 2004; Stein and Bar-Gad, 2013). Indeed transitions between network states become infrequent in parkinsonian circuits. Because Parkinson’s disease is multifactorial and involves multiple cellular disorders (Kalia and Lang, 2015) it is important to observe correlations at the microcircuit scale since they may encompass many of these cellular disorders. This approach suggests a pathway to explain circuit disorders from cellular ones. On the other hand, the correlation of a decrease in circuit transitions and parkinsonism can be clearly correlated with the rigidity and slowness of movement characteristic of parkinsonian subjects.

Finally, microcircuits from animals with L-DOPA induced dyskinesia disclosed increased connectivity and transitions that we have described as a microcircuit correlate of gamma or pro-kinetic rhythms (Carrillo-Reid et al., 2009a, 2009b) and which already have been described in dyskinetic subjects (Dupre et al., 2015). These observations demonstrate that hub neurons are not lost during the parkinsonian state since a set of hub neurons becomes again an important part of the circuit, that is, highly connected neurons were not physically but only functionally lost during parkinsonism. In fact, their reappearance during dyskinesia suggests that they are necessary for the circuit to generate movements. Nonetheless, analysis of clusters distribution indicated that dyskinetic microcircuits suffered a loss in their hierarchical architecture. This finding can be seen as a correlate of the excess of uncoordinated movements in dyskinetic subjects. The difference between the parkinsonian and the dyskinetic circuit is so obvious that we can be sure that dyskinetic circuits can be preserved *in vitro*. During cellular physiological experiments this has been a debated matter (Huot et al., 2013).

In summary, microcircuit analyses of pathological circuits yielded circuit structures very different to those found in control circuits and turned out to be very metaphorical as seen from the perspective of diseased subjects.

5. Conclusions

A set of parameters to compare microcircuits of histological scale was proposed, this methodology can be used to explore other disease

states and the role of interneurons in modular circuits. Besides, several original results were found with this approach: first, control striatal circuits have a set of highly connected neurons (or hubs) that interconnect different neuronal clusters very efficiently with an average $L < 2$. These clusters underlie the peaks of coactivity that alternate and reverberate making transitions between neuron pools. The structure that appeared was modular, scale-free and hierarchical, as many natural networks found in nature. Secondly, after decortication or during the 6-OHDA model of Parkinson’s disease functional hubs decreased significantly. As a consequence, transitions and circuit dynamics decreased, metaphorically reminding hypokinesia, and supporting studies that say that corticostriatal communications are disabled in Parkinson’s disease (Hammond et al., 2007). Third, the obvious conclusion of these results was that cortical commands use these functional hubs to organize circuit dynamics and due to distances between neuron clusters forming the ensembles we deduced that hub neurons should be long-axon neurons, that is, interneurons. Finally, in tissue taken from animals where L-DOPA induced dyskinesia was provoked, the opposite was true: the number of hubs, transitions and circuit activity increased, albeit with a lack of order or hierarchy (uncoordinated). Again, it was surprising that the tissue itself, being analyzed at histological scale was so reminiscent of disease properties. In summary, calcium imaging in brain slices showed us that pathophysiology of nervous tissue can be done at the histological scale.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>.

Author contributions

Jesús Pérez-Ortega, Esther Lara-González, Mariana Duhne, made control and decorticated experiments. Victor Plata made 6-OHDA Parkinson’s disease experiments. Deisy Gasca made L-DOPA induced dyskinesia experiments. Jesús Pérez-Ortega developed and implemented custom made software for acquisition and analysis. Jesús Pérez-Ortega, Arturo Hernández-Cruz, Elvira Galarraga and José Bargas developed the original ideas.

Acknowledgments

We thank A. Laville for technical support and advice, X. Ayala, A. Aparicio and C. Rivera-Cerecedo for animal care, and M. Serrano-Reyes for programming some parts of the custom made software. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT México) grants 154131, 260866, and a Frontera-CONACyT grant 57. Grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico of Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM): IN-202914, IN-202814 and IN-211616 to Elvira Galarraga, José Bargas and Arturo Hernández, respectively were also employed. Deisy Gasca was a DGAPA-UNAM Postdoctoral Fellow. Jesús Pérez-Ortega had a CONACyT doctoral fellowship and data in this work are part of his doctoral dissertation in the Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Bakhurin, K.I., Mac, V., Golshani, P., Masmanidis, S.C., 2016. Temporal correlations among functionally specialized striatal neural ensembles in reward conditioned mice. *J. Neurophysiol.* <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01037.2015>.
- Barabási, A.-L., Albert, R., 1999. Emergence of scaling in random networks. *Science* 286, 509–512. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5439.509>.
- Barabási, A.-L., Oltvai, Z.N., 2004. Network biology: understanding the cell’s functional organization. *Nat. Rev. Genet.* 5, 101–113. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1272>.
- Barroso-Flores, J., Herrera-Valdez, M.A., Lopez-Huerta, V.G., Galarraga, E., Bargas, J., 2015. Diverse short-term dynamics of inhibitory synapses converging on striatal projection neurons: differential changes in a rodent model of parkinson’s disease. *Neural Plast.* 2015, 1–13. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/573543>.
- Beatty, J.A., Song, S.C., Wilson, C.J., 2015. Cell-type-specific resonances shape the responses of striatal neurons to synaptic input. *J. Neurophysiol.* 113, 688–700. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00827.2014>.

- Beggs, J.M., Plenz, D., 2003. Neuronal avalanches in neocortical circuits. *J. Neurosci.* 23, 11167–11177.
- Boccaletti, S., Latora, V., Moreno, Y., Chávez, M., Hwang, D., 2006. Complex networks: structure and dynamics. *Phys. Rep.* 424, 175–308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2005.10.009>.
- Brown, S.L., Joseph, J., Stopfer, M., 2005. Encoding a temporally structured stimulus with a temporally structured neural representation. *Nat. Neurosci.* 8, 1568–1576. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1559>.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2008. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01131.2007>.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Ibáñez-Sandoval, O., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Bargas, J., 2009a. Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 101, 737–749. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.90975.2008>.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Vautrelle, N., Hernández, A., Vergara, R., Galarraga, E., Bargas, J., 2009b. Muscarinic enhancement of persistent sodium current synchronizes striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 102, 682–690. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00134.2009>.
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., Bargas, J., 2011. Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* 31, 14972–14983. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3226-11.2011>.
- Carrillo-Reid, L., Miller, J.-E.K., Hamm, J.P., Jackson, J., Yuste, R., 2015a. Endogenous sequential cortical activity evoked by visual stimuli. *J. Neurosci.* 35, 8813–8828. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5214-14.2015>.
- Carrillo-Reid, L., Lopez-Huerta, V.G., Garcia-Munoz, M., Theiss, S., Arbuthnott, G.W., 2015b. Cell assembly signatures defined by short-term synaptic plasticity in cortical networks. *Int. J. Neural Syst.* 25, 1550026. <http://dx.doi.org/10.1142/S0129065715500264>.
- Cenci, M.A., Lundblad, M., 2007. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.n0925s41> (Chapter 9, Unit 9.25).
- Cenci, M.A., Lee, C.S., Björklund, A., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2694–2706.
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., Costa, R.M., 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11846>.
- Czubayko, U., Plenz, D., 2002. Fast synaptic transmission between striatal spiny projection neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15764–15769. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.242428599>.
- Deharter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., Hammond, C., 2009. Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776–7787. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1527-09.2009>.
- Dunnett, S.B., Björklund, A., Stenevi, U., Iversen, S.D., 1981. Grafts of embryonic substantia nigra reinnervating the ventrolateral striatum ameliorate sensorimotor impairments and akinesia in rats with 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Brain Res.* 229, 209–217. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90759-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(81)90759-9).
- Dupre, K.B., Cruz, A.V., McCoy, A.J., Delaville, C., Gerber, C.M., Eyring, K.W., Walters, J.R., 2015. Effects of L-dopa priming on cortical high beta and high gamma oscillatory activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 86, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.11.009>.
- Eichenbaum, H., 2002. *The Cognitive Neuroscience of Memory*. Oxford University Press, Boston.
- Eichenbaum, H.B., Davis, J.L., 1998. Biological neural networks. In: Eichenbaum, H., Davies, J.L. (Eds.), *Neuronal Ensembles*. Wiley-Liss, NY, pp. 1–15.
- Flores-Barrera, E., Vizcarra-Chacón, B.J., Tapia, D., Bargas, J., Galarraga, E., 2010. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front. Syst. Neurosci.* 4, 15. <http://dx.doi.org/10.3389/fnsys.2010.00015>.
- Frégnac, Y., 2003. Hebbian synaptic plasticity. In: Arbib, M. (Ed.), *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. The MIT Press, Cambridge, MA, pp. 515–522.
- Girvan, M., Newman, M.E.J., 2002. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7821–7826. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.122653799>.
- Grillner, S., 1985. Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228, 143–149. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3975635>.
- Grillner, S., 2006. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52, 751–766. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.008>.
- Hammond, C., Bergman, H., Brown, P., 2007. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends Neurosci.* 30, 357–364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2007.05.004>.
- Harris, K.D., 2005. Neural signatures of cell assembly organization. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 399–407. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1669>.
- Hatsopoulos, N.G., Ojakangas, C.L., Donoghue, J.P., 1998. Detection and identification of ensemble codes in motor cortex. In: Eichenbaum, H., Davies, J.L. (Eds.), *Neuronal Ensembles*. Wiley-Liss, NY, pp. 161–175.
- Hebb, D.O., 1949. *The Organization of Behavior*. Wiley, New York.
- Hudson, J.L., Van Home, C.G., Strömberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A., 1993. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res.* 626, 167–174. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90576-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90576-9).
- Huot, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2013. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* 65, 171–222. <http://dx.doi.org/10.1124/pr.111.005678>.
- Hutchison, W.D., Dostrovsky, J.O., Walters, J.R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J., Brown, P., 2004. Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J. Neurosci.* 24, 9240–9243. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3366-04.2004>.
- Huyck, C.R., 2001. Cell assemblies as an intermediate level model of cognition. In: Wemter, S., Austin, J., Willshaw, D. (Eds.), *Emergent Neural Computational Architectures Based on Neuroscience*. Springer, Berlin, pp. 383–397. <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-44597-8>.
- Ibáñez-Sandoval, O., Tecuapetla, F., Unal, B., Shah, F., Koós, T., Tepper, J.M., 2011. A novel functionally distinct subtype of striatal neuropeptide Y interneuron. *J. Neurosci.* 31, 16757–16769. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2628-11.2011>.
- Ikegaya, Y., Aaron, G., Cossart, R., Aronov, D., Lampl, I., Ferster, D., Yuste, R., 2004. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of cortical activity. *Science* 304, 559–564. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1093173>.
- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., Yuste, R., 2005. Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* 52, 132–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2005.02.004>.
- Jáidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernández, A., Drucker-Colín, R., Bargas, J., Hernández-Cruz, A., 2010. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326–11336. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1380-10.2010>.
- Jain, A., Dubes, R., 1988. *Algorithms for clustering data*. Prentice Hall, New Jersey.
- Kalia, L.V., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Kumar, A., Rotter, S., Aertsen, A., 2010. Spiking activity propagation in neuronal networks: reconciling different perspectives on neural coding. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 615–627. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2886>.
- Lansner, A., 2009. Associative memory models: from the cell-assembly theory to biophysically detailed cortex simulations. *Trends Neurosci.* 32, 178–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.002>.
- López-Huerta, V.G., Carrillo-Reid, L., Galarraga, E., Tapia, D., Fiordelisio, T., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2013. The balance of striatal feedback transmission is disrupted in a model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 33, 4964–4975. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4721-12.2013>.
- Marković, D., Gros, C., 2014. Power laws and self-organized criticality in theory and nature. *Phys. Rep.* 536, 41–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physrep.2013.11.002>.
- Markram, H., Muller, E., Ramaswamy, S., Reimann, M.W., Abdellah, M., Sanchez, C.A., Ailamaki, A., Alonso-Nanclares, L., Antille, N., Arsever, S., Kahou, G.A.A., Berger, T.K., Bilgili, A., Buncic, N., Chalimourda, A., Chindemi, G., Courcol, J.-D., Delalandre, F., Delattre, V., Druckmann, S., Dumusc, R., Dynes, J., Eilemann, S., Gal, E., Gevaert, M.E., Ghobril, J.-P., Gidon, A., Graham, J.W., Gupta, A., Haenel, V., Hay, E., Heins, T., Hernando, J.B., Hines, M., Kanari, L., Keller, D., Kenyon, J., Khazen, G., Kim, Y., King, J.G., Kisvarday, Z., Kumbhar, P., Lasserre, S., Le Bé, J.-V., Magalhães, B.R.C., Merchán-Pérez, A., Meystre, J., Morrice, B.R., Muller, J., Muñoz-Céspedes, A., Muralidhar, S., Muthurasa, K., Nachbaur, D., Newton, T.H., Nolte, M., Ovcharenko, A., Palacios, J., Pastor, L., Perin, R., Ranjan, R., Riachi, I., Rodríguez, J.-R., Riquelme, J.L., Rössert, C., Sfyarakis, K., Shi, Y., Shillcock, J.C., Silberberg, G., Silva, R., Tauheed, F., Telefont, M., Toledo-Rodriguez, J., Tränkle, T., Van Geit, W., Diaz, J.V., Walker, R., Wang, Y., Zaninetta, S.M., DeFelipe, J., Hill, S.L., Segev, I., Schürmann, F., 2015. Reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry. *Cell* 163, 456–492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.029>.
- Miller, J.-E.K., Ayzenshtat, I., Carrillo-Reid, L., Yuste, R., 2014. Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4053–E4061. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1406077111>.
- Mountcastle, V.B., 1998. *Perceptual Neuroscience: The Cerebral Cortex*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Newel, A., 1990. *Unified Theories of Cognition*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Newman, M.E.J., 2003. The structure and function of complex networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256.
- Pérez-Ramírez, M.B., Laville, A., Tapia, D., Duhne, M., Lara-González, E., Bargas, J., Galarraga, E., 2015. KV7 channels regulate firing during synaptic integration in GABAergic striatal neurons. *Neural Plast.* 2015, 472676. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/472676>.
- Prieto, G.A., Perez-Burgos, A., Palomero-Rivero, M., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2011. Upregulation of D2-class signaling in dopamine-denervated striatum is in part mediated by D3 receptors acting on Ca V 2.1 channels via PIP2 depletion. *J. Neurophysiol.* 105, 2260–2274. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00516.2010>.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Hernández-Martínez, R., Rueda-Orozco, P., Galarraga, E., Drucker-Colín, R., Bargas, J., 2013a. Global actions of nicotine on the striatal microcircuit. *Front. Syst. Neurosci.* 7, 78. <http://dx.doi.org/10.3389/fnsys.2013.00078>.
- Plata, V., Duhne, M., Pérez-Ortega, J.E., Barroso-Flores, J., Galarraga, E., Bargas, J., 2013b. Direct evaluation of L-DOPA actions on neuronal activity of Parkinsonian tissue in vitro. *Biomed. Res. Int.* 2013, 519184. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519184>.
- Ravasz, E., Barabási, A.-L., 2003. Hierarchical organization in complex networks. *Phys. Rev. E* 67, 026112. <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.67.026112>.
- Reyes, A.D., 2003. Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nat. Neurosci.* 6, 593–599. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1056>.
- Rubinow, M., Sporns, O., Thivierge, J.-P., Breakspear, M., 2011. Neurobiologically realistic determinants of self-organized criticality in networks of spiking neurons. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002038. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002038>.
- Sadovskiy, A.J., MacLean, J.N., 2013. Scaling of topologically similar functional modules defines mouse primary auditory and somatosensory microcircuitry. *J. Neurosci.* 33, 14048–14060. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1977-13.2013>.
- Sanchez-Vives, M.V., McCormick, D.A., 2000. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.* 3, 1027–1034. <http://dx.doi.org/10.1038/79848>.
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.-A., Hervé, D., Greengard, P., Fisone, G., 2007. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-

- regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 27, 6995–7005. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0852-07.2007>.
- Schreiber, S., Fellous, J.-M., Tiesinga, P., Sejnowski, T.J., 2004. Influence of ionic conductances on spike timing reliability of cortical neurons for suprathreshold rhythmic inputs. *J. Neurophysiol.* 91, 194–205. <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00556.2003>.
- Shepherd, G.M., Grillner, S., 2010. *Handbook of Brain Microcircuits*. Oxford University Press, Oxford.
- Sporns, O., Bullmore, E.T., 2014. From connections to function: the mouse brain connectome atlas. *Cell* 157, 773–775. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.023>.
- Stein, E., Bar-Gad, I., 2013. β -oscillations in the cortico-basal ganglia loop during parkinsonism. *Exp. Neurol.* 245, 52–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.07.023>.
- Stephens, B., Mueller, A.J., Shering, A.F., Hood, S.H., Taggart, P., Arbutnot, G.W., Bell, J.E., Kilford, L., Kingsbury, A.E., Daniel, S.E., Ingham, C.A., 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neuroscience* 132, 741–754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.007>.
- Surmeier, D.J., Carrillo-Reid, L.,argas, J., 2011. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* 198, 3–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.051>.
- Tauste Campo, A., Martínez-García, M., Nacher, V., Luna, R., Romo, R., Deco, G., 2015. Task-driven intra- and interarea communications in primate cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 4761–4766. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503937112>.
- Tavema, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J., 2008. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 28, 5504–5512. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5493-07.2008>.
- Telesford, Q.K., Joyce, K.E., Hayasaka, S., Burdette, J.H., Laurienti, P.J., 2011. The ubiquity of small-world networks. *Brain Connect.* 1, 367–375. <http://dx.doi.org/10.1089/brain.2011.0038>.
- Tepper, J.M., Koós, T., Wilson, C.J., 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662–669. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.007>.
- Tunstall, M.J., Oorschot, D.E., Kean, A., Wickens, J.R., 2002. Inhibitory interactions between spiny projection neurons in the rat striatum. *J. Neurophysiol.* 88, 1263–1269.
- Vergara, R., Rick, C., Hernández-López, S., Laville, A., Guzman, J.N., Galarraga, E., Surmeier, D.J.,argas, J., 2003. Spontaneous voltage oscillations in striatal projection neurons in a rat corticostriatal slice. *J. Physiol.* 553, 169–182. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.050799>.
- Vizcarra-Chacón, B.J., Arias-García, M.A., Pérez-Ramírez, M.B., Flores-Barrera, E., Tapia, D., Drucker-Colin, R.,argas, J., Galarraga, E., 2013. Contribution of different classes of glutamate receptors in the corticostriatal polysynaptic responses from striatal direct and indirect projection neurons. *BMC Neurosci.* 14, 60. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-14-60>.
- Wilson, C., Kawaguchi, Y., 1996. The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 2397–2410.
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., Cenci, M.A., 2002. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.* 10, 165–186. <http://dx.doi.org/10.1006/nbdi.2002.0499>.