



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE ENSAMBLES  
NEURONALES EN LA CORTEZA MOTORA DEL  
RATÓN: CAMBIOS DESPUÉS DEL BLOQUEO  
GABAÉRGICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ING. MIGUEL SERRANO REYES**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. SALVADOR HERNÁNDEZ LÓPEZ**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO. NOVIEMBRE, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Bargas Díaz, por todo el apoyo que me brindó, por la amistad, por tomarse siempre el tiempo de atender mis inquietudes, por ser tan generoso con su conocimiento y motivarme a aprender más cada día.

A Brisa, por todo el apoyo y disposición que siempre tuviste para convertirme en una mejor persona. Los mejores momentos del doctorado los vivimos juntos.

A mi familia, porque ocupan un lugar muy importante en mis pensamientos y porque fueron el apeo en mi educación.

A mis colaboradores, Dra. Elvira Galarraga, Dr. Jesús Pérez Ortega, Biol. Rosa Reyes Chaperó, Dra. Verónica Alejandra Cáceres Chávez, Biol. Dagoberto Tapia y Fis. Antonio Laville, porque sin ellos este trabajo simplemente no se hubiera completado.

A la M.V.Z. Claudia V. Rivera, al M.V.Z. Héctor Malagón Rivero, la M.C. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez y la Dra. Ariadna Aparicio Juárez por el apoyo en el cuidado y manejo de animales.

A la unidad de cómputo del IFC, Ana María Escalante Gonzalbo y a Francisco Pérez Eugenio.

A los ingenieros del Taller de Mantenimiento del IFC, UNAM: el Ing. Aurey Galván Lobato y el Ing. Manuel Ortíz Benavides por su apoyo y asesoría en el mantenimiento y operación de los equipos de Investigación del Laboratorio.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Fisiología Celular

Al CONACyT por la beca 305936

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
Antecedentes .....	5
Mecanismos fisiopatológicos de las crisis epilépticas .....	6
La hipótesis de los ensamblajes neuronales .....	10
Aplicaciones de la teoría de redes en neurociencias .....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
HIPÓTESIS .....	12
OBJETIVOS .....	14
MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
Uso y cuidado de animales .....	15
Infección viral .....	15
Preparación de las rebanadas .....	16
Registros de patch-clamp .....	17
Inmunohistoquímica .....	17
Imagenología de calcio .....	18
Análisis de imágenes .....	19
Detección de actividad neuronal a partir de imagenología de calcio..	19
Registros extracelulares con arreglos de multielectrodos (MEA) .....	20
Detección de actividad neuronal en registros extracelulares de MEA .....	20
Detección de ensamblajes neuronales .....	21
Análisis de redes .....	22
Análisis estadístico .....	23

RESULTADOS .....	24
Arquitectura funcional de la dinámica espontánea en la corteza motora del ratón .....	24
Participación de las interneuronas PV+ en los ensambles Neuronales .....	28
Participación de las interneuronas PV+ durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs) .....	31
Registros extracelulares mediante arreglos de multielectrodos (MEA) durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs) .....	37
Actividad neuronal durante la aparición de descargas epileptiformes interictales (IEDs) .....	40
Caracterización morfológica y electrofisiológica de neuronas registradas durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs) .....	42
Diferencias en la duración de los grupos neuronales identificados durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs) .....	44
DISCUSIÓN .....	46
Configuración de red estándar en tejido cortical en reposo .....	47
Reestructuración de la arquitectura funcional cortical tras el bloqueo GABAérgico .....	49
CONCLUSIÓN .....	52
REFERENCIAS .....	53
ARTÍCULO PUBLICADO .....	62
VIDEOS SUPLEMENTARIOS .....	84

# RESUMEN

El estudio del conectoma cerebral, desde el punto de vista anatómico y funcional, ha permitido desarrollar nuevos abordajes experimentales y obtener nuevos aportes teóricos en diferentes áreas de las neurociencias. Particularmente, en el área de la fisiopatología, se han descrito alteraciones tanto estructurales como funcionales de las neuronas bajo distintas condiciones, como la Enfermedad de Parkinson, la Epilepsia, entre otras. Actualmente existen muchas aproximaciones que intentan describir estos procesos analíticamente, uno de ellos, y el utilizado en el presente trabajo, es la teoría de redes complejas, que permite mediante parámetros representar el comportamiento de microcircuitos neuronales en diferentes condiciones (no solo patológicas) a nivel histológico. Hoy en día, es ampliamente aceptado por la comunidad científica que las neuronas no realizan sus funciones de manera aislada, sino que lo hacen formando pequeños grupos, las neuronas pertenecientes a estos ensambles suelen responder juntas ante una cierta clase de estímulos. De la interacción de estos ensambles neuronales podría surgir el sustrato neuronal de memorias, secuencias motoras, procedimientos, rutinas, etc. Este estudio muestra la presencia de estos ensambles en la corteza motora in vitro del ratón de manera espontánea, es decir, sin necesidad de estimular el tejido, mediante imagenología de calcio con GCaM6f expresado bajo el promotor de sinapsina (solo expresado en neuronas). Estos ensambles neuronales muestran diferentes secuencias temporales de activación, generando lo que parece ser un modo de conducción de la información predeterminado en la corteza cerebral. Además, con la ayuda de animales transgénicos PV-Cre (PV, parvalbúmina) y el marcador fluorescente td-Tomato encontramos que cada uno de los distintos ensambles neuronales en el tejido va acompañado de su propio subconjunto de interneuronas GABAérgicas (PV+). Cuando se bloquea la transmisión GABAérgica mediante la aplicación de Bicuculina y un ambiente bajo en Magnesio, las secuencias temporales de los ensambles colapsan en un evento sincrónico y recurrente, lo que demuestra la necesidad de la inhibición para codificar la actividad

cortical espontánea y muy probablemente en otras condiciones experimentales más complejas. Estos eventos tienen la duración y características electrofisiológicas de descargas epileptiformes interictales (IEDs), registros que se observan en los electroencefalogramas de personas diagnosticadas con Epilepsia entre cada crisis convulsiva. La estabilidad de la actividad neuronal requiere tanto de las sinapsis excitatorias como de las inhibitorias, la acción de estas últimas promueve la riqueza de patrones en la actividad neuronal al ser ellas las responsables de la inhibición recíproca entre ensambles, aunque el presente trabajo no explora todas las diferentes condiciones experimentales para completamente asegurar dicha funcionalidad, si aporta evidencia en apoyo a ella. Juntas, estas herramientas matemáticas y experimentales ayudan a mejorar nuestro entendimiento sobre las interacciones de la actividad neuronal a una escala poblacional.



# ABSTRACT

The study of the brain connectome, from the anatomical and functional point of view, has made it possible to develop new experimental approaches and obtain new theoretical contributions in different areas of neuroscience. Particularly, in pathophysiology, both structural and functional alterations of neurons have been described under different conditions, such as Parkinson's disease, Epilepsy, among others. Currently there are many approaches that attempt to describe these processes analytically, one of them, and the one used in the present work, is the theory of complex networks, which allows to represent the behavior of neuronal microcircuits in different conditions (not only pathological) at the histological level. Nowadays, it is widely accepted by the scientific community that neurons do not perform their functions in isolation, but rather in small groups. The neurons belonging to these ensembles usually respond together to a certain kind of stimulus. From the interaction of these neuronal ensembles, the neuronal substrate of memories, motor sequences, procedures, routines, etc. could arise. This study shows the presence of these ensembles in the in vitro mouse motor cortex spontaneously, that is, without the need to stimulate the tissue, using calcium imaging with GCaM6f expressed under the synapsin promoter (only expressed in neurons). These neuronal ensembles show different time sequences of activation, generating what appears to be a predetermined information conduction mode in the cerebral cortex. Furthermore, with the help of transgenic animals PV-Cre (PV, parvalbumin) and the fluorescent marker td-Tomato we found that each of the different neuronal ensembles in the tissue is accompanied by its own subset of GABAergic interneurons (PV+). When GABAergic transmission is blocked by the application of Bicuculline and a low magnesium environment, the temporal sequences of the ensembles collapse in a synchronous and recurrent event, demonstrating the need for inhibition to encode spontaneous cortical activity and most likely in other more complex experimental conditions. These events have the duration and electrophysiological characteristics of interictal epileptiform discharges (IEDs),

records that are observed in the electroencephalograms of people diagnosed with epilepsy between each seizure. The stability of neuronal activity requires both excitatory and inhibitory synapses, the action of the latter promotes the richness of patterns in neuronal activity as they are responsible for the reciprocal inhibition between ensembles, although the present work does not explore others different experimental conditions to fully ensure, it provides evidence in support of it. Together, these mathematical and experimental tools help improve our understanding of the interactions of neural activity on a population scale.

# INTRODUCCIÓN

## Antecedentes

La comprensión de un fenómeno no puede ser completa sin la vuelta a sus orígenes, o las ideas iniciales. En el último siglo una gran cantidad de estudios se han enfocado en describir las características estructurales y funcionales de la corteza cerebral. Solo basta ver una disección de un cerebro para darnos cuenta de nuestra ignorancia, diversas estructuras comunicándose mediante cientos de fibras que llegan y salen de regiones distintas y realizando sus funciones. Una hipótesis sostiene que las neuronas de los vertebrados no realizan sus funciones de forma aislada, sino que están inmersas en complejas redes de ensambles neuronales que se activan y propagan secuencialmente. Al interactuar entre sí, estos ensambles constituyen los grandes subsistemas encargados de funciones cognitivas superiores en el cerebro. (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Beggs y Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004; Luczak et al., 2007; Pastalkova et al., 2008; Markram et al., 2015; Dechery y MacLean, 2017; Carrillo-Reid, 2020). La mayoría de estos estudios involucran tareas sensoriales, motoras o de toma de decisiones y se han realizado tanto en la corteza como en otras regiones del cerebro (Carrillo-Reid et al., 2008; 2016; Buzsáki, 2010; Churchland et al., 2012; Harvey et al., 2012; Peters et al., 2014; Gründemann et al., 2019). Estos aportes han permitido relacionar la actividad de estos grupos de neuronas con funciones específicas en el cerebro.

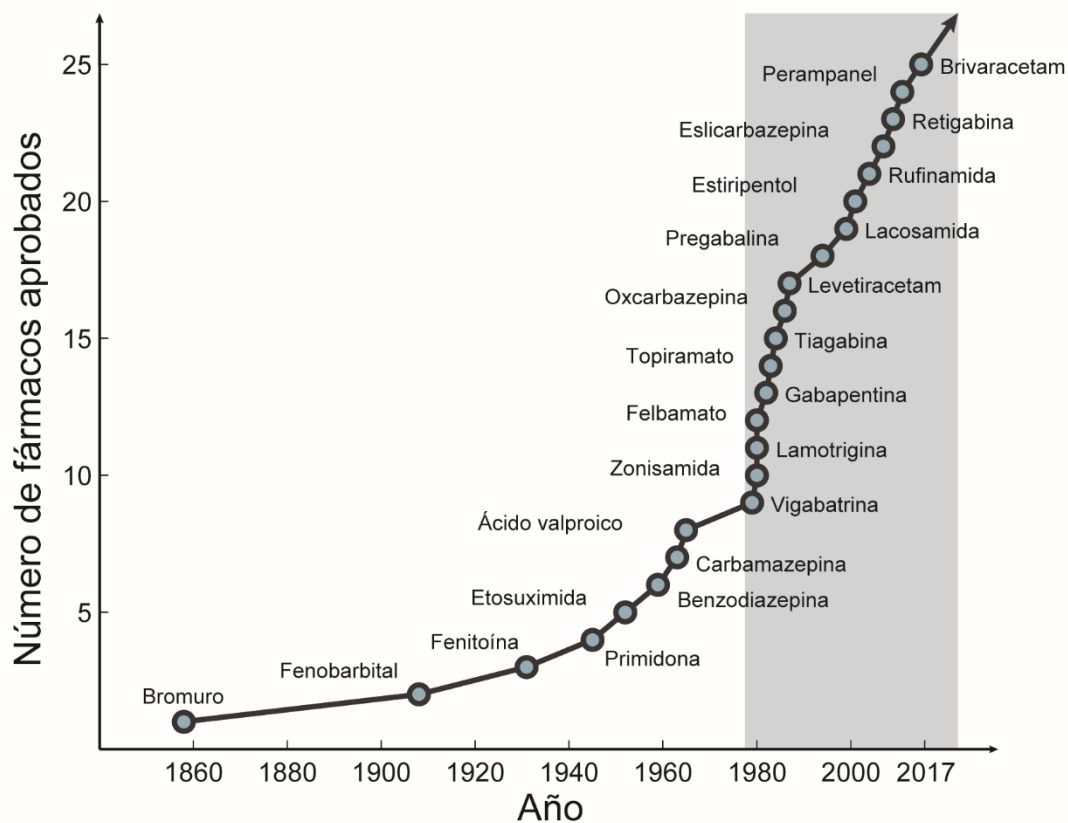
En lo que sabemos, el presente trabajo muestra por primera vez evidencias de la capacidad del tejido cortical del ratón para generar de manera espontánea actividad correlacionada de grupos de neuronas que se activan de manera secuencial y que reverberan durante varios minutos. Este tipo de patrón espontáneo puede ser un modelo de cómo la actividad local persiste a través de circuitos corticales sin estímulo. Equivaldría en el nivel histológico a la actividad en *default mode* de la corteza completa (Luczak et al., 2007; Dechery y MacLean, 2017). Esto es, la corteza siempre está haciendo algo, aún en el tejido aislado. Además, abordamos

el papel de las interneuronas inhibitorias, en particular, las células que expresan parvalbúmina (PV+) también conocidas como interneuronas de disparo rápido (FSI, *Fast Spiking Interneurons*) durante la actividad del microcircuito, dada su participación en oscilaciones fisiológicas y patológicas, y su especial relación con la epileptogénesis ([Avoli y de Curtis, 2011](#); [Huberfeld et al., 2011](#); [Muldoon et al., 2013, 2015](#); [Hongo et al., 2015](#); [Serafini et al., 2016](#); [Smith y Schevon, 2016](#)). Usamos ratones PV-Cre para identificar interneuronas PV+ en la corteza motora. De esta forma, una vez establecidas las propiedades de control de la corteza motora del roedor, se procedió a realizar una manipulación farmacológica para enfocar el estudio en describir cómo se modifica la participación de las interneuronas PV+ en eventos epileptiformes.

## **Mecanismos fisiopatológicos de las crisis epilépticas**

Un cerebro epiléptico es siempre un cerebro disfuncional. En todo el mundo hay alrededor de 65 millones de personas que padecen epilepsia y, aunque se tienen descripciones de la enfermedad de más de 4000 años, su estudio científico tanto como su terapéutica comienzan en el siglo XIX. Una definición clínica común plantea que la epilepsia es una enfermedad provocada por la alteración de alguna zona del cerebro que deja una predisposición a padecer convulsiones recurrentes que pueden dar lugar a consecuencias cognitivas, neurobiológicas y psicológicas ([Ngugi et al., 2010](#)). Se trata de comprender los procesos fisiopatológicos que inducen esta enfermedad en el cerebro, lo que se conoce como epileptogénesis, así como la dinámica del circuito cerebral afectado durante una descarga epiléptica ([Huberfeld et al., 2011](#)). Estas descargas epilépticas, registradas mediante el electroencefalograma (EEG), o electrodos superficiales o de campo sobre el tejido cerebral (LFP o *local field potentials*), son eventos eléctricos complejos, en los cuales se observan cuando menos tres patrones principales de actividad: las descargas ictales (crisis paroxísticas o ictus), pueden durar varios segundos y hasta minutos, como eventos de alta frecuencia y que inducen signos y síntomas que

dependen de la región cerebral donde se localicen (Huberfeld et al., 2011). Las descargas preictales son eventos que preceden a las crisis convulsivas y que suelen aparecer en zonas cercanas a los focos de actividad epiléptica (Wolf y Beniczky, 2014). Por último, las descargas epileptiformes interictales (IEDs), que se generan entre los periodos entre crisis en zonas relativamente lejanas a los focos epilépticos, suelen ser ráfagas de corta duración por lo general asintomáticas (Brückner y Heinemann, 2000; de Curtis et al., 2012) pero que si aparecen en un EEG de rutina o control, alertan al médico de que el proceso de epileptogénesis está en marcha, por lo que generalmente se inicia vigilancia y medicación. Mientras se presenten las IEDs, no se puede decir que el cerebro se ha curado.



**Figura 1.** Desarrollo de fármacos anticonvulsivantes en la edad moderna. La parte sombreada señala los fármacos que surgen a raíz del advenimiento de investigaciones electrofisiológicas en tejido cerebral mantenido in vitro, obtenido por lo general de modelos animales (Löscher, 2016).

Para intentar comprender los mecanismos de las descargas epileptiformes se han desarrollado modelos in vitro útiles para reproducir y modelar estos eventos.

Algunas preparaciones utilizan estimulación eléctrica, fármacos convulsivos, cambios en el entorno iónico extracelular, o combinaciones de estos, para generarlos (Avoli y Jefferys, 2016). El avance en este esfuerzo ha ido de la mano de las tecnologías disponibles en distintas épocas, por ejemplo, desde que surgieron los estudios electrofisiológicos en estas preparaciones, las opciones farmacológicas para el tratamiento de la epilepsia han aumentado de forma considerable (Figura 1). Hoy en día hay muchas nuevas técnicas en neurociencias que permiten realizar experimentos para contestar preguntas relacionadas a la evolución fisiopatológica de esta enfermedad.

Las crisis epilépticas pueden aparecer por distintos motivos, sin embargo, algunas son de origen genético y otras son adquiridas, aunque muchas veces suele haber combinaciones de ambos factores (Berkovic et al., 2006). La epilepsia adquirida se puede desarrollar después de una lesión cerebral focal y su correspondiente respuesta inflamatoria. Como resultado, aparecen primeramente las IEDs, que evidencian la sincronización de grandes poblaciones de neuronas. Las IEDs pueden no provocar episodios ictales o convulsiones, aunque se ha demostrado que pueden provocar discapacidades cognitivas y de memoria (Binnie, 2003; Holmes y Lenck-Santini, 2006; Zhou et al., 2007; Mosbah et al., 2014). Se hipotetiza que si estos eventos se repiten pueden establecerse nuevas sinapsis mediante potenciación de largo plazo, si esto sucede así, se formarían ensamblajes neuronales patológicos que llevarían inevitablemente a la cronicidad (Holmes, 2004). Por otro lado, se ha postulado que las IEDs son impulsadas por interneuronas GABAérgicas sincronizadas, mientras que se cree que los eventos preictales e ictales tienen una mayor contribución de neuronas glutamatérgicas (Derchansky et al., 2008; Huberfeld et al., 2011; Karlócai et al., 2014; Chang et al., 2018; Lévesque et al., 2018). Sin embargo, faltan estudios que ahonden en las relaciones de red cuantitativas entre las neuronas excitadoras e inhibitoras durante las IEDs.

Otra forma de generar descargas epileptiformes puede darse debido a la inducción de corrientes entrantes a través de canales de Na<sup>+</sup>, NMDA y Ca<sup>2+</sup> mediante fármacos despolarizantes que afectan a varias neuronas; por ejemplo, al utilizar

agonistas colinérgicos. En estos casos, las ráfagas de actividad durante los eventos despolarizantes conjuntos reclutan interneuronas inhibitorias, causando flujos masivos de  $\text{Cl}^-$  intracelular. El cotransportador  $\text{K}^+\text{Cl}^-$ -KCC<sub>2</sub> se satura y no puede mantener bajos los niveles de  $\text{Cl}^-$  intracelular por lo que el potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  se invierte, y produce una respuesta bifásica: a la inhibición inicial le sucede una despolarización GABAérgica debida en parte a una corriente de  $\text{HCO}_3^-$ . El cotransportador saca de forma masiva el exceso de  $\text{Cl}^-$  intracelular, pero a expensas de aumentar la concentración externa de  $\text{K}^+$ . Todo lo anterior produce despolarizaciones prolongadas de alta frecuencia, la llamada descarga paroxística, hasta que se cae en periodo refractario. Como se ve, este mecanismo hace disfuncional la inhibición debido a la despolarización masiva inicial ([Huberfeld et al., 2013](#)) dada por las propias interneuronas inhibitorias.

Por otro lado, si se hace disfuncional a la inhibición desde un principio, también se producen descargas epileptiformes agudas. Esto se puede lograr usando fármacos que bloquean al receptor GABAérgico, tales como la bicuculina. Esto favorece a la excitación y por tanto a la despolarización neuronal. Otras manipulaciones farmacológicas que se pueden utilizar son: altos niveles extracelulares de  $\text{K}^+$ , bajo  $\text{Mg}^{2+}$ , bajo  $\text{Ca}^{2+}$ , 4-aminopiridina, alcalinización, pilocarpina, etc. ([Avoli y Jefferys, 2016](#)). En nuestro caso usamos líquido cefalorraquídeo artificial libre de  $\text{Mg}^{2+}$  en presencia de bicuculina ([Cohen et al., 2006](#); [de la Prida et al., 2006](#); [Hongo et al., 2015](#)) sin ningún tipo de estimulación, este modelo afecta principalmente la transmisión GABAérgica e induce eventos similares a las IEDs. Sin embargo, este modelo no induce eventos ictales ([Huberfeld et al., 2011](#); [Karlócai et al., 2014](#)), lo que brinda la oportunidad de estudiar las IEDs de forma aislada en un lapso de tiempo prolongado, para así observar mejor la actividad subyacente de múltiples unidades con resolución de célula única y, de esta manera, separar la participación de las distintas poblaciones neuronales que se puedan identificar con ayuda de animales transgénicos ([Avoli y de Curtis, 2011](#); [Avoli et al., 2013](#)).

La población de neuronas que mayor interés ha generado en el estudio de las IEDs son las interneuronas PV+. Existen dudas sobre si su participación durante estos

eventos protege de o precipita las crisis ictales (de Curtis et al., 2012). Algunas investigaciones muestran que su activación previene la propagación y duración de las convulsiones (Camarota et al., 2013; Krook-Magnuson et al., 2013). Por el contrario, la estimulación optogenética de las interneuronas promueve eventos de tipo ictal (Sessolo et al., 2015; Khoshkhoo et al., 2017; Chang et al., 2018) lo que implica la transmisión GABAérgica en su generación. En este trabajo usamos técnicas de registro multiunitario que permiten dilucidar el rol de las neuronas PV+ y PV- en situación control y durante la generación de IEDs en la corteza motora de ratón.

## La hipótesis de los ensamblajes neuronales

Los ensamblajes neuronales son grupos de neuronas que funcionalmente trabajan en conjunto, un patrón coordinado de actividad neuronal cumpliendo una función biológica y que pueden ser el resultado de la plasticidad sináptica de las neuronas individuales al interactuar entre sí. Los microcircuitos neuronales estarían formados por ensamblajes neuronales interconectados en virtud de que las sinapsis que más se usan se refuerzan (potenciación de largo plazo) y las que menos se usan se debilitan (depresión de largo plazo), por lo que se generan vías preferentes, o microcircuitos, para la conducción de la actividad (Hebb, 1949; Churchland, 2002). Esta hipótesis intenta explicar la dinámica de los circuitos neuronales normales; lo que fluye por la red neuronal es el disparo sincronizado o correlacionado de grupos o ensamblajes de neuronas. Estos se asocian o se disocian propagando la actividad que puede ser recurrente, alternante y reverberante y están en cambio continuo (Sheperd y Grillner, 2010). Diferentes circuitos poseen neuronas con genotipo y fenotipo particulares, lo que origina propiedades intrínsecas y sinápticas diferentes interconectadas de manera modular e iterativa. Cuando la evolución selecciona módulos celulares que trabajan de manera coordinada y estos tienen valor adaptativo, estos tienden a multiplicarse y variar (Dehaene et al., 2017). Los ensamblajes neuronales de tipo Hebbiano son un tipo de multiplicación exaptativa de módulos programados genéticamente donde el aprendizaje y la epigenética



amplifican la variación. Esta infraestructura hace un modelo dinámico y global de sí misma, que hace simulaciones y planes de sus percepciones y acciones pasadas, presentes y futuras en un espacio de trabajo que llamamos conciencia ([Bargas y Pérez-Ortega, 2017](#)).

Numerosos trabajos han mostrado que en el tejido neuronal pueden observarse secuencias temporales de ensamblajes neuronales que se alinean a la conducta y correlacionan con el comportamiento ([Carrillo-Reid et al., 2008; 2016; Buzsáki, 2010; Churchland et al., 2012; Harvey et al., 2012; Cui et al., 2013; Miller et al., 2014; Peters et al., 2014; Bakhurin et al., 2016; Gründemann et al., 2019](#)). Con esta evidencia se ha propuesto que las secuencias generadas por este tipo de actividad neuronal son las posibles responsables de codificar memorias, actos motores, percepciones, conceptos, procedimientos, rutinas, entre otras funciones cognitivas superiores ([Harris, 2005](#)). Sin embargo, al tratarse de un sistema complejo, su comportamiento general muy probablemente no pueda ser explicado por la simple suma de sus partes, se requieren nuevas aproximaciones tanto analíticas como experimentales para ser capaces de caracterizarlos. El presente trabajo combina el uso de animales transgénicos, imagenología de calcio, registro con multielectrodos, análisis exploratorio de datos y teoría de redes para intentar comprender cómo los ensamblajes neuronales de la corteza motora de ratón transitan de una situación de actividad espontánea control a una condición patológica (IEDs).

## **Aplicaciones de la teoría de redes en neurociencias**

El resurgimiento de la teoría de redes en el campo de las neurociencias en las últimas décadas obedece a la necesidad de describir matemáticamente, comprender, predecir y eventualmente controlar la intrincada red neuronal que codifica las interacciones entre los componentes del sistema nervioso. Las redes explicadas de la manera más sencilla posible son puntos unidos por líneas, matemáticamente habría que hablar de conjuntos de nodos (puntos) y enlaces (líneas) que marcan la pauta de las relaciones que existen entre los nodos

([Barabási, 2016](#)). Las redes son quizá una de las más influyentes técnicas de análisis durante el siglo XXI, solo hay que observar el cambio en la forma de vida de las personas que las redes sociales (Facebook, Twitter, Google, etc) han impuesto. La Teoría de Redes está siendo usada en múltiples áreas del conocimiento, principalmente porque de una manera relativamente sencilla son capaces de describir interacciones complejas en los sistemas dinámicos ([Sporns, 2005](#)).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han diseñado técnicas para describir la actividad de los microcircuitos neuronales y se han descrito algunos de sus componentes en el neocórtex ([Carrillo-Reid et al., 2008](#); [Pérez-Ortega et al., 2016](#); [Duhne et al., 2020](#)) y en la corteza cerebral ([Cui et al., 2013](#); [Markram et al., 2015](#); [Gründemann et al., 2019](#)). Sin embargo, todavía hace falta entender cómo funcionan estos circuitos de pequeña escala, habría que poder observar su dinámica temporal y su estructura intrínseca, describir sus reglas de funcionamiento y como participan los diferentes tipos neuronales en sus patrones de actividad. La razón por la que queremos identificar a las neuronas que los componen es que nos permitiría entender la formación de los ensambles neuronales y los circuitos que generan a un nivel histológico o de mesoescala. Cuando el análisis se queda a nivel de celular se pueden describir múltiples fenómenos interesantes, pero no se puede saber a cuál de ellos, o en qué momento, son importantes para la actividad del circuito completo.

## HIPÓTESIS

Existe mucha evidencia que apoya la hipótesis de que las neuronas trabajan en conjunto para realizar funciones puntuales en el cerebro ([Carrillo-Reid y Yuste, 2020](#)). Estas interacciones suelen describirse como relaciones funcionales, es decir,

mediante el registro de actividad estadísticamente significativa durante la ejecución de una tarea en particular (Sheng et al., 2019; Sun et al., 2020; Siegle et al., 2021), bajo una condición patológica específica (Pérez-Ortega et al., 2016, Aparicio-Juárez et al 2019) o bajo un estado previamente definido en el tejido in vitro (Carrillo-Reid et al., 2008, Bruno et al., 2015). Aún esta pendiente corroborar en la mayoría de estos estudios que dichas relaciones funcionales sean también relaciones estructurales, en otras palabras, que existan conexiones físicas entre estas neuronas unidas funcionalmente (Siegle et al., 2021). Estos grupos de neuronas pueden ser iterativos, pueden asociarse o disociarse, están organizados de manera jerárquica y componen a los llamados microcircuitos cerebrales formando ciclos de actividad reverberante (secuencias de activación), reorganizando estos circuitos dinámicamente (Hebb 1943; Abeles, 1991; Carrillo-Reid y Yuste, 2020). Han recibido varios nombres en la literatura, en este trabajo nosotros los llamamos ensamblajes neuronales. Estos ensamblajes deberían observarse en tejido in vitro sin estimulación (actividad espontánea), en el ratón vivo probablemente jugaban algún papel en el procesamiento de información. Asimismo, es muy probable que distintos tipos neuronales participen de manera diferencial en la activación de estos ensamblajes neuronales como se ha mostrado en la medula espinal, donde las interneuronas coordinan la actividad de los microcircuitos (Wang et al., 2009, Zavvarian et al., 2020). En particular, las interneuronas PV+ por sus características fisiológicas, su número y su distribución en la corteza cerebral, estarían entre las encargadas de regular las secuencias de activación de los distintos ensamblajes neuronales. Al perturbar el funcionamiento de este tipo neuronal deberían observarse modificaciones en la dinámica general del microcircuito (Mongillo et al., 2018). Como se ha observado en otros núcleos cerebrales (Pérez-Ortega et al., 2016; Aparicio-Juárez et al 2019), esperamos la aparición de un tipo de actividad patológica consistente en un patrón de disparo repetitivo que anula la dinámica de los ensamblajes neuronales presentes en el tejido (ensamble dominante).

# OBJETIVOS

- Caracterizar in vitro, con ayuda de animales transgénicos, la dinámica poblacional espontánea y bajo el bloqueo GABAérgico en la corteza motora del ratón, registrando decenas de neuronas simultáneamente utilizando imagenología de calcio, multiarreglos de electrodos y registros individuales cuando sea necesario.
- Establecer si hay grupos de neuronas que sincronizan o correlacionan su disparo.
- Observar si estos grupos de neuronas generan secuencias temporales alternando su actividad.
- Describir si la dinámica de los microcircuitos neuronales delimita ciclos de actividad reverberante y si lo hace, cómo se comportan.
- Buscar patrones de actividad en las neuronas con mayor número de conexiones (hubs) que puedan explicar las transiciones entre estados o el mantenimiento de la actividad en ellos.
- Entender estos patrones identificando elementos específicos en las redes que estudiamos.
- Describir posibles diferencias entre las características de las redes formadas en las distintas capas de la corteza motora del ratón.
- Describir la participación de las interneuronas de disparo rápido (PV+) en la generación de los vectores neurales de la corteza.
- Caracterizar la red neuronal mediante determinados parámetros usados en la Teoría de Redes en el tejido control y patológico.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Uso y cuidado de animales

Se adquirieron ratones B6; 129P2-Pvalb<sup>tm1 (cre)</sup> Arbr/J (stock JAX: 017320, [Hippenmeyer et al., 2005](https://www.jax.org/)) de Jackson Laboratories (<https://www.jax.org/>), el apareamiento fue llevado a cabo entre ratones homocigotos. Los ratones heterocigotos hembras y machos se retrocruzaron cada cinco generaciones con nuestros ratones C57BL/6 NHsd de origen silvestre y luego se cruzaron con sus compañeros de camada para obtener ratones homocigóticos como es recomendado (<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2018/april/how-to-refresh-your-mutant-or-transgenic-mouse-strains>). Se utilizaron un total de 36 machos y hembras para todos los grupos experimentales. Los experimentos in vitro se realizaron en ratones *knockin* PV-Cre de ambos sexos en los días postnatales (DP) 40-50. Cumplimos con las pautas internacionales para el uso ético de animales para experimentación establecidas en la National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals Eighth Edition (NIH, 2010). Los protocolos detallados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM-062-Z00-1999; protocolos de laboratorio JBD-59-15). Todos los animales fueron alojados en una habitación libre de patógenos con temperatura controlada, en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h, y se les permitió comida y agua ad libitum, minimizando el número de animales para lograr significancia estadística y evitar el sufrimiento animal.

## Infeción viral

Se realizaron cirugías estereotáxicas en el DP 21 inyectando 0.5  $\mu$ L de vectores virales con una aguja dental en las coordenadas: Bregma, AP +1.5 mm, ML -1.2 mm y DV +1.2 mm, a una tasa de 0.1  $\mu$ L/min para coexpresar pAAV.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 (expresión en todas las neuronas) y AVV pCAG-

FLEX-tdTomato-WPRE (expresión en neuronas PV+). Las diluciones de coexpresión fueron siempre 1: 1 para los registros de imágenes de calcio (n = 13 animales; [Chen et al., 2013](#); [Oh et al., 2014](#)). Para realizar las cirugías, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de solución de ketamina/xilacina (85/15 mg/kg). Se tomaron varias medidas para minimizar el dolor y la incomodidad. Para la cirugía estereotáxica, se colocaron lágrimas artificiales en los ojos de los ratones para evitar daños. La temperatura corporal se moduló con una almohadilla térmica hasta que el animal se recuperó por completo. Durante este período, los ratones recibieron gránulos de chocolate ad libitum y se administraron inyecciones diarias subcutáneas de 100  $\mu$ l de glucosa al 2% en solución salina si se detectaba una pérdida de peso superior al 20%. El 80% de los ratones infectados sobrevivieron.

## Preparación de las rebanadas

Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con ketamina/xilazina (85/15 mg/kg) y se perfundieron con una solución salina fría que contenía (en mM): 2.5 KCl, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1.44 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 dextrosa, 4.5 piruvato, 0.28 ácido ascórbico y 234 sacarosa (300 mOsm/L, pH 7.4), esta solución fue continuamente gaseada con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> para extraer sus cerebros conservando la viabilidad celular. Se obtuvieron rebanadas parasagitales de cerebro (250  $\mu$ m de espesor) usando un vibratomo (Pelco, Ted Pella, Redding, CA, USA). Posteriormente, las rebanadas se transfirieron a una solución salina que contenía (en mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 dextrosa, 0.2 tiourea y 0.2 ácido ascórbico (300 mOsm/L, pH 7.4) a temperatura ambiente durante al menos 1 h antes de realizar experimentos in vitro. Durante todos los tratamientos, la solución salina que contenía las rebanadas se gaseó continuamente con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 32 °C (TC02, Multichannel Systems, SE. Harvard Bioscience, Inc.).

## Registros de patch-clamp

Se realizaron registros de patch-clamp en la modalidad de célula entera en neuronas piramidales e interneuronas PV+ marcadas con td-Tomato en la capa 5 de la corteza motora utilizando micropipetas hechas con vidrio de borosilicato (3-6 M $\Omega$ ) llenas con (en mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>3</sub>GTP y 1% de biocitina. Las señales se adquirieron con un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Las señales se digitalizaron a 10 kHz usando una tarjeta AT-MIO-16E4 (National Instruments, Austin, TX, USA) y se guardaron en una computadora PC usando el *software* Im-Patch© (<http://impatch.ifc.unam.mx/>). Se descartaron las neuronas cuya resistencia de acceso cambió más del 20% durante los registros. La duración de la meseta de las ráfagas de potenciales de acción (PAs) se calculó midiendo el tiempo transcurrido desde el primero hasta el último potencial de acción (Arias-García et al., 2018).

## Inmunohistoquímica

Después de los registros de patch-clamp, las rebanadas de cerebro se fijaron en paraformaldehído al 4% y ácido pícrico saturado al 1% en buffer de fosfato 0.1 M (PB; pH = 7.4) a 4 °C. Las células llenas de biocitina se visualizaron incubando las rebanadas en estreptavidina-Cy3 o conjugado FITC (Invitrogen) 1: 200 en PBS que contenía Triton X-100 (PBS-Tx) al 0.3% durante toda la noche a 4 °C. Para visualizar mediante inmunohistoquímica las neuronas PV+ se extrajeron los cerebros y se fijaron posteriormente durante 24 h en paraformaldehído al 4% en PBS, antes de ser criopreservados en sacarosa al 30% a 4 °C. A continuación, los cerebros se cortaron en un vibratomo en rebanadas de 40  $\mu$ m. Las rebanadas se incubaron primero 30 min con albúmina bovina al 1% para bloquear sitios de unión inespecíficos y durante 24 h con un anticuerpo anti-PV de conejo (anti-PV 1: 2000 Abcam) disuelto en PBS que contenía Triton-X al 0.25 %. Posteriormente, las rebanadas se enjuagaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo

secundario de cabra frente a conejo (1: 200) durante 1 h. Los anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia incluían fluoresceína (FITC)-conjugado anti-conejo IgG (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) para detectar el anticuerpo anti-PV (Ibáñez-Sandoval et al., 2006). Todas las secciones se montaron en medio Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes se adquirieron con un microscopio de barrido láser confocal LSM700 Zeiss (Zeiss, Gottingen, Alemania). Se recopilaron imágenes confocales de una sola sección (1024x1024) y se exportaron al formato de archivo TIFF (Ibáñez-Sandoval et al., 2016).

## Imagenología de calcio

Se obtuvieron imágenes de señales espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  en capas profundas de la corteza motora no estimulada. Las secuencias de imágenes (películas) se capturaron con un microscopio (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA, USA) equipado con un objetivo de inmersión en agua de 10x, 0.3 NA a una tasa de adquisición de seis fotogramas por segundo. Se utilizó una fuente de luz Lambda LS (Sutter instruments, Petaluma, CA) acoplado a filtros de emisión de excitación específicos (GCamp6f; excitación: pasa-banda 470-40 nm, emisión: pasa-banda 520-40 nm y td-Tomato; excitación: pasa-banda 535 / 50 nm, emisión: pasa-altas 590 nm) y una cámara CoolSnap K4, controlada por el software Im-Patch©. La actividad espontánea se registró un mínimo de 10 minutos, después de eso, se añadió bicuculina 10  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich 14.343 - 50 MG) en condiciones de libre de  $\text{Mg}^{2+}$ . Una vez instaurados, las IEDs se registraron durante un mínimo de 10 minutos y se compararon con las condiciones de control. En todos los casos se pudieron realizar registros más largos donde la actividad epileptiforme se mantenía y se podía lavar el efecto regresando a las condiciones control. La etapa de transición de la actividad espontánea a la actividad epileptiforme es motivo de un trabajo futuro. Al finalizar el experimento, se tomó una fotografía con una cámara digital con el filtro específico para identificar las neuronas marcadas con td-Tomato.



## Análisis de imágenes

El procesamiento de imágenes se realizó con complementos de software personalizados en ImageJ (1.51j8, National Institutes of Health). Las coordenadas de las regiones de interés (ROIs; neuronas que contienen GCaMP6f) se identificaron manualmente con una plantilla circular cuyo radio se eligió en cada caso. Para cada ROI, el cambio en la fluorescencia somática ( $\Delta F/F$ ) se calculó como  $(F1 - F0) / F0$  en cada cuadro, donde F1 es la intensidad de fluorescencia en cualquier momento y F0 es la intensidad de fluorescencia de fondo local del ROI (cuatro veces el diámetro de la ROI).

## DetECCIÓN DE ACTIVIDAD NEURONAL A PARTIR DE IMÁGENES DE CALCIO

Todos los análisis se realizaron con programas personalizados en MATLAB (2019a, MathWorks, Natick, MA, USA). Todas las grabaciones se examinaron manualmente para eliminar artefactos. Las señales de calcio de las ROI se deconvolucionaron en trenes de potenciales de acción inferidos con una versión modificada del algoritmo *fast-oopsi* (Vogelstein et al., 2010). El umbral para detectar la probabilidad de disparo fue de dos desviaciones estándar (SD) para cada neurona, los valores que superaron el umbral se establecieron en 1 y los valores que no en 0. Una vez hecho esto, se construyó una matriz  $[N \times F]$  binaria (matriz de rastreo), donde N denota el número de neuronas (eje y) y F representa el número de fotogramas (eje x transformado en tiempo en minutos o segundos). Cada fila de la matriz de rastreo representa la actividad de una neurona.

## **Registros extracelulares con arreglos de multielectrodos (MEA)**

El protocolo experimental se llevó a cabo de la misma manera que en los experimentos de imagenología de calcio. Los registros extracelulares se realizaron utilizando el sistema MEA2100 (Multichannel Systems). Las rebanadas se colocaron en una cámara de registro perforada con un arreglo de microelectrodos. El arreglo es una matriz de 12 x 10 electrodos de nitruro de titanio, de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, 200  $\mu\text{m}$  de distancia entre electrodos y  $<100\text{ k}\Omega$  de impedancia (120pMEA200/30iR-Ti, Multichannel Systems). El flujo de entrada de solución superior e inferior fue de 6 ml/min utilizando un sistema de perfusión peristáltica (PPS2, Multichannel Systems). Los datos crudos se digitalizaron a 25 kHz. Al final del experimento, se tomó una imagen con una cámara digital para corroborar la posición de la rebanada en los electrodos.

## **Detección de actividad neuronal en registros extracelulares de MEA**

Todos los análisis se realizaron con programas personalizados en MATLAB y el software MultiChannel Analyzer (2.8.2.18079, Multichannel Systems). La señal cruda de cada electrodo se procesó con un filtro pasa-banda (500–5000 Hz). Los eventos que excedieron seis veces la SD de la señal base se identificaron como potenciales de acción y las unidades individuales registradas en cada electrodo se distinguieron agrupando espigas con formas similares (amplitud, ancho y postpotencial). Para lograr esto, se calculó el coeficiente de correlación entre todas las espigas de un electrodo dado, esta información se utilizó para construir una red donde cada nodo corresponde a una espiga y la conexión entre ellos representa su correlación entre pares. Con esta red, se realizó una detección de comunidades que reveló automáticamente las unidades de cada electrodo porque las espigas con las mismas formas terminaban agrupándose con el algoritmo de modularidad ([Newman, 2006](#)). Las espigas detectadas se convirtieron en tiempos binarios con

un intervalo de 1 ms. Estos tiempos binarios de unidades individuales se utilizaron para construir una matriz de rastreo  $[N \times F]$  (como en las imágenes de calcio). La señal de potencial local de campo (LFP) se adquirió con un filtro pasa-bajas (100 Hz) aplicado a la señal sin procesar. La frecuencia de muestreo también se utilizó para fijar el número de puntos a utilizar en la transformada de Fourier; la superposición entre intervalos se fijó en 95%.

## DetECCIÓN DE ENSAMBLES NEURONALES

Todos los análisis se realizaron con programas personalizados en MATLAB. Para identificar ensambles neuronales, se obtuvo una matriz  $[N \times N]$  de correlación par a par entre los valores de las filas de la matriz de rastreo (coeficiente de correlación de Pearson entre todos los pares de neuronas). La matriz de correlación se utilizó como matriz adyacente para construir una red funcional binaria en la que las neuronas son los nodos y los valores de correlación significativos se mantuvieron como enlaces. Se utilizaron simulaciones de MonteCarlo con 10,000 matrices de rastreo subrogadas permutando el tiempo de actividad de las neuronas originales mientras se mantienen sus intervalos entre actividad ([Bruno et al., 2015](#); [Pérez-Ortega et al., 2016](#)). Las simulaciones se utilizaron para obtener valores de probabilidad significativos. Esta matriz adyacente permitió encontrar grupos de neuronas interconectadas mediante el algoritmo de modularidad ([Newman 2006](#)), al regresar los resultados a la matriz de rastreo se pudo identificar grupos de neuronas con actividad correlacionada con distintos patrones espaciotemporales. La ventaja de este método de agrupamiento es que no es necesario utilizar una regla para proponer el número de grupos en la red: se detectan comunidades neuronales fuertemente interconectadas maximizando el parámetro  $Q = \{\text{número de enlaces dentro de un módulo}\} - \{\text{número esperado de enlaces}\}$  a través de un algoritmo que realiza una serie de iteraciones que revelan automáticamente el número óptimo de grupos. Los grupos fuertemente correlacionados con diferentes patrones de actividad entre comunidades se denominan aquí ensambles neuronales ([Lampl et al., 1999](#); [Luczak et al., 2007](#)). Se obtuvo el número de neuronas coactivas

en cada intervalo de tiempo sumando las columnas de la matriz de rastreo. La suma se realizó en intervalos de 5 ms excepto en los experimentos con imágenes de calcio donde se hizo la suma bruta de la columna de la matriz (cada cuadro dura 1/6 segundos). Cada IED se identificó como un evento mayor a 5 SD de la señal de coactividad, el valor máximo se consideró como el tiempo cero del IED. El ancho medio de las IEDs se calculó como la duración de los eventos coactivos a la mitad de la amplitud máxima.

## Análisis de redes

Las redes neuronales obtenidas experimentalmente se pueden describir utilizando la Teoría de Redes, este enfoque es útil para describir y predecir el comportamiento estructural de sistemas dinámicos (Feldt et al., 2011; Fornito et al., 2016). Se calcularon las medidas características de la organización de la red: (1) relación conexiones/nodos, para comparar la densidad de conexiones. (2) Grado ( $k$ ), el número de enlaces que conectan un nodo a otros elementos de la red. (3) Longitud característica ( $L$ ), la longitud de rutas promedio entre todos los posibles pares de nodos en una red. Una ruta se entiende como una secuencia ordenada de enlaces en una red. (4) Coeficiente de agrupamiento ( $C$ ), una medida topológica de la tendencia de dos nodos, conectados a un tercero, a conectarse también entre sí. (5) Modularidad ( $Q$ ), parámetro relacionado con la subdivisión de un gráfico en grupos fuertemente interconectados, se obtiene calculando el número de enlaces que existen dentro de los grupos menos el número esperado de conexiones en una red equivalente con enlaces colocados aleatoriamente (Newman, 2006; Feldt et al., 2011; Cossart, 2014). Además, se obtuvo la distribución de grados normalizada  $P(k_n)$ : probabilidad de que un nodo tenga conexiones  $k / k_{max}$  en cada experimento. El cálculo de los parámetros de la red se realizó con los algoritmos presentes en Brain Connectivity Toolbox (<https://sites.google.com/site/bctnet/>). La visualización de la red se realizó utilizando la plataforma de visualización de redes de código abierto Gephi (<https://gephi.org/>). Para probar la tendencia de las neuronas de alto grado a estar más densamente conectadas funcionalmente entre sí que con las

neuronas de menor grado, se calculó el coeficiente de club-rico. Para cada red, se calculó el grado de cada nodo, los nodos con los valores de grado más pequeños se eliminaron de forma incremental. El coeficiente club-rico se calculó como la relación de conexiones presentes entre los nodos aún existentes y el número total de conexiones posibles que estarían presentes cuando el gráfico estuviera completamente conectado. El coeficiente de club-rico generalmente se normaliza con respecto a una red aleatoria equivalente de igual tamaño y distribución de conectividad similar. Un coeficiente normalizado con valores  $>1$  en un rango creciente de  $k$  revela la existencia de una rica organización de grupos en la red (Colizza et al., 2006; van den Heuvel y Sporns, 2011). Para asegurarnos de si nuestras redes neuronales tenían propiedades de "mundo pequeño" (es decir, agrupación alta, pero con trayectorias cortas entre sus nodos), utilizamos una medida cuantitativa llamada "*small-world-ness*" de una red. Esta métrica es  $S_w = (L / LR) / (C / CL)$ , donde  $CL$  es el coeficiente de agrupamiento de la red regular correspondiente y  $LR$  es la longitud característica de la red aleatoria (ambos bajo el modelo Watts-Strogatz con  $P = 0$  y  $P = 1$ ). Cuando esta métrica se acerca a 1, la red se comporta como una red aleatoria. Mientras que, cuando está cerca de -1, es más una red regular. Cuando el valor es aproximadamente 0, la red se comporta como una red de mundo pequeño (Watts y Strogatz, 1998; Boccaletti et al., 2006; Pérez-Ortega et al., 2016; She et al., 2016).

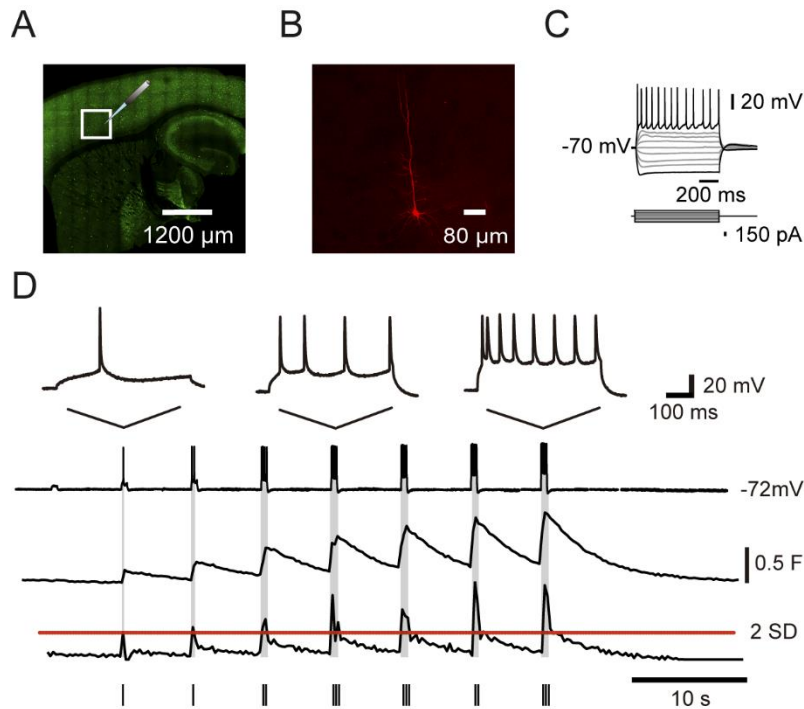
## Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas significativas entre múltiples grupos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. Las distribuciones de los parámetros entre las diferentes muestras se compararon con la prueba de Kolmogórov-Smirnov y la prueba de rangos con signo de Wilcoxon se utilizó para los grupos emparejados. A menos que se indique lo contrario, todos los datos se presentan como media  $\pm$  2 errores estándar de la media (SEM). En todos los análisis, se tomó  $P < 0.05$  para indicar comparaciones con valores significativos estadísticamente.

# RESULTADOS

## Arquitectura funcional de la dinámica espontánea en la corteza motora del ratón

Para observar la dinámica de la actividad neuronal espontánea en la corteza motora de ratones, utilizamos rebanadas parasagitales de cerebros mantenidos *in vitro* (ver cuadro en la Figura 2A), enfocamos nuestro interés en las capas 5 y 6 para la adquisición de videos de imagenología de calcio de múltiples neuronas con resolución de célula única. Esta región también se utilizó para obtener registros electrofisiológicos de células individuales. Con el fin de validar que los cambios de fluorescencia obtenidos en los experimentos corresponden a potenciales de acción, se realizaron registros simultáneos de imágenes de calcio y *current-clamp* en configuración de célula entera. La Figura 2B muestra el marcado intracelular con biocitina, también se muestran las respuestas de voltaje de la misma neurona evocadas con inyecciones de corriente intracelular despolarizante e hiperpolarizante (Figura 2C). La Figura 2D muestra registros simultáneos de trenes de potenciales de acción evocados con inyecciones de corriente despolarizante (no mostradas) de intensidades crecientes ilustradas en diferentes bases de tiempo en la primera y segunda filas. La tercera fila muestra los transitorios de calcio intracelular generados por los potenciales de acción de la misma neurona registrada. A partir de estas señales de calcio, se obtuvo la probabilidad de activación de los potenciales de acción utilizando el algoritmo *fast-oopsi* (Vogelstein et al., 2010) y se ilustró en la cuarta fila. Los potenciales de acción inferidos se muestran en la quinta fila con un umbral de 2 SD. Las espigas inferidas siguen muy bien a las evocadas o reales como se ve al comparar la segunda y la quinta fila. Las espigas inferidas se utilizaron para construir las matrices de rastreo (Theis et al., 2016).



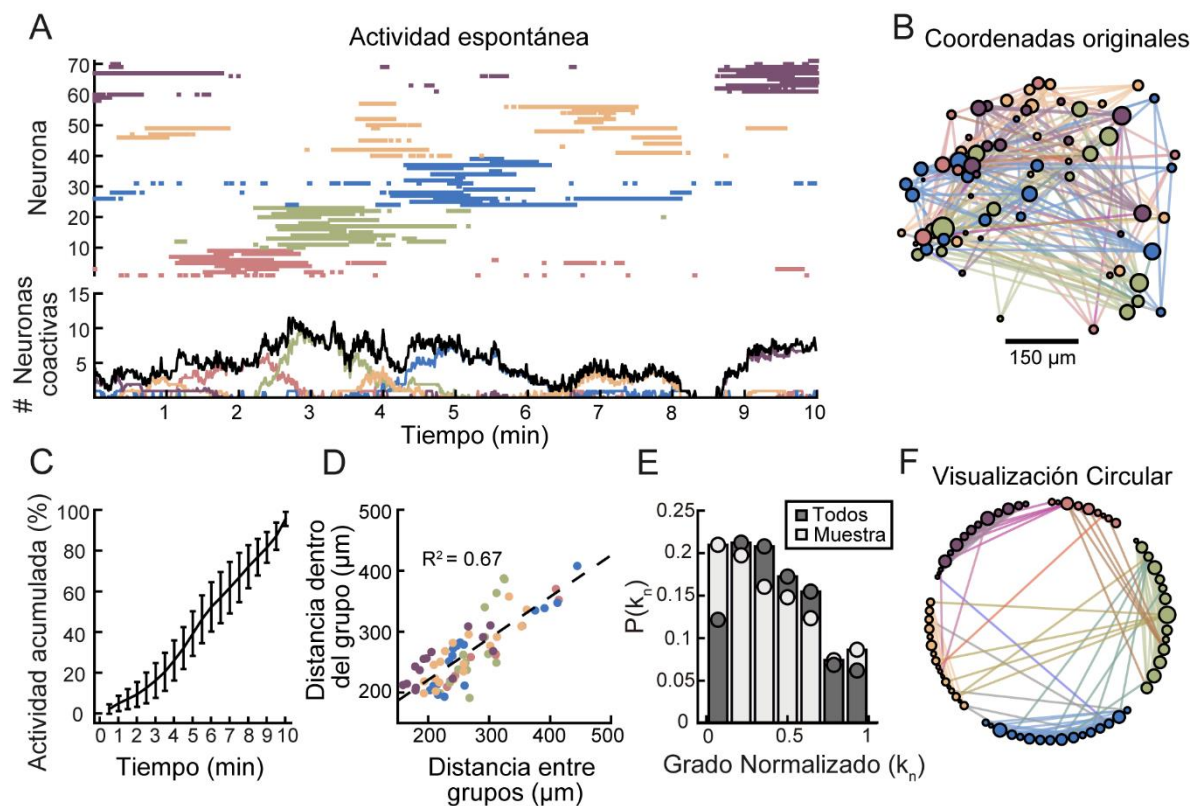
**Figura 2.** Imagenología de calcio y electrofisiología simultáneas en una rebanada de corteza motora de ratón. (A) El esquema muestra una fotografía de un corte parasagital de ratón con inmunorreactividad a PV, el cuadro blanco representa el sitio de adquisición de video de los registros ópticos y eléctricos. (B) Una neurona registrada que muestra un fenotipo piramidal se llenó con biocitina conjugada con estreptavidina-Cy3 (rojo). (C) Respuestas de voltaje (arriba) de la neurona evocadas con inyecciones de corriente intracelular despolarizante e hiperpolarizante de diferentes magnitudes (abajo). La célula exhibía disparos de potenciales de acción regulares, el patrón de respuesta típico de una neurona piramidal. (D) Registros electrofisiológicos simultáneos de potenciales de acción (primera y segunda filas) y transitorios de calcio intracelular generados por actividad eléctrica (tercera fila) evocados con inyecciones de corriente intracelular de intensidad creciente (no se muestra; la primera fila amplifica algunos eventos de la segunda fila) en la misma neurona. A partir de las señales de calcio, se infirió la probabilidad de que se disparen potenciales de acción (cuarta fila) con el algoritmo fast-oopsi, la probabilidad de espigas inferidas (quinta fila) tiene un umbral de 2 SD (línea punteada roja) de la señal total. Los potenciales de acción inferidos siguieron de cerca a los evocados (cf., segunda y quinta filas).

Después de la obtención de las imágenes de calcio de varias neuronas, se construyeron gráficas de rastreo de su actividad espontánea a lo largo del tiempo (Figura 3A), donde cada fila denota la actividad de una neurona (eje y). Nuestro método de agrupamiento (correlaciones de célula a célula emparejadas con optimización de modularidad) permite clasificar las neuronas en grupos con

patrones de disparo similares, aquí llamados ensamblajes neuronales representados con diferentes colores (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Beggs y Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004; Markram et al., 2015; Dechery y MacLean, 2017; Buzsáki y Tingley, 2018). Demostramos, en nuestro conocimiento esta es la primera vez que se demuestra, que la actividad espontánea de las redes corticales en reposo (sin estimulación) consiste en secuencias temporales de actividad de estos conjuntos de neuronas. Los ensamblajes emergen espontáneamente y se desvanecen como en los experimentos in vivo durante la ejecución de la tarea (Pastalkova et al., 2008). Un histograma de coactividad del gráfico de rastreo (trazo negro en la parte inferior de la Figura 3A) muestra la actividad poblacional ruidosa típica del tejido cortical en reposo, sin estimulación (Markram et al., 2015; Sporns y Betzel, 2016). Sin embargo, subyacente a esta actividad poblacional, los trazos similares tomados de diferentes conjuntos neuronales muestran claramente una secuencia temporal (indicada por diferentes colores; Luczak et al., 2007). Este comportamiento fue estable y recurrente durante varios minutos. En la Figura 3B se ilustra un gráfico que conserva las coordenadas originales en el tejido: los nodos son las neuronas que mostraron actividad y los enlaces representan correlaciones significativas entre sus patrones de activación. Los colores representan los ensamblajes neuronales identificados en el panel anterior. Los tamaños de los nodos indican el número de enlaces (grado). En el presente trabajo intentamos analizar experimentos que compartan características similares, la Figura 3C muestra la actividad neuronal acumulada de cada rebanada cerebral cortical considerada en el estudio ( $n = 10$  rebanadas de diferentes animales; las barras verticales representan 1 SD en ambas direcciones). Las redes neuronales obtenidas en cada experimento no mostraron diferencias significativas en sus distribuciones de grados (no se muestra). Las neuronas observadas se entremezclaban espacialmente, esta conclusión se obtuvo al calcular la distancia promedio contra las neuronas pertenecientes al mismo ensamble contra las pertenecientes a otros ensamblajes, se procedió a hacer una regresión lineal mostrando que se ajustan muy bien a una línea recta, indicando que no hay regiones espaciales de la rebanada que incluyan a un ensamble determinado (Figura 3D;  $R^2 = 0.67$ ;  $P < 0.001$ ; similar en siete rebanadas examinadas; una



rebanada sola tuvo  $P = 0.014$ ; las rebanadas se tomaron de animales diferentes). La figura 3E muestra las distribuciones de conexiones funcionales normalizadas entre neuronas tanto en un solo experimento ( $n = 71$  neuronas, gris claro) como en todos los experimentos ( $n = 427$  neuronas, gris oscuro;  $8.9 \pm 1.2$  neuronas por ensamble;  $n = 48$  ensambles de diez animales). Nótese las distribuciones descendentes: los nodos con mayor grado aparecen con menor probabilidad. Finalmente, se muestra una representación circular ordenada del microcircuito (Figura 3F) que muestra interacciones entre ensambles neuronales durante la actividad espontánea.



**Figura 3.** Dinámica espontánea de ensambles neuronales en la corteza motora de ratón. (A, arriba) Gráfica de rastreo de la actividad espontánea de varias neuronas a lo largo del tiempo en la corteza motora, cada fila denota actividad en una neurona (eje y); el color representa la pertenencia de cada neurona a ensambles neuronales identificados por medio de correlaciones pareadas de célula a célula (ver Métodos). (A, abajo) Histograma de la actividad sumada de todas las neuronas en el tiempo (trazo negro) más histogramas para cada ensamble mostrado con los trazos de color correspondientes; note la secuencia temporal. (B) Grafo del microcircuito cortical conservando las coordenadas originales en el tejido, cada neurona es un nodo y cada línea que las une representa la existencia de una correlación

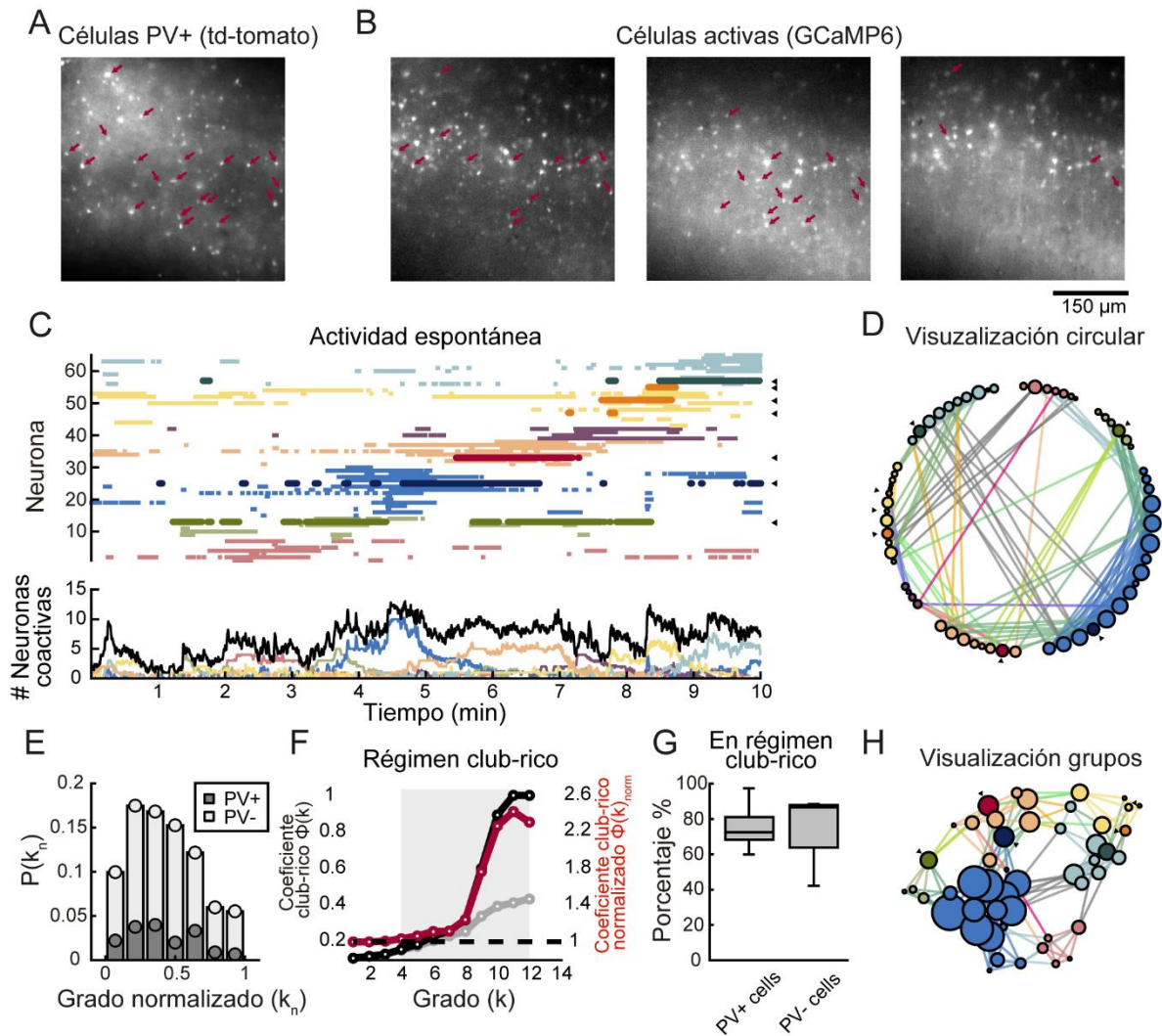
significativa entre sus patrones de disparo a lo largo del experimento. Los colores representan los ensambles neuronales identificados en (A), el tamaño del nodo representa el número de conexiones de la neurona, existen nodos altamente conectados en la red (hubs) distribuidos entre los diferentes ensambles neuronales. (C) Comportamiento de la actividad neuronal acumulada de todas las rebanadas registradas ( $n = 10$ ), las barras verticales representan 1 SD en ambas direcciones. (D) Distancia dentro de los grupos en función de la distancia entre grupos para cada neurona ( $R^2 = 0.67$ ;  $P < 0.001$ ), los colores denotan su pertenencia al ensamble como se muestra en A. (E) Distribución de conexiones funcionales normalizadas entre neuronas en un solo experimento (gris claro,  $n = 71$  neuronas) y en todos los experimentos (gris oscuro,  $n = 427$  neuronas). (F) Representación circular ordenada de la red del microcircuito que se muestra en (B), las coordenadas se han reagrupado en los diferentes ensambles neuronales para mostrar las interacciones que ocurrieron durante la actividad cortical espontánea. El tamaño del nodo representa su número de conexiones (grado).

## **Participación de las interneuronas PV+ en los ensambles neuronales**

Los experimentos de imagenología de calcio se llevaron a cabo en rebanadas de cerebro de ratón que co-expresaban GCaMP6f en todas las neuronas bajo el promotor de sinapsina y td-Tomato exclusivamente en las interneuronas PV+-Cre. En la Figura 4A se puede observar un campo de adquisición que muestra la ubicación de las neuronas marcadas con td-Tomato (PV+) con flechas rojas, se utilizó un filtro especial para poder estimular y observar las longitudes de onda específicas del td-Tomato. Los paneles de la Figura 4B son diferentes cuadros del mismo video de imagenología de calcio que muestran diferentes neuronas activas (expresan GCaMP6f, excitadas y visualizadas con los filtros adecuados; ver Métodos) en diferentes momentos, entre ellas, interneuronas PV+ (flechas rojas) previamente identificadas con td-Tomato. De esta forma es posible identificar a tipos neuronales específicos en las gráficas de rastreo neuronal. En la parte superior de la Figura 4C se ilustra una gráfica de rastreo representativa de la actividad espontánea en la corteza motora tomada de una rebanada y un animal diferentes a los mostrados en la Figura 3. Puede observarse una secuencia temporal de ensambles neuronales representados aquí por diferentes colores para cada grupo. Además, la actividad de las interneuronas PV+ se indica con colores más oscuros

y con las puntas de flecha a la derecha. Casi cada ensamble neuronal tuvo el disparo acompañado de cuando menos una interneurona PV+ ( $80.2 \pm 0.1\%$  de los ensambles identificados;  $n = 10$  rebanadas de diferentes animales), un resultado altamente improbable que ocurra al azar ( $25.5 \pm 6\%$ ;  $P < 0.001$ ; comparando 10000 matrices de rastreo subrogadas para cada una de las 10 rebanadas de animales diferentes). La participación de las neuronas PV+ en la actividad de la red es escasa en comparación con las neuronas PV-. En la parte inferior de la Figura 4C se aprecia el histograma de coactividad global (negro), nuevamente la actividad poblacional de la corteza en reposo muestra un comportamiento ruidoso. Sin embargo, la coactividad obtenida para los diferentes ensambles (diferentes colores al negro) muestra que detrás de este aparente comportamiento hay una secuencia ordenada de ensambles neuronales que van y vienen con un cierto nivel de intersección. Una visualización circular de este microcircuito muestra la ubicación de las interneuronas PV+ dentro de los ensambles (Figura 4D, puntas de flecha). La mayoría de las conexiones funcionales más importantes están dentro de cada ensamble, incluidos los de las interneuronas PV+. Sin embargo, algunas conexiones se cruzan hacia otros ensambles y algunos de estos cruces pertenecen específicamente a interneuronas (posible mecanismo de inhibición recíproca).

Para evaluar el comportamiento estructural en la red de las dos clases de neuronas se obtuvo la distribución normalizada del número de conexiones de neuronas PV+ (gris oscuro,  $n = 70$  neuronas de 10 animales) y de las neuronas PV- (gris claro,  $n = 357$  neuronas de 10 animales), obteniendo en ambos casos una forma similar (Figura 4E). La distribución tiene una cola alargada, lo que revela la existencia de una pequeña cantidad de neuronas altamente interconectadas, conocidas en teoría de redes como concentradoras (*hubs*). Existen varias métricas (principalmente el grado del nodo) que utilizan este concepto y generalmente convergen en la idea de que corresponden a nodos topológicamente centrales posicionados de tal manera que tienen una fuerte influencia en la circuitería local a la que pertenecen.



**Figura 4.** Participación de las interneuronas PV+ en los ensambles neuronales de la corteza motora de ratón. (A) Fotografía del campo de adquisición de un video de imagenología de calcio que muestra neuronas marcadas con td-Tomato (PV+), las flechas rojas indican interneuronas que mostraron actividad en los siguientes paneles. (B) Fotografías en tres momentos diferentes del mismo campo ilustrado en (A), que muestran diferentes grupos de neuronas activas que expresan GCaMP6f (ver Métodos). Las flechas rojas indican las interneuronas que se marcaron en (A) y que muestran actividad en estas imágenes. (C) Gráfica de rastreo de la actividad espontánea en la corteza motora (arriba). Los ensambles neuronales identificados se muestran en diferentes colores; la actividad de las interneuronas PV+ se indica con un color más oscuro y con las puntas de flecha a la derecha. Casi cada ensamble neuronal tiene su propia neurona PV+ o un subconjunto de ellas. En la parte inferior, histograma de la actividad total sumada (negro) y de los diferentes ensambles neuronales (coloreados). (D) Visualización circular del microcircuito. Las neuronas se han clasificado según sus ensambles como en (C). Las interneuronas PV+ se muestran en color más oscuro y con puntas de flecha. El tamaño del nodo denota el número de conexiones de la neurona. (E) Distribución del número de

conexiones normalizadas para las neuronas PV+ (gris oscuro,  $n = 70$  neuronas) y para neuronas PV- (gris claro,  $n = 357$  neuronas). (F) Curva del coeficiente de club-rico para la red que se muestra en (D), el gráfico muestra un comportamiento de club-rico significativo de la estructura de la red neuronal entre 4 y 12 conexiones funcionales. El coeficiente de club-rico normalizado (línea roja) aumenta en función de  $k$  (número de conexiones funcionales). La línea negra muestra el coeficiente de club-rico y la línea gris muestra el mismo coeficiente para una red aleatoria de igual tamaño y distribución de conectividad similar. (G) Porcentaje de interneuronas PV+ y neuronas PV- ubicadas dentro del régimen de club-rico ( $n = 70$  interneuronas y  $n = 357$  neuronas PV-; no hay diferencias significativas). (H) Red de microcircuitos que exhibe a los nodos con cuatro o más conexiones funcionales solamente (régimen de club-rico), las neuronas PV+ se señalan con puntas de flecha.

Es posible definir un núcleo de nodos basado en la densidad de conectividad entre los hubs de una red dada. En la figura 4F se realizó el análisis de club-rico: se trata de encontrar y describir el subconjunto de nodos de alto grado que están más densamente conectados entre sí que de lo esperado por el azar (Colizza et al., 2006; Feldt et al., 2011; van den Heuvel y Sporns, 2011). El coeficiente de club-rico en función del grado ( $k$ ) comparado con el mismo coeficiente para una red aleatoria de igual tamaño y distribución de conectividad similar (línea negra vs línea gris) muestra un comportamiento de club-rico significativo para la estructura de la red neuronal mostrada en la sección 4C en los valores entre 4 y 12 conexiones funcionales, esto se muestra mediante valores superiores a 1 del coeficiente de club-rico normalizado (línea roja). La incorporación de los dos tipos neuronales aquí estudiados dentro del régimen del club-rico se observa en la figura 4G, las interneuronas PV+ pertenecientes al club-rico son alrededor del  $75 \pm 14\%$  y las neuronas PV- son  $75 \pm 20\%$  ( $n = 10$  rebanadas de diez animales diferentes). La red del club-rico con  $n=5$  se observa en la Figura 4H, las neuronas PV+ se señalan con puntas de flecha. Tenga en cuenta que los nodos con grados más altos no son interneuronas PV+ (como lo muestran las distribuciones de grado).

## **Participación de las interneuronas PV+ durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs)**

Para observar lo que sucede en el circuito de control espontáneo cuando se bloquea la transmisión mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>, se añadió bicuculina 10  $\mu\text{M}$  a una

solución salina virtualmente libre de  $Mg^{2+}$ . Esta es una de las muchas formas de inducir descargas epileptiformes (Cohen et al., 2006; de la Prida et al., 2006). En circuitos corticales, esta maniobra induce descargas epileptiformes breves y recurrentes sin ninguna estimulación (Huberfeld et al., 2011; Karlócai et al., 2014). Según su duración y recurrencia son similares a las descargas epileptiformes interictales o IEDs (Brückner y Heinemann, 2000; de Curtis et al., 2012). Debido a que nuestro procedimiento de agrupamiento exhibe como ensambles neuronales a aquellos grupos de neuronas con patrones de activación correlacionados, y porque se ha descrito que los patrones de activación de interneuronas PV+ son relativamente diferentes a los de PV- neuronas durante las descargas epileptiformes (Chang et al., 2018; Levesque et al., 2018), esperábamos observar una separación parcial entre ambas clases de neuronas para apreciar mejor la clase, función y cantidad de neuronas sincronizadas. La Figura 5A muestra una gráfica de rastreo neuronal que confirma esta hipótesis. La estructura temporal de los ensambles neuronales espontáneos en situación control desaparece para dar lugar a descargas epileptiformes breves que consisten en un único ensamble recurrente que recluta la mayoría de las neuronas en el campo de adquisición. Nuestro método de agrupación separó este ensamble en dos grupos diferentes de neuronas cuya dinámica temporal se aprecia mejor en la sección 4B, donde se aprecia la red de conexiones funcionales construida a partir de los datos de la matriz de rastreo (ver materiales y métodos). Las interneuronas PV+ identificadas previamente con td-Tomato se muestran en colores más oscuros. Nótese la alta presencia de interneuronas en el grupo con actividad más prolongada (rojo; 74.2% o 23 interneuronas de 31 neuronas en este experimento; y:  $76.7 \pm 9.1\%$  agrupando  $n = 9$  rebanadas de diferentes animales;  $P < 0.001$ ; Prueba de Kolmogórov-Smirnov). En la parte inferior de las secciones 5A y 5B, se aprecia el histograma de coactividad que a su vez revela la presencia de IEDs cada  $19 \pm 1.2$  s ( $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). Aunque no etiquetamos formalmente las neuronas piramidales con ayuda de animales transgénicos, sabemos por descripciones de poblaciones en la corteza de los roedores que corresponden a aproximadamente el 85% de las neuronas que son PV- (Markram et al., 2004; Tremblay et al., 2016), en nuestros

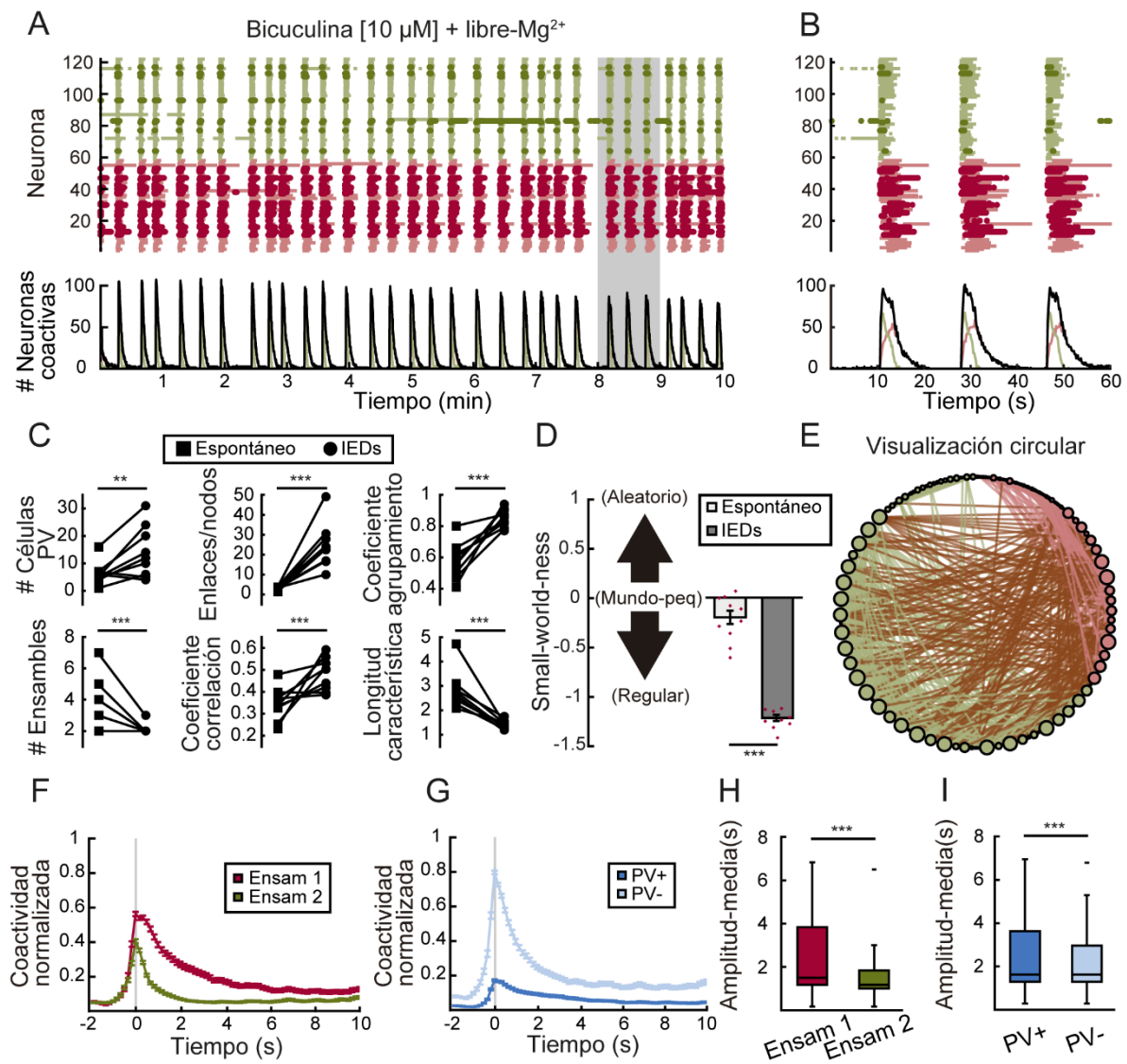
resultados corresponderían principalmente al grupo de color verde, con una duración más breve en su actividad.

Se calculó un conjunto de parámetros para comparar las redes en situación control con las formadas durante la aparición de IEDs (Figura 5C). Primero, las interneuronas PV+ con actividad correlacionada aumentaron significativamente de  $6 \pm 2.8$  a  $14 \pm 6.2$  ( $P = 0.024$ ; prueba de rangos con signo de Wilcoxon en esta y otras comparaciones en esta sección a menos que se indique lo contrario;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes); Las neuronas PV- también pasaron de  $35 \pm 6.86$  a  $64 \pm 6.70$  neuronas activas en ambas condiciones (No mostrado;  $P = 0.033$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes); La proporción de enlaces a nodos aumentó significativamente de  $2.9 \pm 0.6$  a  $24.5 \pm 7.4$  ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes), el coeficiente de agrupamiento global aumentó de  $0.57 \pm 0.08$  a  $0.85 \pm 0.04$  ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes), el número de grupos neuronales disminuyó significativamente de  $4.2 \pm 1$  a  $2.0 \pm 0.2$  ( $P = 0.014$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes), el coeficiente de correlación de la actividad neuronal aumentó significativamente de  $0.34 \pm 0.04$  en el control a  $0.48 \pm 0.04$  durante las IEDs ( $P = 0.013$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes), finalmente, la longitud característica disminuyó significativamente de  $2.82 \pm 0.51$  en el control a  $1.44 \pm 0.12$  durante las IEDs ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). Los cambios en los parámetros de la red revelan una arquitectura funcional completamente diferente en las condiciones de control en comparación con la generación de IEDs en el mismo tejido ([Beggs y Plenz, 2003](#); [Sadovsky y MacLean, 2013](#); [Bullmore y Sporns, 2009](#); [Pérez-Ortega et al., 2016](#)). Pueden describirse extremos de comportamientos topológicos en las redes, el primero sería una red completamente regular con conexiones rígidas predeterminadas y con una alta capacidad de agrupamiento, el otro, una red conectada aleatoriamente con agrupación baja pero una longitud de ruta promedio corta. En un punto medio, se encuentran las llamadas redes de mundo pequeño, que resulta de la combinación de un alto agrupamiento y una longitud de ruta corta. Estas características se han

descrito en muchas redes del mundo real. Las redes de mundo pequeño también se han asociado con altos niveles de eficiencia topológica, lo que las convierte en integradores competentes de información en diferentes escalas de estudio (Watts y Strogatz, 1998; Boccaletti et al., 2006; Feldt et al., 2011). En las redes que estudiamos, la propiedad del mundo pequeño (*small-world-ness*) cambió desde redes que mostraban secuencias de ensambles a unas donde podía observarse una rígida conectividad repetitiva; ambas clases de redes estaban alejadas de las redes aleatorias (Figura 5D; Humphries y Gurney, 2008; She et al., 2016), desde un valor de *small-world-ness* de  $0.20 \pm 0.14$  en control a  $1.22 \pm 0.06$  durante las IEDs ( $P < 0,001$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). La Figura 5E mantiene el código de color para ambos grupos dentro del ensamble síncrono de la sección A y B, mostrando un reacomodo circular de los nodos dentro de la red. La dinámica de activación de estos grupos se alineó con sus picos máximos de actividad en cada IED (Figura 5F). Dado que se identificaron las interneuronas PV+, se muestra que los diferentes patrones de activación pueden atribuirse a la diferencia entre las interneuronas (PV+) y otras neuronas (PV-; Figura 5G). Las duraciones medias del ancho de estos trazos obtenidos de las Figuras 5F y 5G mostraron diferencias significativas:  $2.57 \pm 0.24$  s para el grupo rojo y  $1.58 \pm 0.14$  s para el grupo verde ( $P < 0.001$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes) en correspondencia con las interneuronas PV+:  $2.57 \pm 0.26$  s y las neuronas PV-:  $2.07 \pm 0.16$  s (Figura 5H;  $P = 0.007$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). De estos resultados se puede concluir que las interneuronas PV+ tienen actividades con mayor duración, lo que sugiere que el perfil de activación de las interneuronas PV+ durante las IEDs es diferente al de otras neuronas en la corteza motora del ratón. Por otro lado, las interneuronas PV+ aumentaron su participación en estos eventos sincrónicos (Figura 5C arriba a la izquierda) en una proporción de  $3.4 \pm 1.6$  ( $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). Sin embargo, las neuronas PV- también lo hicieron en una proporción de  $2.9 \pm 1.3$  ( $n = 9$  rebanadas de animales diferentes). Esto también se ve reflejado en la proporción de interneuronas PV+ con respecto al número total de neuronas con actividad correlacionada significativa en cada experimento, por lo que



no hubo cambio significativo:  $15.5 \pm 0.1\%$  en los controles y  $16.8 \pm 1.3\%$  durante las IEDs.

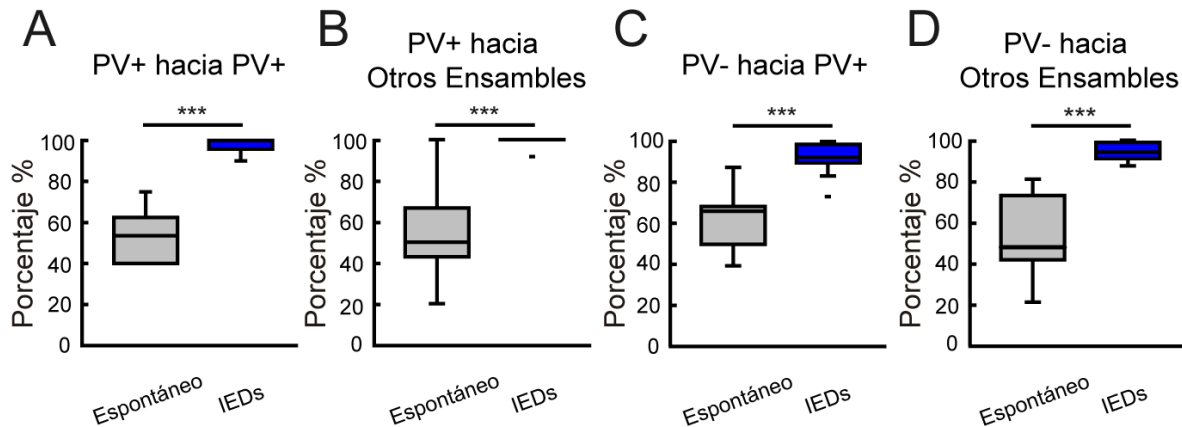


**Figura 5.** Participación de las interneuronas PV+ durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs). (A) Gráfico de rastreo de la actividad después de aplicar bicuculina [10  $\mu$ M] bajo una solución virtualmente libre de Mg<sup>2+</sup>. La secuencia y diversidad de ensamblés neuronales presentes durante la actividad espontánea se convierte en eventos sincrónicos recurrentes. La actividad de las interneuronas PV+ se muestra en colores más oscuros. (B) Gráfico de una fracción (sombreado) del gráfico de rastreo mostrado en (A): se observan tres eventos epileptiformes. La mayoría de las interneuronas PV+ (rojas) aparecieron en uno de los ensamblés, debido al diferente patrón mostrado por las neuronas PV- (verde). La parte inferior en (A) y (B) muestra la actividad sumada (trazo negro) y diferentes cursos de tiempo para los ensamblés que lo componen (coloreados). (C) Comparación de un conjunto

de métricas de redes entre la actividad espontánea y durante la presencia de IEDs: el número de neuronas PV+ aumenta significativamente mientras que el número de ensamblajes de neuronas discernibles disminuye durante la actividad epileptiforme. Se encontraron diferencias significativas en el número de células PV+ ( $P = 0.024$ ), la relación enlaces/nodos ( $P = 0.009$ ), el coeficiente de agrupamiento ( $P = 0.009$ ), el número de ensamblajes ( $P = 0.014$ ), el coeficiente de correlación ( $P = 0.013$ ) y longitud característica ( $P = 0.009$ ). En todos los casos se utilizó la prueba de rango con signo de Wilcoxon ( $n = 9$  rebanadas). (D) *Small-world-ness* de las redes espontáneas y epileptiformes, respectivamente. Los valores cercanos a '0' indican similitud con una red de mundo pequeño, mientras que '1' o '-1' denotan redes aleatorias y regulares, respectivamente ( $P < 0.001$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n = 9$  en cada muestra). (E) Visualización circular de la red formada con la matriz de rastreo mostrada en A, el aumento de conexiones funcionales la hacen aparecer como una red regular. (F, G) Coactividad normalizada de los ensamblajes durante las IEDs. Agrupados a partir de varios experimentos alineados con el pico de actividad máxima (cero) de los IEDs. (H) La duración de amplitud media de los trazos mostrados en (F, G) grupo rojo ( $P < 0.001$ ) y PV+ interneuronas identificadas ( $P = 0.007$ ) tuvieron una actividad de mayor duración durante las IEDs (en ambos casos, prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $n = 256$  IEDs de  $n = 9$  rebanadas).

Las diferentes características de la conectividad funcional entre las dos condiciones aquí estudiadas de las neuronas PV+ y PV- se ilustran mediante diagramas de caja en la Figura 6. La sección 6A revela que en el régimen de actividad espontánea las interneuronas PV+ que se conectan con otras interneuronas PV+ son cerca del  $45 \pm 14\%$ , significativamente diferente al  $97 \pm 2.4\%$  de interneuronas PV+ con ese patrón de conexión durante la presencia de IEDs en las rebanadas ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). En la Figura 6B se puede apreciar que las conexiones de este grupo de neuronas hacia otros ensamblajes diferentes al que pertenecen también cambiaron significativamente en ambas condiciones, pasaron de aproximadamente el  $53 \pm 14\%$  en situación espontánea a  $99 \pm 0.9\%$  durante las IEDs ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). En la Figura 6C se obtuvo el porcentaje de neuronas PV- (neuronas piramidales putativas) que se conectan con interneuronas PV+, se registró un cambio significativo pasando de  $62 \pm 9\%$  a  $91 \pm 3\%$  ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). De la misma manera en la Figura 6D se calculó el porcentaje de neuronas PV- que presentaban conexiones funcionales hacia otros ensamblajes al cual pertenecían, cambiaron su porcentaje significativamente de  $51 \pm 13\%$  en la condición espontánea a  $95 \pm 3\%$  durante la presencia de IEDs ( $P < 0.001$ ;

prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). En ambas condiciones calculamos el porcentaje de neuronas tanto PV+ como PV- que se conectan con neuronas PV-, en todos los casos dichos porcentajes eran muy cercanos a 100% y no tenían diferencias significativas entre condiciones.

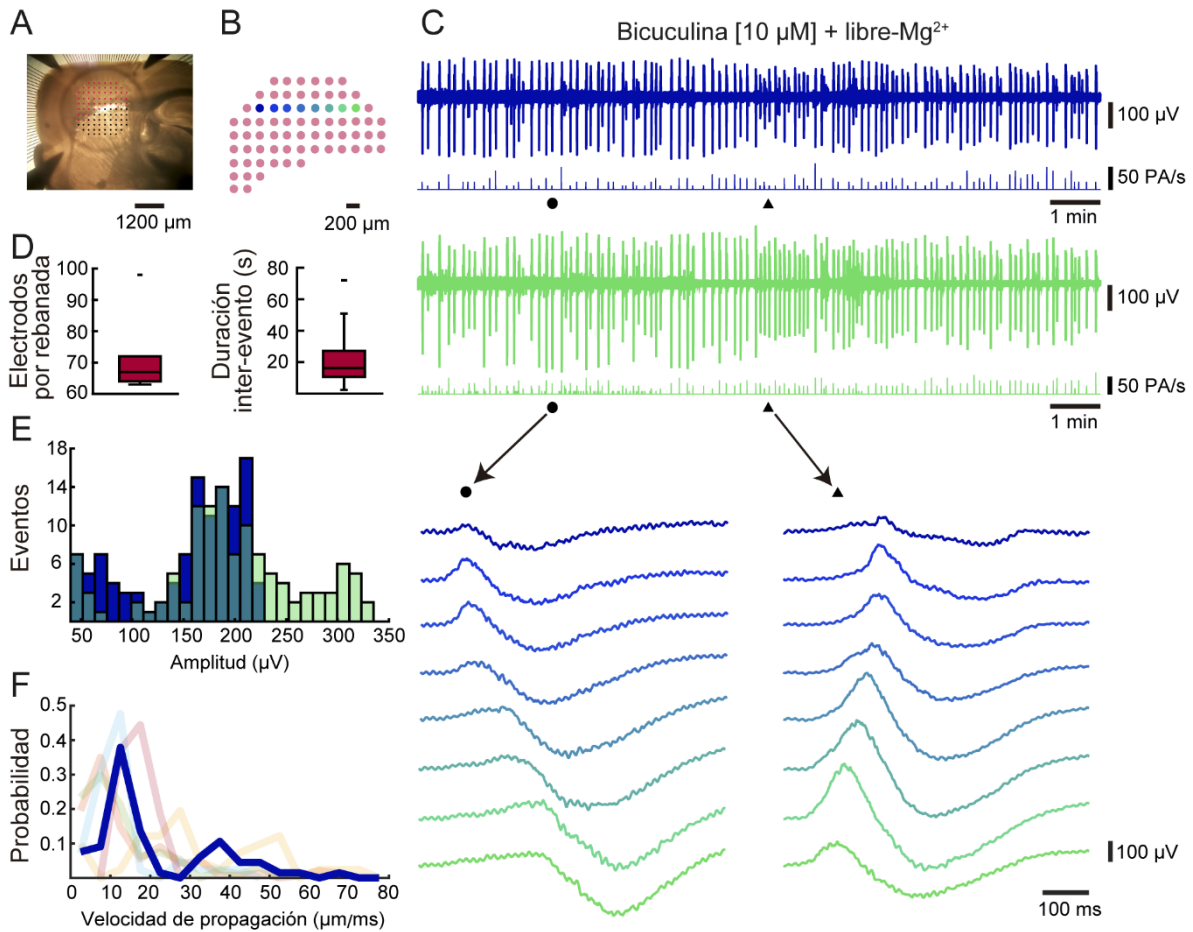


**Figura 6.** Características de la conectividad funcional de las interneuronas PV+ y neuronas PV- en condición espontánea y durante las IEDs. (A) Las interneuronas PV+ que presentaban conexiones funcionales con otras interneuronas PV+ pasaron de  $45 \pm 14\%$  en la condición espontánea a  $97 \pm 2.4\%$  durante las IEDs ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). (B) Las interneuronas PV+ que presentaban conexiones con neuronas de otros ensambles a los que ellas pertenecen pasaron de  $53 \pm 14\%$  en la condición espontánea a  $99 \pm 0.9\%$  durante las IEDs ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). (C) Las neuronas PV- que presentaban conexiones funcionales con interneuronas PV+ pasaron de  $62 \pm 9\%$  en la condición espontánea a  $91 \pm 3\%$  durante las IEDs ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas). (D) Las neuronas PV- que se conectaron con neuronas de otros ensambles pasaron de  $51 \pm 13\%$  en la condición espontánea a  $95 \pm 3\%$  durante las IEDs ( $P < 0.001$ ; prueba de rango con signo de Wilcoxon;  $n = 9$  rebanadas).

## Registros extracelulares mediante arreglos de multielectrodos (MEA) durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs)

Para estudiar la dinámica de las IEDs con mayor resolución temporal, se realizaron registros extracelulares con un arreglo de multielectrodos (MEA). Se emplearon rebanadas sagitales y los mismos protocolos utilizados en los experimentos de imagenología de calcio. La disposición del MEA en la rebanada se muestra en la

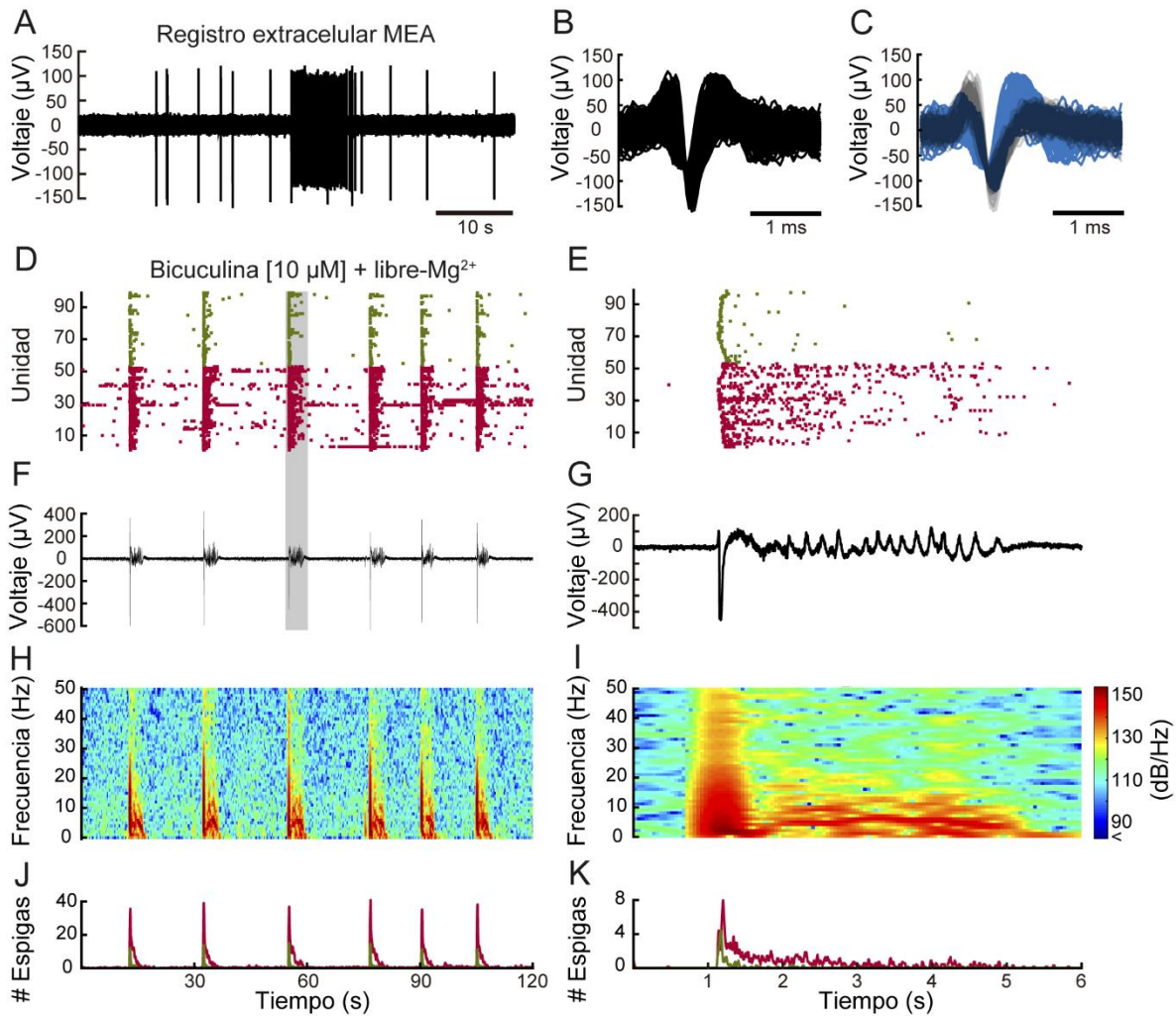
Figura 7A, solo se utilizaron para el análisis los electrodos colocados en la corteza cerebral (círculos rojos). En la Figura 7B se ven con mayor detalle los electrodos corticales. La distancia de separación entre cada electrodo es de 200  $\mu\text{m}$ , es posible rastrear eventos generados en cualquier electrodo y las direcciones de propagación de los eventos que se extienden a través de la rebanada ([Joglekar et al., 2018](#)). En esta sección también se indica una fila de electrodos siguiendo un código de color utilizado en los paneles siguientes. La Figura 7C arriba y en medio muestra el potencial de campo local (LFP, filtro paso-baja < 100 Hz) y la tasa de disparo de las IEDs registrados por electrodos colocados en los extremos de la fila (los colores corresponden a la sección 5B). La tasa de disparo unitaria medida en los electrodos aumenta en correlación con las IEDs. La parte inferior de la Figura 7C muestra registros de los electrodos de toda la fila (Figura 7B) tomadas en dos momentos diferentes indicados por círculos y triángulos negros en el panel superior. Se puede ver que las IEDs (en LFP) se propagaban en ambas direcciones. Figura 7D a la izquierda, se informa el número de electrodos considerados en cada experimento:  $72 \pm 10$  electrodos ( $n = 6$  rebanadas de animales diferentes). Figura 7D a la derecha, la duración de los intervalos entre IEDs fue de  $22 \pm 1.96$  s ( $n = 300$  eventos de seis animales diferentes; no significativamente diferente al encontrado con imágenes de calcio). La distribución de las IEDs identificadas mediante LFP se muestra en la Figura 7E ( $n = 300$  eventos de seis animales diferentes), la amplitud de voltaje promedio de cada IED identificado en cada electrodo fue  $180 \pm 48$   $\mu\text{V}$  (360 electrodos y 1734 eventos). Se calculó la velocidad de propagación de las IEDs en cada rebanada (Figura 7F), la curva de color resaltada corresponde a los datos de la rebanada mostrados en la sección 7C. La velocidad de propagación fue de  $15.3 \pm 2.4$   $\mu\text{m} / \text{s}$  ( $n = 6$  rebanadas de seis animales diferentes). Encontramos IEDs con atributos espaciales y temporales similares que se extendían en diferentes direcciones en cada rebanada ([Serafini et al., 2016](#)). Estos experimentos mostraron que las IEDs identificadas electrofisiológicamente se corresponden estrechamente con los identificados con imagenología de calcio.



**Figura 7.** Registros con arreglos de multielectrodos extracelulares durante descargas epileptiformes interictales (IEDs). (A) Fotografía que muestra la disposición del MEA en la rebanada, en el presente trabajo solo se consideraron los electrodos que estaban en la corteza cerebral (puntos rojos). (B) Esquema de los electrodos utilizados para caracterizar las IEDs que se muestran en los siguientes paneles. (C) Los registros extracelulares se realizaron después de aplicar 10  $\mu\text{M}$  de bicuculina en una solución virtualmente libre de  $\text{Mg}^{2+}$ . Arriba, potencial de campo local de las IEDs (LFP, filtro pasa-bajas  $<100$  Hz) en los electrodos siguiendo el código de colores que se muestra en (B). Los registros que se muestran corresponden a los lados opuestos de la línea horizontal de electrodos. El círculo y el triángulo corresponden a los instantes de tiempo analizados en toda la línea de electrodos. La frecuencia de los potenciales de acción (ver más abajo) se muestra en la línea inferior de cada registro. Los registros en la parte inferior muestran la propagación de las IEDs en ambas direcciones. (D) Izquierda, número de electrodos considerados en cada rebanada ( $n = 6$  rebanadas de diferentes animales). Derecha, duración entre eventos entre IEDs recurrentes ( $n = 300$  eventos de diferentes animales). (E) Distribución de amplitud de voltaje para todas las IEDs (LFP) en los registros que se muestran en la parte superior (C). (F) Distribución de la velocidad de propagación de las IEDs en cada segmento (colores claros), la línea azul corresponde al segmento que se muestra en (C).

## Actividad neuronal durante la aparición de descargas epileptiformes interictales (IEDs)

Después de obtener IEDs de manera estable, estudiamos unidades individuales en electrodos del MEA. La Figura 8A muestra un ejemplo de un registro de unidades múltiples con potenciales de acción extracelulares y una ráfaga en un electrodo del MEA (filtro de paso-banda 500–5000 Hz). Los potenciales de acción identificados se alinearon 1 ms antes y 2 ms después con respecto a su punto de voltaje más negativo en los registros (Figura 8B). Las unidades individuales se extrajeron de acuerdo con sus formas (ver Procedimientos experimentales; gris y azul; Figura 8C) y se utilizaron para construir gráficos de rastreo con unidades individuales (Figuras 8D, E). El número de unidades individuales por electrodo fue  $1.2 \pm 0.8$  ( $n = 360$  electrodos,  $n = 6$  rebanadas de animales diferentes). Las espigas se ordenaron mediante el mismo método de agrupamiento de los ensambles neuronales. La actividad durante un IED muestra claramente un ensamble sincrónico con dos grupos presentando diferentes patrones y duraciones de disparo. El disparo de las neuronas obtenido con mayor resolución temporal (MEA) se parece mucho al inferido con imagenología de calcio (Figura 8D, E). Además, se obtuvieron los registros simultáneos de LFP (Figuras 8F, G). Los componentes de LFP en un IED fueron: un pico interictal seguido de una onda lenta y oscilaciones tardías que corresponden principalmente al ensamble que dura más tiempo activo (rojo). Todo el evento dura aproximadamente  $3.5 \pm 0.18$  s ( $n = 1734$  eventos,  $n = 6$  rebanadas de animales diferentes). Se muestran espectrogramas representativos (Figuras 8H, I), observe las bandas delta, theta y alfa aumentadas correspondientes a oscilaciones tardías después del pico principal de actividad ([Huberfeld et al., 2011](#)). La coactividad de los potenciales de acción (Figuras 8J, K) muestra una mayor duración en el grupo rojo, como se obtuvo en experimentos de imágenes de calcio. Básicamente, estos experimentos demostraron que los análisis de IEDs arrojan resultados similares utilizando potenciales de acción unitarios reales (MEA) y potenciales de acción inferidos (imagenología de calcio); lo que valida el método para inferir potenciales de acción desde la imagenología de calcio.



**Figura 8.** Actividad unitaria durante la presencia de descargas epileptiformes interictales (IEDs). (A) Ejemplo de un registro de unidades múltiples con potenciales de acción extracelulares y una ráfaga en un electrodo MEA (filtro de pasa-banda 500–5000 Hz). (B) Formas de las espigas divididas en (A), estos eventos se detectaron como cambios en el voltaje que excedieron un umbral de seis SD de la señal del electrodo global. (C) Unidades individuales extraídas de (B), se identificaron dos unidades en este electrodo (azul claro y gris, la superposición es azul oscuro). (D, E) Gráfico de rastreo de las IEDs recurrentes y aumento de un evento epileptiforme en (E) (área sombreada en D). Cada fila denota la actividad exhibida por unidades individuales (potenciales de acción registrados) durante las IEDs, después de aplicar bicuculina [10  $\mu$ M] en condiciones libres de  $Mg^{2+}$ . Los resultados de las imágenes de  $Ca^{2+}$  (potenciales de acción inferidos en la Figura 5 (A)) son confirmados por los MEAs (potenciales de acción reales): las neuronas se coactivan agrupándose en dos ensambles debido a sus diferentes patrones de disparo. Una característica que define a estos ensambles es su duración: la actividad dura más en uno de ellos (rojo). (F, G) Potencial de campo local (LFP, filtro de pasa-bajas <100 Hz) registrado simultáneamente durante el disparo neuronal. La ampliación (G) muestra los componentes del LFP: un pico interictal seguido de

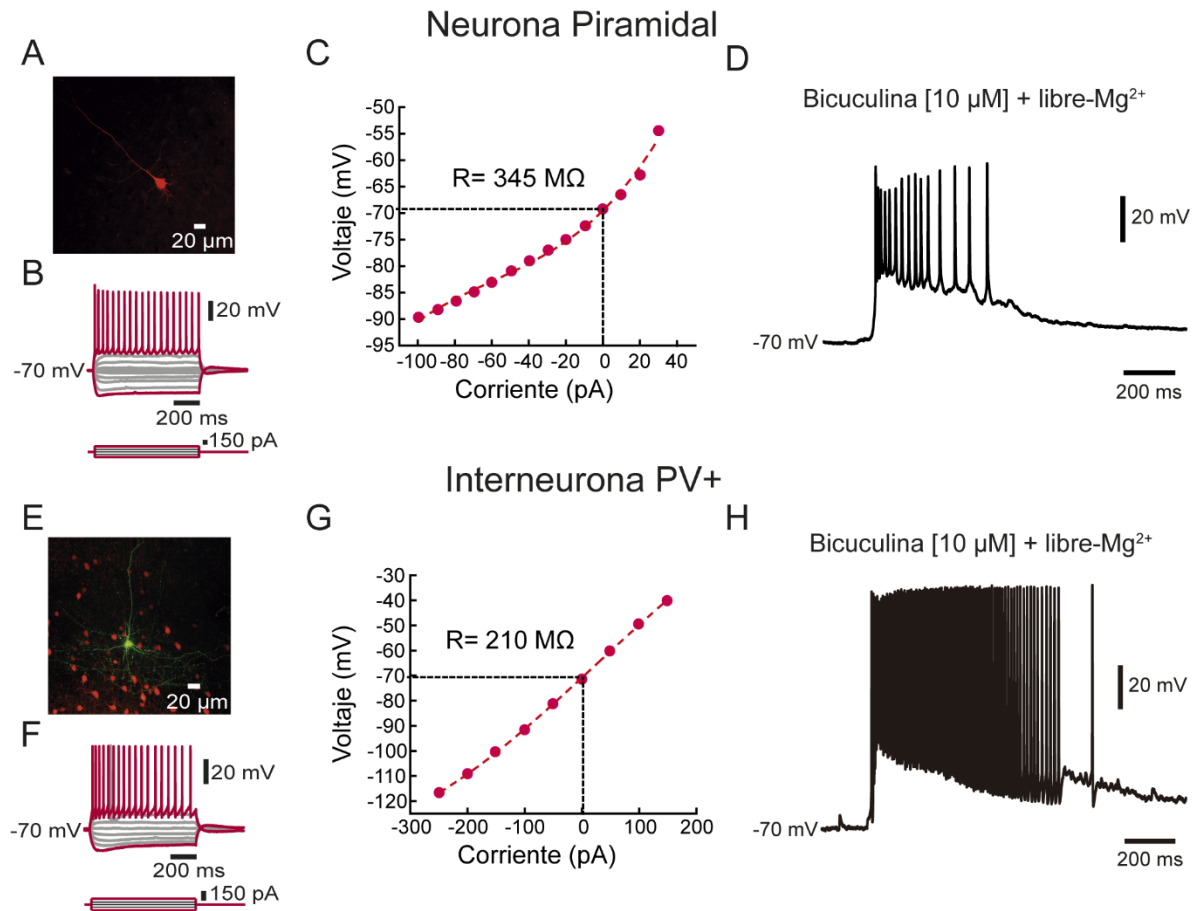
una onda lenta y oscilaciones tardías que corresponden principalmente a la actividad en el ensamble que dura más tiempo activo. (H, I) Espectrogramas de los registros mostrados en (F, G). (J, K) Coactividad de neuronas individuales con un intervalo de tiempo de 5 ms, separadas según los grupos identificados, observe diferentes cursos temporales que confirman los hallazgos utilizando imágenes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **Caracterización morfológica y electrofisiológica de neuronas registradas durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs)**

Se realizaron registros de células en la modalidad de célula entera en las capas 5-6 de la corteza motora de ratones en neuronas PV+ y PV-, tanto en la situación control espontánea como después de inducir IEDs con 10  $\mu\text{M}$  bicuculina en condiciones libres de  $\text{Mg}^{2+}$ . La Figura 9A muestra la morfología de una neurona piramidal marcada intracelularmente con estreptavidina-Cy3 conjugada con biocitina y registrada durante la condición control de actividad espontánea. Para esta célula obtuvimos sus respuestas de voltaje a la aplicación de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes en el soma (Figura 9B) y su correspondiente curva corriente-voltaje (Figura 9C). La resistencia de entrada para una muestra de neuronas PV- con las mismas características fue  $328 \pm 68 \text{ M}\Omega$  ( $n = 12$  neuronas de animales diferentes). Durante la etapa sincrónica de un IED, el disparo de esta misma neurona sin estimulación (Figura 9D) exhibió un cambio despolarizante y un tren de espigas. Todas las neuronas de esta muestra aparecieron en los grupos de breve duración durante las IEDs. La Figura 9E muestra una interneurona PV+ (transfección viral td-Tomato más marcaje intracelular con estreptavidina-FITC conjugada con biocitina). Además, el extenso árbol dendrítico excluye que se trate de una célula piramidal. De la misma manera que en la neurona piramidal antes descrita, se obtuvieron las respuestas de voltaje (arriba) a los pasos de corriente (abajo; Figura 9F) y la curva I-V correspondiente (Figura 9G). En este grupo de interneuronas calculamos una resistencia de entrada promedio de  $204 \pm 60 \text{ M}\Omega$  ( $n = 7$  neuronas de animales diferentes), significativamente diferente al valor medido a partir de neuronas piramidales ( $P = 0.034$ ; prueba de Kolmogórov-



Smirnov; n1 = 7 células PV+; n2 = 12 PV- neuronas con morfología de células piramidales, todos los casos de diferentes animales). En este grupo de neuronas se observó un cambio despolarizante y un tren más prolongado de espigas (Figura 8H) que alcanza frecuencias más altas que las neuronas piramidales (ver Figura 9D), justo como se esperaría de las interneuronas de disparo rápido.



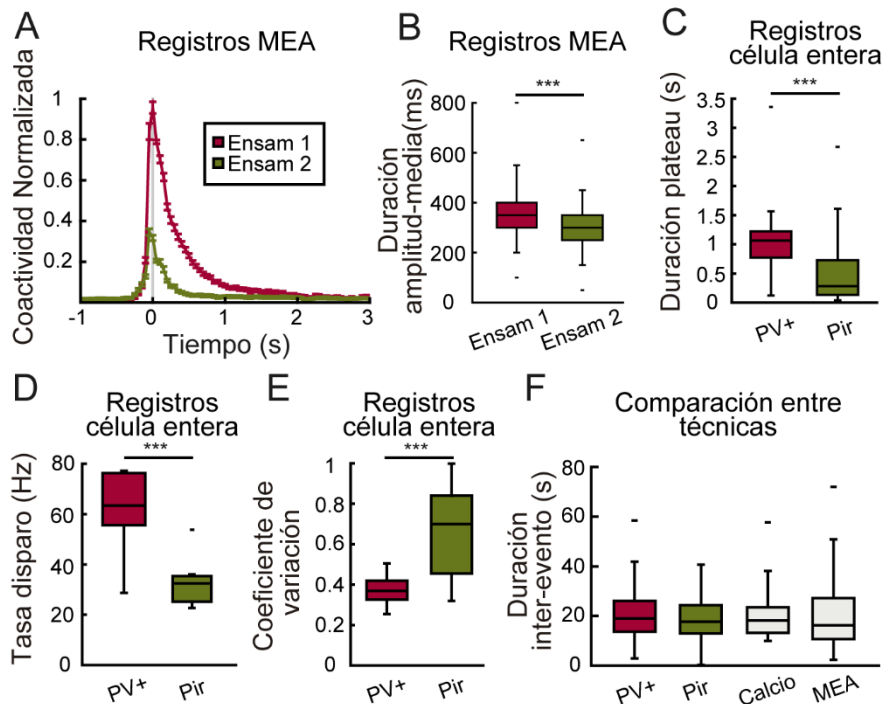
**Figura 9.** Caracterización morfológica y electrofisiología de dos clases de neuronas registradas durante descargas epileptiformes interictales (IEDs). (A) Morfología de una neurona piramidal marcada intracelularmente con estreptavidina-Cy3 conjugada con biocitina (rojo). (B) Respuestas de voltaje (arriba) a la aplicación de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (abajo) en el soma de la misma célula. (C) Curva corriente-voltaje de la neurona que se muestra en (A). (D) Cambio despolarizante más tren de potenciales de acción durante la etapa sincrónica de una IED en condiciones de bicuculina 10  $\mu\text{M}$  y libre de  $\text{Mg}^{2+}$  en la misma célula mostrada en (A). (E) Morfología de una interneurona identificada como PV+ por transfección viral con td-Tomato (rojo) y marcada intracelularmente con biocitina conjugada con estreptavidina-FITC (amarillo). (F) Respuestas de voltaje (arriba) después de la aplicación de pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes (abajo) en el soma de la misma célula. (G) Curva I-V de la neurona

que se muestra en (F). (H) Cambio despolarizante y tren de espigas de la misma interneurona PV+ registrados durante la etapa sincrónica de un IED en bicuculina 10  $\mu\text{M}$  y libre de  $\text{Mg}^{2+}$ . Tenga en cuenta una resistencia de entrada más baja, una frecuencia de disparo más alta y una duración de disparo más larga en comparación con (D).

## **Diferencias en la duración de los grupos neuronales identificados durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs)**

Los dos grupos identificados en los registros de MEAs durante las IEDs presentan diferentes perfiles de disparo. La coactividad de estos grupos durante las IEDs individuales se ilustra en la Figura 10A (código de color como en la Figura 8). La duración del ancho de la amplitud media para el grupo rojo fue de  $0.38 \pm 0.02$  s y fue de  $0.33 \pm 0.05$  s para el grupo verde (Figura 10B;  $P < 0.001$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n = 306$  de seis animales diferentes en ambos casos). En los experimentos de imagenología de calcio, la mayoría de las interneuronas PV+ marcadas tenían una actividad más prolongada que los otros tipos neuronales, coincidiendo principalmente con el patrón de actividad del grupo rojo identificado con los MEAs. La figura 10C muestra la duración de los trenes de potenciales de acción de neuronas registradas individualmente utilizando la técnica de célula entera:  $1.07 \pm 0.49$  s para interneuronas PV+, duración significativamente mayor que la medida en células piramidales:  $0.49 \pm 0.53$  s ( $P < 0.001$ ; prueba de Kolmogórov-Smirnov;  $n_1 = 119$  eventos de neuronas PV+;  $n_2 = 354$  eventos de neuronas piramidales). Este fenómeno se observa en la Figura 9D donde las neuronas piramidales tienen ráfagas mucho más breves que las interneuronas PV+. La tasa de disparo de potenciales de acción durante las IEDs (Figura 10D) en interneuronas PV+ fue de  $61.9 \pm 12.6$  Hz, significativamente más alta que la mostrada por las neuronas piramidales:  $33.4 \pm 4.8$  Hz ( $P < 0.001$ ;  $n_1 = 7$  células PV+;  $n_2 = 12$  células piramidales; prueba de Kolmogórov-Smirnov, todos los casos de diferentes animales). El coeficiente de variación (Figura 10E) medido para células PV+:  $0.37 \pm 0.06$  y neuronas piramidales:  $0.67 \pm 0.12$  fue significativamente diferente ( $P = 0.004$ ;  $n_1 = 7$  células PV+;  $n_2 = 12$  células piramidales; prueba de

Kolmogórov-Smirnov, todos los casos de diferentes animales). Las duraciones entre eventos medidas de pico a pico de actividad máxima durante las IEDs obtenidos con los diferentes protocolos experimentales fueron similares (Figura 10F;  $P = 0.54$ ; Kruskal-Wallis;  $n_1 = 111$  eventos de interneuronas PV+;  $n_2 = 333$  eventos de neuronas piramidales;  $n_3 = 187$  eventos con imagenología de calcio;  $n_4 = 300$  eventos registrados con MEAs). Por lo tanto, los experimentos mostraron resultados similares con todas las técnicas utilizadas.



**Figura 10.** Diferencias en la duración de los ensambles formados durante las descargas epileptiformes interictales (IEDs). (A) Coactividad normalizada de los ensambles formados en los experimentos con MEAs durante IEDs, las curvas están alineadas a su instante máximo de coactividad (tiempo cero; se sigue el código de color en las figuras anteriores). (B) La duración a la mitad de la amplitud de la coactividad muestra un ensamble que exhibe una mayor duración (rojo) durante las IEDs, similar a los resultados obtenidos con los experimentos de imagenología de calcio ( $P < 0.001$ ;  $n = 306$  en ambos casos; prueba de Kolmogórov-Smirnov). (C) Diferencia en la duración de los trenes de potenciales de acción de interneuronas y neuronas piramidales registradas individualmente (registros de células enteras). Similar a los resultados con imágenes de calcio, las interneuronas PV+ permanecen activas durante períodos más largos durante las IEDs (registros de MEA;  $P < 0.001$ ;  $n_1 = 119$  eventos de PV+;  $n_2 = 354$  eventos de PV-; Prueba de Kolmogórov-Smirnov). (D) La tasa de disparo de potenciales de acción de las interneuronas PV+ durante las IEDs fue mayor que la tasa alcanzada por las neuronas piramidales

identificadas (registros de célula entera  $P < 0.001$ ;  $n_1 = 7$  células PV+;  $n_2 = 11$  células piramidales; prueba de Kolmogórov-Smirnov). (E) El coeficiente de variación fue significativamente mayor en las neuronas piramidales con respecto a las células PV+ ( $P = 0.004$ ;  $n_1 = 7$  células PV+;  $n_2 = 11$  células piramidales; prueba de Kolmogórov-Smirnov). (F) Duración entre IEDs recurrentes ( $P = 0.54$ ;  $n_1 = 111$  intereventos de PV+ putativas;  $n_2 = 333$  intereventos de neuronas piramidales putativas;  $n_3 = 187$  intereventos de imágenes de calcio;  $n_4 = 300$  intereventos de MEAs; Prueba Kruskal-Wallis).

## DISCUSIÓN

Los hallazgos originales del presente trabajo son: (1) El tejido cortical en reposo, no estimulado, in vitro, tiene una actividad generada espontáneamente que consiste en secuencias temporales de ensambles neuronales: grupos de neuronas con patrones de actividad espaciotemporal fuertemente correlacionados ([Carrillo-Reid et al., 2009](#); [Dechery y MacLean, 2017](#)). (2) Cuando están activos, la mayoría de los ensambles neuronales van acompañados de la activación de al menos una interneurona PV+. Debido a que nuestro muestreo comprende unas pocas docenas de neuronas, es posible que los conjuntos observados sean muestras de grupos neuronales más grandes por debajo y por encima de nuestro plano de visión bidimensional, por lo que esta observación puede ser una subestimación. Sin embargo, este subconjunto que probablemente estamos observando es suficiente para advertir las secuencias temporales recurrentes ([Buzsáki, 2010](#); [Dechery y MacLean, 2017](#)). (3) El análisis de red mostró que esta actividad espontánea in vitro es similar a una configuración de mundo pequeño con unas pocas neuronas que tienen una gran conectividad y forman un club-rico. Curiosamente, la mayoría de las neuronas conectadas eran PV-, muy probablemente neuronas piramidales ([Fornito et al 2016](#)). (4) El bloqueo de la transmisión GABAérgica con bicuculina en un medio extracelular virtualmente libre de  $Mg^{2+}$  ([Hongo et al 2015](#)) es suficiente para remodelar la red y generar descargas epileptiformes breves y recurrentes sin estimulación. Por su duración son similares a las descargas epileptiformes interictales o IEDs ([Brückner y Heinemann, 2000](#); [de Curtis et al., 2012](#)). El pico inicial de coactividad corresponde al pico interictal inicial en el LFP, y las

postdescargas corresponden a sus oscilaciones lentas. (5) Se reveló el perfil de activación de las interneuronas de disparo rápido (FSI o interneuronas PV+) en estos eventos sincrónicos mediante identificación óptica en ratones PV-Cre. En estos eventos también se describió la participación de neuronas PV- (principalmente glutamatérgicas). (6) En el análisis de redes, en la configuración epileptiforme se obtuvo una red repetitiva recurrente con muchas conexiones funcionales en comparación con los controles. Como era de esperar, este tipo de red tendió a abandonar la configuración de mundo pequeño y tendió a adoptar la de una red regular ([Watts y Strogatz, 1998](#)). (7) Los registros de célula entera confirmaron que las neuronas PV+ identificadas tienen trenes de potenciales de acción con mayor frecuencia y duración que los de las células piramidales. De tal forma, en las condiciones actuales, las postdescargas se deben básicamente a interneuronas.

## **Configuración de red estándar en tejido cortical en reposo**

Los experimentos de imagenología de calcio con resolución unicelular demostraron que una secuencia temporal de ensambles neuronales corticales se puede generar espontáneamente en tejido cortical no estimulado in vitro, el 95.34% de las transiciones medidas en estas condiciones tuvo como objetivo otro ensamble en el microcircuito, el resto de transiciones resultaron en actividad de tipo recurrente, sin embargo, solo el 10.64% de los ensambles neuronales mostraron este último comportamiento ([Hebb, 1949](#); [Abeles, 1991](#); [Beggs y Plenz, 2004](#); [Ikegaya et al., 2004](#); [Luczak et al., 2007](#); [Pastalkova et al., 2008](#); [Dechery y MacLean, 2017](#)). Estas observaciones podrían representar una actividad estructurada básica de la corteza motora de los ratones en reposo, o sin estimulación, con pocas o nulas influencias provenientes de regiones lejanas ([Luczak et al., 2007](#)). Aunque mayoritariamente estos ensambles neuronales se activan significativamente solos, es decir, aparecen picos de coactividad formados exclusivamente de neuronas pertenecientes a estos grupos. Existe cierta superposición temporal entre ensambles, el 70.83 % de los ensambles en situación espontánea presentaron al menos una coactivación con

otro ensamble en la red, lo cual presupone que existe colaboración entre ellos para realizar algunas tareas. Lo cual también apoya la idea de que una neurona no participa exclusivamente en un ensamble neuronal o computación cerebral ([Carrillo-Reid et al., 2009](#); [Dechery y MacLean, 2017](#)). De hecho, el algoritmo aquí mostrado puede medir que tanto una neurona pertenece a un grupo dado, nosotros nos decantamos por no mostrar esos datos de agrupamiento difusos, aunque si alguien quisiera estudiar ese aspecto podría abordarlo con herramientas similares a las que aquí desarrollamos.

En nuestras condiciones experimentales, esto dio como resultado una forma estable de actividad espontánea en la corteza motora de los ratones, sin necesidad de estimulación y sin influencias de largo alcance. Durante esta actividad espontánea, cada ensamble neuronal tiene la asociación de interneuronas PV+, casi ensamble por ensamble. De los diversos mecanismos para explicar estas secuencias, dos son pertinentes aquí: (1) Las neuronas glutamatérgicas sincronizadas excitan el siguiente conjunto en una secuencia recurrente, en una clase de circuito de retroalimentación positiva ([Hebb, 1949](#); [Abeles et al., 1991](#); [Aertsen et al., 1996](#); [Reyes, 2003](#); [Fries, 2005](#); [DeMarse et al., 2016](#), [Mongillo et al., 2018](#)). (2) Las neuronas inhibitorias son necesarias para inhibir los ensambles que no disparan, la actividad y el número de neuronas en sus propios ensambles en una interacción excitadora-inhibidora ([Sánchez-Vives y McCormick, 2000](#); [Cossart et al., 2003](#); [Litvak et al., 2003](#); [Litvak et al., 2003](#); [Grillner et al., 2005](#), [Mongillo et al., 2018](#)). Aquí mostramos evidencia principalmente sobre el segundo mecanismo, al inhibir la acción de las neuronas GABAérgicas en el microcircuito, este es incapaz de mantener la estabilidad de los patrones de actividad en la corteza motora de ratón. Aunque existe evidencia de la primera hipótesis aquí mencionada ([Loewenstein et al., 2015](#); [Mongillo et al., 2018](#)), hacen falta mayores estudios en nuestra preparación para investigar el componente glutamatérgico en el tejido cortical. Sin embargo, podemos concluir que tanto la excitación como la inhibición juegan roles completamente diferentes en el control de la persistencia de los ensambles neuronales de la corteza motora de ratón.

Las neuronas PV+ tienen un patrón característico de actividad dentro del circuito. Debido a que nuestro algoritmo de agrupamiento depende de la correlación del patrón de disparo, este resultado sugiere que diferentes neuronas PV+ adaptan su patrón de disparo al de sus compañeras PV-, sugiriendo un papel preciso de las interneuronas en cada ensamble. Debido a que tanto las neuronas PV+ como las PV- (en su mayoría neuronas piramidales) aumentan su actividad durante el bloqueo GABAérgico y colapsan las secuencias temporales de los ensambles neuronales que se encuentran en la actividad espontánea control, la necesidad de que un ensamble posea sus propias interneuronas para regular las secuencias temporales parece importante, tanto para inhibir a otros ensambles como para limitar el número de neuronas en sus propios grupos. De lo contrario, se produce una sola columna de coactividad repetitiva (IED).

La distribución del grado de las neuronas PV+ y PV- son similares, lo que indica que existe la misma probabilidad de encontrar uno de estos tipos de neuronas como hubs en la red. En general, las interneuronas PV+ estaban estrechamente conectadas a los hubs de la red. Estas evidencias experimentales sugieren que las secuencias de retroalimentación impulsadas por neuronas piramidales están controladas por neuronas inhibitorias con el fin de generar secuencias ordenadas temporalmente. Aún con estos resultados, es necesario estudiar otras clases de interneuronas utilizando un marco similar para develar su función estructural en los microcircuitos corticales.

## **Reestructuración de la arquitectura funcional cortical tras el bloqueo GABAérgico**

Se desconoce la maquinaria celular completa que genera las secuencias temporales de los ensambles neuronales en el circuito cortical en reposo, sin embargo, está completamente remodelada después de eliminar el importante componente proporcionado por la inhibición GABAérgica. Al bloquear la transmisión GABAérgica, el tejido cortical en reposo no estimulado es capaz de reconfigurarse a partir de una secuencia temporal de ensambles neuronales con participación

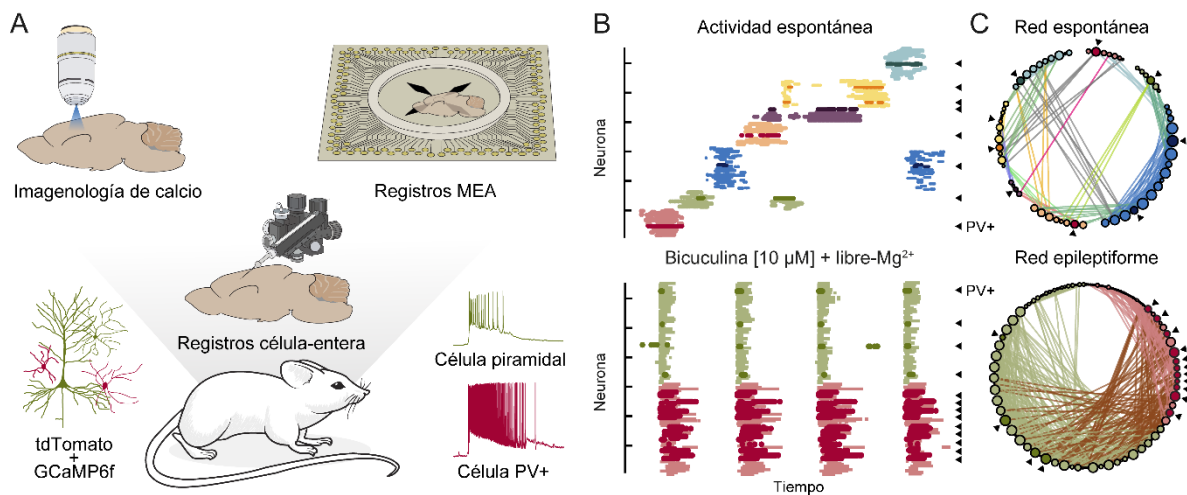
escasa y ordenada de interneuronas PV+, a un único evento sincrónico recurrente. El análisis de redes demostró esta remodelación al estudiar la configuración de mundo pequeño que se ve en la actividad espontánea, la cual se transformó en una red completamente regular con muchos más enlaces y un par de ensambles fuertemente correlacionados. En estos mismos experimentos, identificamos neuronas PV+ con td-Tomato, e inferimos su actividad junto con las neuronas PV- utilizando GCaMP6f bajo el promotor de sinapsina. La actividad neuronal durante las IEDs muestra claramente dos grupos con distintos perfiles de activación, uno de estos grupos poseía más interneuronas y se mantuvo activo durante tiempos más prolongados. Los potenciales de acción unitarios reales obtenidos con los MEAs mostraron el mismo resultado: dos grupos de neuronas, uno de ellos con mayor duración que el otro. Sin embargo, en términos generales ambos tipos neuronales (PV+ y PV-) aumentaron en la misma proporción su actividad durante las IEDs.

Estos resultados muestran que la actividad de las interneuronas PV+ es esencial para mantener la configuración espontánea del tejido cortical, dado que su inhibición produce eventos de tipo interictal. Sin embargo, en ningún caso pudimos registrar el desarrollo de un evento de tipo ictal, sugiriendo la necesidad de transmisión GABAérgica o quizá algún estímulo glutamatérgico externo para llegar a esa etapa ([Bekenstein y Lothman, 1993](#); [Jirsa et al., 2014](#); [Sessolo et al., 2015](#); [Khoshkhou et al., 2017](#); [Zaitsev, 2017](#); [Chang et al., 2018](#)). Este comportamiento es totalmente reversible al que se muestra en la Figura 3 y 4, aun después de permanecer durante varios minutos (registramos hasta 60 min) en estado epileptiforme.

Los registros de potenciales de acción reales con MEAs se parecían mucho a los obtenidos con los potenciales de acción inferidos con imagenología de calcio: las IEDs consistieron en eventos sincrónicos capaces de reclutar una gran cantidad de neuronas en el tejido, cuyo mayor valor de coactividad coincide con el pico principal interictal registrado en el LFP, seguido por potenciales de acción cada vez con menor frecuencia de aparición mientras se disipan ondas lentas (<10 Hz principalmente) en el LFP. Según los experimentos de imagenología de calcio, la mayoría de las espigas en el grupo rojo deberían corresponder a FSI o



interneuronas PV+. Para estar completamente seguros de esta inferencia, registramos individualmente neuronas de estos diferentes grupos durante estos eventos y las identificamos anatómicamente con inmunohistoquímica. Los experimentos de *current-clamp* de células enteras antes y durante la sincronización de las IEDs confirmaron que el método de agrupación utilizado tanto en las imágenes de calcio como en los registros de MEAs distinguía entre neuronas piramidales (la mayoría de PV-) y patrones de activación de interneuronas PV+, lo que facilita el recuento de su participación y atestigua sus roles durante la sincronización de las IEDs separándolos en dos grupos dentro del mismo evento. Al medir la duración de sus trenes de potenciales de acción, probamos que las neuronas PV+ se activan durante tiempos más prolongados.



**Figura 11.** Hallazgos originales del trabajo. (A) Se utilizaron tres técnicas de registro neuronal distintas en la corteza motora de ratones transgénicos PV-Cre. Con una transfección viral fue posible expresar GCaMP6f en todas las neuronas a donde difundió y td-Tomato en las interneuronas PV+. Con los registros de célula entera se observó un patrón de disparo diferencial entre neuronas piramidales y PV+ durante la presencia de bicuculina [10 μM] y en un medio libre de Mg<sup>2+</sup>. Las interneuronas PV+ tienen un disparo más prolongado durante las IEDs. (B) La actividad poblacional espontánea muestra una diversidad de ensamblajes neuronales activándose de manera secuencial. La mayoría de los ensamblajes en condición control contenían su propia interneurona PV+. La actividad epileptiforme condensa este patrón de actividad a unos eventos sincrónicos y tiende a separar las neuronas piramidales de las PV+. (C) Las redes obtenidas en ambas condiciones presentaron características topológicas distintas. Las redes espontáneas se asemejan a las llamadas redes de mundo pequeño, con una mayor eficiencia en su intercomunicación y una alta tendencia a formar grupos. Por el contrario, las redes

epileptiformes tendieron a comportarse como redes regulares, con una topología muy rígida y con poca tendencia a formar comunidades.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, la corteza motora de ratón no estimulada in vitro genera espontáneamente una actividad de red que consiste en secuencias temporales de ensambles neuronales, que persiste de forma recurrente sin estimulación ni influencias de largo alcance. Cada ensamble neuronal puede ir acompañado de una interneurona PV+ o FSI. La configuración de este circuito es similar a la de una red de mundo pequeño. Las métricas de red arrojan que la mayoría de las neuronas centrales conectadas son PV- favoreciendo la hipótesis de la propagación feed-forward a través de células piramidales. Sin embargo, los ensambles con neuronas PV+ están conectados a estos subconjuntos de neuronas, y cuando se bloquea la transmisión de GABAérgica, las secuencias temporales de los ensambles colapsan en uno recurrente, lo que sugiere que la inhibición es necesaria para controlar la actividad espontánea. El ensamble resultante tiene la duración y las características electrofisiológicas de IEDs recurrentes compuestas por la coactividad de ambos grupos neuronales, interneuronas PV+ o FSI y neuronas piramidales putativas (PV- y caracterización electrofisiológica), lo que sugiere que la transmisión GABAérgica normalmente impide su aparición. Estos eventos sincrónicos están claramente divididos en dos grupos, uno de ellos con un disparo más prolongado que el otro, compuesto principalmente por neuronas PV+. Debido a que no se registró un evento de tipo ictal después de varios minutos de registro de IEDs, concluimos que quizás un estímulo diferente y/o una manipulación diferente del componente GABAérgico sean necesarios para su aparición, lo que hace que esta preparación sea ideal para estudiar tanto los mecanismos de actividad cortical espontánea como su transformación en descargas epileptiformes breves.

# REFERENCIAS

- Abeles M (1991) *Corticonics: neural circuits of the cerebral cortex*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Aertsen A, Diesmann M, Gewaltig MO (1996) Propagation of synchronous spiking activity in feedforward neural networks. *J Physiol Paris* 90(3–4):243–247. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(97\)81432-5](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(97)81432-5).
- Aparicio-Juárez A, Duhne M, Lara-González E, Ávila-Cascajares F, Calderón V, Galarraga E, Bargas J. (2019) Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur J Neurosci*.49(6):834-848. <https://doi: 10.1111/ejn.13806>.
- Arias-García MA, Tapia D, Laville JA, Calderón VM, Ramiro-Cortés Y, Bargas J, Galarraga E (2018) Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct* 223:1229–1253. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1536-6>.
- Avoli M, de Curtis M (2011) GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol* 95:104–132. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.07.003>.
- Avoli M, Panuccio G, Herrington R, D’Antuono M, de Guzman P, Lévesque M (2013) Two different interictal spike patterns anticipate ictal activity in vitro. *Neurobiol Dis* 52:168–176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.004>.
- Avoli M, Jefferys JGR (2016) Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J Neurosci Methods* 260:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.10.006>.
- Bakhurin KI, Mac V, Golshani P, Masmanidis SC (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 AL (2016) *Network science*. Cambridge University Press.
- Bargas J, Pérez-Ortega JE (2017) Microcircuits neuroscience to understand pathophysiology. *Oncotarget* 8(5):7226-7227. doi: 10.18632/oncotarget.14792.
- Beggs JM, Plenz D (2004) Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures. *J Neurosci* 24(22):5216–15129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0540-04.2004>.
- Bekenstein JW, Lothman EW (1993) Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259 (5091):97–100. <https://doi.org/10.1126/science.8093417>.

Berkovic SF, Mulley JC, Scheffer IE, Petrou S (2006). Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors. *Trends in Neurosciences*. 29 (7): 391–7. doi: 10.1016/j.tins.2006.05.009

Binnie CD (2003) Cognitive impairment during epileptiform discharges: is it ever justifiable to treat the EEG? *Lancet Neurol* 2:725–730. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00584-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00584-2).

Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang DU (2006) Complex networks: structure and dynamics. *Phys Rep* 424:175–308. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2005.10.009>.

Bruno AM, Frost WN, Humphries MD (2015) Modular deconstruction reveals the dynamical and physical building blocks of a locomotion motor program. *Neuron* 86:304–318. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.005>.

Brückner C, Heinemann U (2000) Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res* 859:15–20. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02348-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02348-3).

Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci* 10:186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>.

Buzsáki G (2010) Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron* 68:362–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.023>.

Buzsáki G, Tingley D (2018) Space and Time: The Hippocampus as a sequence generator. *Trends Cogn Sci* 10:853–869. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.07.006>.

Cammarota M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Carmignoto G (2013) Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *J Physiol* 591(4):807–822. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238154>.

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>.

Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737–749. <https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008>.

Carrillo-Reid L, Yang W, Bando Y, Peterka DS, Yuste R (2016) Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science* 353 (6300):691–694. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7560>.

Carrillo-Reid L, Yuste R (2020) Playing the piano with the cortex: role of neuronal ensembles and pattern completion in perception and behavior. *Current Opinion in Neurobiology* 64:89-95. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.03.014>

Chang M, Dian JA, Dufour S, Wang L, Chameh HM, Ramani M, Zhang L, Carlen PL, et al. (2018) Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through postinhibitory rebound excitation. *Neurobiol Dis* 109:102–116. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.007>.

Chen TS, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, et al. (2013) Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499(7458):295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.

Churchland MM, Cunningham JP, Kaufman MT, Foster JD, Nuyujukian P, Ryu SI, Shenoy KV (2012) Neural population dynamics during reaching. *Nature* 487(7405):51–56. <https://doi.org/10.1038/nature11129>.

Churchland PS, Churchland PM (2002) Neural worlds and real worlds. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 903–907(2002). doi:10.1038/nrn958

Cohen I, Huberfeld G, Miles R (2006) Emergence of disinhibition induced synchrony in the CA3 region of the guinea pig hippocampus in vitro. *J Physiol* 570(Pt 3):583–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097899>.

Colizza V, Flammini A, Serrano MA, Vespignani A (2006) Detecting rich-club ordering in complex networks. *Nat Phys* 2:110–115. <https://doi.org/10.1038/nphys209>.

Cossart R, Aronov D, Yuste R (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423:283–288. <https://doi.org/10.1038/nature01614>.

Cossart R (2014) Operational hub cells: a morpho-physiologically diverse class of GABAergic neurons united by a common function. *Curr Opin Neurol* 26:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.12.002>.

Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11846>.

de Curtis M, Jefferys JGR, Avoli M (2012) Interictal epileptiform discharges in partial epilepsy: complex neurobiological mechanisms based on experimental and clinical evidence. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, editors. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). p. 303–325.

de la Prida LM, Huberfeld G, Cohen I, Miles R (2006) Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 49(1):131–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.034>.

Dechery JB, MacLean JN (2017) Emergent cortical circuit dynamics contain dense, interwoven ensembles of spike sequences. *J Neurophysiol* 118:1914–1925. <https://doi.org/10.1152/jn.00394.2017>.

Dehaene S, Lau H, Kouider S (2017) What is consciousness, and could machines have it? *Science* 358(6362):486–492. doi: 10.1126/science.aan8871.

DeMarse TB, Pan L, Alagapan S, Brewer GJ, Wheeler BC (2016) Feed-forward propagation of temporal and rate information between cortical populations during coherent activation in engineered in vitro networks. *Front Neural Circuits* 10(32). <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00032>.

Derchansky M, Jahromi SS, Mamani M, Shin DS, Sik A, Carlen PL (2008) Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: a switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. *J Physiol* 15586(2):477–494. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143065>.

Duhne M, Lara-González E, Laville A, Padilla-Orozco M, Ávila-Cascajares F, Arias-García M, Galarraga E, Vargas J (2020) Activation of parvalbumin-expressing neurons reconfigures neuronal ensembles in murine striatal microcircuits. *Eur J Neurosci*. 00:1-16. doi: 10.1111/ejn.14670.

Feldt S, Bonifazi P, Cossart R (2011) Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: experimental and theoretical insights. *Trends Neurosci* 34(5):225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>.

Fornito A, Zalesky A, Bullmore ET (2016) *Fundamentals of brain network analysis*. London: Academic Press.

Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* 9:474–480. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.08.011>.

Gonzalez-Sulser A, Wang J, Queenan BN, Avoli M, Vicini S, Dzakpasu R (2012) Hippocampal neuron firing and local field potentials in the in vitro 4-aminopyridine epilepsy model. *J Neurophysiol* 108:2568–2580. <https://doi.org/10.1152/jn.00363.2012>.

Grillner S, Markram H, De Schutter E, Silberberg G, LeBeau FE (2005) Microcircuits in action—from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci* 28(10):525–533. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.003>.

Gründemann J, Bitterman Y, Lu T, Krabbe S, Grewe BF, Schnitzer MJ, Lüthi A (2019) Amygdala ensembles encode behavioral states. *Science* 364: eaav8736. <https://doi.org/10.1126/science.aav8736>.

Harris KD (2005) Neural signatures of cell assembly organization. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 399–407. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1669>.

Harvey CD, Coen P, Tank DW (2012) Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature* 484(7392):62–68. <https://doi.org/10.1038/nature10918>.

Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior*. *J Clin Psychol* 335.

Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signalling. *PLoS Biol* 3:0878–0890.

Holmes GL. (2004) Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(2):101-5. doi: 10.1002/mrdd.20019. PMID: 15362164.

Holmes GL, Lenck-Santini PP (2006) Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. *Epilepsy Behav* 8 (3):504–515. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.11.014>.

Holmes GL. (2004) Effects of early seizures on later behavior and epileptogenicity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(2):101-5. doi: 10.1002/mrdd.20019. PMID: 15362164.

Hongo Y, Takasu K, Ikegaya Y, Hasegawa M, Sakaguchi G, Ogawa K (2015) Heterogeneous effects of antiepileptic drugs in an in vitro epilepsy model – a functional multineuron calcium imaging study. *Eur J Neurosci* 42:1818–1829. <https://doi.org/10.1111/ejn.12945>.

Huberfeld G, de la Prida LM, Pallud J, Cohen I, Quyen MLV, Adam C, Clemenceau S, Baulac M, et al. (2011) Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci* 14:627–635. <https://doi.org/10.1038/nn.2790>.

Huberfeld G, Le Duigou C, Le Van Quyen M, Navarro V, Baulac M, Miles R. (2013) The paradox of the paroxysm: can seizure precipitants help explain human ictogenesis? *The Neuroscientist* 2013;19,523–40. <http://dx.doi.org/10.1177/1073858413497430>.

Humphries MK, Gurney K (2008) Network ‘small-world-ness’: A quantitative method for determining canonical network equivalence. *PLoS ONE* 3(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002051> e0002051.

Ibanez-Sandoval O, Hernández A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erij D, Aceves J, Vargas J (2006) Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800–1811. <https://doi.org/10.1152/jn.00620.2007>.

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(5670):559–564. <https://doi.org/10.1126/science.1093173>.

Jirsa VK, Stacey WC, Quilichini PP, Ivanov AI, Bernard C (2014) On the nature of seizure dynamics. *Brain* 137:2210–2230. <https://doi.org/10.1093/brain/awu133>.

Karlócai MR, Kohus Z, Káli S, Ulbert I, Szabó G, Máté Z, Freund TF, Gulyas AI (2014) Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what’s the difference? *Brain* 137:463–485. <https://doi.org/10.1093/brain/awt348>.

Khoshkhoo S, Vogt D, Sohal VS (2017) Dynamic, cell-type-specific roles for GABAergic interneurons in a mouse model of optogenetically inducible seizures. *Neuron* 93:291–298. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.043>.

- Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I (2013) Ondemand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 4(1376). <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>.
- Joglekar MR, Mejias JF, Yang GR, Xiao-Jing W (2018) Inter-areal balanced amplification enhances signal propagation in a large-scale circuit model of the primate cortex. *Neuron* 98, 222–234. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.031
- Lampl I, Reichova I, Ferster D (1999) Synchronous membrane potential fluctuations in neurons of the cat visual cortex. *Neuron* 22:361–374. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81096-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81096-X).
- Loewenstein Y, Yanover U, Rumpel S. (2015) Predicting the dynamics of network connectivity in the neocortex. *J. Neurosci.* 35, 12535–12544. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2917-14.2015>.
- Lévesque M, Chen LY, Hamidi S, Avoli M (2018) Dynamic interneuron-principal cell interplay leads to a specific pattern of in vitro ictogenesis. *Neurobiol Dis* 115:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.004>.
- Litvak L, Delgutte B, Eddington D (2003) Improved neural representation of vowels in electric stimulation using desynchronizing pulse trains. *J Acoust Soc Am* 114(4 Pt 1):2099–2111. <https://doi.org/10.1121/1.1612494>.
- Löscher W (2016) Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Research* 126,157-84. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.05.016>
- Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1):347–352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605643104>.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev* 5:793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>.
- Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, DeFelipe J, Hill SL, Segev I, Schurmann F, et al. (2015) Reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry. *Cell* 163:456–492. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.029>.
- Miller J, 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>.
- Mongillo G, Rumpel S, Loewenstein Y (2018) Inhibitory connectivity defines the realm of excitatory plasticity. *Nat Neurosci* 21: 1463–1470. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0226-x>
- Mosbah A, Tramonì E, Guedj E, Aubert S, Daquin G, Ceccaldi M, Félician O, Bartolomei F (2014) Clinical, neuropsychological, and metabolic characteristics of transient epileptic amnesia syndrome. *Epilepsia* 55(5):699–706. <https://doi.org/10.1111/epi.12565>.



- Muldoon SF, Soltesz I, Cossart R (2013) Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *PNAS* 110(9):3567–3572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216958110>.
- Muldoon SF, Villette V, Tressard T, Malvache A, Reichinnek S, Bartolomei F, Cossart R (2015) GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice. *Brain* 138:2875–2890. <https://doi.org/10.1093/brain/awv227>.
- Newman MEJ (2006) Modularity and community structure in networks. *PNAS* 103(23):8577–8582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601602103>.
- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR (2010) Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51:883–890. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>.
- Oh SW, Harris JA, Ng J, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, et al. (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508:207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>.
- Pastalkova E, Itskov V, Amarasingham A, Buzsáki G (2008) Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321(5894):1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>.
- Peters AJ, Chen SX, Komiyama T (2014) Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature* 510 (7504):263–267. <https://doi.org/10.1038/nature13235>.
- Reyes AD (2003) Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nat Neurosci* 6:593–599. <https://doi.org/10.1038/nn1056>.
- Sadovskiy AJ, MacLean JN (2013) Scaling of topologically similar functional modules defines mouse primary auditory and somatosensory microcircuitry. *J Neurosci* 33(35):14048–14060. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1977-13.2013>.
- Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64:404–418. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.020>.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3(10):1027–1034. <https://doi.org/10.1038/79848>.
- Sasaki T, Matsuki N, Ikeyaga Y (2007) Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 27(3):517–528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4514-06.2007>.

Serafini R, Dettloff S, Loeb JA (2016) Neocortical slices from adult chronic epileptic rats exhibit discharges of higher voltages and broader spread. *Neuroscience* 322:509–524. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.026>.

Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, Fellin T, Carmignoto G (2015) Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J Neurosci* 35(26):9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>.

She Q, Chen G, Chan RHM (2016) Evaluating the small-world-ness of a sampled network: functional connectivity of entorhinal hippocampal circuitry. *Sci Rep* 6(21468). <https://doi.org/10.1038/srep21468>.

Sheng M, Lu D, Shen Z, Poo M, (2019) Emergence of stable striatal D1R and D2R neuronal ensembles with distinct firing sequence during motor learning. *PNAS* 116(22): 11038–11047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901712116>.

Shepherd, G.M., Grillner, S., (2010) *Handbook of brain microcircuits*. Oxford University Press, Oxford.

Siegle JH, Jia X, Durant S, Gale S, Olsen SR, Koch C, et al., (2021) Survey of spiking in the mouse visual system reveals functional hierarchy. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03171-x>

Smith EH, Schevon CA (2016) Toward a mechanistic understanding of epileptic networks. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16:97. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0701-2>.

Sporns O, Tononi G, Kötter R (2005) The human connectome: a structural description of the human brain. *PLoS Computational Biology*, 1:4, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010042>

Sporns O (2011) *Networks of the brain*. MIT Press.

Sporns O, Bezel RF (2016) Modular brain networks. *Annu. Rev. Psychol.* 67, 613–640. doi:10.1146/annurev-psych-122414-033634

Sun X, Bernstein M, Meng M, Rao S, Sørensen A, Yao L, Zhang X, Anikeeva PO, Lin Y (2020) Functionally Distinct Neuronal Ensembles within the Memory Engram. *Cell* 181(2): 410-423.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.055>.

Theis L, Berens P, Froudarakis E, Euler T, Tolias AS, Bethge M (2016) Benchmarking spike rate inference in population calcium imaging. *Neuron* 90:471–482. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.014>.

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 91:260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>.

van den Heuvel MP, Sporns O (2011) Rich-club organization of the human connectome. *J Neurosci* 31(44):15775–15786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3539-11.2011>.

Vogelstein JT, Packer AM, Machado TA, Sippy T, Babadi B, Yuste R, Paninski L (2010) Fast nonnegative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging. *J Neurophysiol* 104:3691–3704. <https://doi.org/10.1152/jn.01073.2009>.

Wang S, Polo-Parada L, Landmesser LT (2009) Characterization of Rhythmic Ca<sup>2+</sup> Transients in Early Embryonic Chick Motoneurons: Ca<sup>2+</sup> Sources and Effects of Altered Activation of Transmitter Receptors. *J Neurosci*. 29(48):15232-15244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3809-09.2009>.

Watts DJ, Strogatz SH (1998) Collective dynamics of ‘small-world’ networks. *Nature* 393:440–442. <https://doi.org/10.1038/30918>.

Wolf P, Beniczky S. Understanding ictogenesis in generalized epilepsies. *Expert Rev Neurother* 2014;14, 787–98. <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.2014.925803>

Zaitsev AV (2017) The role of GABAergic interneurons in the cortex and hippocampus in the development of epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 47(8):913–922. <https://doi.org/10.1007/s11055-017-0491-2>.

Zavvarian MM, Hong J, Fehlings MG (2020) The Functional Role of Spinal Interneurons Following Traumatic Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci* 18:14-127. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00127>.

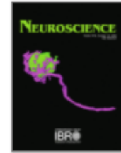
Zhou JL, Shatskikh TN, Liu X, Holmes GL (2007) Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. *Eur J Neurosci* 25(12):3667–3677. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05598.x>.

# ARTÍCULO PUBLICADO



Neuroscience

Volume 446, 15 October 2020, Pages 304-322



## Spontaneous Activity of Neuronal Ensembles in Mouse Motor Cortex: Changes after GABAergic Blockade

Miguel Serrano-Reyes, Brisa García-Vilchis, Rosa Reyes-Chapero, Verónica Alejandra Cáceres-Chávez, Dagoberto Tapia, Elvira Galarraga, José Bargas  

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

Received 9 June 2020, Accepted 18 August 2020, Available online 27 August 2020.



## Spontaneous Activity of Neuronal Ensembles in Mouse Motor Cortex: Changes after GABAergic Blockade

Miguel Serrano-Reyes, Brisa García-Vilchis, Rosa Reyes-Chapero, Verónica Alejandra Cáceres-Chávez, Dagoberto Tapia, Elvira Galarraga and José Bargas\*

División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, Mexico

**Abstract**—The mouse motor cortex exhibits spontaneous activity in the form of temporal sequences of neuronal ensembles *in vitro* without the need of tissue stimulation. These neuronal ensembles are defined as groups of neurons with a strong correlation between its firing patterns, generating what appears to be a predetermined neural conduction mode that needs study. Each ensemble is commonly accompanied by one or more parvalbumin expressing neurons (PV+) or fast spiking interneurons. Many of these interneurons have functional connections between them, helping to form a circuit configuration similar to a small-world network. However, rich club metrics show that most connected neurons are neurons not expressing parvalbumin, mainly pyramidal neurons (PV−) suggesting feed-forward propagation through pyramidal cells. Ensembles with PV+ neurons are connected to these hubs. When ligand-gated fast GABAergic transmission is blocked, temporal sequences of ensembles collapse into a unique synchronous and recurrent ensemble, showing the need of inhibition for coding cortical spontaneous activity. This new ensemble has a duration and electrophysiological characteristics of brief recurrent interictal epileptiform discharges (IEDs) composed by the coactivity of both PV− and PV+ neurons, demonstrating that GABA transmission impedes its occurrence. Synchronous ensembles are clearly divided into two clusters one of them lasting longer and mainly composed by PV+ neurons. Because an ictal-like event was not recorded after several minutes of IEDs recording, it is inferred that an external stimulus and/or fast GABA transmission are necessary for its appearance, making this preparation ideal to study both the neuronal machinery to encode cortical spontaneous activity and its transformation into brief non-ictal epileptiform discharges. © 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** motor cortex spontaneous activity, neuronal ensembles, epileptiform activity, parvalbumin expressing neurons, calcium imaging recordings, multielectrode array recordings.

### INTRODUCTION

It has been postulated that neurons do not perform their functions in isolation, there is evidence that the activity of cortical circuits is generated by a network of neuronal ensembles that are activated and propagate sequentially (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Beggs and Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004; Luczak et al., 2007; Pastalkova et al., 2008; Markram et al., 2015; Dechery and MacLean, 2017). Most of these studies involve sensory, motor, or decision-making tasks and have been performed both in the cortex and in other brain regions (Carrillo-Reid et al., 2008; 2016; Buzsáki, 2010; Churchland et al., 2012; Harvey et al., 2012; Peters

et al., 2014; Gründemann et al., 2019). However, there is a paucity of network analysis in non-stimulated or spontaneously active rodent motor cortex *in vitro*. We approached this study asking if the local functional architecture of the motor cortex at rest can be seen as a spontaneous temporal sequence of neuronal ensembles (Dechery and MacLean, 2017). This type of spontaneous pattern can be a model of how local activity persists through cortical circuits without stimulus (Luczak et al., 2007). In addition, we address the role of inhibitory interneurons, in particular, parvalbumin-expressing cells (PV+) or fast-spiking interneurons (FSI), during network activity, given their participation in physiological and pathological oscillations, and their special relationship with epileptogenesis (Avoli and de Curtis, 2011; Huberfeld et al., 2011; Muldoon et al., 2013, 2015; Hongo et al., 2015; Serafini et al., 2016; Smith and Schevon, 2016). We used PV-Cre mice to identify PV+ interneurons in the motor cortex. In this way, once the control properties of the rodent motor cortex were established, we proceeded to perform a pharmacological

\*Corresponding author.

E-mail address: [jbargas@ifc.unam.mx](mailto:jbargas@ifc.unam.mx) (J. Bargas).

**Abbreviations:** FSIs, fast-spiking interneurons; GABA, gamma-aminobutyric acid; IEDs, interictal epileptiform discharges; LFPs, local field potentials; MEAs, multi-electrodes arrays; PV+, parvalbumin expressing neurons; PV−, neurons not expressing parvalbumin mainly pyramidal neurons.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.08.025>

0306-4522/© 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

manipulation to focus the study on describing the participation of the PV+ interneurons in epileptiform events.

Epilepsy prevalence is around 65 million people worldwide (Ngugi et al., 2010). Efforts to understand the mechanisms of this disease are being done. Helpful *in vitro* models of epileptiform-like events have been developed. Some use electrical stimulation, convulsant drugs, changes in the extracellular ionic environment or combinations of these (Avoli and Jefferys, 2016). As a result, several kinds of epileptiform discharges have been described. Here, we are interested in brief and recurrent interictal epileptiform discharges (IEDs; Brückner and Heinemann, 2000; de Curtis et al., 2012), which appear between or before pre-ictal spikes or ictal-like discharges (Huberfeld et al., 2011). IEDs have been postulated to be driven by synchronized GABAergic interneurons, while pre-ictal and ictal events are thought to have a larger contribution of glutamatergic neurons (Derchansky et al., 2008; Huberfeld et al., 2011; Karlócai et al., 2014; Chang et al., 2018; Lévesque et al., 2018). However, quantitative network relationships between excitatory and inhibitory neurons during IEDs are lacking. When pre-ictal events appear, ictal events are eminent. But IEDs may not lead to full ictal discharges during long time periods, bringing the opportunity to study them in isolation, in the motor cortex, to better observe the underlying multiunit activity with single cell resolution, and separate the collective participation of GABAergic PV+ and non-GABAergic PV− (mostly glutamatergic) neuronal populations (Avoli and de Curtis, 2011; Avoli et al., 2013). GABAergic contribution to IEDs raises a question about whether they protect from or precipitate ictal events (de Curtis et al., 2012). We used a cortical *in vitro* model where GABAergic transmission is impaired by bicuculline plus  $Mg^{2+}$ -free solution (Cohen et al., 2006; de la Prida et al., 2006). It induced IED-like events in the absence of stimulation. IEDs may not lead to ictal events or seizures, although they may course with cognitive and memory disabilities (Binnie, 2003; Holmes and Lenck-Santini, 2006; Zhou et al., 2007; Mosbah et al., 2014). We use multirecording techniques such as calcium imaging and multi-electrodes arrays (MEAs) to visualize and record multiple neurons simultaneously with single cell resolution (Sasaki et al., 2007; Karlócai et al., 2014; Levesque et al., 2018; Sadvosky and MacLean, 2013), as well as targeted single cell recordings with the whole-cell technique to analyze neuronal and network dynamics during IEDs.

Pharmacological manipulations including high  $K^+$ , low  $Mg^{2+}$ , low  $Ca^{2+}$ , 4-aminopyridine, alkalization, pilocarpine, etc. are needed to induce ictal-like events in *in vitro* slices. Simple manipulations such as bicuculline plus  $Mg^{2+}$ -free solutions may fail to induce ictal events (Huberfeld et al., 2011; Karlócai et al., 2014). Here we show that recurrent IEDs can be generated by a blockade of GABAergic transmission. They can be recorded for several minutes without inducing ictal-like events. In the last decade, similar studies have distinguished putative pyramidal neurons and FSI interneurons through the shape of their spikes in extracellular recordings (Sakata and Harris, 2009; Gonzalez-Sulser et al., 2012; Lévesque et al., 2018). Contradictory results have been

obtained related to the participation of PV+ interneurons in different epileptiform phenomena, some data show that their activation prevent the spread of seizures or their duration (Camarota et al., 2013; Krook-Magnuson et al., 2013). In contrast, optogenetic stimulation of interneurons promote ictal-like events (Sessolo et al., 2015; Khoshkhoo et al., 2017; Chang et al., 2018) implying GABAergic transmission in their generation. Here we use multi-recording techniques that allow elucidate the role of PV+ and PV− neurons in control and during IEDs. This shows a way to study other neuronal phenotypes during control, stimulated circuitry, pre-ictal and ictal phenomena.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animal use and care

B6;129P2-*Pvalb*<sup>tm1(cre)Arbr/J</sup> (JAX stock:017320, Hippenmeyer et al., 2005) mice were acquired from Jackson Laboratories (<https://www.jax.org/>), and mating was carried out between homozygous mice. However, female and male heterozygous mice were backcrossed every five generations with our background wild C57BL/6 N<sup>Hsd</sup> mice and later bred with their littermates to obtain homozygous mice as recommended (<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2018/april/how-to-refresh-your-mutant-or-transgenic-mouse-strains#>). A total of 36 male and female animals were used for all experimental groups. *In vitro* experiments were performed on PV-Cre knockin mice of both sexes at postnatal days (PD) 40–50. We accomplish the international guidelines for the ethical use of experimental animals established in the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals Eighth Edition (NIH, 2010). The detailed protocols were approved by the Institutional Committee for Laboratory Animals Care of the Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM (NOM-062-Z00-1999; laboratory protocols JBD-59-15). They were housed in a temperature-controlled, pathogen-free room, on a 12 h light–dark cycle, and allowed food and water ad libitum, minimizing the number of animals to achieve statistical significance and the avoidance of animal suffering.

### Viral infection

Stereotaxic surgeries were performed at PD 21 injecting 0.5  $\mu$ L of viral vectors with a dental needle in coordinates from Bregma, AP +1.5 mm, ML −1.2 mm and DV +1.2 mm to a 0.1  $\mu$ L/min rate to co-express pAAV.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 for expression in all neurons and AAV pCAG-FLEX-tdTomato-WPRE into PV+ neurons (Chen et al., 2013; Oh et al., 2014). Co-expression dilutions were always 1:1 for calcium imaging recordings ( $n = 13$  animals). To perform surgeries, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (85/15 mg/kg) solution. Several measures were taken to minimize pain and discomfort. For stereotaxic surgery artificial tears were placed in the mice's eyes to avoid damage. Body temperature was modulated with a heating pad peri- and post-operatively until animal full recovery. During this period mice received

chocolate pellets ad libitum and subcutaneous 100  $\mu$ L glucose 2% in saline solution daily injections were administered if more than 20% weight loss was detected. 80% of injected mice survived.

### Slice preparation

Mice were anesthetized intraperitoneally with ketamine/xylazine (85/15 mg/kg) and perfused with an iced saline solution containing (in mM): 2.5 KCl, 28 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 1.44 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 dextrose, 4.5 pyruvate, 0.28 ascorbic acid and 234 sucrose (300 mOsm/l, pH 7.4) gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in order to remove their brains while preserving cellular viability. Parasagittal brain slices were obtained (250  $\mu$ m thick) using a vibratome (Pelco, Ted Pella, Redding, CA, USA). Afterwards, slices were transferred to saline containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 dextrose, 0.2 thiourea and 0.2 ascorbic acid (300 mOsm/l, pH 7.4) at room temperature for at least 1 h before performing *in vitro* experiments. During all treatments, the saline containing the slices were continuously gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> set at 32 °C (TC02, Multichannel systems, SE. Harvard Bioscience, Inc.).

### Patch-clamp recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were performed from pyramidal neurons and PV+ interneurons labeled with td-Tomato in layer 5 of motor cortex using micropipettes made with borosilicate glass (3–6 M $\Omega$ ) filled with (in mM): 120 KMeSO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.2 Na<sub>2</sub>ATP, 0.2 Na<sub>3</sub>GTP and 1% biocytin. Responses were acquired with an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The signals were digitized at 10 kHz using an AT-MIO-16E4 board (National Instruments, Austin, TX, USA) and saved in a PC computer using Im-Patch<sup>©</sup> (<http://impatch.ifc.unam.mx/>). Neurons whose access resistance changed >20% during recordings were discarded. The plateau duration of bursts was calculated by measuring the time elapsed from the first to the last spike (Arias-García et al., 2018).

### Immunohistochemistry

Following patch-clamp recordings, the slices were fixed in 4% paraformaldehyde and 1% saturated picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH = 7.4) at 4 °C. Biocytin-filled cells were visualized by incubating slices in 1:200 streptavidin-Cy3 or FITC conjugate (Invitrogen) in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx) overnight at 4 °C. To perform immunohistochemistry to visualize PV+ neurons the brains were removed and post-fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde in PBS, before being cryopreserved in 30% sucrose at 4 °C. The brains were then cut on a vibratome into 40  $\mu$ m slices. Free-floating slices were first incubated 30 min with 1% bovine albumina to block nonspecific binding sites and for 24 h with a rabbit PV antibody against parvalbumin (anti PV 1:2000 Abcam) dissolved in PBS containing 0.25%

Triton-X. The slices were then rinsed three times with PBS and incubated with a goat versus rabbit secondary antibody (1:200) during 1 h. The secondary antibodies used for immunofluorescence included fluorescein (FITC)-conjugated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) for detecting the anti-PV antibody (Ibanez-Sandoval et al., 2006). All sections were mounted in Vectashield medium (Vector Laboratories). Images were acquired with an LSM700 Zeiss confocal laser scanning microscope (Zeiss, Gottingen, Germany). Single section confocal images (1024  $\times$  1024) were collected and exported to TIFF file format (Ibanez-Sandoval et al., 2016).

### Calcium imaging recordings

Imaging of spontaneous Ca<sup>2+</sup> signals in deep layers of non-stimulated motor cortex were performed. Image sequences (movies) at six frames per second were captured with a microscope (XLUMPlanFI, Olympus, Center Valley, PA, USA) equipped with a 10 $\times$ , 0.3 NA water-immersion objective. A Lambda LS illuminator (Sutter instruments, Petaluma, CA) coupled to specific excitation-emission filters (GCamp6f; excitation: band-pass 470–40 nm, emission: band-pass 520–40 nm and td-Tomato; excitation: band-pass 535/50 nm, emission: high-pass 590 nm) and a CoolSnap K4 camera, controlled by Im-Patch<sup>©</sup> software were used. Spontaneous activity was recorded for 10 min, thereafter, 10  $\mu$ M bicuculline (Sigma-Aldrich 14,343 – 50 MG) were added under Mg<sup>2+</sup>-free conditions. Once installed, IEDs were recorded for another 10 min and compared with control conditions, however, longer recordings could be done. Transition from control activity to IEDs generation is the subject of another work. Previous to the experiment, a digital camera picture was taken with the specific filter to identify the neurons labeled with td-Tomato.

### Image analysis

Image processing was performed with custom-written plugins in ImageJ (1.51j8, National Institutes of Health). Coordinates of the regions of interest (ROIs; neurons containing GCaMP6f) were manually identified with a circular template whose radius was chosen in each case. For each ROI, the change in somatic fluorescence ( $\Delta F/F$ ) was calculated as  $(F_1 - F_0)/F_0$  in each frame, where  $F_1$  is the fluorescence intensity at any time point, and  $F_0$  is the local background fluorescence intensity of the ROI (four times the ROI diameter).

### Detection of neuronal activity from calcium imaging

All analyses were performed with custom-written programs in MATLAB (2019a, MathWorks, Natick, MA, USA). All recordings were examined manually to remove artifacts. Calcium signals of the ROIs were deconvolved into trains of inferred action potentials with a modified version of the fast-oopsi algorithm (Vogelstein et al., 2010). Threshold to detect spike probability was two standard deviations (SD) for each neuron,

the values above were set to 1, and the values below were set to 0. Once this was done, a  $[N \times F]$  binary matrix (raster matrix) was built, where  $N$  denotes the number of neurons ( $y$ -axis) and  $F$  represents the number of frames ( $x$ -axis transformed to time in minutes or seconds). Each row in the raster matrix represents the activity of one neuron.

#### Extracellular multi-electrode array (MEA) recordings

The experimental protocol was conducted in the same way as in calcium imaging experiments. Extracellular recordings were performed using the MEA2100-System (Multichannel systems). Slices were positioned in the chamber of a perforated microelectrode array. The array is a  $12 \times 12$  titanium nitride electrode grid, of  $30 \mu\text{m}$  diameter,  $200 \mu\text{m}$  inter-electrode distance and  $< 100 \text{ k}\Omega$  impedance (120pMEA200/30iR-Ti, Multichannel systems). The upper and lower solution inflow was  $6 \text{ ml/min}$  using a peristaltic perfusion system (PPS2, Multichannel systems). Raw data was digitized at  $25 \text{ kHz}$ . At the end of the experiment, a digital camera picture of the slice position was taken.

#### Detection of neuronal activity in extracellular MEA recordings

All analyses were performed with custom-written programs in MATLAB and MultiChannel Analyzer software (2.8.2.18079, multichannel systems). The raw signal of each electrode was processed with a bandpass filter ( $500\text{--}5000 \text{ Hz}$ ). Events that exceeded six times the SD of the baseline signal were identified as action potentials and individual units recorded in each electrode were distinguished by grouping spikes with similar shapes (amplitude, width and after-potential). To achieve this, the correlation coefficient between all the spikes of a given electrode was calculated, this information was used to build a network where each node corresponds to a spike and the connection between them represents its correlation between pairs. With this network, a community detection was performed that automatically revealed the units of each electrode because spikes with the same shapes ended up grouping together (Newman, 2006). Detected spikes were converted to binary times of occurrence with a  $1\text{-ms}$  bin. These binary times of individual units were used to build an  $[N \times F]$  raster matrix (as in calcium imaging). The local field potential (LFP) signal was acquired with a low-pass filter ( $100 \text{ Hz}$ ) applied to the raw signal. The LFP spectrogram was estimated using interval sizes set to sampling frequency. The sampling frequency was also used to fix the number of points to use in the Fourier transform; the overlap between intervals was set to 95%.

#### Detection of neuronal ensembles

All analyses were performed with custom-written programs in MATLAB. In order to identify neuronal ensembles in a raster matrix, a  $[N \times N]$  pair to pair correlation matrix was obtained between the row values of the raster matrix (Pearson's correlation coefficient

between all neuron pairs). The correlation matrix was used as an adjacent matrix to build a binary functional network in which neurons are the nodes and significant correlation values were maintained as links. Monte Carlo simulations with 10,000 surrogate raster matrices that shuffle the activity time of the original neurons while maintaining their inter-spike intervals (Bruno et al., 2015; Pérez-Ortega et al., 2016) were used to obtain significant probability values. In addition, due to the significant spontaneous activity of cortical tissue, the adjacent matrix built by detecting groups of neurons with correlated activity was tuned up by detecting communities in a network using the modularity algorithm (Newman 2006) under an assumption-free analyses of spatiotemporal firing patterns. The advantage of this grouping method is that there is no need to use a rule or stimulus to propose a number of groups in the network: strongly linked neuronal communities were detected by maximizing the parameter  $Q = \{\text{number of links within a module}\} - \{\text{expected number of such links}\}$  making an algorithm to perform a number of iterations that automatically reveal the optimal number of groups (see Supplementary movie V1). Strongly correlated groups with different activity patterns between communities are here referred to as neuronal ensembles (Lampf et al., 1999; Luczak et al., 2007). Nearly coactive neurons at each time interval were obtained by adding the columns of the raster matrices. The sum was done in  $5 \text{ ms}$  intervals except in the experiments with calcium imaging where the raw sum of the matrix column was made (each frame lasts  $1/6$  seconds). Each IED was identified as an event larger than 5 SDs from the coactivity signal, the maximum value was considered as time zero of the IED. Half-width of the IEDs was calculated as the duration of coactive events at half the maximum amplitude.

#### Network analysis

The experimentally obtained neural networks can be described using Graph Theory, this approach is useful to describe and predict the structural and dynamic behavior of networks (Feldt et al., 2011; Fornito et al., 2016). Characteristic measures of network organization were computed: (1) ratio edges/nodes, to compare the density of connections, (2) Degree ( $k$ ), the number of links that connect a node to other elements of the network. (3) Characteristic path length ( $L$ ), the average path length among all possible node pairs in a network. A path is understood as an ordered sequence of edges in a graph. (4) Clustering coefficient ( $C$ ), a topological measure of the tendency of two nodes, connected to a third one, to also connect to each other. (5) Modularity ( $Q$ ), parameter related to the subdivision of a graph into strongly interconnected groups, it is obtained by calculating the number of links that exist within the groups minus the expected number of connections in an equivalent network with randomly placed edges (Newman, 2006; Feldt et al., 2011; Cossart, 2014). In addition, the normalized degree distribution  $P(k_n)$  was obtained: probability that a node has  $k/k_{\text{max}}$  connections in each experiment. The computation of network parameters was performed with the algorithms present in the Brain Connectivity Toolbox



(<https://sites.google.com/site/bctnet/>). Network visualization was done using the open source graph visualization platform Gephi (<https://gephi.org/>).

To test the tendency for high-degree neurons to be more densely functionally connected among themselves than with neurons of a lower degree, the rich-club coefficient was calculated. For a given network, the degree of each node was calculated, the nodes with the smallest degree values were incrementally removed, from the network that remains in each step. The rich-club coefficient was calculated as the ratio of connections present between the still existing nodes and the total number of possible connections that would be present when the graph would be entirely connected. The rich-club coefficient is typically normalized regarding to an equivalent random network of equal size and similar connectivity distribution. A normalized coefficient with values  $>1$  in a growing range of  $k$  reveals the existence of a rich club organization in the network (Colizza et al., 2006; van den Heuvel and Sporns, 2011).

To make sure whether our neural networks had “small world” properties (that is, high grouping but with short path lengths between its nodes), we use a quantitative measure called small-world-ness of a network. This metric is  $S_w = (L/L_R) - (C/C_L)$ , where  $C_L$  is the  $C$  from the corresponding regular lattice and  $L_R$  is the  $L$  from the random graph (both from the Watts-Strogatz model with  $P = 0$  and  $P = 1$ ). When this metric is close to 1, the network behaves like a random network. Whereas, when it is close to  $-1$  is more a regular lattice network. When the value is about 0 the network shows a stronger small-world-ness feature (Watts and Strogatz, 1998; Boccaletti et al., 2006; Pérez-Ortega et al., 2016; She et al., 2016).

### Statistical analysis

Differences between multiple groups were analyzed for statistical significance with Kruskal–Wallis ANOVA tests. Parameters distributions between the different samples were compared with the Kolmogorov–Smirnov test and Wilcoxon’s signed-rank test was used for paired groups. Unless indicated otherwise, all data are presented as means  $\pm 2$  standard errors of the mean (SEMs). In all analyses,  $P < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

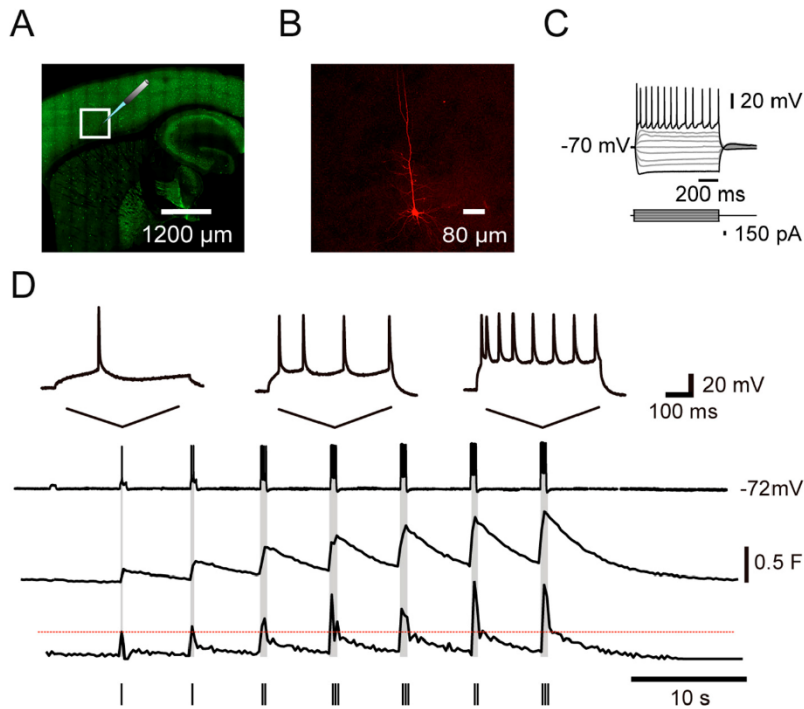
## RESULTS

### Functional architecture of spontaneous dynamics in control mouse motor cortex

To observe the network dynamics of spontaneous neuronal activity in mice motor cortex we used mouse parasagittal slices maintained *in vitro* (see box in Fig. 1A) and focused our interest in layers 5 and 6 for the acquisition of calcium imaging videos of multiple neurons with single cell resolution. This region was also used to acquire electrophysiological recordings of targeted cells. In order to validate that the fluorescence changes obtained in the experiments correspond to

action potentials firing simultaneous current-clamp and calcium imaging recordings in whole-cell configuration was performed. Fig. 1B shows intracellular labeling with biocytin. Voltage responses of the same neuron evoked with depolarizing and hyperpolarizing intracellular current injections (Fig. 1C) are also shown. Fig. 1D shows simultaneous recordings of trains of action potentials evoked with depolarizing current injections (not shown) of increasing intensities illustrated at different time bases in the first and second rows. Third row shows intracellular calcium transients generated by the firing of action potentials from the same recorded neuron. From these calcium signals, the probability of action potentials firing was obtained using the fast-oopsi algorithm (Vogelstein et al., 2010) and illustrated in the fourth row. Inferred action potentials are then shown in the fifth row with a threshold of 2 SD. Inferred spikes closely follow real evoked ones as seen by comparing the second and fifth rows. Inferred spikes were used in raster plots of several neurons obtained with calcium imaging (Theis et al., 2016).

After calcium imaging of several neurons, raster plots of their spontaneous activity along time were built (Fig. 2A), where each row denotes activity of one neuron ( $y$ -axis). Our grouping method (paired cell to cell correlations with modularity optimization; see Experimental procedures and Supplementary movie V1 for a graphic demonstration) allowed sorting the neurons into groups with similar firing patterns, here called neuronal ensembles represented with different colors (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Beggs and Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004; Markram et al., 2015; Dechery and MacLean, 2017; Buzsáki and Tingley, 2018). Here we show that the spontaneous activity of cortical networks at rest (without stimulation) consists in temporal sequences of these ensembles. To observe control spontaneous firing before using a grouping method see Supplementary Fig. S1. Ensembles emerge spontaneously and fade away as in *in vivo* experiments during task performance (Pastalkova et al., 2008). A coactivity histogram of the raster plot (black trace at the bottom in Fig. 2A), shows the typical noisy population activity of cortical resting tissue-without stimulation (Markram et al., 2015). However, underlying this population activity, similar plots taken from different neuronal ensembles clearly show a temporal sequence (denoted by different colors; Luczak et al., 2007). This behavior was stable and recurrent during several minutes. A graph preserving the original coordinates in the tissue is illustrated in Fig. 2B: nodes are the active neurons and links represent significant correlations between their firing patterns. Colors represent identified neuronal ensembles. Node sizes denote number of links (degree). Some neurons appear more connected than others. In order to analyze experiments that share similar characteristics, Fig. 2C shows the accumulated neuronal activity of each slice considered in the study ( $n = 10$  out of 10 slices from different animals; vertical bars represent 1 SD in both directions). The neural networks obtained in each experiment did not show significant differences in their degree distributions (not shown). Recorded neurons were intermingled since correlation within group distance



**Fig. 1.** Simultaneous calcium imaging and electrophysiology in a mouse motor cortex slice. **(A)** The schematic shows a photograph of a mouse parasagittal slice with PV immunoreactivity, the white box represents the calcium imaging video acquisition site and the region where electrophysiological and fluorescence recordings were made. **(B)** A recorded neuron was filled with streptavidin-Cy3 conjugated biocytin (red) showing a pyramidal phenotype. **(C)** Voltage responses (top) of the neuron evoked with depolarizing and hyperpolarizing intracellular current injections of different magnitudes (bottom). The cell exhibited regular spiking, the typical response pattern of a pyramidal neuron. **(D)** Simultaneous electrophysiological recordings of action potentials (first and second rows) and intracellular calcium transients generated by electrical activity (third row) evoked with intracellular current injections of increasing intensity (not shown; first row amplifies some events of the second row) in the same neuron. From calcium signals the probability of action potentials firing was inferred (fourth row) with the fast-oopsi algorithm, the probability of inferred spikes (fifth row) has a threshold of 2 SD (red dotted line) of the total signal. Inferred spikes closely followed evoked ones (cf., second and fifth row). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

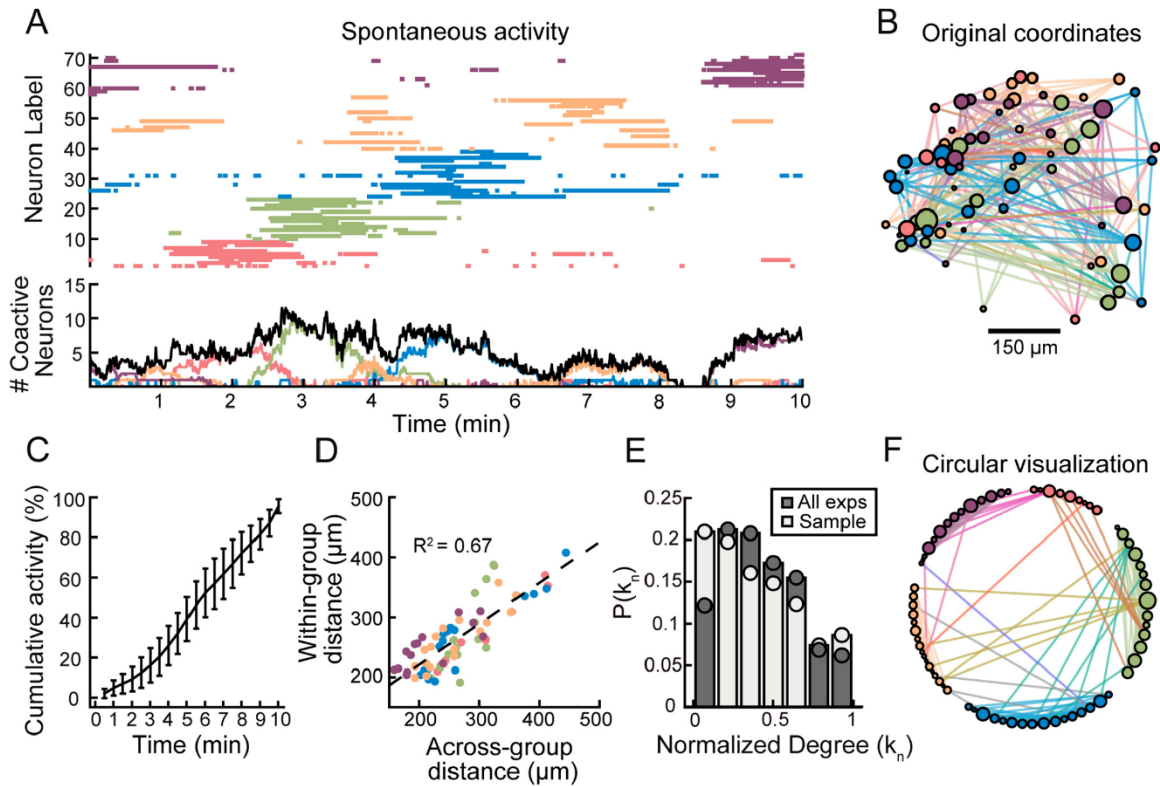
and across groups distance was significant (Fig. 2D;  $R^2 = 0.67$ ;  $P < 0.001$ ; similar in seven slices examined;  $P < 0.001$ . One slice only had  $P = 0.014$ , slices were taken from different animals). Fig. 2E illustrates the distributions of normalized and significant functional connections between neurons both in a single experiment ( $n = 71$  neurons, light gray) and in all experiments ( $n = 427$  neurons, dark gray;  $8.9 \pm 1.2$  neurons per ensemble;  $n = 48$  ensembles from ten animals). Note descending distributions: nodes with higher degree appear with less probability. Finally, a sorted circular representation of the microcircuit (Fig. 2F) shows interactions between neuronal ensembles during spontaneous activity.

#### Participation of PV+ interneurons within neuronal ensembles

One acquisition field of a calcium imaging video showing the location of neurons labeled with td-Tomato (PV+)

marked with red arrows (Fig. 3A). Panels in Fig. 3B are different frames of an image sequence showing that different neurons expressing GCaMP6f are active at different moments, among them, PV+ interneurons (red arrows) previously identified with td-Tomato. A representative raster plot of the spontaneous activity in motor cortex taken from a slice and animal different to the ones shown in Fig. 2 is illustrated (Fig. 3C top). A temporal sequence of neuronal ensembles is shown using different colors. In addition, the activity of PV+ interneurons is indicated with darker colors and by the arrowheads on the right. Interestingly, almost each neuronal ensemble had the accompanying firing of a PV+ interneuron ( $80.2 \pm 0.1\%$  of the ensembles;  $n = 10$  slices from different animals), a result highly improbable to happen at random ( $25.5 \pm 6\%$ ;  $P < 0.001$ ; comparing 10,000 surrogate raster plots for each of  $n = 10$  slices from ten different animals). The participation of PV+ neurons in network activity is sparse as compared to PV- neurons. At the bottom, the global coactivity histogram (black) shows the noisy population activity of the resting cortex. However, coactivity obtained for the different ensembles (colored) shows that behind this apparent chaotic behavior there is an ordered

sequence of neuronal ensembles that go on and off with a certain level of intersection. A circular visualization of this microcircuit shows the location of PV+ interneurons within ensembles (Fig. 3D arrow heads). Even if most significant functional connections are within ensembles, including those of PV+ interneurons, some connections cross to other ensembles, and some of these crossings belong to interneurons. Distribution of the number of normalized connections of PV+ neurons (dark gray,  $n = 70$  neurons from 10 animals) and PV- neurons (light gray,  $n = 357$  neurons from ten animals) have a similar shape, in both cases highly connected neurons have less probability (Fig. 3E). The distribution has an elongated tail, revealing the existence of a small number of highly interconnected neurons, known as hubs. There are several metrics (mainly node degree) that use this concept and generally converge on the idea that they correspond to topologically central nodes positioned in such a way that they have a strong influence on the



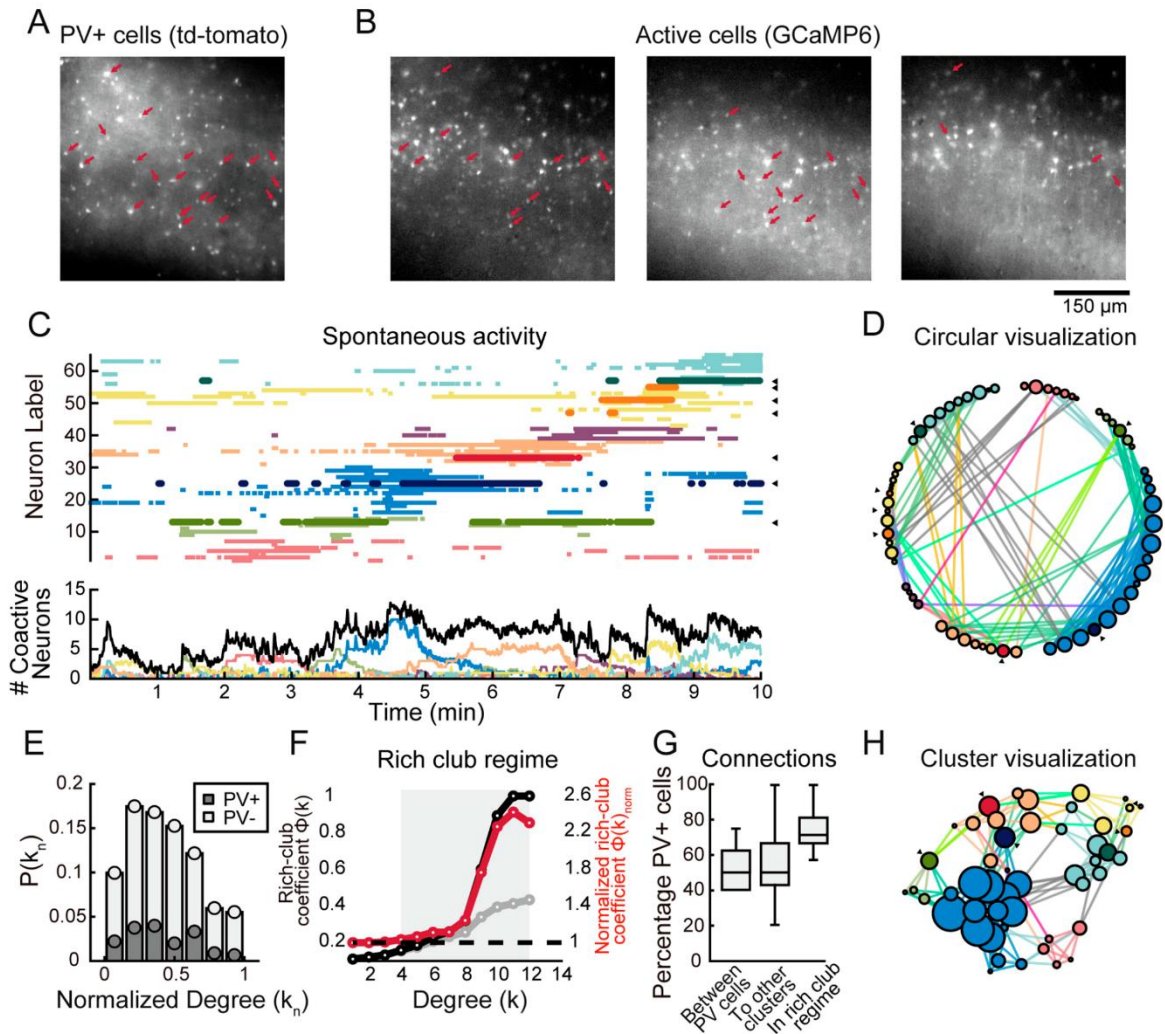
**Fig. 2.** Spontaneous dynamics of neuronal ensembles in control mouse motor cortex. **(A)** Raster plot of the spontaneous activity of several neurons along time in motor cortex, each row denotes activity in one neuron (*y*-axis); the color represents the belonging of each neuron to identified neuronal ensembles by means of paired cell to cell correlations (see Methods). Histogram of the summed activity of neurons in time (black trace at the bottom) plus histograms for each ensemble shown with corresponding colored traces; note the temporal sequence. **(B)** Graph of the cortical microcircuit preserving the original coordinates in the tissue, each neuron is a node and each line joining them represents the existence of significant correlation between their firing patterns throughout the experiment. Colors represent the neuronal ensembles identified in **(A)**, the size of the node represents number of connections with respect to others, there are highly connected nodes in the network (hubs) distributed among the different neuronal ensembles. **(C)** Behavior of the cumulative neuronal activity of all recorded slices ( $n = 10$ ), vertical bars represent 1 SD in both directions. **(D)** Within group distance as a function of across group distance for each neuron ( $R^2 = 0.67$ ;  $P < 0.001$ ), colors denote their ensemble membership as shown in **(A)**. **(E)** Distribution of normalized functional connections between neurons in a single experiment (light gray,  $n = 71$  neurons) and in all experiments (dark gray,  $n = 427$  neurons). **(F)** Sorted circular representation of the microcircuit network shown in **(B)**, the coordinates have been regrouped in the different neuronal ensembles to show the interactions that occurred during cortical spontaneous activity. The size of the node represents its number of connections (degree). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

local circuitry to which they belong. It is possible to define a core based on the density of connectivity between the hubs of a given network. This is what the rich club analyses means: it finds and describes the subset of high-degree nodes that are more densely connected to each other than expected by chance (Colizza et al., 2006; Feldt et al., 2011; van den Heuvel and Sporns, 2011). The rich-club coefficient as a function of degree ( $k$ ) compared against the same coefficient for a random network of equal size and similar connectivity distribution (black line vs gray line) shows a significant rich-club behavior of the neural network structure between 4 and 12 functional connections. It is shown by values greater than 1 of the normalized rich-club coefficient (red line) that increases as a function of  $k$  (Fig. 3F). Different characteristics of PV+ functional connectivity are illustrated by box plots of Fig. 3G: PV+ interneurons connecting with other

PV+ interneurons are near  $45 \pm 14\%$ , connections with other ensembles different to the one they belong are about  $57 \pm 14\%$ , and PV+ interneurons belonging to the rich club are about  $75 \pm 10\%$  ( $n = 10$  slices from ten different animals). In the rich club network PV+ neurons are signaled with arrow heads. Note that nodes with higher degrees are not PV+ interneurons. However, all clusters with PV+ neurons connect with these highly connected PV- neurons (in blue, Fig. 3H).

#### Participation of PV+ interneurons during IEDs

In order to observe what happens to the control circuit when fast ligand-gated GABA<sub>A</sub>-receptor mediated transmission is blocked, 10  $\mu$ M bicuculline were added to a virtual Mg<sup>2+</sup>-free saline solution. This is one of many ways to induce epileptiform discharges (Cohen



**Fig. 3.** Participation of the PV+ interneurons in the neuronal ensembles of the mouse motor cortex. **(A)** Photograph of the acquisition field of a calcium imaging video showing neurons marked with td-Tomato (PV+), red arrows indicate interneurons that showed activity in the following panels. **(B)** Photographs at three different moments of the same field illustrated in **(A)**, showing different groups of active neurons expressing GCaMP6f (see Methods). Red arrows indicate interneurons that were marked in **(A)** and that show activity in these frames. **(C)** Raster plot of the spontaneous activity in motor cortex (top). Identified neuronal ensembles are shown in different colors; the activity of PV+ interneurons is indicated with darker color and by the arrowheads on the right. Note that each neuronal ensemble has its own PV+ or subset of PV+ interneurons. At bottom, histogram of the summed whole activity (black) and that of different neuronal ensembles (colored). **(D)** Circular visualization of the microcircuit. Neurons have been sorted according to their ensembles. PV+ interneurons are shown in darker color and with arrowheads. The size of the node denotes the number of connections. **(E)** Distribution of the number of normalized connections of PV+ neurons (dark gray,  $n = 70$  neurons) and PV- neurons (light gray,  $n = 357$  neurons). **(F)** Rich-club curve for the network shown in **(D)**, the graph shows a significant rich-club behavior of the neural network structure between 4 and 12 functional connections. Normalized rich-club coefficient (red line) increases as a function of  $k$  (number of functional connections). The black line shows the rich-club coefficient and the gray line shows the same coefficient for a random network of equal size and similar connectivity distribution **(G)** Percentage of PV+ interneurons that had connections between them, to other ensembles, and percentage located within the rich-club regime ( $n = 70$  neurons). **(H)** Microcircuit network exhibiting the nodes with four or more functional connections only (rich-club regime), PV+ neurons are signaled with arrow heads. Note that nodes with higher degrees are not PV+ interneurons. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

et al., 2006; de la Prida et al., 2006). In cortical non-stimulated circuits, this maneuver induced brief and recurrent epileptiform discharges without any stimulation (Huberfeld et al., 2011; Karlócai et al., 2014). According to their duration and recurrence they are similar to

interictal epileptiform discharges or IEDs (Brückner and Heinemann, 2000; de Curtis et al., 2012). To observe a movie that compares control spontaneous firing with IEDs activity see [Supplementary movie V2](#). Because our grouping procedure exhibits neuronal ensembles as

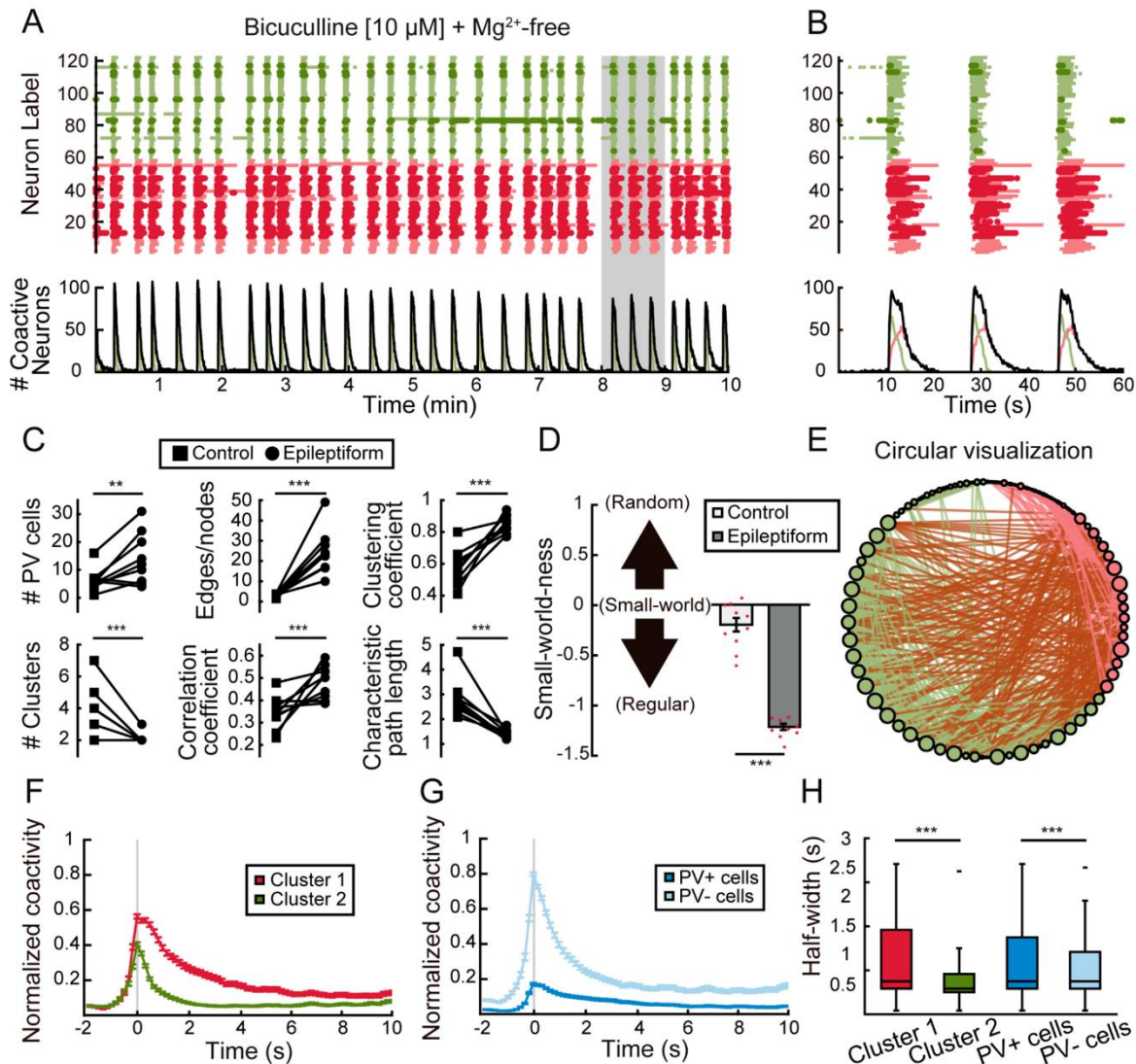
those neurons with correlated firing patterns, and because it has been described that firing patterns of PV+ interneurons are relatively different to those of PV− neurons during epileptiform discharges (Chang et al., 2018; Levesque et al., 2018), we expected to observe a partial separation between both classes of neurons to better appreciate the class, role and quantity of synchronized neurons. Fig. 4A shows a raster plot that confirms this hypothesis. The temporal structure of control spontaneous ensembles disappears to give rise to brief epileptiform discharges consisting in a sole recurrent ensemble that recruits most active neurons (IEDs). Our grouping method separated this ensemble into two different clusters of neurons whose temporal dynamics are best appreciated in section 4B. The PV+ interneurons previously identified with td-Tomato are shown in darker colors. Note the high presence of interneurons in the group with more prolonged activity (red; 74.2% or 23 interneurons out of 31 neurons in this experiment; and:  $76.7 \pm 9.1\%$  pooling  $n = 9$  slices from different animals;  $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test). At the bottom of sections 4A and 4B, the coactivity histogram reveals the presence of these IEDs every  $19 \pm 1.2$  s ( $n = 9$  slices from nine different animals). Although we do not formally label pyramidal neurons, we know from population descriptions in the rodent cortex that they correspond to about 85% of the neurons that are PV− (Markram et al., 2004; Tremblay et al., 2016), in our results they would correspond mainly to the group of green color, with briefer duration in its activity.

Raster plot activity allowed build a functional connection network (Fig. 4E). A set of parameters was calculated to compare control and IEDs networks (Fig. 4C): PV+ interneurons with correlated activity increased significantly from  $6 \pm 2.8$  to  $14 \pm 6.2$  ( $P = 0.024$ ; Wilcoxon Signed Ranks test in this and other comparisons in this section unless said otherwise;  $n = 9$  slices from nine different animals); edges to nodes ratio increased significantly from  $2.9 \pm 0.6$  to  $24.5 \pm 7.4$  ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  slices from nine different animals), global clustering coefficient raised from  $0.57 \pm 0.08$  to  $0.85 \pm 0.04$  ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  slices from nine different animals), number of neuron groups separated by our method decreased significantly from  $4.2 \pm 1$  to  $2.0 \pm 0.2$  ( $P = 0.014$ ;  $n = 9$  slices from nine different animals), the correlation coefficient of neuron activity increased significantly from  $0.34 \pm 0.04$  in the control to  $0.48 \pm 0.04$  during IEDs ( $P = 0.013$ ;  $n = 9$  slices from nine different animals), finally, the characteristic path length decreased significantly from  $2.82 \pm 0.51$  in control to  $1.44 \pm 0.12$  during IEDs ( $P = 0.009$ ;  $n = 9$  slices from nine different animals). Changes in network parameters reveal a completely different functional architecture in control conditions as compared to IEDs generation in the same tissue (Beggs and Plenz, 2003; Sadovsky and MacLean, 2013; Bullmore and Sporns, 2009; Pérez-Ortega et al., 2016). The extremes of these topological behaviors are: an entirely regular network with predetermined rigid connections and high clustering and the randomly connected network with low clustering but short average path length. At

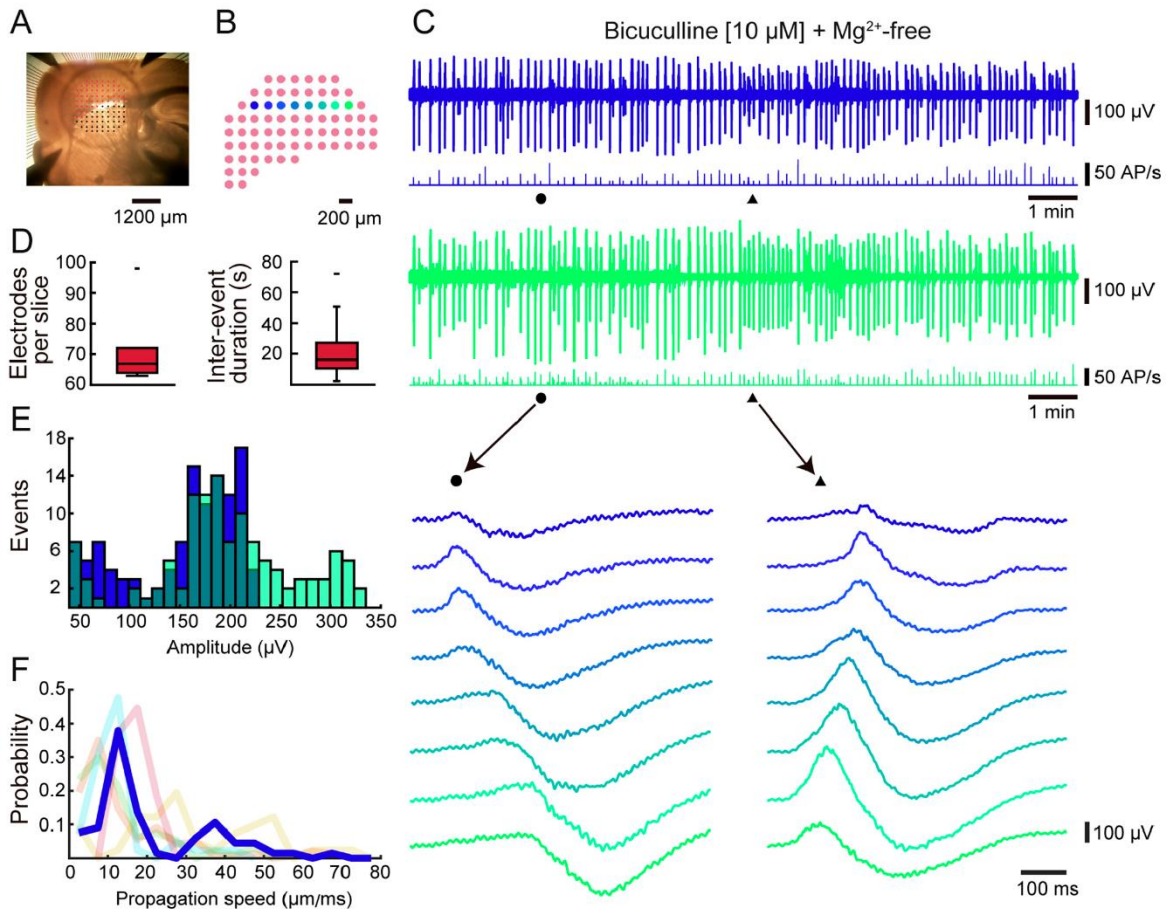
a midpoint, there is the so-called small-world network, which results from the combination of high clustering and short path length. These characteristics have been described in many real-world networks. Small-world networks have also been associated with high levels of topological efficiency, making them competent integrators of information at different scales of study (Watts and Strogatz, 1998; Boccaletti et al., 2006; Feldt et al., 2011). In the networks that we study the small-world-ness changed from ensemble sequences to a rigid repetitive connectivity; both networks were away from a random network (Fig. 3D; Humphries and Gurney, 2008; She et al., 2016), from a small-world-ness value of  $-0.20 \pm 0.14$  in control to  $-1.22 \pm 0.06$  during IEDs ( $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n = 9$  slices from nine different animals). Fig. 4E maintains the color code for both clusters within the synchronous ensemble. The activation dynamics of these clusters were aligned with their maximum peaks of activity in each IED (Fig. 4F). Since PV+ interneurons were identified, it is shown that different firing patterns can be attributed to the difference between interneurons (PV+) and other neurons (PV−; Fig. 4G). Half-width durations obtained from Fig. 4F, G showed significant differences:  $2.57 \pm 0.24$  s for the red and  $1.58 \pm 0.14$  s for the green cluster ( $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n = 9$  slices from nine different animals) in correspondence with PV+ interneurons:  $2.57 \pm 0.26$  s and PV− neurons:  $2.07 \pm 0.16$  s (Fig. 4H;  $P = 0.007$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n = 9$  slices from nine different animals). Therefore, PV+ interneurons have activities with longer durations, suggesting that activation profile of PV+ interneurons during IEDs is different to that of other neurons in the mouse motor cortex. This phenomenon can be seen even if real duration of IEDs is hard to appreciate with calcium imaging due to low temporal resolution: inferred action potentials are within 160 ms image frames. Nevertheless, imaging allows identify PV+ neurons and separate the recurrent ensemble into two clusters with different firing patterns and durations. PV+ interneurons increase their participation in synchronous events (Fig. 4C top-left) in a ratio of  $3.4 \pm 1.6$  ( $n = 9$  slices from nine different animals). However, PV− neurons also increase in proportion:  $2.9 \pm 1.3$  ( $n = 9$  slices from nine different animals). Thus the proportion of PV+ interneurons with respect to the total number of neurons with significant correlated activity in each experiment was non-significant:  $15.5 \pm 0.1\%$  in controls and  $16.8 \pm 1.3\%$  during IEDs.

#### Extracellular multi-electrode array (MEA) recordings during IEDs

To study IEDs dynamics with higher temporal resolution, extracellular multi-electrode array (MEAs) recordings were made. The same parasagittal slice and protocols used in calcium imaging experiments were employed. The arrangement of the MEA in the slice is shown in Fig. 5A, only the electrodes placed in the cerebral cortex were used for the analysis (red circles). In Fig. 5B cortical electrodes are seen in greater detail. The separation distance between each electrode is  $200 \mu\text{m}$ : it is possible to track events generated on any



**Fig. 4.** Participation of PV+ interneurons during interictal epileptiform discharges (IEDs). **(A)** Raster plot of activity after applying 10  $\mu\text{M}$  bicuculline under a virtual  $\text{Mg}^{2+}$ -free solution: recurrent IEDs are recorded in the slice. Sequence and diversity of neuronal ensembles present during spontaneous activity turns into synchronous events with a single ensemble. The activity of the PV+ interneurons is shown in darker colors. **(B)** Plot of a fraction (shaded) of the raster plot in **(A)**: three epileptiform events are observed. Due to our grouping procedure, most PV+ interneurons (red) appeared as separated to PV- neurons (green), confirming differences in firing patterns. However, some PV+ interneurons also appeared in the green cluster and some PV- neurons appeared in the red cluster of the ensemble. This synchronous event remains active for longer times during IEDs. Bottom in **(A)** and **(B)** show summed activity (black trace), and different time courses for the composing clusters (colored). **(C)** Comparison of a set of differences between control and the IEDs networks: number of PV+ neurons increases significantly while number of discernible neuron clusters decrease during epileptiform activity. Significant differences were found in number of PV+ cells ( $P = 0.024$ ), edges/nodes ratio ( $P = 0.009$ ), clustering coefficient ( $P = 0.009$ ), number of clusters ( $P = 0.014$ ), correlation coefficient ( $P = 0.013$ ) and characteristic path length ( $P = 0.009$ ). Wilcoxon signed-rank test was used in all cases ( $n = 9$  slices). **(D)** Small-world-ness of the spontaneous and epileptiform networks, respectively. Values close to '0' indicate similarity to a small-world network, while '1' or '-1' denote random and regular networks, respectively ( $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n = 9$  in each sample). **(E)** Circular visualization of the network formed with raster plot shown in **A**, the increase in functional connections make it appear as a regular network. **(F, G)** Normalized coactivity of the grouped clusters within the ensemble. Grouped from several experiments and aligned to the peak of maximum activity (zero) of the IEDs. **(H)** Half-width duration of the plots shown in **(F, G)** red cluster ( $P < 0.001$ ) and identified PV+ interneurons ( $P = 0.007$ ) had longer lasting activity during IEDs (in both cases Kolmogorov–Smirnov test,  $n = 256$  IEDs from  $n = 9$  slices). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 5.** Extracellular multi-electrode array (MEA) recordings during interictal epileptiform discharges (IEDs). **(A)** Photograph showing the disposition of the MEA in the slice, in the present work only the electrodes that were in the cerebral cortex were considered (red dots). **(B)** Scheme of the electrodes used to characterize the IEDs shown in the following panels. **(C)** Extracellular recordings were done after applying  $10 \mu M$  bicuculline in virtual  $Mg^{2+}$ -free solution. Top, local field potential of IEDs (LFP, low-pass filter < 100 Hz) from electrodes according to color code shown in **(B)**. The recordings shown correspond to the opposite sides of the electrodes line. The circle and the triangle correspond to the instants of time analyzed over the entire line of electrodes. Frequency of action potentials (see below) is shown in the lower line of each recording. Recordings at bottom show IEDs spreading in both directions. **(D)** Left, number of electrodes considered in each slice ( $n = 6$  slices from different animals). Right, inter-event duration between recurrent IEDs ( $n = 300$  events from different animals). **(E)** Amplitude distribution for all IEDs (LFPs) in the recordings shown at **(C)** top. **(F)** Distribution of speed propagation of IEDs in each slice (light colors), blue line correspond to slice shown in **(C)**. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

electrode and directions of wave spreading across the slice. A row of electrodes is also indicated following a color code used in the subsequent panels. **Fig. 5C** above and middle show local field potential (LFP, low-pass filter < 100 Hz) and firing rate of IEDs recorded by color-coded electrodes; electrodes positioned at the ends of the row. Unitary firing rate (see below) measured at electrodes increases in correlation with synchronous IEDs. Bottom of **Fig. 5C** shows recordings from the entire row of electrodes (**Fig. 5B**) taken at two different times indicated by black circles and triangles on the top panel. IEDs (LFPs) could be seen propagating locally in both directions. **Fig. 5D** left, the number of electrodes considered in each experiment is reported:  $72 \pm 10$  electrodes ( $n = 6$  slices from six

different animals). **Fig. 5D** right, the duration between inter IEDs intervals was  $22 \pm 1.96$  s ( $n = 300$  events from six different animals; non-significantly different to that found with calcium imaging – see above). Distribution of IEDs identified by LFPs is shown in **Fig. 5E** ( $n = 300$  events from six different animals), the average voltage amplitude of each identified IED at each electrode was  $180 \pm 48 \mu V$  (360 electrodes and 1734 events). The propagation speed of IEDs in each slice was calculated (**Fig. 5F**), the highlighted color curve corresponds to the data of the slice shown in **C**. Propagation speed was  $15.3 \pm 2.4 \mu m/s$  ( $n = 6$  slices from six different animals). We found IEDs with similar spatial and temporal attributes spreading in different directions in each slice (Serafini et al., 2016). These

experiments showed that IEDs identified electrophysiologically by LFPs closely correspond to those identified by calcium imaging. The fact that they propagate without a predominant direction being initiated in any electrode suggests that they are locally generated, away from long range interferences.

#### Neuronal activity during the occurrence of IEDs

After obtaining IEDs in a stable manner, we studied individual units with MEA electrodes. To observe control spontaneous firing in raw data before using a grouping method see [Supplementary Fig. S2](#). [Fig. 6A](#) shows an example of a multi-unit recording with extracellular action potentials and a burst from one MEA electrode (bandpass filter 500–5000 Hz). Identified action potentials were aligned 1 ms before and 2 ms later with respect to their most negative voltage point in the recordings ([Fig. 6B](#)). Individual units were extracted according to their shapes (see Experimental procedures; gray and blue; [Fig. 6C](#)) and used to build raster plots with individual units ([Fig. 6D, E](#)). The number of individual units per electrode was  $1.2 \pm 0.8$  ( $n = 360$  electrodes,  $n = 6$  slices from six different animals). Spikes were sorted by our grouping method (see Material and Methods) to see whether neuronal classes could be separated. Synchronous activity during an IED clearly shows a synchronous ensemble with two clusters with different firing patterns and durations. Real spikes obtained with higher temporal resolution (MEA) closely resemble inferred spikes obtained with calcium imaging ([Fig. 6D, E](#)). In addition, simultaneous LFPs recordings were obtained ([Fig. 6F, G](#)). The LFP components in an IED were: an inter-ictal spike followed by a slow wave and late oscillations mainly corresponding to the cluster that lasts longer. The whole event lasts about  $3.5 \pm 0.18$  s ( $n = 1734$  events,  $n = 6$  slices from six different animals). Representative spectrograms are shown ([Fig. 6H, I](#)), note gamma band during the spike and theta and alpha bands corresponding to late oscillations ([Huberfeld et al., 2011](#)). Action potentials coactivity ([Fig. 6J, K](#)) shows a longer duration in the red cluster, as obtained in calcium imaging experiments. Basically, these experiments showed that IEDs analyses yield similar results using real unitary action potentials (MEAs) and inferred action potentials (calcium imaging).

#### Morphological and electrophysiological characterization of neurons recorded from different clusters during IEDs

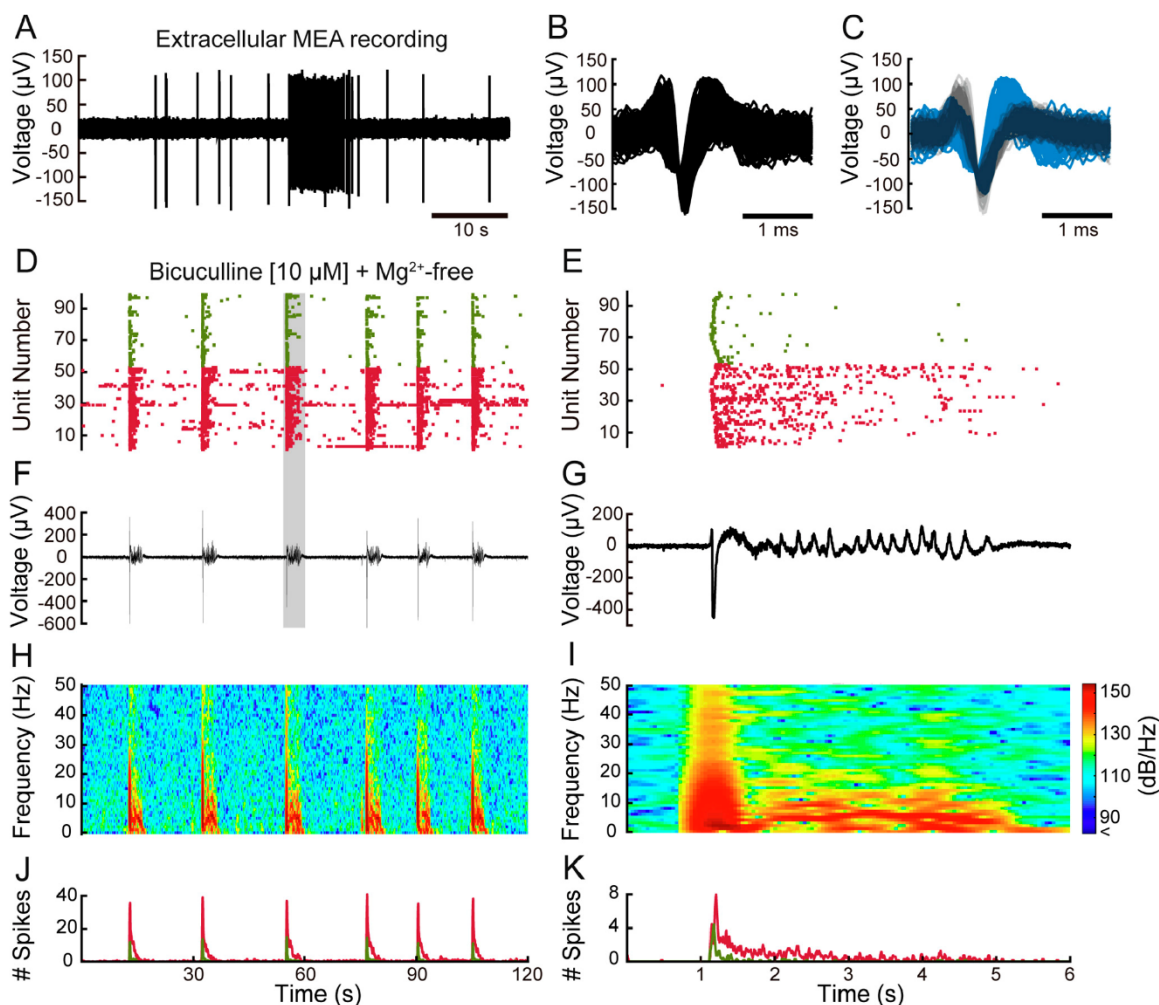
Whole-cell recordings were performed in layers 5–6 of mice motor cortices in PV+ and PV– neurons both in control conditions and after inducing IEDs with  $10 \mu\text{M}$  bicuculline under  $\text{Mg}^{2+}$ -free conditions. [Fig. 7A](#) shows the morphology of a pyramidal neuron intracellularly labeled with streptavidin-Cy3 conjugated with biocytin and recorded during resting control conditions. Voltage responses to the application of hyperpolarizing and depolarizing current pulses at the soma ([Fig. 7B](#)) and its corresponding current voltage relationship (I–V plot;

[Fig. 7C](#)). The input resistance for a sample of PV– neurons with the same characteristics was  $328 \pm 68 \text{ M}\Omega$  ( $n = 12$  neurons from 12 different animals). During the synchronous stage of an IED, the firing of this same neuron without stimulation ([Fig. 7D](#)) exhibited a depolarizing shift and a train of spikes. All neurons in this sample appeared in the brief duration clusters during IEDs. [Fig. 7E](#) shows a PV+ interneuron (td-Tomato viral transfection plus intracellular labeling with streptavidin-FITC conjugated with biocytin). The extensive dendritic arbor excludes a pyramidal cell. Voltage responses (top) to current steps (bottom; [Fig. 7F](#)) and corresponding I–V plot ([Fig. 7G](#)) yield an average input resistance of  $204 \pm 60 \text{ M}\Omega$  (mean  $\pm$  SEM,  $n = 7$  neurons from seven different animals), significantly different to that measured from pyramidal neurons ( $P = 0.034$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n_1 = 7$  PV+ cells;  $n_2 = 12$  PV– neurons with pyramidal cells morphology, all cases from different animals). A depolarizing shift and a more prolonged train of spikes ([Fig. 7H](#)) reaching higher frequencies (see [Fig. 8D](#)) were commonly found in the sample of PV+ interneurons.  $n = 6$  out of seven neurons of this sample were recorded within longer duration clusters during IEDs.

#### Differences in the duration of synchronous ensemble clusters during IEDs

The two clusters identified in MEA recordings within IED events present different activation profiles, firing patterns and durations. Coactivity of these clusters during single IEDs is illustrated in [Fig. 8A](#) (color code of as in [Fig. 6](#)). Half-width duration for the red cluster was  $0.38 \pm 0.02$  s and it was  $0.33 \pm 0.05$  s for the green cluster ([Fig. 8B](#);  $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n = 306$  from six different animals in both cases). In the calcium imaging experiments, most of the labeled PV+ interneurons had a more prolonged activity than the other neuronal types, mainly coinciding with the pattern of activity of the red cluster. [Fig. 8C](#) shows duration of action potentials trains of individually recorded neurons using the whole-cell technique:  $1.07 \pm 0.49$  s for PV+ interneurons, significantly longer duration than that measured in pyramidal cells:  $0.49 \pm 0.53$  s ( $P < 0.001$ ; Kolmogorov–Smirnov test;  $n_1 = 119$  PV+ neurons events;  $n_2 = 354$  PV– trains of spikes, all cases from different animals). This phenomenon is observed in [Fig. 7D](#) where pyramidal neurons have a much briefer bursts than PV+ interneurons. The firing rate of the action potentials during IEDs ([Fig. 8D](#)) in PV+ interneurons was  $61.9 \pm 12.6$  Hz, significantly higher than that shown by pyramidal neurons:  $33.4 \pm 4.8$  Hz ( $P < 0.001$ ;  $n_1 = 7$  PV+ cells;  $n_2 = 12$  pyramidal cells; Kolmogorov–Smirnov test, all cases from different animals) supporting frequencies reached during spectrograms. The coefficient of variation ([Fig. 8E](#)) measured for PV+ cells:  $0.37 \pm 0.06$  and pyramidal neurons:  $0.67 \pm 0.12$  was significantly different ( $P = 0.004$ ;  $n_1 = 7$  PV+ cells;  $n_2 = 12$  pyramidal cells; Kolmogorov–Smirnov test, all cases from different animals). Inter-event durations measured from peak to



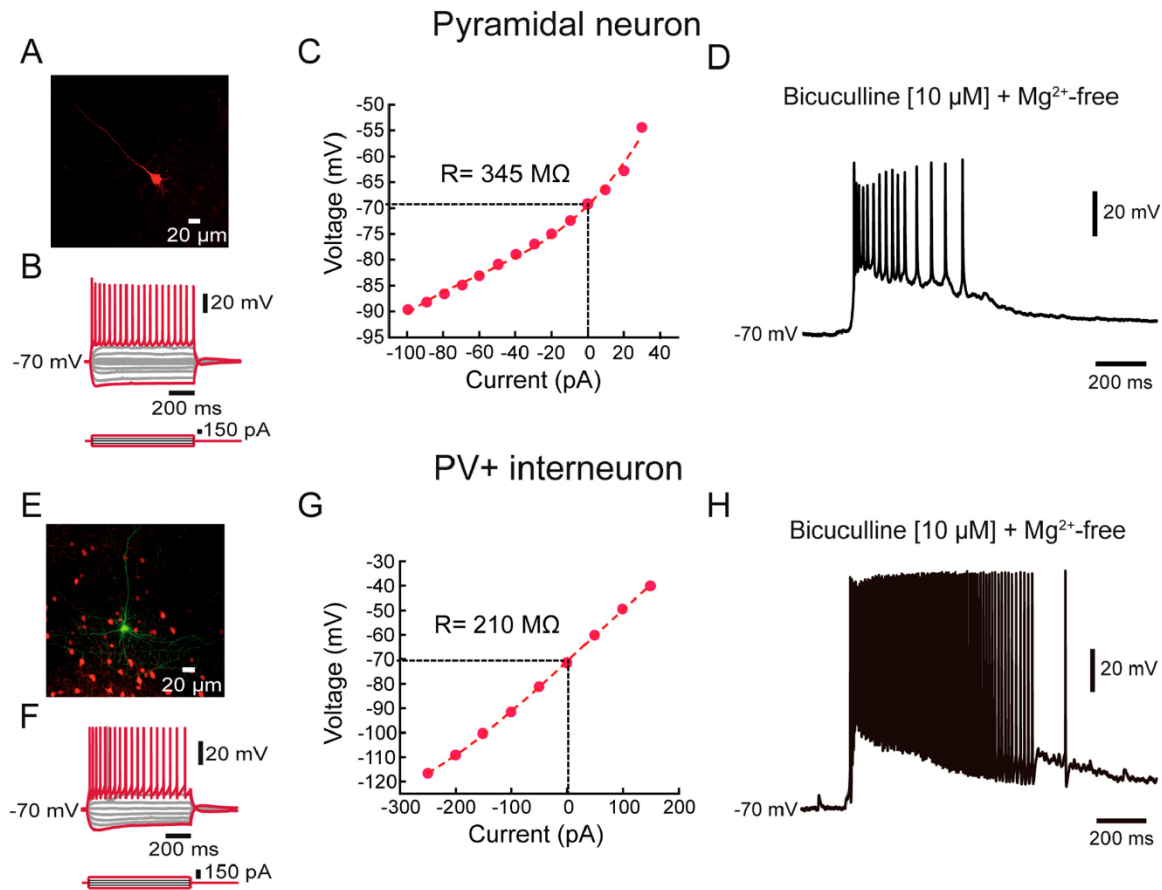


**Fig. 6.** Unitary activity during the occurrence of IEDs. **(A)** Example of a multiunit recording with extracellular action potentials and a burst from one MEA electrode (bandpass filter 500–5000 Hz). **(B)** Spike waveforms detected from **(A)**, these events were detected as changes in voltage that exceeded a threshold of six SD of global electrode signal (see Experimental procedures). **(C)** Individual units extracted from **(B)** (see Experimental procedures); two units were identified in this electrode (light blue and gray, superposition is dark blue). **(D, E)** Raster plot of recurrent IEDs and magnification of one event in **(E)** (shaded area in **(D)**). Each row denotes activity exhibited by individual units (recorded action potentials) during IEDs, after applying 10  $\mu\text{M}$  bicuculline under  $\text{Mg}^{2+}$ -free conditions.  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging results (inferred action potentials in Fig. 4(A)) are confirmed by MEAs (real action potentials): the neurons fire in near synchrony into one ensemble which is grouped into two clusters by their different correlated firing patterns. One characteristic that defines clusters is their duration: activity lasts more in one of them (red). **(F, G)** Local field potential (LFP, low-pass filter <100 Hz) simultaneously recorded during neuronal firing. Magnification **(G)** shows the components of the LFP: an inter-ictal spike followed by a slow wave and late oscillations that mostly correspond to activity in the ensemble that lasts longer. **(H, I)** Spectrograms of the recordings shown in **(F, G)**. **(J, K)** Coactivity of individual neurons with a time interval of 5 ms, separated according to identified clusters, note different time courses confirming findings using  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging and inferred spikes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

peak of maximal activity IEDs obtained with the different experimental protocols were similar (Fig. 8F;  $P = 0.54$ ; Kruskal–Wallis ANOVA test;  $n_1 = 111$  PV+ interneurons inter-events;  $n_2 = 333$  pyramidal neurons inter-events;  $n_3 = 187$  calcium imaging inter-events;  $n_4 = 300$  MEA inter-events, all cases from different animals). Thus, experiments showed similar results with all techniques used.

## DISCUSSION

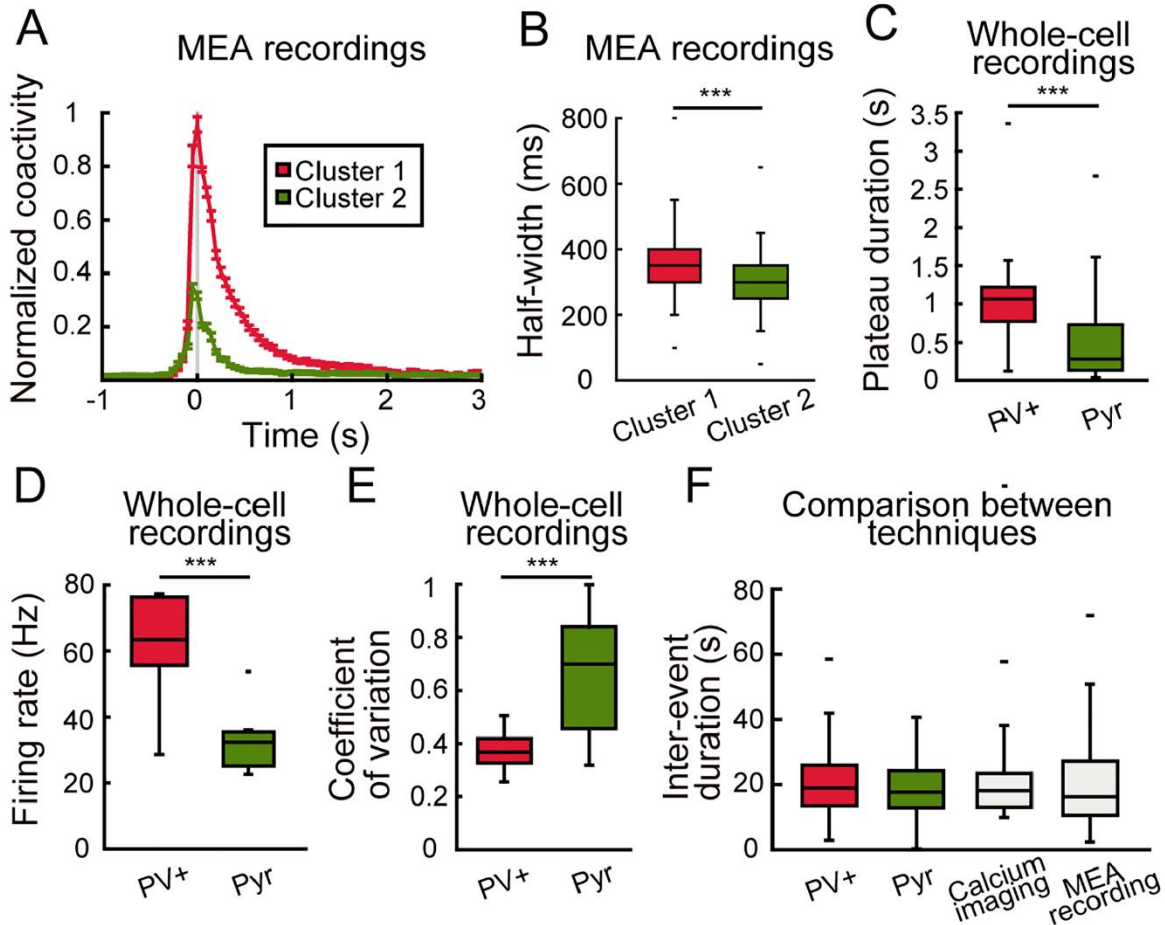
Original findings of the present work are: (1) Resting, non-stimulated, cortical tissue *in vitro* have a spontaneously generated activity which consist in temporal sequences of neuronal ensembles: groups of neurons with strongly correlated spatiotemporal activity patterns, demonstrated with pair to pair correlations in control



**Fig. 7.** Morphological and electrophysiological characterization of two main classes of neurons recorded before and during interictal epileptiform discharges. **(A)** Morphology of a pyramidal neuron intracellularly labeled with streptavidin-Cy3 conjugated with biocytin (red). **(B)** Voltage responses (top) to the application of depolarizing and hyperpolarizing current pulses (bottom) at the soma of the same cell. Recorded in control conditions. **(C)** Current-voltage relationship (I–V plot) of the neuron shown in **(A)**. **(D)** Depolarizing shift plus train of spikes during the synchronous stage of an IED under 10  $\mu$ M bicuculline and  $Mg^{2+}$ -free conditions of the same cell. **(E)** Morphology of an interneuron identified as PV+ by viral transfection with td-Tomato (red) and intracellularly labeled with streptavidin-FITC conjugated biocytin (yellow). **(F)** Voltage responses (top) after application of depolarizing and hyperpolarizing current pulses (bottom) at the soma of the same cell. Recorded in control conditions. **(G)** I–V plot of the neuron shown in **(F)**. **(H)** Depolarizing shift and train of spikes of the same PV+ interneuron recorded during the synchronous stage of an IED in 10  $\mu$ M bicuculline and  $Mg^{2+}$ -free conditions. Note lower input resistance (cf. I–V plots), higher firing frequency and longer duration of firing as compared with **(D)**. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

conditions. There is some neuronal overlapping between neuronal ensembles (Carrillo-Reid et al., 2009; Dechery and MacLean, 2017). (2) When active, most neuronal ensembles are accompanied by the firing of at least one PV+ interneuron. Because our sampling comprises a few dozen of neurons, it is possible that observed ensembles are samples of larger neuronal groups below and above of our two dimensional plane of view, thus this observation may be an underestimation. However, this view suffice to observe the recurrent temporal sequences (Buzsáki, 2010; Dechery and MacLean, 2017). (3) Network analysis showed that this control default activity *in vitro* is similar to a small-world configuration with a few neurons having great connectivity and forming a rich club. Interestingly, most connected neurons were PV-, most probably pyramidal neurons (Fornito et al 2016).

(4) The blockade of GABA transmission with bicuculline in a virtual  $Mg^{2+}$ -free extracellular medium (Hongo et al 2015) suffice to remodel the network to generate brief recurrent epileptiform discharges without stimulation. Due to their duration they are similar to interictal epileptiform discharges or IEDs (Brückner and Heinemann, 2000; de Curtis et al., 2012). They are seen as coactivity of PV+ and PV- neurons forming a large ensemble, both with inferred action potentials after calcium imaging and with real action potentials after MEA recordings, forming an initial synchronicity with high frequency followed by brief after-discharges. The initial peak of coactivity corresponds to the initial interictal spike in the LFP, and after-discharges correspond to its slow oscillations. (5) The importance of fast spiking interneurons activity (FSIs or PV+ cells) in these synchronous events was done with



**Fig. 8.** Differences in the duration of clusters making up IEDs. **(A)** Normalized coactivity of multi-units clusters within IEDs separated by their differing firing patterns and aligned to their maximal peak of coactivity at time zero (MEA recordings; color code in previous figures is followed). **(B)** Half-width (duration at half coactivity amplitude) shows a cluster exhibiting longer duration (red) during IEDs, similar to results obtained with calcium imaging experiments ( $P < 0.001$ ;  $n = 306$  in both cases; Kolmogorov–Smirnov test). **(C)** Difference in duration of action potentials trains of individually recorded interneurons and pyramidal neurons (whole-cell recordings). Similar to results with calcium imaging, interneurons units remain active for longer periods during IEDs (MEA recordings;  $P < 0.001$ ;  $n_1 = 119$  PV+ events;  $n_2 = 354$  PV– events; Kolmogorov–Smirnov test). **(D)** Firing rate of action potentials of PV+ interneurons during IEDs was higher than the rate reached by identified pyramidal neurons (Whole-cell recordings  $P < 0.001$ ;  $n_1 = 7$  PV+ cells;  $n_2 = 11$  pyramidal cells; Kolmogorov–Smirnov test). **(E)** Coefficient of variation was significantly higher in pyramidal neurons with respect to PV+ cells ( $P = 0.004$ ;  $n_1 = 7$  PV+ cells;  $n_2 = 11$  pyramidal cells; Kolmogorov–Smirnov test). **(F)** Mean inter-event duration between recurrent IEDs ( $P = 0.54$ ;  $n_1 = 111$  putative PV+ inter-events;  $n_2 = 333$  putative pyramidal inter-events;  $n_3 = 187$  calcium imaging inter-events;  $n_4 = 300$  MEA inter-events; Kruskal–Wallis test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

identified neurons in PV-Cre mice. However, PV– (mainly glutamatergic) neurons also participate. (6) Network analysis generated a recurrent repetitive network with many functional connections as compared to the controls. As expected, this kind of network tended to leave the small-world configuration and tended to adopt that of a regular network (Watts and Strogatz, 1998). (7) Targeted whole cell recordings in current clamp confirmed that identified PV+ neurons have action potentials trains with higher frequency and longer duration than those of pyramidal cells. This is why, in the present conditions, afterdischarges are basically due to interneurons.

#### Network default configuration in resting cortical tissue

Calcium imaging experiments with single cell resolution demonstrated the long-standing hypothesis that a temporal sequence of cortical neuronal ensembles is generated spontaneously in non-stimulated cortical tissue *in vitro* (Hebb, 1949; Abeles, 1991; Beggs and Plenz, 2004; Ikegaya et al., 2004; Luczak et al., 2007; Pastalkova et al., 2008; Dechery and MacLean, 2017). Therefore these phenomena represents a basic structured activity of mice motor cortex at rest or without stimulation and long range influences (Luczak et al., 2007), in

need of further study. In our experimental conditions this resulted in a stable form of spontaneous activity in mice motor cortex, without the need of stimulation and without long range influences. Intersections between ensembles suggest some neuronal overlapping (Carrillo-Reid et al., 2009; Dechery and MacLean, 2017). During this spontaneous activity, each neuronal ensemble has the association of PV+ interneurons, almost ensemble by ensemble. From the various mechanism to explain these sequences two are pertinent here: (1) Synchronized glutamatergic neurons excite the next ensemble in a recurrent sequence of a class of feed-forward circuit (Hebb, 1949; Abeles et al., 1991; Aertsen et al., 1996; Reyes, 2003; Fries, 2005; DeMarse et al., 2016). (2) Inhibitory neurons are necessary to inhibit the non-firing ensembles, and the activity and number of neurons in their own ensembles in an excitatory-inhibitory interplay (Sanchez-Vives and McCormick, 2000; Cossart et al., 2003; Litvak et al., 2003; Grillner et al., 2005). Here we show experimental evidence that both mechanisms do not exclude each other.

PV+ neurons have a characteristic pattern of activity within the circuit. Because our grouping procedure depends on firing pattern correlation, this result suggest that different PV+ neurons adapt their firing pattern to that of their PV- companions, suggesting a precise role in each ensemble. Because both PV+ or FSIs and PV- (mostly pyramidal neurons) increase during GABAergic blockade and collapse temporal sequences of neuronal ensembles found in the control, the need of interneurons to regulate control temporal sequences seems important, both to inhibit non-firing ensembles and to limit the number of neurons in their own ensembles. Otherwise a single repetitive ensemble firing once and again takes place.

The degree distribution of the PV+ and PV- neurons are similar, indicating that there is an equal probability of finding one of these types of neurons as hubs in the network. However, the largest proportion of PV- neurons (most probably pyramidal neurons) causes us to find these types of neurons as the more common hubs in agreement with rich-club metrics. These experimental evidences suggest that feed-forward sequences driven by pyramidal neurons are controlled by inhibition to generate ordered sequences. PV+ interneurons and their corresponding ensembles were closely linked to the highly connected hubs. In this scheme, other interneuron classes need to be studied using a similar framework.

#### Remodeling of cortical functional architecture following GABAergic blockade

The exact cellular machinery that generates the temporal sequences of neuronal ensembles in the resting cortical circuitry is unknown, however, it should be completely remodeled after removing the important component given by GABAergic inhibition. By blocking GABAergic transmission, a non-stimulated resting cortical tissue is capable to reconfigure itself from a temporal sequence

of neuronal ensembles with sparse and ordered PV+ interneurons participation, to a single recurrent ensemble that repeats itself regularly. Network analysis proved this remodeling since the small-world configuration seen in the control was transformed to a regular network with many more correlation links and a single synchronous ensemble. We identified PV+ neurons in calcium imaging experiments with td-Tomato, and lately we inferred their activity together with that of PV- neurons using GCaMP6f under the synapsin promoter. Our grouping method clearly divided the IED ensemble into two clusters with different firing patterns, thus destroying the similar correlation between PV+ and PV- neurons observed in the control ensembles. One of these clusters possessed more interneurons and lasted during more prolonged times. Real unitary action potentials obtained with MEA showed the same result: two clusters one lasting more than the other. It was true that the number of interneurons increased during these events, but PV- neurons also increased so that their proportion within the active and synchronous neuronal population remained the same, discarding that PV+ interneurons have a predominant role during this type of discharges. The fact that both PV+ and PV- neurons fired at the same initial time window is probably due to the lack of GABAergic inhibition. Thus, GABA transmission is not needed to reach this stage or to activate these neuronal populations or to generate the silent period between the epileptiform discharges. However, in no case we could see the development of an ictal-like event, suggesting the need of GABAergic transmission to reach that stage (Sessolo et al., 2015; Khoshkhou et al., 2017; Chang et al., 2018). The sole blockade of GABA transmission do not produce them without stimulation (Bekenstein and Lothman, 1993; Jirsa et al., 2014; Zaitsev, 2017).

These experiments also demonstrate that synchronization of GABAergic and glutamatergic neurons do not need GABAergic transmission but are favored by the lack of it. Alternation between PV+ and PV- neurons, such as that seen with the 4-AP model (Levesque et al., 2018) is not seen perhaps because GABAergic transmission has been blocked, but this has to be proven with the present experimental conditions in future studies. In addition, the fact that these events could be maintained for several minutes without entering an ictal-like event show that IEDs are not due to GABAergic transmission, at least that coming from ligand-gated GABA<sub>A</sub> receptors. This network behavior is totally reversible to the one shown in Fig. 1 (see Supplementary Fig. S1).

Recordings of real action potentials with MEAs closely resembled those obtained with inferred action potentials obtained with calcium imaging: IEDs-like events consists in a synchronous high frequency event reaching the gamma band and coinciding with the interictal main spike recorded as LFP, followed by lower spike frequencies coinciding with the slow wave in the LFP. Spikes firing from one of the clusters after the initial synchronous event had frequencies within theta and

alpha bands coinciding with late oscillations in the LFP. According to calcium imaging experiments most spikes in the red cluster should correspond to FSIs or PV+ interneurons.

To completely be sure of this inference, we individually recorded neurons from these different clusters during these events and anatomically identified them with immunocytochemistry. Whole-cell current-clamp experiments before and during IEDs synchronization confirmed that the grouping method used in both calcium imaging and MEA recordings did distinguish between pyramidal neurons (most PV–) and PV+ interneurons firing patterns, making it easy to count their participation and attesting their roles during IEDs synchronization by separating them into two clusters within the same event. By measuring the duration of their trains of action potentials we proved that PV+ neurons fire during more prolonged times.

In conclusion, resting control or non-stimulated mouse motor cortex *in vitro* spontaneously generate a patterned network activity consisting in temporal sequences of neuronal ensembles, which persists in a recurrent way without stimulation and long range influences. Each neuronal ensemble might be accompanied by a PV+ or FSI. The configuration of this circuit is similar to a small-world network. Rich club metrics yield that most connected hub neurons are PV– favoring the hypothesis of feed-forward propagation through pyramidal cells. However, ensembles with PV+ neurons are connected to these hubs, and when ligand-gated fast GABA transmission is blocked, the temporal sequences of ensembles collapses into a unique recurrent ensemble, suggesting that inhibition is necessary to control spontaneous activity. The resulting ensemble has the duration and electrophysiological characteristics of brief recurrent IEDs composed by the coactivity of both PV– and PV+ neurons, suggesting that fast GABA transmission commonly impedes its occurrence. These synchronous events are clearly divided into two clusters one of them with more prolonged firing than the other because it is mainly composed with PV+ neurons. Because an ictal-like event was not recorded after several minutes of IEDs recording, we conclude that perhaps a different stimulus and/or fast GABA transmission are necessary for its appearance, making this preparation ideal to study both cortical spontaneous activity mechanisms and its transformation into brief epileptiform discharges.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank Antonio Laville and Ariadna Aparicio-Juárez for technical support, Claudia Rivera-Cerecedo, Héctor Alfonso Malagón-Rivero and Xochitl Ayala for their help in animal care facility. Ana Maria Escalante and Francisco Pérez Eugenio for fixing computational incidents. This work was supported by public grants CONACYT Frontera 57 FON.INS. 29-10, DGAPA-UNAM: IN202920 to J.B. and IN203020 to E.G. Miguel Serrano-Reyes is a student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomedicas, Universidad

Nacional Autónoma de México (UNAM), and received doctoral fellowship 375821 from CONACYT. Data in this work are part of his doctoral dissertation.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Miguel Serrano-Reyes: Study conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting of manuscript. Brisa García-Vilchis: Acquisition of data. Rosa Reyes-Chapero: Acquisition of data. Dagoberto Tapia: Acquisition of data. Elvira Galarraga: Drafting of manuscript, Critical revision. José Vargas: Study conception and design, Interpretation of data, Drafting of manuscript, Critical revision.

#### DECLARATIONS OF INTEREST

None.

#### REFERENCES

- Abeles M (1991) *Corticomics: neural circuits of the cerebral cortex*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Aertsen A, Diesmann M, Gewaltig MO (1996) Propagation of synchronous spiking activity in feedforward neural networks. *J Physiol Paris* 90(3–4):243–247. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(97\)81432-5](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(97)81432-5).
- Arias-García MA, Tapia D, Laville JA, Calderón VM, Ramiro-Cortés Y, Vargas J, Galarraga E (2018) Functional comparison of corticostriatal and thalamostriatal postsynaptic responses in striatal neurons of the mouse. *Brain Struct Funct* 223:1229–1253. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1536-6>.
- Avoli M, de Curtis M (2011) GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol* 95:104–132. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.07.003>.
- Avoli M, Panuccio G, Herrington R, D'Antonio M, de Guzman P, Lévesque M (2013) Two different interictal spike patterns anticipate ictal activity *in vitro*. *Neurobiol Dis* 52:168–176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.004>.
- Avoli M, Jefferys JGR (2016) Models of drug-induced epileptiform synchronization *in vitro*. *J Neurosci Methods* 260:26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.10.006>.
- Beggs JM, Plenz D (2004) Neuronal avalanches are diverse and precise activity patterns that are stable for many hours in cortical slice cultures. *J Neurosci* 24(22):5216–15129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0540-04.2004>.
- Bekenstein JW, Lothman EW (1993) Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259(5091):97–100. <https://doi.org/10.1126/science.8093417>.
- Binnie CD (2003) Cognitive impairment during epileptiform discharges: is it ever justifiable to treat the EEG? *Lancet Neurol* 2:725–730. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00584-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00584-2).
- Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, Chavez M, Hwang DU (2006) Complex networks: structure and dynamics. *Phys Rep* 424:175–308. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2005.10.009>.
- Bruno AM, Frost WN, Humphries MD (2015) Modular deconstruction reveals the dynamical and physical building blocks of a locomotion motor program. *Neuron* 86:304–318. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.005>.
- Brückner C, Heinemann U (2000) Effects of standard anticonvulsant drugs on different patterns of epileptiform discharges induced by 4-aminopyridine in combined entorhinal cortex-hippocampal slices. *Brain Res* 859:15–20. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02348-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02348-3).
- Bullmore E, Sporns O (2009) Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat Rev Neurosci* 10:186–198. <https://doi.org/10.1038/nrn2575>.

- Buzsáki G (2010) Neural syntax: cell assemblies, synapsembles, and readers. *Neuron* 68:362–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.023>.
- Buzsáki G, Tingley D (2018) Space and Time: The Hippocampus As A Sequence Generator. *Trends Cogn Sci* 10:853–869. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.07.006>.
- Cammarota M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Carmignoto G (2013) Fast spiking interneuron control of seizure propagation in a cortical slice model of focal epilepsy. *J Physiol* 591(4):807–822. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238154>.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J (2008) Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99:1435–1450. <https://doi.org/10.1152/jn.01131.2007>.
- Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Ibáñez-Sandoval O, Hernández-Cruz A, Galarraga E, Vargas J (2009) Activation of the cholinergic system endows compositional properties to striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 101:737–749. <https://doi.org/10.1152/jn.90975.2008>.
- Carrillo-Reid L, Yang W, Bando Y, Peterka DS, Yuste R (2016) Imprinting and recalling cortical ensembles. *Science* 353(6300):691–694. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7560>.
- Chen TS, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreier ER, Kerr RA, et al. (2013) Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499(7458):295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Chang M, Dian JA, Dufour S, Wang L, Chameh HM, Ramani M, Zhang L, Carlen PL, et al. (2018) Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. *Neurobiol Dis* 109:102–116. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.007>.
- Churchland MM, Cunningham JP, Kaufman MT, Foster JD, Nuyujukian P, Ryu SI, Shenoy KV (2012) Neural population dynamics during reaching. *Nature* 487(7405):51–56. <https://doi.org/10.1038/nature11129>.
- Cohen I, Huberfeld G, Miles R (2006) Emergence of disinhibition-induced synchrony in the CA3 region of the guinea pig hippocampus in vitro. *J Physiol* 570(Pt 3):583–594. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097899>.
- Colizza V, Flammini A, Serrano MA, Vespignani A (2006) Detecting rich-club ordering in complex networks. *Nat Phys* 2:110–115. <https://doi.org/10.1038/nphys209>.
- Cossart R, Aronov D, Yuste R (2003) Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423:283–288. <https://doi.org/10.1038/nature01614>.
- Cossart R (2014) Operational hub cells: a morpho-physiologically diverse class of GABAergic neurons united by a common function. *Curr Opin Neurol* 26:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.12.002>.
- de Curtis M, Jefferys JGR, Avoli M (2012) Interictal epileptiform discharges in partial epilepsy: complex neurobiological mechanisms based on experimental and clinical evidence. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, editors. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). p. 303–325.
- de la Prida LM, Huberfeld G, Cohen I, Miles R (2006) Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 49(1):131–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.034>.
- Dechery JB, MacLean JN (2017) Emergent cortical circuit dynamics contain dense, interwoven ensembles of spike sequences. *J Neurophysiol* 118:1914–1925. <https://doi.org/10.1152/jn.00394.2017>.
- DeMarse TB, Pan L, Alagapan S, Brewer GJ, Wheeler BC (2016) Feed-forward propagation of temporal and rate information between cortical populations during coherent activation in engineered in vitro networks. *Front Neural Circuits* 10(32). <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00032>.
- Derchansky M, Jahromi SS, Mamani M, Shin DS, Sik A, Carlen PL (2008) Transition to seizures in the isolated immature mouse hippocampus: a switch from dominant phasic inhibition to dominant phasic excitation. *J Physiol* 15586(2):477–494. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143065>.
- Feldt S, Bonifazi P, Cossart R (2011) Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: experimental and theoretical insights. *Trends Neurosci* 34(5):225–236. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.02.007>.
- Formito A, Zalesky A, Bullmore ET (2016) *Fundamentals of brain network analysis*. London: Academic Press.
- Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* 9:474–480. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.08.011>.
- Gonzalez-Sulser A, Wang J, Queenan BN, Avoli M, Vicini S, Dzakpasu R (2012) Hippocampal neuron firing and local field potentials in the in vitro 4-aminopyridine epilepsy model. *J Neurophysiol* 108:2568–2580. <https://doi.org/10.1152/jn.00363.2012>.
- Grillner S, Markram H, De Schutter E, Silberberg G, LeBeau FE (2005) Microcircuits in action—from CPGs to neocortex. *Trends Neurosci* 28(10):525–533. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.08.003>.
- Gründemann J, Bitterman Y, Lu T, Krabbe S, Grewe BF, Schnitzer MJ, Lüthi A (2019) Amygdala ensembles encode behavioral states. *Science* 364:eaav8736. <https://doi.org/10.1126/science.aav8736>.
- Harvey CD, Coen P, Tank DW (2012) Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature* 484(7392):62–68. <https://doi.org/10.1038/nature10918>.
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior*. *J Clin Psychol* 335.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR, Arber S (2005) A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signalling. *PLoS Biol* 3:0878–0890.
- Holmes GL, Lenck-Santini PP (2006) Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. *Epilepsy Behav* 8(3):504–515. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.11.014>.
- Hongo Y, Takasu K, Ikegaya Y, Hasegawa M, Sakaguchi G, Ogawa K (2015) Heterogeneous effects of antiepileptic drugs in an in vitro epilepsy model – a functional multineuron calcium imaging study. *Eur J Neurosci* 42:1818–1829. <https://doi.org/10.1111/ejn.12945>.
- Huberfeld G, de la Prida LM, Pallud J, Cohen I, Quyen MLV, Adam C, Clemenceau S, Baulac M, et al. (2011) Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci* 14:627–635. <https://doi.org/10.1038/nn.2790>.
- Humphries MK, Gurney K (2008) Network 'small-world-ness': A quantitative method for determining canonical network equivalence. *PLoS ONE* 3(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002051> e0002051.
- Ibanez-Sandoval O, Hernández A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erij D, Aceves J, Vargas J (2006) Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800–1811. <https://doi.org/10.1152/jn.00620.2007>.
- 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(5670):559–564. <https://doi.org/10.1126/science.1093173>.
- Jirsa VK, Stacey WC, Quilichini PP, Ivanov AI, Bernard C (2014) On the nature of seizure dynamics. *Brain* 137:2210–2230. <https://doi.org/10.1093/brain/awu133>.
- Karlócai MR, Kohus Z, Káli S, Ulbert I, Szabó G, Máté Z, Freund TF, Gulyas AI (2014) Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? *Brain* 137:463–485. <https://doi.org/10.1093/brain/awt348>.
- Khoshkhou S, Vogt D, Sohal VS (2017) Dynamic, cell-type-specific roles for GABAergic interneurons in a mouse model of optogenetically inducible seizures. *Neuron* 93:291–298. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.043>.
- Krook-Magnuson E, Armstrong C, Oijala M, Soltesz I (2013) On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. *Nat Commun* 4(1376). <https://doi.org/10.1038/ncomms2376>.

- Lampl I, Reichova I, Ferster D (1999) Synchronous membrane potential fluctuations in neurons of the cat visual cortex. *Neuron* 22:361–374. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81096-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81096-X).
- Lévesque M, Chen LY, Hamidi S, Avoli M (2018) Dynamic interneuron-principal cell interplay leads to a specific pattern of in vitro ictogenesis. *Neurobiol Dis* 115:92–100. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.004>.
- Litvak L, Delgutte B, Eddington D (2003) Improved neural representation of vowels in electric stimulation using desynchronizing pulse trains. *J Acoust Soc Am* 114(4 Pt 1):2099–2111. <https://doi.org/10.1121/1.1612494>.
- Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD (2007) Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1):347–352. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605643104>.
- Markram H, Toledo-Rodríguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev* 5:793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>.
- Markram H, Müller E, Ramaswamy S, Reimann MW, DeFelipe J, Hill SL, Segev I, Schürmann F, et al. (2015) Reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry. *Cell* 163:456–492. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.029>.
- Mosbah A, Tramoni E, Guedj E, Aubert S, Daquin G, Ceccaldi M, Félician O, Bartolomei F (2014) Clinical, neuropsychological, and metabolic characteristics of transient epileptic amnesia syndrome. *Epilepsia* 55(5):699–706. <https://doi.org/10.1111/epi.12565>.
- Muldoon SF, Soltész I, Cossart R (2013) Spatially clustered neuronal assemblies comprise the microstructure of synchrony in chronically epileptic networks. *PNAS* 110(9):3567–3572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216958110>.
- Muldoon SF, Villette V, Tressard T, Malvache A, Reichinnek S, Bartolomei F, Cossart R (2015) GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice. *Brain* 138:2875–2890. <https://doi.org/10.1093/brain/awv227>.
- Newman MEJ (2006) Modularity and community structure in networks. *PNAS* 103(23):8577–8582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601602103>.
- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR (2010) Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51:883–890. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>.
- Oh SW, Harris JA, Ng J, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, et al. (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508:207–214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>.
- Pastalkova E, Itskov V, Amarasingham A, Buzsáki G (2008) Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321(5894):1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.023>.
- Peters AJ, Chen SX, Komiyama T (2014) Emergence of reproducible spatiotemporal activity during motor learning. *Nature* 510(7504):263–267. <https://doi.org/10.1038/nature13235>.
- Reyes AD (2003) Synchrony-dependent propagation of firing rate in iteratively constructed networks in vitro. *Nat Neurosci* 6:593–599. <https://doi.org/10.1038/nn1056>.
- Sadovskiy AJ, MacLean JN (2013) Scaling of topologically similar functional modules defines mouse primary auditory and somatosensory microcircuitry. *J Neurosci* 33(35):14048–14060. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1977-13.2013>.
- Sakata S, Harris KD (2009) Laminar structure of spontaneous and sensory-evoked population activity in auditory cortex. *Neuron* 64:404–418. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.020>.
- Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3(10):1027–1034. <https://doi.org/10.1038/79848>.
- Sasaki T, Matsuki N, Ikeyaga Y (2007) Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 27(3):517–528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4514-06.2007>.
- Serafini R, Dettloff S, Loeb JA (2016) Neocortical slices from adult chronic epileptic rats exhibit discharges of higher voltages and broader spread. *Neuroscience* 322:509–524. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.026>.
- Sessolo M, Marcon I, Bovetti S, Losi G, Cammarota M, Ratto GM, Fellin T, Carmignoto G (2015) Parvalbumin-positive inhibitory interneurons oppose propagation but favor generation of focal epileptiform activity. *J Neurosci* 35(26):9544–9557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5117-14.2015>.
- She Q, Chen G, Chan RHM (2016) Evaluating the small-world-ness of a sampled network: functional connectivity of entorhinal-hippocampal circuitry. *Sci Rep* 6(21468). <https://doi.org/10.1038/srep21468>.
- Smith EH, Schevon CA (2016) Toward a mechanistic understanding of epileptic networks. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16:97. <https://doi.org/10.1007/s11910-016-0701-2>.
- Theis L, Berens P, Froudarakis E, Euler T, Tolias AS, Bethge M (2016) Benchmarking spike rate inference in population calcium imaging. *Neuron* 90:471–482. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.014>.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic interneurons in the neocortex: from cellular properties to circuits. *Neuron* 91:260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>.
- van den Heuvel MP, Sporns O (2011) Rich-club organization of the human connectome. *J Neurosci* 31(44):15775–15786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3539-11.2011>.
- Vogelstein JT, Packer AM, Machado TA, Sippy T, Babadi B, Yuste R, Paninski L (2010) Fast nonnegative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging. *J Neurophysiol* 104:3691–3704. <https://doi.org/10.1152/jn.01073.2009>.
- Watts DJ, Strogatz SH (1998) Collective dynamics of 'small-world' networks. *Nature* 393:440–442. <https://doi.org/10.1038/30918>.
- Zaitsev AV (2017) The role of GABAergic interneurons in the cortex and hippocampus in the development of epilepsy. *Neurosci Behav Physiol* 47(8):913–922. <https://doi.org/10.1007/s11055-017-0491-2>.
- Zhou JL, Shatskikh TN, Liu X, Holmes GL (2007) Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures. *Eur J Neurosci* 25(12):3667–3677. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05598.x>.

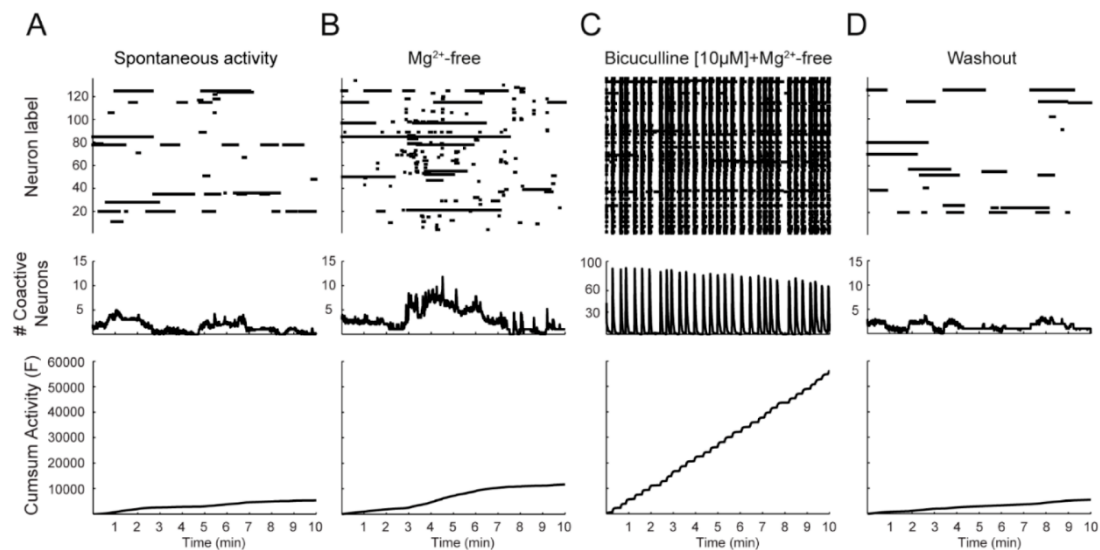
## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.08.025>.

(Received 9 June 2020, Accepted 18 August 2020)  
(Available online 27 August 2020)

**Supplementary material. Serrano-Reyes et al. 2020. NSC-S-20-01265R1**

**Supplementary Video V1.** Detection of neuronal ensembles from raw raster plots. Animation illustrates, step by step, how a raw raster plot is processed. Neurons are rearranged vertically according to their paired cross-correlations of their firing patterns and the modularity algorithm (see Experimental procedures). Raw raster plots give little information about neuronal populations, however, after the grouping procedure, different neuronal ensembles are revealed following a sequence of activation. The same grouping procedure can be used for active neurons detected with calcium imaging and with extracellular recorded units after MEA recordings, however, calcium imaging uses real neurons and MEAs are influenced by electrodes position.

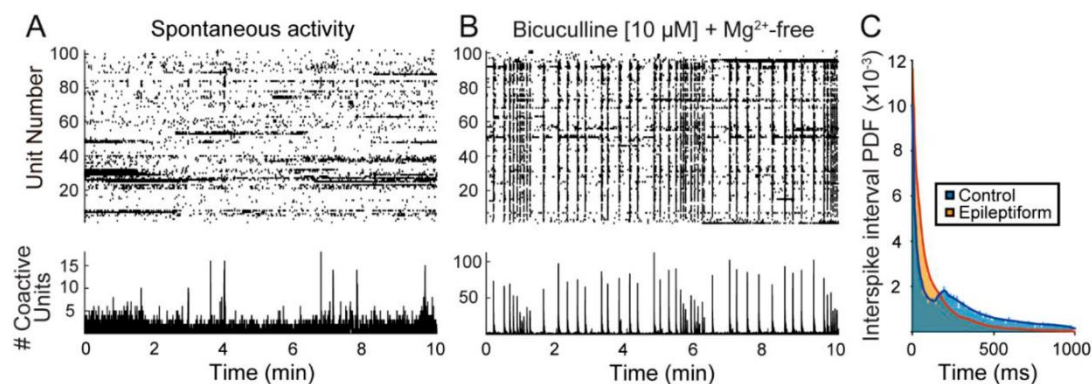


**Supplementary Figure S1. Different conditions in the mouse cortical tissue slice.** (A, top) Raw raster plot of spontaneous activity (without the grouping procedure applied in Figs. 2, 3 and illustrated in Video V1), the label of the neurons was chosen according to their physical position in the slice and is maintained throughout the following boxes. (A, middle) Histogram of the coactivity of the neurons, the maximum values of coactivity oscillate around 3 or 4 neurons, with maximums of 5. (A, bottom) Graph of cumulative activity along time of all neurons during the ten minutes of recording (Cumsum Activity; F = frames). (B, top) Raw raster plot of the activity of the motor cortex during Mg<sup>2+</sup>-free solution. An increase in the coactivity of the neurons (B, middle) is observed and cumulative activity exhibits a curve with different slope (B, bottom). (C, top) Raw raster plot of epileptiform activity induced with the application of 10 µM bicuculline under a virtual Mg<sup>2+</sup>-free solution. Interictal epileptiform discharges appear (C, middle) for several minutes. Cumulative activity (C, bottom) along time is higher. (D, top) Raw raster plot of activity after washing of bicuculline and restoration of



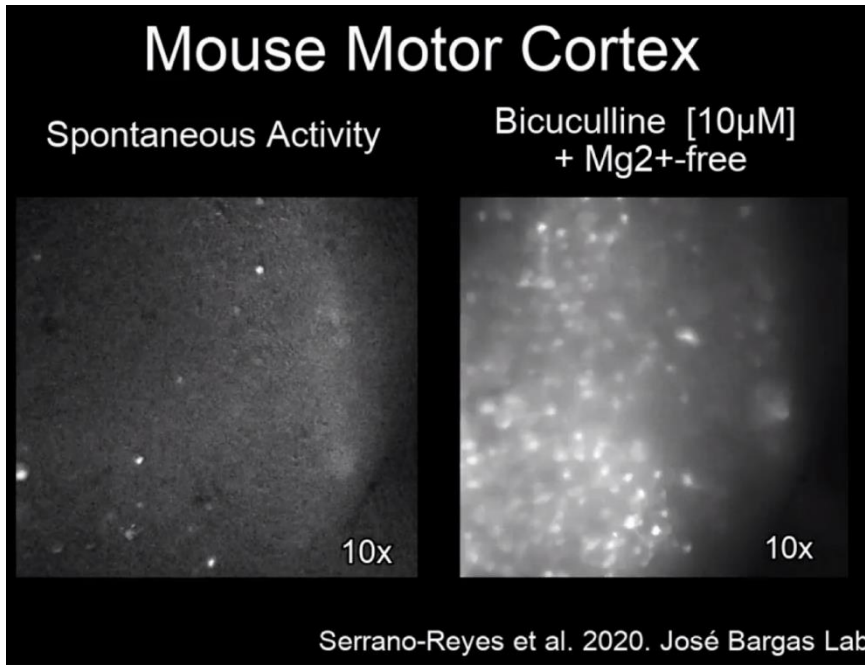
Mg<sup>2+</sup>. Coactivity returns to minimum levels (D, middle) and cumulative activity along time is similar to the control (D, bottom). The duration between each raster plot is less than one minute.

**Supplementary Video V2. Comparison of control spontaneous activity and epileptiform conditions.** Representative example of the acquisition field for calcium imaging videos in the mouse motor cortex: control spontaneous activity is observed on the left and interictal epileptiform discharges on the right. The contrast was enhanced to easily observe the changes in fluorescence associated with neuronal action potentials. From these videos, the selection of the regions of interest are carried out to proceed with subsequent analysis (see Experimental procedures).

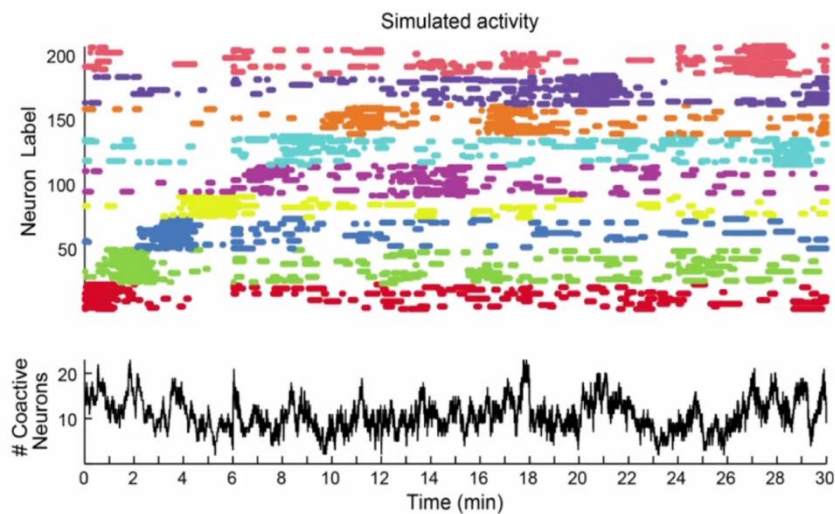


**Supplementary Figure S2. Comparison between spontaneous control activity and interictal epileptiform discharges using extracellular multi-electrode array (MEA) recordings.** (A, top) Raw raster plot of the spontaneous control activity (without grouping procedure) recorded with electrodes located in the mouse motor cortex. (A, bottom) Histogram shows units coactivity with a time interval of 50 ms, in some intervals coactivity reaches values greater than 10 units. (B, top) Raw raster plot of activity in the presence of 10 μM bicuculline plus Mg<sup>2+</sup>-free solution. Blocking of the fast ligand-gated GABA<sub>A</sub>-receptor produces brief and recurrent interictal epileptiform discharges (B, bottom) that can be recorded for several minutes. More than 50 units are activated at different time intervals. (C) Probability density function of inter-spike intervals in the control condition and during interictal epileptiform discharges.

# VIDEOS SUPLEMENTARIOS



## Cluster detection algorithm



Serrano-Reyes et al. 2020. José Bargas Lab