

Tesis para obtener el título de Ingeniero
Mecatrónico

Implementación de un sistema de análisis de microcircuitos neuronales mediante teoría de redes

Miguel Serrano Reyes



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ingeniería
División de Ingeniería Mecánica e Industrial

A mis padres, por su apoyo y confianza. A mi familia, por creer en mí. A mi amor, por su paciencia y cariño, y a mis amigos, por motivarme a ser mejor cada día de mi vida.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	5
1.1. Neuronas	6
1.2. Niveles y estilos de análisis en la teoría del cerebro y las redes neuronales	9
1.3. Microcircuitos neuronales biológicos	11
1.4. Teoría de redes complejas	14
2. Planteamiento del problema	21
3. Objetivo	25
3.1. Objetivos particulares	25
4. Métodos	27
4.1. Identificación de neuronas en videos obtenidos mediante imagenología de calcio	27
4.2. Obtención de las señales fluorescentes dependientes de calcio	28
4.3. Construcción de las matrices de actividad	30
4.4. Generación de la matriz adyacente binaria de la red neuronal	31
4.5. Cálculo de parámetros de la red neuronal	33
5. Resultados	45
5.1. Caso de uso	45
6. Conclusiones	59
Agradecimientos	63
A. Apéndice I: Interfaces de usuario del sistema	65
Bibliografía	69

Resumen

La neurofisiología estudia la actividad de las neuronas y los circuitos que ellas forman, tanto para comprender sus propiedades intrínsecas como para ayudar a entender su papel en los subsistemas de los que forman parte.

El proceso de la conciencia y las formas de cómo percibimos, actuamos, aprendemos y recordamos ha sido difícil de esclarecer, aunque son problemas que el hombre se ha planteado desde la antigüedad, dando como resultado grandes controversias en busca de respuestas a lo largo de la historia. Durante la mayor parte del siglo pasado las ciencias biomédicas han respaldado el paradigma denominado “Celular-molecular”.

Adoptar ese planteamiento, ha permitido avances significativos en la Biología. Tal es el caso del problema de entender el funcionamiento de las células, en específico, los procesos que son comunes a todas ellas: metabolismo, señalización, respiración, transporte transmembranal, motilidad, etc.

De igual forma, el paradigma mencionado, ha permitido conocer cuáles son los organelos intracelulares, proteínas y moléculas, ocupados de realizar dichas funciones —enzimas, receptores, mitocondrias, canales, transportadores, bombas-ATPasas, porinas y recientemente los exosomas—. Hoy en día, concebimos a la célula cómo

una unidad dinámica altamente organizada. Con lo anterior, se ha avanzado mucho en la identificación de los procesos que subyacen a la plasticidad de las sinapsis de las neuronas biológicas, permitiendo establecer un panorama general del funcionamiento de éstas, logrando instaurar un marco conceptual para toda la neurobiología.

Recientemente, el estudio del cerebro y sus funciones se ha expandido a través de distintos campos de la ciencia, el trabajo multidisciplinario ha sido la regla, lo cual ha propiciado grandes avances en la solución de los problemas. La búsqueda de nuevos planteamientos teóricos que puedan contribuir a aclarar los problemas se hacen necesarios.

Por ejemplo, la teoría de redes está empezando a revelar información sobre los principios fundamentales de la arquitectura y funciones del cerebro. A nivel del sistema nervioso, sabemos que el trabajo lo realizan las interacciones entre las neuronas de pequeños módulos, desde los grupos de motoneuronas dedicadas a un músculo hasta las columnas corticales.

Sin embargo las operaciones cognitivas complejas emergen de la actividad coordinada de grandes poblaciones neuronales en las redes cerebrales. ¿Cómo interactúan entre sí las neuronas de los módulos que las conforman? No lo sabemos, estos son los llamados microcircuitos neuronales. Tradicionalmente, se ha partido de simulaciones basadas en los datos de neuronas y sinapsis individuales, para tratar de averiguar qué sucede cuando las interconectamos.

El presente trabajo busca caracterizar a los microcircuitos neuronales biológicos en diferentes estructuras cerebrales de ratón, mediante datos recabados con imagenología de calcio desde el microcircuito entero o conformado de decenas de neuronas simultáneamente y haciendo uso de la teoría de redes complejas, que se ha utilizado de manera exitosa en otras áreas del conocimiento. Los resultados obtenidos muestran que es posible extraer características diferenciales en estos circuitos,

se muestra que existen neuronas que presentan propiedades específicas (dadas por los parámetros calculados) que le permiten al microcircuito hacer más eficiente la comunicación entre sus elementos, así como dar unidad a los módulos que exhiben.

A partir de dicho análisis es posible describir de una manera sencilla los distintos núcleos cerebrales, lo que abre las puertas a nuevos experimentos en el área. Hasta ahora los neurocientíficos se habían preocupado del estudio de neuronas y sinapsis únicas; procesos moleculares y disparos ante estímulos. Esto asentó las bases celulares. Lo que sigue ahora es el estudio de la relación e interacciones entre neuronas: ha comenzado la era de los circuitos, pues las enfermedades neurológicas y psiquiátricas se consideran alteraciones en el funcionamiento de los mismos.

De esta manera, nos encontramos en el umbral de un nuevo paradigma que desplazará al “Celular-molecular”, ahora trabajaremos a un nivel distinto para entender los entes biológicos. Los resultados de este trabajo muestran que un microcircuito de unas decenas de neuronas es muy dinámico y su estructura requiere de un análisis a profundidad para averiguar su funcionamiento.

1. Introducción

El estudio de la conectividad del cerebro ha abierto nuevas fronteras de investigación en las neurociencias. Durante la última década, el estudio de las redes complejas se ha expandido llamativamente en diversos campos científicos, que van desde las ciencias sociales a la física y la biología. Para entender estos sistemas, se requiere no sólo del conocimiento de sus componentes elementales, sino también del conocimiento de las formas en las que estos componentes interactúan y las propiedades que se manifiestan de sus interacciones. En todos los casos, el análisis cuantitativo de la conectividad requiere nuevas técnicas matemáticas y estadísticas. Actualmente se trabaja en el diseño de herramientas experimentales y teóricas para comenzar a comprender el sistema nervioso a un nivel intermedio entre el celular y el sistémico: al nivel de los microcircuitos neuronales.

Particularmente, uno de los problemas que se ha dejado de lado es muy simple: ¿cómo coordinan sus acciones un grupo de 50 a 300 células? A principios del siglo XXI puede decirse que no se sabe. En general, ignoramos las funciones de las conexiones locales de cualquier tejido y ese es el problema. Sabemos cómo funcionan las células, pero también sabemos que el funcionamiento de los diferentes órganos y tejidos no es la suma simple de las acciones de las células que los constituyen. La función es el producto de interacciones complejas entre las células que conforman un módulo. Recientemente estas interacciones están siendo estudiadas y documen-

tadas, las técnicas de observación para hacerlo están en sus comienzos aunque en pleno desarrollo.

1.1. Neuronas

El sistema nervioso central está constituido por un extenso número de células nerviosas individuales, conocidas como neuronas. Además de éstas, los sistemas nerviosos central y periférico contienen muchas células llamadas neuroglía, o sencillamente glía. Estas células desempeñan, de manera principal, la función de soporte de las neuronas. Tanto las neuronas como las células gliales comparten muchas características con las células en general. No obstante, las neuronas se encuentran especialmente dotadas con la capacidad de comunicarse con precisión y rápidamente con otras células, incluso con células en sitios distantes del cuerpo. En otras palabras, su morfología está adecuada para recibir, conducir y transmitir señales.

La Figura 1.1 muestra una visión esquemática de una neurona común. El cuerpo celular (o soma) contiene el núcleo y muchos de los varios organelos que son críticos para el funcionamiento de la célula. Proyectándose desde el cuerpo celular se encuentran finos tubos, llamados neuritas. Cada neurona tiene dos tipos de neuritas: las muy ramificadas, llamadas dendritas, que reciben señales, y un axón, que juega un importante papel en la transmisión de señales desde una estructura a otra. Una vez que es activada la porción del axón cercana al cuerpo celular, la señal recorre su longitud sin modificación o modulación hasta que alcanza el final del axón, denominado axón terminal o botón. El axón terminal está ramificado, aunque de manera menos extensa que la dendrita, de modo que un solo axón puede hacer contacto funcional con cientos de sitios dendríticos sobre muchas otras neuronas.

Para comprender la complejidad de la transmisión neuronal, hay que dirigirse a

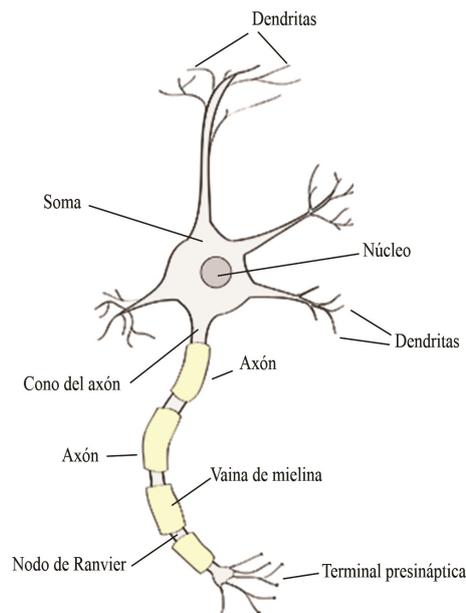


Figura 1.1.: Esquema de una neurona. El cuerpo celular contiene un núcleo que mantiene al material genético de la célula. Dos tipos de procesos se extienden desde el cuerpo celular, las dendritas y el axón. Las dendritas son la mayor superficie receptora de la neurona, aunque las señales de otras neuronas también arriban al cuerpo celular. El axón conduce el potencial de acción, la señal de la célula, hacia la siguiente neurona. El cono del axón es el punto donde se inicia el potencial de acción. Muchas neuronas están aisladas por medio de una vaina de mielina que periódicamente es interrumpida por nodos de Ranvier. Las ramas de un axón (la terminal presináptica) transmiten señales a otra neurona en un sitio llamado sinapsis.

los dos extremos de la neurona. El lugar donde se comunica una neurona con otra se llama sinapsis, dicho término fue introducido por Charles Sherrington a principios del siglo XX [1]. En dichos sitios se lleva a cabo la transmisión de los impulsos nerviosos. Con el tiempo se descubrió que las sinapsis pueden ser eléctricas o químicas, cuya estructura y bioquímica resultan muy diferentes (Figura 1.2). La sinapsis químicas son mucho más abundantes, usan un neurotransmisor químico que se empaqueta en vesículas en la terminal nerviosa presináptica, las cuales son lanzadas en cantidades cuantificadas (vesículas múltiples), y se unen a los receptores postsinápticos que abren un canal iónico directamente (canales iónicos dependientes de voltaje) o

modulan el canal a través de una molécula intracelular que se une a los receptor activando la apertura o cierre del canal.

Por otro lado, la sinapsis eléctrica es en la cual la transmisión entre la primera neurona y la segunda se lleva a cabo por medio de canales formados por el acoplamiento de complejos proteicos llamados conexones, de esta manera los iones pueden moverse del citoplasma de una neurona a la otra, transmitiendo directamente el potencial de acción, esto permite la activación rápida y simultánea de las células interconectadas. A través de estas interacciones las neuronas forman circuitos que intervienen en las operaciones funcionales específicas de las diferentes regiones del cerebro.

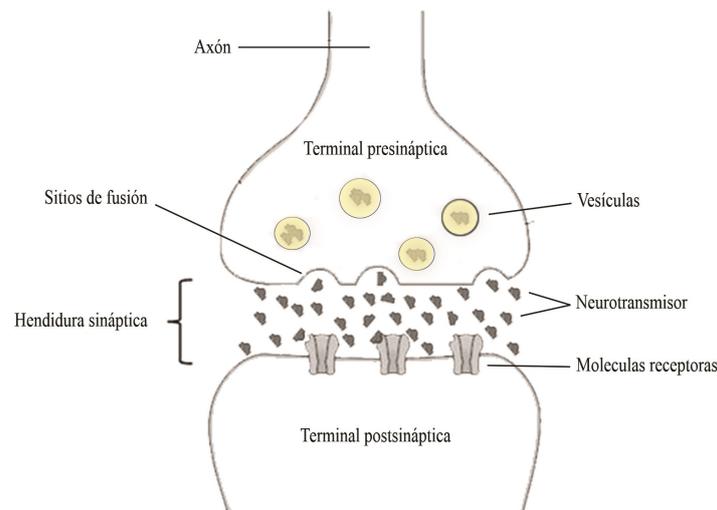


Figura 1.2.: Resumen de los eventos relacionados con la transmisión en la sinapsis química. Los axones transportan enzimas y precursores necesarios para la síntesis de agentes transmisores, vesículas, etc. El potencial de acción se propaga por el axón hasta su terminal. El transmisor es sintetizado y almacenado en vesículas. La terminal presináptica es despolarizada, provocando un influjo de Ca^{2+} , el cual ocasiona que las vesículas se fusionen con los sitios activos en la membrana presináptica y arrojen neurotransmisores en la hendidura sináptica. El transmisor se une a moléculas receptoras en la membrana postsináptica, iniciando el potencial postsináptico. Los potenciales postsinápticos se expanden de manera pasiva sobre las dendritas.

Las neuronas tienen formas y tamaños muy diferentes, adoptan distintas formas en diferentes partes del sistema nervioso. Existen alrededor de 1000 clases de neuronas, las cuales varían considerablemente en sus características morfológicas específicas, por ejemplo, difieren en la complejidad de sus árboles dendríticos, el grado de ramificación de su axón, así como en el número de terminales sinápticas que forman y reciben. El hecho de que existan estas diferencias contribuye a la gran complejidad del procesamiento de información presente en el cerebro.

1.2. Niveles y estilos de análisis en la teoría del cerebro y las redes neuronales

En la actualidad, el estudio del cerebro comprende muchas teorías en cuanto a cómo las estructuras del cerebro pueden realizar tan diversas funciones como la percepción, la memoria, el control del movimiento y en general las funciones mentales superiores. El siglo XIX fue testigo de los primeros intentos formales por explicar el funcionamiento del cerebro [2]. Todo llevó a que alrededor del año 1900 existiera un importante debate en la neurobiología, la cuestión era si el sistema nervioso estaba conformado por una red de tejido interconectado (hipótesis reticular) o por células individuales con espacios entre ellas (hipótesis de la neurona).

Al pasar los años la hipótesis de la neurona llegó a ser la dominante, aunque la hipótesis reticular tuvo eminentes seguidores. Uno de éstos fue Camillo Golgi, biólogo italiano que descubrió la técnica del tñido celular que lleva su nombre (hace posible la visualización de neuronas individuales con todas sus ramas) y que es de amplio uso en la actualidad. Con ayuda de esta técnica, en España, Santiago Ramón y Cajal

realizó estudios anatómicos en muchas regiones del cerebro, revelando la estructura particular de cada una de ellas [3]. De esta forma logró reunir una fuerte evidencia experimental en apoyo de la hipótesis de la neurona, en contra de la teoría de conexión que apoyaba Golgi.

En la década de 1920 Ross Harrison proporcionó más evidencia en apoyo a la hipótesis de la neurona, mostró que las dendritas y el axón crecen desde el cuerpo celular y que lo hacen incluso cuando cada neurona se encuentra aislada en cultivos de tejido. La prueba definitiva de la hipótesis de la neurona llegó a mediados de 1950 con el desarrollo de la microscopía electrónica. Esto permitió la visualización de la sinapsis (postulada por Charles Sherrington en el año 1897), encontrando que se trata de un espacio muy pequeño: aproximadamente 20-40 nanómetros. ¿De qué manera emergen las funciones cerebrales de esta interacción entre las neuronas? Esa es la pregunta primordial que motiva el estudio de las redes neuronales.

El primer intento de explicar el comportamiento en términos de la conectividad sináptica fue el estudio del arco reflejo de Sherrington. Cuando un impulso aferente o sensitivo genera una respuesta motora o un impulso eferente, las neuronas y fibras que participan en este fenómeno constituyen un arco reflejo. Por otro lado, un acto reflejo es una respuesta estereotipada e involuntaria a un estímulo específico y resulta de la acción realizada por el arco reflejo, es decir, para cualquier acto reflejo uno puede generalmente identificar un arco reflejo. La activación secuencial de las neuronas en esta cadena de eventos resulta ser una serie de causas y efectos que conectan el estímulo a la respuesta. Por lo cual el estudio de Sherrington del arco reflejo puede ser considerado cómo un antepasado de los modelos de redes neuronales. Por otra parte, en 1938 Rafael Lorente de Nó, alumno de Santiago Ramón y Cajal, sostuvo otra hipótesis, pensaba que los bucles sinápticos (cadenas de sinapsis que comienzan y terminan en la misma neurona) eran los circuitos básicos del

sistema nervioso central. Lorente de Nó sugirió que el propósito de estos bucles era sostener patrones de actividad "reverberantes". De esta forma, pensaba, la actividad neuronal puede persistir más tiempo en el cerebro, es decir, mediante la circulación a través de estos bucles sinápticos. Posteriormente estas ideas fueron formalizadas en distintos modelos matemáticos de redes neuronales, de esta manera se pudieron obtener más detalles acerca de los patrones de conectividad en el sistema nervioso central y de la organización de sus circuitos. Aunque aún están lejos de ser probados de manera concluyente.

1.3. Microcircuitos neuronales biológicos

Desde hace tiempo se sabe que las funciones del sistema nervioso casi nunca son llevadas a cabo por neuronas únicas. En efecto, cuando se piensa en las conexiones entre los diferentes núcleos del cerebro lo hacemos como si cada neurona particular se conectara como pudiese, y como si la suma de las conexiones formara la unión entre los núcleos. Lo anterior concilia con el esquema conceptual que sobresale de la fisiología celular de los años 50 del siglo pasado: las neuronas se conectan mediante sinapsis, las neuronas del núcleo A se conectan con las que pueden del núcleo B. Las de este último con las del C, y así sucesivamente se conectan los otros núcleos del cerebro. Resulta sencillo imaginar tal escenario, sin embargo, la realidad está demostrando ser mucho más complicada, alejada de esa vetusta percepción de la fisiología.

El empirismo subraya el papel de la experiencia como elemento clave en la formación del conocimiento. Los experimentos demuestran que no somos tabla rasa. Se nace con circuitos neuronales para la respiración, los ritmos intestinales y cardíacos, locomoción y nado, succión, entre otros. Si esos circuitos, por alguna razón,

no se desarrollan, se corre el riesgo de padecer complicaciones en el desarrollo del individuo.

Estos circuitos fueron llamados por Grillner “Centros Generadores de Pautas” (CPG: central pattern generators, en inglés). Muchos investigadores han sido atraídos por esos circuitos y han registrado su actividad con diversos métodos; se pueden utilizar arreglos con matrices de electrodos para registrar extracelularmente distintos sitios anatómicos [4] o utilizar registros ópticos que miden indirectamente la actividad eléctrica de las neuronas [5, 6, 7], entre otros. Cada técnica mide un aspecto diferente de la dinámica neuronal y su organización, por lo cual la interpretación de los conjuntos de datos debe tener en cuenta esas diferencias. A partir de sus resultados, han llegado a las siguientes conclusiones: 1) grupos de neuronas disparan sincrónicamente; 2) esos grupos de neuronas transmiten la actividad a otros grupos; 3) lo que circula por la red es la actividad sincrónica de las neuronas trabajando en equipo; 4) al transmitir la actividad de un grupo a otro se establece alternancia y recurrencia entre ellos, esto es, ciclos de actividad estereotipada que se repiten; 5) la actividad secuencial de estos grupos de neuronas no necesita de estímulos externos, pero éstos los pueden modular; 6) se pueden correlacionar los ciclos de actividad con las secuencias de movimientos que los animales generan [8].

En 1949, Donald Olding Hebb publicó sus hipótesis sobre el modo en que fenómenos psicológicos tan complejos como las percepciones, las emociones, los pensamientos y la memoria, pueden ser producidos por la actividad cerebral [9]. La primera hipótesis postula cómo cambia la fuerza de las sinapsis con el uso, que de manera simple y resumida plantea que: las sinapsis que se usan mucho se refuerzan, las que se usan poco se debilitan, al final las conexiones que quedan entre los núcleos A, B y C fueron aquellas seleccionadas por el proceso refuerzo-disminución. Su primera demostración experimental fue dada por Bliss y Lomo en 1973 [10] y en

la actualidad a este fenómeno se le conoce como potenciación de largo plazo (LTP: long term potentiation, en inglés), a su debilitamiento y quizás desaparición se le llama depresión de largo plazo (LTD: long term depression, en inglés).

Pero para que sucediera eso se tuvo que comprender cómo es que las neuronas generan señales eléctricas y cómo es que funcionan las sinapsis, conocimiento que ha venido llegando al cabo de los años.

La segunda hipótesis Hebbiana defiende que si las sinapsis cambian su fuerza con el uso, entonces deberían formarse circuitos conectados de forma preferente. Es decir, grupos de neuronas que respondan estereotipadamente ante un estímulo dado. A estos circuitos se les conoce como ensamblajes neuronales. Posteriormente, el trabajo conjunto de científicos mostró que las máquinas con redes neuronales artificiales que siguen estos principios son capaces de aprender y guardar memorias para luego categorizar y reconocer patrones. Estos conceptos se formalizaron y con ellos han surgido las redes neuronales artificiales usadas en la resolución de problemas de inteligencia artificial, por describir un caso, en la robótica. Al final, de este esquema se toman los datos duros de la fisiología celular y se trata de ver si, acoplándolas en una red neuronal artificial, sus conexiones reproducen el funcionamiento del cerebro o alguna de sus partes o núcleos. Se han mostrado avances en el área pero estas redes artificiales siguen sin mostrar las propiedades verdaderas que tienen los ensamblajes neuronales, en parte porque todavía no se conocen bien.

En la teoría de Hebb, el disparo de las neuronas sostenido y armonizado es indispensable para mejorar la eficiencia sináptica, una propiedad necesaria para habilitar la transición entre memorias de corto y largo plazo. Dentro de las mismas ideas, postuló que la realización de tareas aprendidas y ejecutadas por microcircuitos neuronales biológicos, deberían ser el resultado de la formación de ensamblajes neuronales, es decir, si una neurona A dispara y activa a una neurona B, la cual a su vez

dispara y activa a una neurona C, la cual también dispara activando a la neurona A; entonces la sinapsis que unen a dichas neuronas se reforzará e incrementará la probabilidad de que el mismo ciclo A-B-C-A ocurra nuevamente en el futuro. La deducción de esta hipótesis, como ya se mencionó, es la formación de rutas, formadas por ciclos cerrados de actividad que se repiten siguiendo secuencias específicas, esto en particular podría constituir el verdadero indicador de la memoria. Darían lugar a algo similar a sub-rutinas en bucle dentro de un programa. Cada programa se ensambla con muchas de estas sub-rutinas.

Los ensambles neuronales han sido observados usando imagenología de calcio, mostrando que las propiedades adscritas a ellos y propuestas por Hebb están presentes en microcircuitos neuronales biológicos como en el neuroestriado de ratones y ratas *in vitro* [5], posibilitando el estudio de dichos ensambles con otras técnicas que hasta antes de tales avances tecnológicos no había sido posible tratar. Otras dinámicas de circuitos en otras estructuras cerebrales han sido registradas con propiedades similares [11].

1.4. Teoría de redes complejas

La teoría de grafos tiene sus raíces en el mundo físico. En 1736, Euler demostró que era imposible atravesar a pie la ciudad de Königsberg a través de sus siete puentes pasando sólo una vez por cada uno, y regresar al mismo punto de inicio (Figura 1.3). Para probar esta conjetura, Euler representó el problema como un grafo, y su publicación original se toma generalmente como el origen de una nueva rama de las matemáticas llamada teoría de grafos. A mediados del siglo XIX, el análisis de circuitos eléctricos y la exploración de isómeros químicos condujo al descubrimiento de nuevos conceptos en esta rama. Esta teoría resulta ser el estudio

matemático de las redes, entendiendo éstas como representaciones matemáticas de redes del mundo real o, más generalmente, de algún sistema compuesto por elementos interconectados [12, 13, 14].

Mientras que algunas de las formulaciones de dicha teoría caen bajo las matemáticas puras y no tienen aplicaciones inmediatas, el uso de su formalismo teórico suele ser muy valioso en el tratamiento de problemas del mundo real. Hoy en día, la teoría de grafos es una de las ramas más activas de las matemáticas. Sus aplicaciones están por todas partes, van desde la mecánica estructural, la planificación urbana, la programación y el enrutamiento del tráfico aéreo hasta las comunicaciones electrónicas, la química de polímeros, y las ciencias sociales. Durante la última década, el estudio de las redes se ha expandido para incluir las descripciones estadísticas de sistemas mucho más grandes [15]. Este nuevo enfoque, conocido como teoría de redes complejas, tiene como objetivo caracterizar la estructura y la dinámica de dicho tipo de redes y en consecuencia hacer predicciones de su funcionalidad global. Muchos de los sistemas en la naturaleza están formados por un gran número de unidades dinámicas altamente interconectadas.

El primer enfoque para capturar las propiedades globales de tales sistemas es modelarlos como grafos, cuyos nodos representan a las unidades dinámicas (por ejemplo, las neuronas en el cerebro o los individuos en un sistema social) y los enlaces representan las interacciones entre estas unidades. Es evidente que esta aproximación es muy aventurada, ya que significa la interpretación de la interacción entre dos unidades dinámicas, que comúnmente son funciones del tiempo, espacio y otros detalles, en un simple número binario, es decir, en la existencia o no de un vínculo entre los dos nodos correspondientes. Sin embargo, en muchas ocasiones prácticas, una aproximación de este tipo proporciona una representación simple y muy informativa



Figura 1.3.: Königsberg era una próspera ciudad cerca de San Petersburgo, en el este de Prusia, a orillas del Pregel. La ciudad tenía siete puentes sobre el río, y sus ciudadanos se preguntaban si alguien podría caminar a través de los siete puentes y nunca cruzar el mismo dos veces. En 1736, Leonhard Euler modeló el problema de los puentes Königsberg como un gráfico y matemáticamente demostró que el problema no tiene solución. Sostuvo que los nodos con un grado impar tienen que ser o bien el inicio o el punto final de un camino que atraviese todos los puentes de una sola vez. Por lo tanto, un camino euleriano (como se le conoce) no puede existir si el gráfico tiene más de dos nodos con grado impar, lo que fue el caso de la red de puentes de Königsberg.

de todo el sistema.

Durante la última década, una amplia gama de factores (los más destacados son los avances computacionales) han logrado una mayor exploración de las propiedades topológicas de varios sistemas modelados como grafos en el mundo real. El principal resultado ha sido revelar que, a pesar de las diferencias inherentes, la mayoría de las redes reales se caracterizan por poseer las mismas propiedades topológicas. Estas características hacen de las redes reales sustancialmente diferentes de los grafos aleatorios o de los grafos regulares, modelos estándar estudiados en la rama matemática: teoría de grafos. El término grafo aleatorio se refiere a la naturaleza desordenada de la disposición de las conexiones entre los diferentes nodos y un grafo regular es

aquél en donde cada nodo tiene el mismo número de elementos adyacentes.

Existen avances importantes en esta teoría que han llegado principalmente desde el estudio de las redes sociales [16]. Un experimento de Stanley Milgram en 1967 siguió los caminos de convivencia a través de una red social muy grande y encontró que incluso este tipo de redes podían ser atravesadas, en promedio, en un pequeño número de pasos. Milgram pidió a personas seleccionadas al azar en Nebraska enviar cartas a un individuo objetivo en Boston, identificado sólo por su nombre, ocupación y ubicación aproximada. Las cartas sólo se podían enviar a alguien a quien el actual titular conocía de nombre, y que estuviera presumiblemente más cerca del receptor final. Milgram llevó la cuenta de las trayectorias seguidas por las cartas y de las características demográficas de sus manipuladores. Aunque la suposición común es que podría tomar cientos de estos pasos para que las cartas lleguen a su destino final, el resultado sorprendente de Milgram fue que el número de enlaces necesarios para llegar a la persona objetivo tuvo un valor promedio de sólo seis. Aunque este fenómeno conocido como “mundo pequeño” (small-world, en inglés) rápidamente capturó la imaginación del público, sus orígenes permanecieron en la oscuridad hasta que se demostró su asociación con determinados tipos de conectividad.

Se ha reportado evidencia de los atributos de “mundo pequeño” en una amplia gama de estudios de genética, de señalización, comunicaciones, redes neuronales y computacionales [17]. Estos estudios indican que prácticamente todas las redes que se encuentran en los sistemas naturales y tecnológicos tienen arquitecturas no aleatorias y que las formas en que estas redes se desvían de la aleatoriedad reflejan su funcionalidad específica.

Cuando se describen redes neuronales biológicas mediante esta teoría, un grafo proporciona una representación abstracta de los elementos del sistema y sus interacciones. Las redes cerebrales funcionales y estructurales han mostrado propiedades

pertenecientes a las llamadas redes de “mundo pequeño” [17, 18, 19, 20], las cuales combinan altos niveles de agrupamiento local entre los nodos de la red (para formar grupos) y caminos cortos entre nodos que globalmente enlazan a la red. Esto significa que todos los nodos del sistema están conectados a través de relativamente pocos pasos intermedios, a pesar del hecho de que la mayoría de los nodos mantienen pocas conexiones directas. Existen otros modelos de redes, en lo que concierne al caso de estudio es importante mencionar a las redes de escala libre, las cuales muestran pocos nodos con muchas conexiones y un gran número de elementos con pocas conexiones [21].

Una vez expuesto lo anterior, la teoría de redes complejas: 1) representa una red mediante un conjunto de nodos unidos entre sí por algún tipo de conexión (un grafo). Esta conexión puede ser real (físicamente, como una sinapsis entre dos neuronas) o virtual (socialmente, como la amistad entre dos personas); 2) divide a las redes en aleatorias en un extremo y ordenadas en el otro. Es interesante saber que las llamadas “redes reales” no son ni lo uno ni lo otro; tienen propiedades de ambos extremos; 3) obtiene mediante el grafo de la red —formada por nodos y conexiones (aristas)— sus características globales y estadísticas que la definen de un cierto tipo de red; 4) cuantifica las propiedades topológicas de la red, que son, entre otras: i) medidas de centralidad, éstas indican que existe jerarquía entre los nodos en la red; ii) la distancia promedio para alcanzar un nodo de la red a otro cualquiera, así como la eficiencia para hacerlo; iii) la identificación de sub-grupos de nodos formando comunidades; iv) la robustez de la red.

La que sigue a lo expuesto anteriormente es: conseguir técnicas experimentales que nos permitan ver, de manera directa o indirecta, la actividad de 50 a 300 neuronas simultáneamente y buscar la forma de observar si hay grupos de neuronas que se activen juntas, que se alternen la actividad, que formen circuitos reverberantes o

ciclos de actividad; cuál es la distancia media entre cualquier nodo de la red, si la red de un microcircuito tiene “jerarquías”, si los grupos que se forman son robustos y evaluar cuál es el efecto de los cambios topológicos en el microcircuito neuronal.

2. Planteamiento del problema

Actualmente existen técnicas para estudiar la dinámica de los microcircuitos neuronales, es decir, el sustrato de la actividad neuronal [5, 6, 22]. Se han diseñado técnicas que han permitido observar in vitro la actividad sincrónica en dichos ensamblajes, así como correlación en su disparo y alternancia en su actividad. La técnica de la cual el presente trabajo hace uso para sustentarse y recabar sus datos es la de imagenología de calcio, que consiste a grandes rasgos en lo siguiente: se obtienen rebanadas de tejido cerebral de ratón y se mantienen en una solución salina para favorecer la aparición de oscilaciones en el potencial de membrana de las neuronas, las rebanadas se incuban en condiciones de obscuridad en presencia de un fluoróforo, que entra en las neuronas y cuando se encuentra en presencia de calcio, el fluoróforo cambia su conformación y muestra propiedades fluorescentes. Cada vez que una neurona dispara sus trenes de potenciales de acción entra calcio al soma (y las dendritas). De esta manera, cada vez que una neurona dispara, brilla: se ve como una mancha luminosa. Con esta técnica se puede ver una porción de tejido nervioso vivo conteniendo varias decenas de neuronas incubadas con el fluoróforo. Con ayuda de una videocámara se toma una película de la actividad de esa porción de tejido por varios minutos. En la Figura 2.1 se puede ver un ejemplo.

La película obtenida muestra la actividad del microcircuito, en donde se observa la actividad en secuencia de varias neuronas juntas. ¿Cómo se analizan? En primer

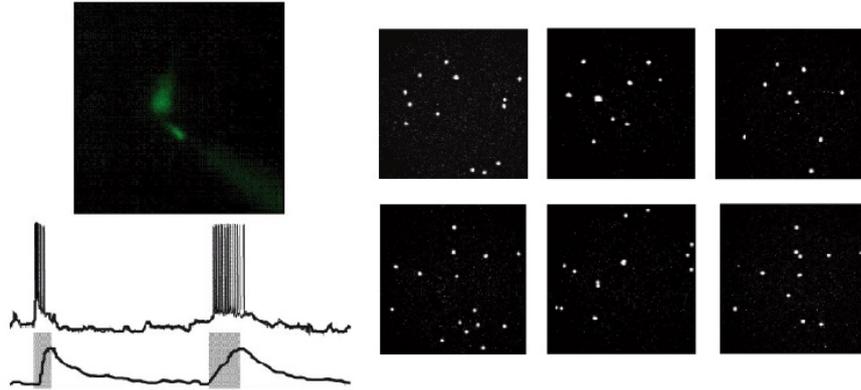


Figura 2.1.: Observación directa de la actividad de un microcircuito cerebral. Izquierda-arriba: se muestran dos manchas de fluorescencia, la de arriba es una neurona registrada y la de abajo el electrodo que registra su actividad eléctrica de manera simultánea (también tiene fluoróforo). Izquierda-abajo: registro simultáneo, el de arriba muestra los disparos de la neurona, el de abajo muestra la entrada de calcio a la misma (aumento del brillo de la neurona). El sombreado muestra que mientras la neurona dispara, el calcio intracelular incrementa. Por lo tanto, este incremento en el calcio lo asociamos con la actividad neuronal y por cada neurona graficamos una señal binaria, colocando puntos en el curso temporal en donde tiene actividad (filas de la Figura 2.2 gráfica superior-izquierda). Las 6 figuras de la derecha muestran cuadros instantáneos de una película tomada al tejido cerebral activo. Los puntos brillantes son las neuronas activas en un momento. Nótese que a lo largo de la película distintas neuronas, con distintas coordenadas, se activan juntas.

lugar, se numeran y registran sus coordenadas. Se hace juntando todos los cuadros de la película en uno solo, y contamos ya sea de abajo hacia arriba o al revés. Luego se sigue la película cuadro por cuadro y se coloca un punto en una gráfica cada vez que una neurona se activa. Esto puede verse en la Figura 2.2, donde hay una matriz representando el curso temporal de decenas de neuronas activas a lo largo del tiempo: cada línea es la actividad de una neurona y cada columna un cuadro de la película como los mostrados en la Figura 2.1. Se nota que, de manera espontánea, determinadas neuronas se co-activan o sincronizan para actuar juntas en grupos. La gráfica inferior de la Figura 2.2 es la suma de la actividad de todas las neuronas de la matriz de rastreo y muestra con claridad los picos de sincronía.

La teoría de redes complejas ofrece una amplia gama de mediciones basadas en

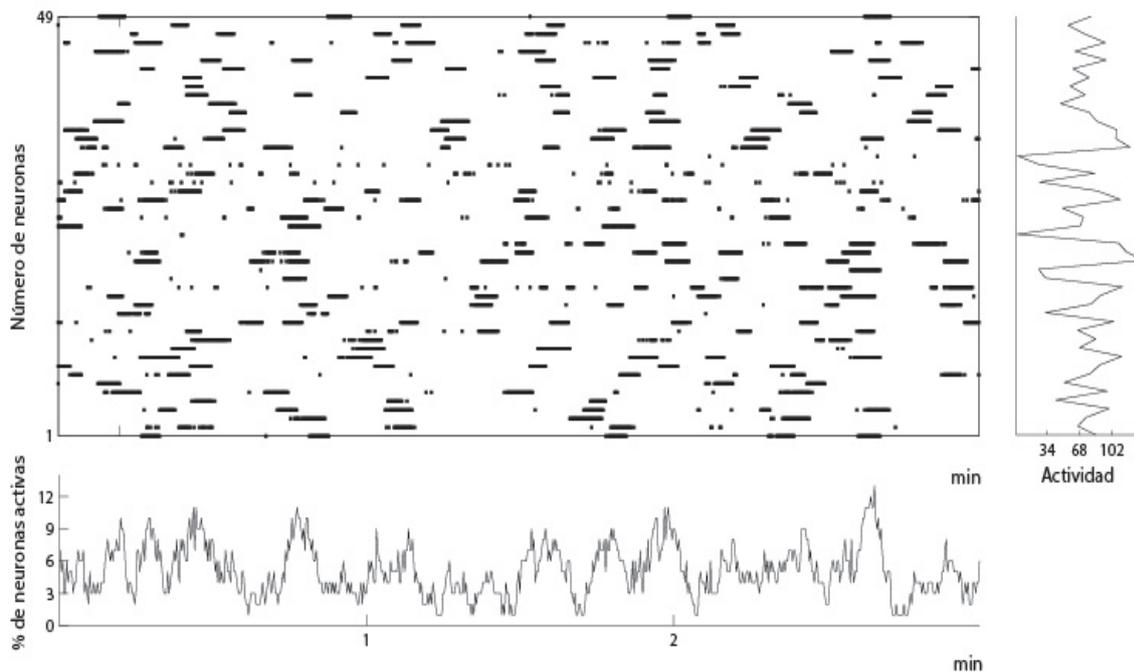


Figura 2.2.: Rastreo de las neuronas activas. La imagen muestra una gráfica de rastreo donde, en las ordenadas, se ve el número de neuronas que se activaron durante la filmación de la película, así cada línea de la matriz representa la actividad de una neurona y los puntos denotan los momentos de su activación (cuando brillaron). Cada columna de la matriz es un cuadro de la película como los ilustrados en la figura Figura 2.1. De esta forma se puede seguir a las neuronas activas a lo largo de varios minutos. La gráfica debajo del rastreo muestra la suma de la actividad de las neuronas, los picos muestran a los diferentes grupos de neuronas que se activan juntas durante la película, esto es, nos muestra dónde hay un vector columna neuronal. La gráfica de la derecha es la suma de la actividad de cada neurona por separado a lo largo del tiempo, note que algunas neuronas son más activas que otras.

datos objetivos para caracterizar la topología de las redes, muchas de las cuales, en un principio, se han definido en otras disciplinas [12, 13, 21]. Un importante subconjunto de éstas identifica elementos de la red (nodos o conexiones) que muestran una fuerte influencia en la integración de información y comunicación y, por lo tanto, en la función global de las redes. El hecho de poder identificar este tipo de elementos resulta una fuerte contribución al entendimiento del funcionamiento de la redes neuronales.

Como puede verse, un microcircuito de unas decenas de neuronas es muy di-

námico y su estructura necesita de un análisis a profundidad para explicar su funcionamiento. Ahora imaginemos que esto se puede realizar en otros tejidos, no sólo en el sistema nervioso. Claro está, las técnicas mejorarán y están mejorando en el proceso, pero el punto primordial es que ya no se está pensando en neuronas únicas y tampoco en extrapolar sus acciones individuales a todo el organismo como si éstas fueran una suma de las acciones de cada célula, si no que ya se estudia en un nivel en donde conocer la interacción y la coordinación entre las células es básica para entender la función del tejido.

3. Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo implementar una herramienta de software que contenga un sistema de análisis de microcircuitos neuronales biológicos, haciendo uso del formalismo de la teoría de redes complejas, permitiendo identificar en videos de rebanadas de cerebro, usando la técnica de imagenología de calcio, la topología de tales microcircuitos para determinar cuáles son las neuronas más “importantes” (en base a la teoría) en el funcionamiento de la red en un tiempo reducido, que permita durante el mismo experimento de adquisición de videos tomar decisiones que complementen (o reafirmen experimentalmente) los resultados obtenidos mediante el análisis de red del microcircuito neuronal.

3.1. Objetivos particulares

- La herramienta debe identificar las neuronas presentes en los videos obtenidos con la técnica de imagenología de calcio.
- La herramienta debe obtener los valores de luminiscencia de cada neurona a lo largo del video.
- La herramienta debe calcular un conjunto de parámetros dentro del marco de la teoría de redes complejas que se han usado para identificar nodos y

conexiones que son, según la teoría, fundamentales en el funcionamiento del microcircuito.

- Se sabe que la mayoría de las redes forman grupos o módulos, el sistema debe ser capaz de identificar, si es que existen en la red, módulos de neuronas trabajando juntos en el funcionamiento del microcircuito.
- La herramienta debe obtener resultados en el menor tiempo posible (alrededor de 5 minutos), esto debido a la importancia de poder identificar en la rebanada viva a las neuronas importantes en el funcionamiento de la red con el fin de permitir al usuario experimentar con ellas.

4. Métodos

4.1. Identificación de neuronas en videos obtenidos mediante imagenología de calcio

El procesamiento de las imágenes fue realizado con programas escritos en Matlab, en un entorno interactivo para el cálculo numérico y visualización de los datos adquiridos. El proceso comienza una vez que se obtiene el vídeo de la actividad de los microcircuitos mediante la técnica de imagenología de calcio. Posteriormente se almacena el video en formato de escala de grises, se procede a calcular la intensidad promedio de cada pixel a lo largo de cada uno de los cuadros que contenga el video. Entonces se calcula la desviación estándar de cada pixel, el usuario debe proporcionar un umbral en porcentaje con respecto al valor máximo de desviación estándar de tal forma que el programa descarte a los pixeles que se encuentran por debajo de ese umbral a lo largo del vídeo. El usuario también puede proporcionar el número mínimo de pixeles que serán considerados como posibles neuronas para evitar elegir como neuronas a pequeñas regiones del video ruidosas. Después se localizan los bordes de la máscara obtenida y se genera un conjunto de regiones que corresponden a las neuronas detectadas en el transcurso del vídeo (Figura 4.1).

El usuario tiene la posibilidad de descartar las regiones encontradas mediante

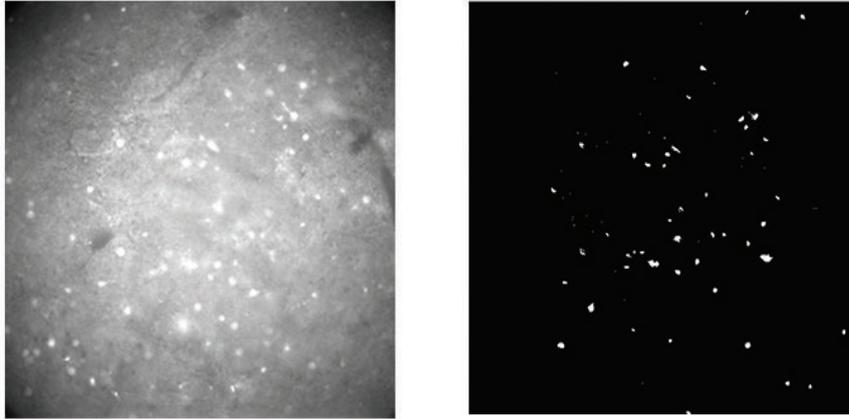


Figura 4.1.: Imagen comparativa de un cuadro de la película obtenida mediante imagenología de calcio (izquierda) y de la máscara de las regiones (derecha) obtenidas mediante el procesamiento en Matlab.

una interfaz que permite observar a la posible neurona a lo largo del vídeo original para observar el cambio de intensidad que muestra con la técnica de imagenología de calcio, en esa misma interfaz el usuario puede agregar o quitar pixeles a la región de tal forma que quede mejor definida el área en donde se localiza la neurona.

4.2. Obtención de las señales fluorescentes dependientes de calcio

Una vez que las neuronas activas fueron identificadas, el cambio de fluorescencia de cada una de ellas fue medido en función del tiempo. Las señales fluorescentes dependientes de calcio fueron obtenidas como $T - T_0$ (modificado de la referencia [5]) para reducir tanto el ruido en la señal, como el decaimiento debido al fotoblanqueo (fenómeno que disminuye la capacidad de fluorecer a lo largo del experimento). Donde T representa la intensidad en la fluorescencia medida para cada neurona

(región) identificada y T_0 representa la intensidad en la fluorescencia medida para una región circular con centro en el centroide de la neurona identificada y con un radio tres veces el tamaño de ésta. Este proceso se calcula para cada cuadro del vídeo y al final se obtienen las señales fluorescentes de calcio para cada neurona. La interfaz de usuario permite observar, para cada cuadro del vídeo, las señales (Figura 4.2), así como una imagen de la neurona en la película original (Figura A.3), posibilitando al usuario la eliminación de regiones previamente identificadas como neuronas pero que no muestren cambios significativos en su fluorescencia y que más bien se trate de ruido en la película o de neuronas muertas.

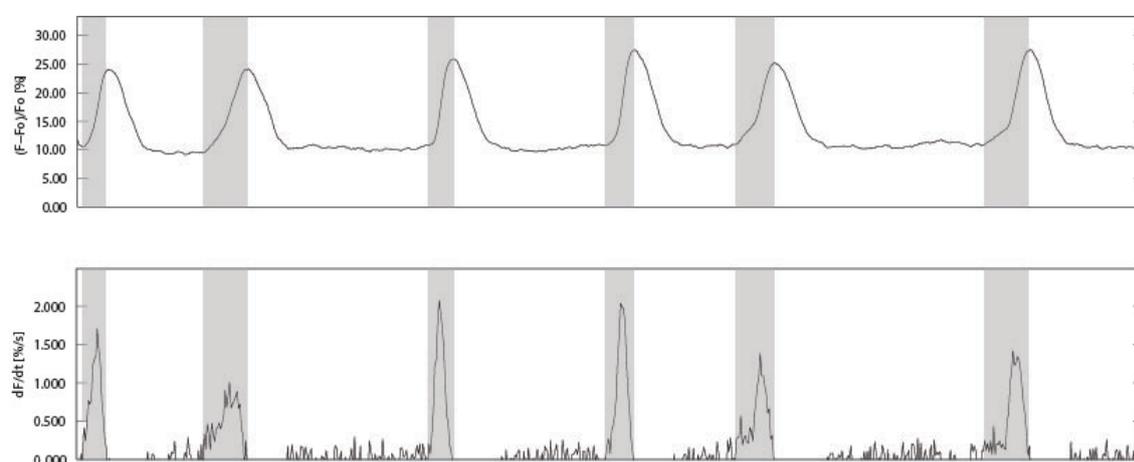


Figura 4.2.: En el cuadro superior se muestran las señales fluorescentes dependientes de calcio. Puede observarse el disparo de la neurona analizada en este caso. En la imagen de abajo puede verse la derivada de la señal. Los picos de la derivada corresponden con las subidas en los cambios de fluorescencia, es decir cuando la neurona dispara sus potenciales de acción.

La interfaz proporciona un botón para suavizar las señales fluorescentes de calcio usando el filtro de promedio móvil. Este método suaviza datos reemplazando cada punto de los datos por el promedio de los datos definidos en el lapso, este proceso es equivalente a un filtro pasa bajas con la respuesta suavizada dada por la ecuación:

$$y_s(i) = \frac{1}{2N+1}(y(i+N) + y(i+N-1) + \dots + y(i-N)) \quad (4.1)$$

Donde $y_s(i)$ es el valor suavizado para el punto i -ésimo, N es el número de puntos vecinos a cada lado de $y_s(i)$, y $2N+1$ es el lapso. El programa utiliza un lapso de 5 para realizar los cálculos correspondientes de suavizado de las señales fluorescentes de calcio.

4.3. Construcción de las matrices de actividad

El tipo de grafo que se obtiene con la herramienta recibe el nombre de grafo no dirigido $G = (\mathcal{N}, \mathcal{L})$ el cual consiste de dos conjuntos \mathcal{N} y \mathcal{L} , tales que $\mathcal{N} \neq \emptyset$ y \mathcal{L} es un conjunto de pares no ordenados de elementos de \mathcal{N} . Los elementos de $\mathcal{N} \equiv \{n_1, n_2, \dots, n_N\}$ son los nodos (en este caso neuronas) del grafo G , mientras que los elementos de $\mathcal{L} \equiv \{l_1, l_2, \dots, l_K\}$ corresponden a sus conexiones funcionales, esto es, las veces que disparan juntas o muestran disparo correlacionado. El número de elementos de \mathcal{N} y \mathcal{L} son denotados por N y K , respectivamente. Un nodo es usualmente referido por su posición i en el conjunto \mathcal{N} . En un grafo no dirigido, cada conexión es referida por una pareja de nodos i y j , y se denota como (i, j) o l_{ij} (Figura 4.3).

Las señales fluorescentes dependientes de calcio fueron obtenidas con base en un valor umbral dado por el criterio de la primera derivada de la señal fluorescente. En la interfaz de usuario puede observarse el registro temporal de la primera derivada de las señales fluorescentes (Figura A.3), el usuario tiene la posibilidad de mover

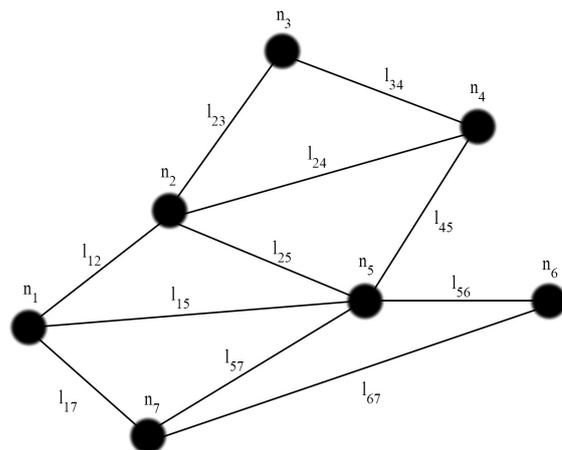


Figura 4.3.: Un ejemplo de un grafo G con 7 nodos y 11 conexiones.

el umbral de tal forma que todos los valores que queden por arriba de este umbral serán considerados como disparos de la neurona y no así los que queden por abajo del umbral. De esta forma se puede reconstruir la dinámica de las neuronas a lo largo del vídeo, obteniéndose una matriz $A \times B$ donde A denota el número de neuronas activas durante el experimento (vídeo), y B representa el disparo de las neuronas ($1 = \text{activas}$ y $0 = \text{inactivas}$) durante la ventana de tiempo, valor que depende de las imágenes por segundo del vídeo.

La interfaz muestra los datos de la matriz de actividad así como las gráficas correspondientes a la coactividad de las neuronas para cada ventana de tiempo y la actividad de cada neurona a lo largo de todo el experimento (Figura A.4).

4.4. Generación de la matriz adyacente binaria de la red neuronal

Un paso crucial en el análisis mediante teoría de redes complejas aplicado a los microcircuitos neuronales es la selección del criterio bajo el cual se considera a dos

neuronas conectadas. Para hacer tal afirmación se escogió el criterio de juzgar a dos neuronas unidas funcionalmente cuando disparan juntas a lo largo del experimento. Lo que se quiere obtener es una representación matricial del grafo que subyace a la actividad de las neuronas. La matriz adyacente del grafo \mathcal{A} describe completamente sus relaciones binarias, es una matriz que representa el número de conexiones funcionales entre cada par de neuronas (Fig. 4.4). En la teoría de los ensambles neuronales a estas conexiones se les llama funcionales pues no se sabe si corresponden a: sinapsis reales, a que otro elemento de la red sincronice a ambos elementos conectados o a moduladores químicos que sincronicen cierto tipo de células. Lo que interesa es que las neuronas del grupo disparen juntas. Para dar un fundamento matemático a este criterio primero se escoge un umbral en la coactividad de las neuronas activas para determinar a partir de cuantas neuronas se considera un pico de sincronía mediante simulaciones de Montecarlo con $P < 0.05$ [7]. Una vez que se tiene el umbral se seleccionan las neuronas presentes en los picos de sincronía para calcular la matriz adyacente del grafo, la cual indica el número de veces que dispara junta una neurona con otra, posteriormente se vuelve a realizar una simulación de Montecarlo con $P < 0.05$ para determinar el mínimo número de disparos síncronos entre dos neuronas que no se están realizando de manera azarosa con esa probabilidad dada, es importante mencionar que el usuario puede escoger el número de iteraciones a realizarse, mientras más simulaciones num_{sim} se realicen, disminuirá el error del valor calculado en razón de $1/\sqrt{num_{sim}}$. De esta forma al final se procede a binarizar la matriz de adyacencia colocando un 1 donde el número de conexiones superó el umbral dado por la simulación de Montecarlo (existe conexión funcional) y un 0 donde no lo hizo (no existe conexión funcional). La interfaz de usuario permite experimentar con diferentes umbrales tanto para determinar el número mínimo de picos como el de conexiones para obtener la matriz adyacente del grafo, teniendo a

las simulaciones de Montecarlo como opciones fundamentadas de los valores posibles a usar. Una vez que se tiene la matriz adyacente binaria de la red neuronal es posible calcular una amplia gama de mediciones de conectividad funcional y de eficiencia en la red.

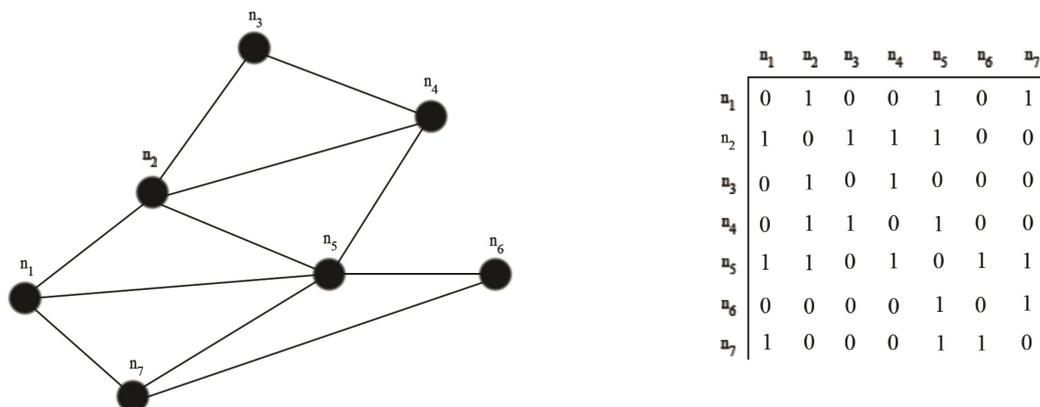


Figura 4.4.: Grafo con su matriz de adyacencia, observe que donde existe conexión entre los nodos se coloca un 1 y donde no existe tal conexión se coloca un 0.

4.5. Cálculo de parámetros de la red neuronal

Como ya se ha mencionado una red compleja puede ser representada mediante un grafo, en la sección anterior se obtuvo la matriz adyacente \mathcal{A} del grafo correspondiente al microcircuito de la red neuronal presente en el experimento con imagenología de calcio. Ahora bien, la topología de un grafo se puede describir cuantitativamente mediante una amplia variedad de parámetros, algunos de las cuales se discuten aquí. En la actualidad no existe un consenso sobre qué parámetros son los más adecuados para el análisis de microcircuitos neuronales [23]. El sistema desarrollado hace uso de varias mediciones que han sido utilizadas para describir tanto redes estructurales

como funcionales en cerebros de diferentes mamíferos, con la intención de observar su comportamiento en niveles de organización nunca antes observados, en los micro-circuitos neuronales funcionales y de esta forma poder dilucidar sus características [24].

El primer parámetro que la herramienta puede calcular es la distribución de grado (degree distribution, en inglés), el grado (o conectividad) k_i de un nodo i es el número de conexiones incidentes en un nodo [25], y es definido en términos de la matriz adyacente \mathcal{A} como:

$$k_i = \sum_{j \in N} a_{ij} \tag{4.2}$$

Aquí a_{ij} es el estado de la conexión entre la neurona i y la neurona j . $a_{ij} = 1$ cuando existe la conexión (i, j) (cuando i y j son vecinos) y $a_{ij} = 0$ en caso que no exista tal conexión (observe que $a_{ii} = 0$ para cualquier caso). Esta es la medida más importante de la red y la mayoría de las otras mediciones están en última instancia vinculadas con el grado del nodo. Los grados de todos los nodos de la red forman una distribución de grado. En redes aleatorias todas las conexiones son igualmente probables, lo que resulta en una distribución de grado Gaussiana. Las redes complejas suelen tener distribuciones de grado no Gaussianas, a menudo con una larga cola hacia los altos grados [26]. En términos más formales se define a la distribución de grado $P(k)$ como la probabilidad de que un nodo escogido uniformemente al azar tenga grado k o, equivalentemente, como la fracción de nodos en el grafo que tienen grado k . La interfaz también proporciona la medida de grado medio \bar{k} obteniendo tal valor como:

$$\bar{k} = \frac{\sum_{i \in N} k_i}{N} \quad (4.3)$$

Donde N es el número de nodos. Además de simplemente mostrar los grados de los nodos, a menudo también estamos interesados en saber en qué medida se unen los nodos con otros nodos de mismos o diferentes grados. Por ejemplo, en las redes sociales nodos de alto grado parecen generalmente estar unidos el uno del otro, mientras que en muchas redes tecnológicas, los nodos de alto grado se unen con los de bajo grado.

El emparejamiento o cruzamiento (assortativity, en inglés) r es una medida de la tendencia de los nodos a estar conectados a otros nodos del mismo o similar grado [27]. Es un coeficiente de correlación entre los grados de todos los nodos en dos extremos opuestos de una conexión. Un cruzamiento positivo indica que los nodos tienden a ligarse a otros nodos con el mismo o similar grado. Para el caso de evaluarlo se procede así:

$$r = \frac{K^{-1} \sum_i j_i k_i - \left[K^{-1} \sum_i \frac{1}{2} (j_i + k_i) \right]^2}{K^{-1} \sum_i \frac{1}{2} (j_i^2 - k_i^2) - \left[K^{-1} \sum_i \frac{1}{2} (j_i + k_i) \right]^2} \quad (4.4)$$

Donde j_i, k_i son los grados de los nodos en los extremos de la i -ésima conexión, con $i = 1 \dots K$. La herramienta también calcula la densidad de conexiones ρ , entendiéndose ésta como la fracción de las conexiones presentes a las posibles en el grafo [28]. De manera más formal:

$$\rho = \frac{2K}{N^2 - N} \tag{4.5}$$

Para una gráfica G de tamaño N , el número de conexiones K es al menos 0 y como máximo $N(N - 1)/2$ (cuando todos los nodos son pares adyacentes). Pasando a otras definiciones, un concepto central en la teoría de grafos es el de la accesibilidad de dos nodos diferentes en un grafo. Es decir, dos nodos que no son adyacentes pueden ser alcanzables el uno del otro. Un camino desde el nodo i al nodo j es una secuencia alternante de nodos y conexiones (una secuencia de nodos adyacentes) que comienza con i y termina con j . La longitud del camino se define como el número de enlaces en la secuencia. Una trayectoria es un camino en el cual un nodo no se visita más que una sola vez.

La siguiente medida con posibilidad de calcularse es longitud de la trayectoria más corta entre cada pareja de nodos. Las trayectorias más cortas juegan un papel importante en la comunicación dentro de la red pues proveen caminos óptimos para la transferencia rápida de información y para la economía de los recursos del sistema. Por tales motivos, las trayectorias más cortas tienen un rol importante en la caracterización de la estructura interna de un grafo. En el programa desarrollado se representan las longitudes de trayectorias más cortas (shortest path length, en inglés) de un grafo G como una matriz \mathcal{D} en la cual la entrada d_{ij} es la longitud de la geodésica del nodo i al nodo j [21]. La herramienta también calcula el diámetro del grafo $Diam(G)$, el cual corresponde al máximo valor de d_{ij} . Muy relacionada con las medidas obtenidas recién mencionadas se encuentra la longitud de trayectoria media (characteristic path length, en inglés) L [21], otra de las cuales puede obtener el sistema desarrollado, es una medida típica de la separación entre dos nodos, la

cual se define como la media de las longitudes geodésicas entre todas las parejas de nodos.

$$L = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i,j \in N, i \neq j} d_{ij} \quad (4.6)$$

Existen un inconveniente en el cálculo de esta última medición mencionada ya que L diverge si existen componentes desconectados en el grafo. Una opción para estos casos es usar la media armónica de las longitudes geodésicas, la llamada eficiencia global (global efficiency, en inglés) del grafo G como:

$$E = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i,j \in N, i \neq j} \frac{1}{d_{ij}} \quad (4.7)$$

Esta medición es un indicador de la capacidad de tráfico de una red, y evita la divergencia de la Ecuación 4.6, ya que cualquier par de nodos que se encuentren desconectados en el grafo dan una contribución igual a cero a la suma en la Ecuación 4.7[21].

La comunicación de dos nodos no adyacentes, digamos j , k , depende de los nodos que pertenecen a las trayectorias de conexión entre j y k . Por consecuencia, una medida de la relevancia de un nodo con estas características se puede obtener contando el número de geodésicas que pasan por él, a ésta medida se le conoce como intermediación y es una de las medidas más comunes de la centralidad de nodos en la teoría de grafos. Con mayor precisión, la centralidad de intermediación (betweenness centrality, en inglés) b_i de un nodo i , es definida como:

$$b_i = \sum_{j,k \in N, j \neq k} \frac{n_{jk}(i)}{n_{jk}} \quad (4.8)$$

Donde n_{jk} es el número de trayectorias más cortas conectando j y k , mientras que $n_{jk}(i)$ corresponde al número de trayectorias más cortas conectando j y k pasando por el nodo i .

Otra propiedad conocida de los grafos es el agrupamiento. La herramienta desarrollada calcula el coeficiente de agrupamiento (clustering coefficient, en inglés) C , una medida desarrollada por Watts y Strogatz [17] y que se define como sigue. Primero se calcula el coeficiente de agrupamiento local c_i del nodo i , el cual cuantifica la proporción de las conexiones entre los nodos e_i dentro del vecindario G_i , entendiéndose este último como todos los nodos adyacentes al nodo i y todos los enlaces que conectan a tales nodos, dividido por el número total de enlaces que podrían existir entre ellos, tal como se muestra en la siguiente expresión:

$$c_i = \frac{2e_i}{k_i(k_i - 1)} \quad (4.9)$$

Note que $k_i(k_i - 1)$ es el máximo número posible de conexiones dentro del vecindario G_i . El coeficiente de agrupamiento del grafo es dado por la media de c_i sobre todos los nodos del grafo G :

$$C = \langle c \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i \in N} c_i \quad (4.10)$$

Se puede ver claramente que, $0 \leq c_i \leq 1$, y $0 \leq C \leq 1$. Las redes aleatorias

tienen bajo coeficiente de agrupamiento mientras que las redes complejas tienen alto coeficiente (asociado con una alta eficiencia local de la transferencia de información y robustez). El coeficiente de agrupamiento es un índice de la estructura local, y ha sido interpretada como una medida de la capacidad de resistencia al error aleatorio (si se pierde el nodo i , sus vecinos siguen conectados). Otro parámetro que el software es capaz de calcular es la centralidad de proximidad (closeness centrality, en inglés) φ_i [29]. La proximidad puede ser considerada como una medida de cuánto tiempo va a tomar difundir la información de un nodo a todos los demás secuencialmente y se calcula como:

$$\varphi_i = \frac{1}{\sum_{j \in N, j \neq i} d_{ij}} \quad (4.11)$$

Esto último con la convención de que $1/\infty = 0$. De esta forma el nodo que presenta mayor centralidad de proximidad es el que tiene la más baja distancia total a todos los demás nodos. Una medición alternativa del agrupamiento en la red es la eficiencia local (local efficiency, en inglés) E_{loc} [30], la cual es la media de las eficiencias de todos los subgrafos G_i vecinos de cada uno de los nodos de la gráfica, esto es:

$$E_{loc} = \frac{1}{N} \sum_{i \in N} E(G_i) \quad (4.12)$$

La última medida que calcula la herramienta es la centralidad de vector propio (eigenvector centrality, en inglés) x_i [31], se trata de una medida auto-referente de centralidad, es decir, los nodos tienen una alta centralidad de vector propio si se conectan a otros nodos que tienen una alta centralidad de vector propio, se basa en

la idea de que una relación a un nodo más interconectado contribuye a la propia centralidad en mayor medida que una relación a un nodo menos interconectado. La centralidad de vector propio del nodo i es equivalente al i -ésimo elemento del vector propio (eigenvector) correspondiente al valor propio (eigenvalor) más grande de la matriz de adyacencia \mathcal{A} . Para ver por qué, designemos a λ como el eigenvalor más grande y x como el correspondiente eigenvector, entonces:

$$\mathcal{A}x = \lambda x \text{ o equivalentemente, } x = \frac{1}{\lambda} \mathcal{A}x, \text{ y } x_i = \mu \sum_{j=1}^n a_{ij}x_j \quad (4.13)$$

Con el factor de proporcionalidad $\mu = 1/\lambda$ de tal forma que x_i es proporcional a la suma de las puntuaciones de similaridad de todos los nodos conectados a él. Una matriz cuadrada de tamaño n puede tener un máximo de n diferentes eigenvalores reales. ¿Qué valor se debe usar en este caso? El más grande en valor absoluto. La particularidad de esta definición está garantizada por el teorema de Perron-Frobenius, que establece que cualquier matriz cuadrada con entradas estrictamente positivas tiene un valor propio más grande verdadero único con componentes estrictamente positivos [32].

Un tema que ha ganado atención actualmente es la detección y caracterización de los módulos o grupos de nodos conectados densamente en los grafos (como se mencionó en el párrafo anterior), y que presentan relativamente pocas interconexiones entre ellos, la llamada estructura de la comunidad en la red (Figura 4.5). Estos módulos en los microcircuitos neuronales representan grupos de neuronas que trabajan en equipo para realizar una función específica, resulta de esta manera importante poder identificarlos plenamente en el grafo obtenido.

La estructura de la comunidad en una red se puede cuantificar utilizando la

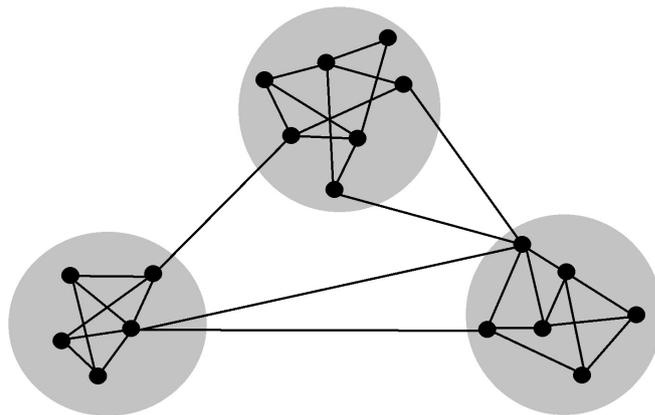


Figura 4.5.: Los nodos en la mayoría de las redes forman grupos o comunidades. Existen conjuntos de nodos (círculos grises) dentro de los cuales hay muchas conexiones, y que además muestran pocas conexiones con los nodos de los diferentes grupos presentes en el grafo.

medida conocida como modularidad (modularity, en inglés) Q [33]. La estructura de la comunidad óptima es una subdivisión de la red en grupos de nodos que no se superponen, de manera que maximiza el número de nodos dentro de los grupos, y minimiza el número de conexiones entre los grupos. La modularidad es una estadística que cuantifica el grado en que la red se puede subdividir en tales grupos claramente delimitados. La modularidad puede ser positiva o negativa, valores positivos indican que es posible la presencia de una estructura comunitaria en el grafo, puede escribirse así:

$$Q = \frac{1}{4K} \sum_{i,j \in N} \left(a_{ij} - \frac{k_i k_j}{2K} \right) s_i s_j = \frac{1}{4K} s^T B s \quad (4.14)$$

Donde K es el número total de conexiones en el grafo, a_{ij} son los elementos de la matriz de adyacencia \mathcal{A} , k_i y k_j son el grado de los nodos y para una división particular de la red en dos grupos (esto se hace en cada paso del algoritmo) sea

$s_i = 1$ si el nodo i pertenece al grupo 1 y $s_i = -1$ si pertenece al grupo 2, con lo cual tenemos que s en la Ecuación 4.14 resulta ser el vector cuyos elementos son s_i . El factor $1/4K$ es meramente convencional y ha sido elegido por compatibilidad con versiones previamente reportadas de la definición.

En la Ecuación 4.14 ha sido definida la matriz de modularidad (modularity matrix, en inglés):

$$B_{ij} = a_{ij} - \frac{k_i k_j}{2K} \quad (4.15)$$

El algoritmo que se sigue es el siguiente: se permuta aleatoriamente el orden de los nodos, posteriormente se construye la matriz de modularidad para el grafo y se localiza el más positivo eigenvalor de la matriz y su correspondiente eigenvector, se divide al grafo en dos partes acorde al signo de los elementos de este eigenvector y luego se repite cada una de las partes mencionadas. Si en algún instante se encuentra que la división propuesta hace una contribución nula o negativa al resultado previo de modularidad calculado, se deja el grafo ya sin dividir. Cuando todo el grafo ha sido descompuesto en subgrafos indivisibles de la forma antes mencionada, el algoritmo termina. La estructura de la comunidad y la modularidad pueden variar de una ejecución del algoritmo a otra, debido a la heurística del mismo [31]. En consecuencia, deben compararse múltiples ejecuciones. El sistema obtiene la media de 1000 ejecuciones.

El último tema a mencionar es el de los nodos concentradores y el de los nodos centrales. Se le conoce como concentradores al conjunto de nodos que presentan alto número de conexiones y a los nodos centrales, en sentido más estricto, se les puede describir en términos de su rol en la estructura o topología de la red [34]. Por

ejemplo, muchas redes complejas están formadas por diferentes módulos o grupos de nodos (como se acaba de mencionar), resultan ser nodos centrales aquellos que se conectan principalmente con nodos de su mismo módulo o grupo y también aquellos nodos que comunican a los diferentes módulos presentes en un grafo. En cualquier caso los nodos con estas características son cruciales para comunicación eficiente en las redes.

5. Resultados

El presente trabajo logra la caracterización de microcircuitos neuronales biológicos mediante datos recabados con imagenología de calcio con una herramienta de software desarrollada en Matlab (para observar las interfaces de usuario realizadas remítase al apéndice I), identifica las neuronas presentes en los videos y extrae parámetros topológicos de la red que forman las neuronas tal como se explicó en la sección anterior. En este apartado mostraré los resultados obtenidos en un caso de uso.

5.1. Caso de uso

El video que se obtuvo para este análisis corresponde a rebanadas de cerebro de un ratón de 14 días, específicamente se registró el video en un núcleo cerebral llamado sustancia nigra reticulata, usando el fluoróforo FLUO 4 AM y con una solución cefaloraquídea artificial en el medio de perfusión. En la Figura 5.1 se observa un cuadro del video donde pueden observarse la mayoría de las neuronas incubadas con el fluoróforo en el experimento. Dentro de los criterios de selección utilizados en este caso de estudio se tiene un umbral de veinte por ciento del valor máximo de desviación estándar y un mínimo de 4 píxeles para considerar a una mancha brillante como neurona. De esta forma, se localizaron 45 neuronas en el segmento de tejido

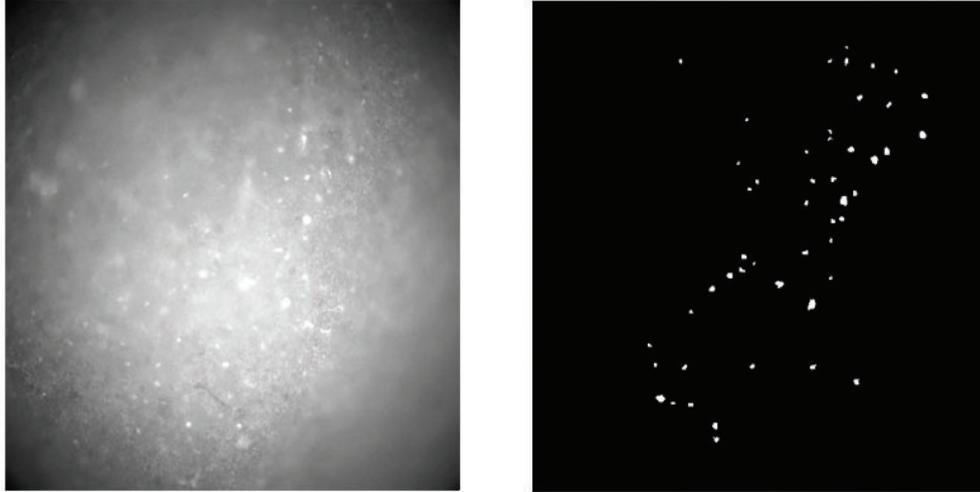


Figura 5.1.: A la izquierda, imagen de la rebanada de cerebro de ratón en donde son visibles las neuronas (puntos brillantes) incubadas con el fluoróforo FLUO 4 AM. A la derecha, máscara con las neuronas localizadas en el video mediante el programa realizado.

que se observa en el video.

Posteriormente se obtuvieron las señales fluorescentes dependientes de calcio para cada neurona identificada, se realizó el alisado de dichas señales y se obtuvo la matriz de actividad de las neuronas que se muestra en la Fig. 5.2, es importante mencionar en este punto que se presenta actividad sincrónica o correlacionada en distintos instantes de tiempo en el video, tal cual puede observarse en la gráfica de la matriz de actividad, ésta es una de las propiedades observadas en los microcircuitos neuronales biológicos. Los resultados de las simulaciones de Montecarlo para encontrar los umbrales de significancia tanto para la sincronía de los picos de actividad como para el número de disparos sincrónicos entre dos neuronas dieron como resultado 4 y 5 respectivamente con 1000 simulaciones y probabilidad de 0.05 para cada caso. Con estos valores se obtuvo la matriz binaria de adyacencia \mathcal{A} que puede

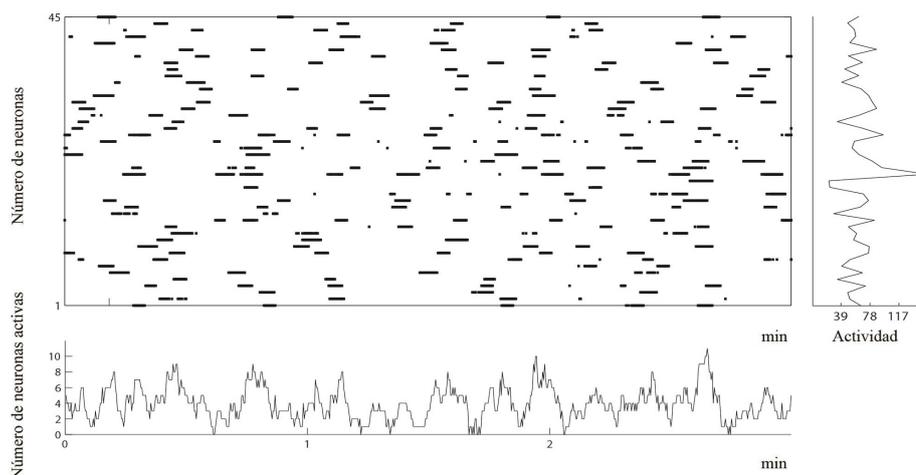


Figura 5.2.: Matriz de actividad del caso de estudio. A la derecha puede observarse la cantidad de veces que cada neurona se activó. En la parte inferior se observa la suma de neuronas activas para cada cuadro del video.

observarse en la Fig. 5.3.

Con las relaciones que muestra la matriz adyacente del grafo se puede construir una imagen de las conexiones existentes entre las neuronas del experimento, en la Figura 5.4 podemos apreciar el grafo resultante tomando los valores de \mathcal{A} .

Una vez en esta etapa del análisis se obtuvieron los valores de los parámetros mencionados en el apartado anterior. Primeramente se obtuvo el número de neuronas $N = 45$ y el número de conexiones $K = 425$ en el microcircuito neuronal. Posteriormente se calculó la distribución de grado, que se aprecia en la Fig. 5.5, se puede observar que la neurona número 40 es la que tiene el grado más alto con un valor de 33, la neurona 21, 22, 27 y 28 son otras que muestran un alto grado. El grado medio de la red resultó $\bar{k} = 18.889$ y la densidad de conexiones $\rho = 0.429$, estos valores relativamente altos se explican debido a la alta actividad del núcleo cerebral donde fue capturado el video. De la misma manera el microcircuito muestra un cruzamiento $r = -0.044$, el valor negativo de este parámetro indica que los



Figura 5.3.: Matriz adyacente del experimento. El color negro representa un 1 (conexión) mientras el color blanco un 0 (sin conexión).

nodos presentes en el grafo formado tienden a conectarse con nodos que presentan diferente grado al suyo.

El siguiente parámetro calculado es el diámetro del grafo, se obtuvo un valor $Diam(G) = 3$. La longitud de trayectoria media resultó $L = 1.540$ y la eficiencia del grafo tuvo un valor $E = 0.714$. En la Fig. 5.6 se contempla la matriz de las longitud de las trayectorias más cortas (geodésicas) entre las neuronas presentes en el tejido estudiado. Se puede observar que la red resultante muestra bajos valores de las longitudes de las trayectorias entre las neuronas, esto resulta en una mejor eficiencia en la comunicación entre las neuronas presentes en el microcircuito neuronal biológico.

El grafo muestra un valor pequeño de longitud de trayectoria media, este parámetro es importante debido a que Watts and Strogatz propusieron definir a las redes de “mundo pequeño” como aquellas que muestran pequeños valores de L o con valores que crecen proporcionalmente al número de nodos en la red, esto es: $L \propto \log(N)$, para este caso se tiene que la longitud de trayectoria media calculada de ésta forma mencionada es $L = 1.653$, valor que muestra un error relativo de 0.9%

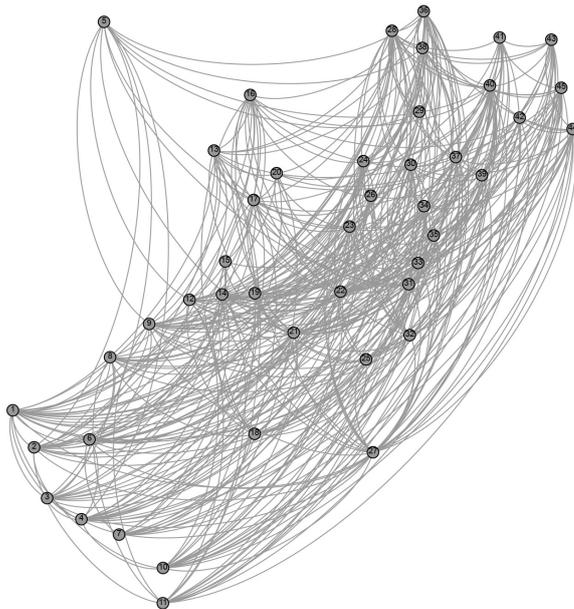


Figura 5.4.: Grafo resultante del caso de estudio. Los nodos se encuentran numerados para su identificación, se corresponden con el número de neurona.

con respecto al valor de L calculado con la ecuación 4.6.

¿Cómo sabemos que este es un valor pequeño de L ? Pues bien voy a citar algunos valores de L en otro tipo de redes que son consideradas de “mundo pequeño”, por ejemplo la red de páginas web (WWW) cuyo número de nodos se estima en alrededor de 2×10^8 y en el cual la conexión entre nodos se asocia a la presencia de un hipervínculo que comunique a las páginas web ha mostrado tener un valor de $L = 16$ [35]. Las redes de actores, en el cual la conexión se vincula a la presencia de ambos actores en la misma película y cuyo número de nodos ha sido estimado en alrededor de 225 000, muestra un valor de $L = 3.65$ [17, 25]. El valor obtenido en el microcircuito neuronal biológico es menor incluso a los dos ejemplos mencionados.

Redes de “mundo pequeño” se definen formalmente como redes que se encuentran significativamente más agrupadas que las redes aleatorias, sin embargo, tienen aproximadamente la misma longitud de trayectoria que éstas. De manera más gene-

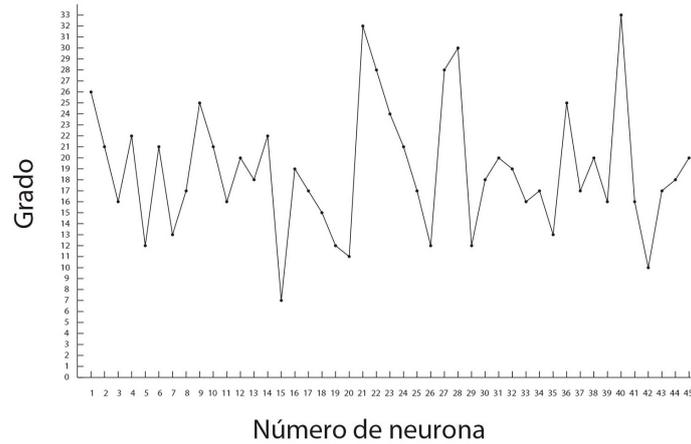


Figura 5.5.: Distribución de grado

ral, las redes de “mundo pequeño” deben ser simultáneamente altamente segregadas e integradas [17].

Para poder concluir que la red analizada en este caso de estudio corresponde a las llamadas redes de “mundo pequeño” se tiene que comparar el resultado obtenido para el coeficiente de agrupamiento del grafo [17]. En la Figura 5.7 puede observarse el coeficiente de agrupamiento local para cada neurona presente en el tejido. Se observa que la neurona 20 es la que presenta el mayor valor del c , le siguen en valor la neurona 5, 42 y 25. Note que ninguna de estas neuronas figura entre las que muestran un alto grado.

Regresando al tema del coeficiente de agrupamiento del grafo resultante, el valor calculado fue $C = 0.557$, si este valor es significativamente más alto que el obtenido con un grafo aleatorio construido con el mismo número de nodos y número de conexiones, el grafo puede ser considerado como una red de “mundo pequeño”. Se obtuvieron entonces 1000 redes aleatorias con las características requeridas antes mencionadas y se obtuvo un valor promedio del coeficiente de agrupamiento para todos los grafos aleatorios dando como resultado $C_{alea} = 0.431$.

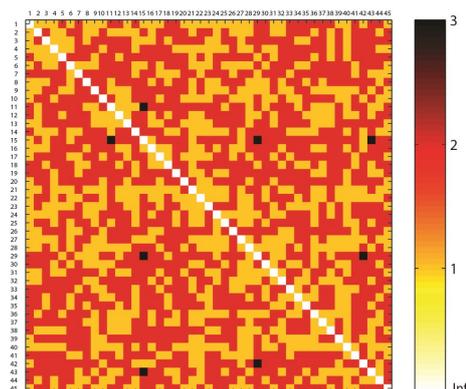


Figura 5.6.: Imagen de la matriz de longitudes de las trayectorias más cortas entre las neuronas presentes en el microcircuito neuronal del caso de estudio. A la derecha se observa la escala de color correspondiente a los valores de las longitudes más cortas.

El valor calculado para la red neuronal real es más grande que el de la red aleatoria, sin embargo para aumentar la certeza de la afirmación sobre sí la red es de “mundo pequeño” haremos uso de la formula propuesta por Humphries y Gurney [36] la cual sostiene que:

$$S = \frac{C/C_{alea}}{L/L_{alea}} \quad (5.1)$$

En este caso se hace necesario el calculo de L_{alea} que corresponde al valor de la longitud de trayectoria media, de la misma manera en la que se realizo el calculo de C_{alea} se realizaron 1000 redes aleatorias y se obtuvo el promedio del valor L de cada una de ellas obteniéndose $L_{alea} = 1.536$. Si $S \gg 1$ entonces la red puede ser considerada como una de “mundo pequeño”. En este caso $S = 1.289$, un valor apenas superior a la unidad, por lo tanto puede concluirse que a la red neuronal estudiada le hace falta una mayor segregación (un mayor valor de C) para ser considerada

con total plenitud como red de “mundo pequeño”, sin embargo se acerca más a este modelo que al de las redes aleatorias.

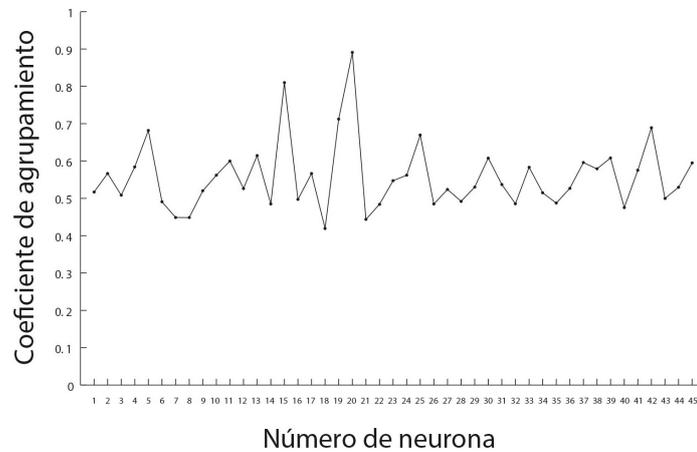


Figura 5.7.: Coeficiente de agrupamiento local del microcircuito neuronal biológico.

El análisis continua con la evaluación de otra de las medidas de centralidad que realiza el programa, la centralidad de proximidad φ . En la Figura 5.8 se puede contemplar la proximidad de cada nodo presente en la red. Es notable que las neuronas 40, 21 y 28 resultan ser las que mayor valor de proximidad presentan respectivamente en el microcircuito, esto porque precisamente estas neuronas se encuentran entre las de mayor grado en la red. En este momento del análisis podemos ir sospechando que estas neuronas se encuentran dentro del conjunto de los llamados nodos concentradores, debido a que vuelven a figurar dentro de los nodos con mayor valor de centralidad.

El programa también calcula la eficiencia local de cada nodo en la red. En la Figura 5.9 se observa el cálculo de la eficiencia local de cada neurona en el microcircuito neuronal. Las neuronas 20, 15, 5, 25 y 42 exhiben la mayor eficiencia local, estas neuronas a excepción de la 15 ya habían mostrado altos valores de coeficiente

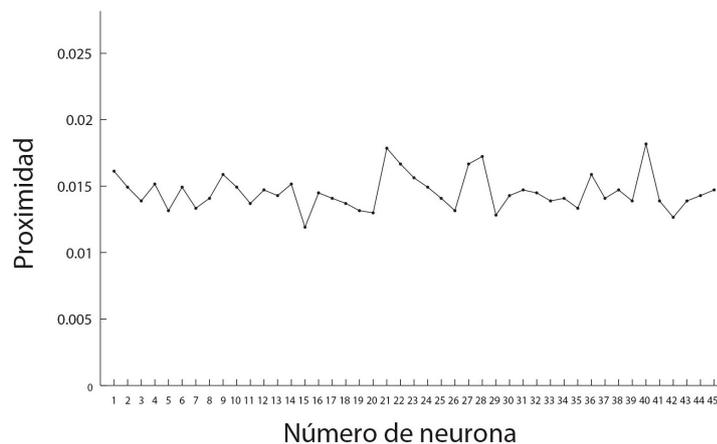


Figura 5.8.: Centralidad de proximidad para cada neurona del microcircuito.

de agrupamiento, resulta entonces, que estas neuronas son las que mejor ayudan al microcircuito en el flujo eficiente de información. En otras palabras, estas neuronas pueden estar comunicando a los distintos grupos o módulos en el grafo o a su vez podrían ser el elemento central en la comunicación de interna de estos módulos.

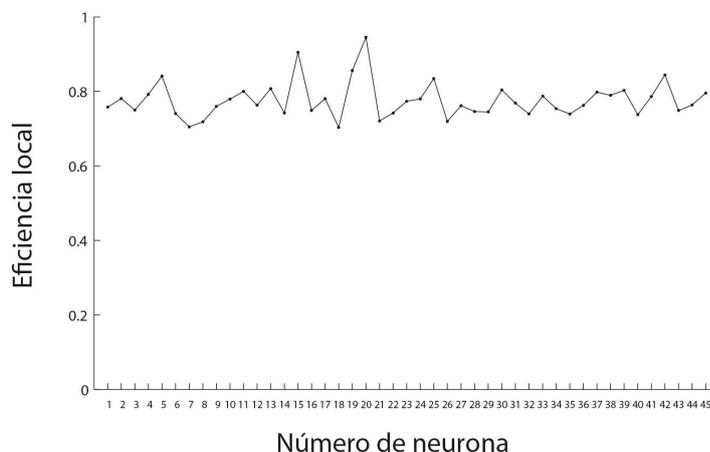


Figura 5.9.: Eficiencia local de cada neurona en el microcircuito.

El siguiente parámetro medido es la centralidad eigenvector x . Se puede ver el valor de cada nodo de la red en la Figura 5.10. Nuevamente aparecen las neuronas

40, 21 y 28 con mayor centralidad, lo que confirma la importancia que tienen en el microcircuito.

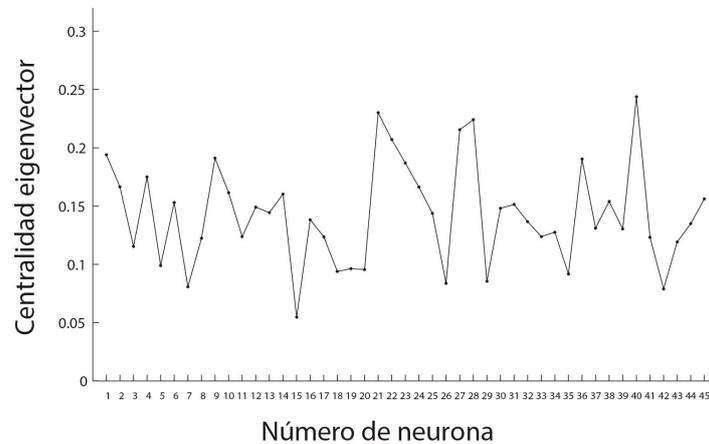


Figura 5.10.: Centralidad eigenvector del grafo.

Por último se obtuvo el valor de la centralidad de intermediación b . Los resultados calculados para cada neurona presente en el tejido se muestran en la Figura 5.11. Note que las neuronas 21, 40 y 28 presentan el mayor valor de intermediación. Estas neuronas ya habían figurado entre las que presentan el mayor valor de proximidad y ya habían sido consideradas como concentradoras. De esta observación puede deducirse que estas neuronas son cruciales para la comunicación eficiente entre las distintas neuronas presentes en el microcircuito neuronal [29].

En cuanto al tema de la modularidad el resultado obtenido por el sistema (después de las 1000 repeticiones) fue de $Q = 0.1463$. El algoritmo identificó 4 módulos presentes en la red (que designaré como m_1 , m_2 , m_3 y m_4 de aquí en adelante). El número de elementos de m_1 fue de 15, el de m_2 resultó de 12, el de m_3 fue de 8 y el de m_4 fue de 10. En la Fig. 5.12 podemos observar dos imágenes representando con diferentes colores a las neuronas según el módulo al que pertenecen. Resulta evidente la diferencia en el flujo de información entre los distintos módulos que par-

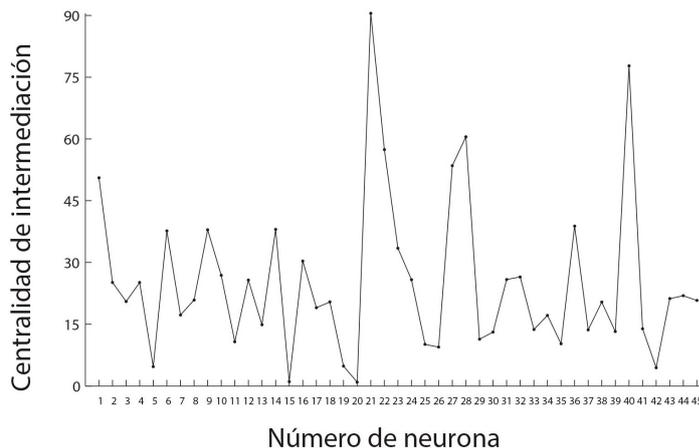


Figura 5.11.: Centralidad de intermediación del grafo.

ticipan en la red, por ejemplo centrándonos en el módulo m_1 podemos apreciar que existe una carga mayor de conexiones con el módulo m_2 y el m_4 , un examen más minucioso nos revela que dicho módulo tiene entre sus integrantes a las 4 neuronas que presentaron mayor grado en la red (neuronas número 40, 21, 22 y 27), las dos primeras también figuran entre las de mayor centralidad de proximidad, centralidad de vector propio y centralidad de intermediación. Además las neuronas 25 y 42 también pertenecen a este módulo y estas se encuentran entre las que muestran mayor coeficiente de agrupamiento y eficiencia local en la red.

Por este motivo podemos decir que el módulo m_1 es el más importante de la red, esto al tener dentro de sus integrantes a neuronas que acorde al análisis previo son importantes para la eficiencia en el trasiego de información, además de presentar en conjunto una mayor cantidad de conexiones con los otros módulos. Ahora analizando al módulo m_2 podemos observar que la mayor cantidad de sus conexiones van al módulo m_1 y al m_3 (en ese orden), y dentro de las neuronas que posee que llaman la atención podemos encontrar únicamente a la neurona 5, que mostró altos valores de coeficiente de agrupamiento y eficiencia local en la red.

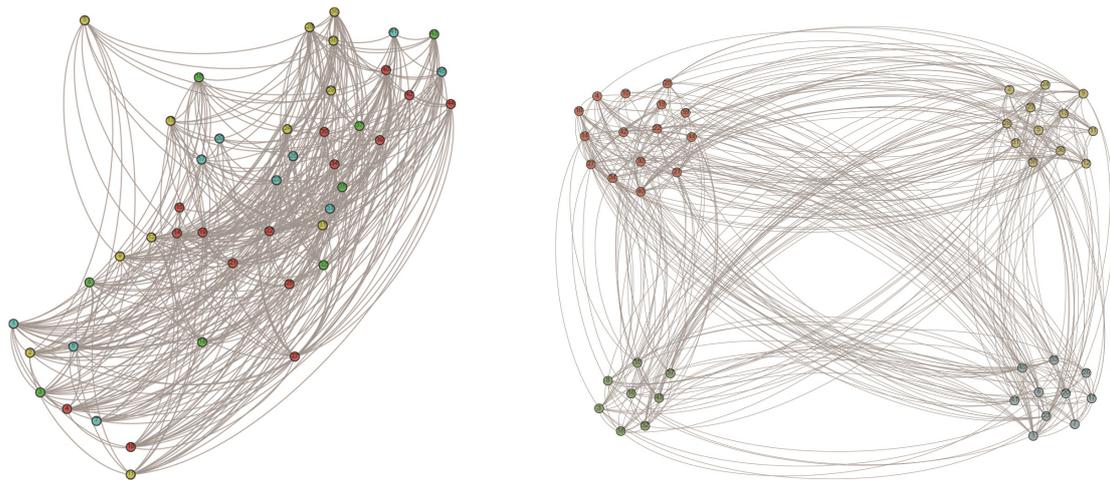


Figura 5.12.: A la izquierda, imagen del grafo obtenido en el análisis conservando las coordenadas originales y diferenciando los 4 módulos identificados. A la derecha, el mismo grafo ordenando sus coordenadas de acuerdo al módulo al que pertenecen (m_1 color rojo, m_2 color amarillo, m_3 color verde y m_4 color azul).

Pasando al análisis del módulo m_3 se puede apreciar que aunque se comunica con todos los módulos (como es el caso de todos) es con el m_2 con el que presenta una mayor cantidad de conexiones, entre sus neuronas (es el módulo con menor número de elementos) no destaca alguna con valores altos en las medidas de centralidad obtenidas con el sistema. El último módulo, el m_4 presenta un mayor número de conexiones con el módulo m_1 y entre las neuronas destacables encontramos a la número 20, esta neurona presentó el mayor valor de coeficiente de agrupamiento y eficiencia local en la red, podemos intuir de esta manera que debido a la naturaleza de las mediciones antes mencionadas, la neurona 20 le da unidad al módulo y facilita la comunicación a sus compañeras.

De esta manera es cómo el análisis de la modularidad nos brinda información para poner en contexto la importancia de cada una de las neuronas que presentan altos valores de centralidad.

El análisis del grafo ha sido útil para explorar las relaciones de conectividad entre las neuronas presentes en el tejido estudiado y en base a estos resultados se ha identificado a las neuronas más importantes en la dinámica del microcircuito ayudando a comprender las relaciones de conectividad en estas redes funcionales. Los resultados se obtienen en el lapso de dos minutos aproximadamente, permitiendo de esta forma reducir significativamente el tiempo de análisis de estos videos en la práctica, por lo tanto brinda oportunidad al investigador para centrarse en qué modificación experimental sería útil para observar las acciones del microcircuito: adicionar un fármaco, quitar una conexión, activar o desactivar (mediante optogenética) alguna de las neuronas con alta centralidad.

6. Conclusiones

El análisis de redes complejas se ha convertido en una importante herramienta para la caracterización de la conectividad de microcircuitos neuronales biológicos. En este trabajo se han descrito un conjunto de medidas (parámetros) que cuantifican las propiedades locales y globales de las redes neuronales (redes complejas en general). El software realizado permite que los investigadores comiencen a explorar las propiedades de los microcircuitos obtenidos mediante imagenología de calcio.

Al observar los resultados obtenidos mediante el análisis del caso de estudio mostrado en la sección anterior se puede afirmar que existe un conjunto de neuronas que figuran entre las que muestran los valores más altos en las mediciones realizadas por el software. Como ya se mencionó, estas neuronas resultan ser o bien las concentradoras de la información (neuronas número 40, 21, 28, 22 y 27 en importancia) o bien las que permiten el flujo eficiente de la información en el microcircuito (neuronas número 20, 5, 25, 42 y 15 en importancia). En la literatura puede encontrarse la definición del club rico de una red, estos resultan ser los nodos que tienen fuerte influencia en el accionar de las redes, en este caso podemos utilizar el concepto para nombrar así a este grupo de neuronas que obtuvieron los mayores valores en las medidas calculadas por el programa.

Debido al corto tiempo que se lleva la obtención de estos resultados (alrededor de 2 minutos) permite que el investigador pueda obtenerlos en pleno experimento,

es decir, mientras se encuentra adquiriendo los vídeos del tejido cerebral vivo mantenido *in vitro*. De esta forma se abre la posibilidad de que el investigador pueda realizar una mayor cantidad de experimentos con el microcircuito que se encuentra estudiando, por ejemplo puede ir a registrar eléctricamente (recordemos que la técnica de imagenología de calcio mide de manera indirecta la actividad eléctrica de las neuronas) a las neuronas que más le interesen después de realizar el análisis con las herramientas de la teoría de redes, esto con el fin de identificar al tipo de neurona que está concentrando o haciendo más eficiente la actividad del microcircuito, dependiendo de lo que elija. Otra opción que el investigador puede escoger es matar a las neuronas que muestran pertenecer al club rico del microcircuito, de esta manera puede observar qué le sucede a la dinámica de la red y así estudiar el efecto real que tienen estas neuronas. De la misma manera se abre la posibilidad para analizar tejido patológico rápidamente, esto último podría utilizarse en un futuro no muy lejano en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el mal funcionamiento de la actividad neuronal, imagínese que se tenga una base de datos con las características topológicas que presentan los microcircuitos neuronales de enfermedades neurodegenerativas, así se podría obtener una biopsia del tejido anormal y analizarlo con esta herramienta para poder comparar contra la base de datos y por tanto efectuar un diagnóstico más preciso. Además del hecho de poder realizar los análisis de los microcircuitos durante el experimento, no hay que olvidar que debido a la rapidez del programa un investigador puede volver a revisar fácilmente sus datos en cualquier momento bajo otros parámetros, evitando grandes inversiones de tiempo en ello.

Resulta evidente que las posibilidades de desarrollar nuevos experimentos para el investigador son enormes ya que más bien depende de la capacidad de éste para usar los resultados del programa y obtener nuevos resultados que hasta la fecha no

se hayan descrito o se requieran validar. La herramienta desarrollada tiene un enorme potencial que enriquece el entendimiento de las interacciones de las neuronas en pequeños módulos o microcircuitos que se involucran en las operaciones cognitivas complejas del cerebro. Falta mucho por hacer, pero la existencia de nuevas herramientas que ayuden en este proceso son indispensables para el desarrollo científico, ésta, en específico, muestra un gran potencial a corto plazo debido a que el marco en el que se genera está siendo estudiado enormemente en la actualidad.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Ing. Jesús Esteban Pérez Ortega por su contribución en el desarrollo de la aplicación al sugerirme mejoras en los procesos de obtención de datos y por hacerme más claro las necesidades que se requerían en el trabajo práctico. Gracias por facilitarme el material necesario para los análisis hechos durante todo el desarrollo de este trabajo. Gratitud al Dr. José Bargas Díaz por concederme el permiso de trabajar entre su equipo y por último, gracias a todos los estudiantes del laboratorio BL-103 del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad que de alguna u otra manera apoyaron al presente escrito.

A. Apéndice I: Interfaces de usuario del sistema

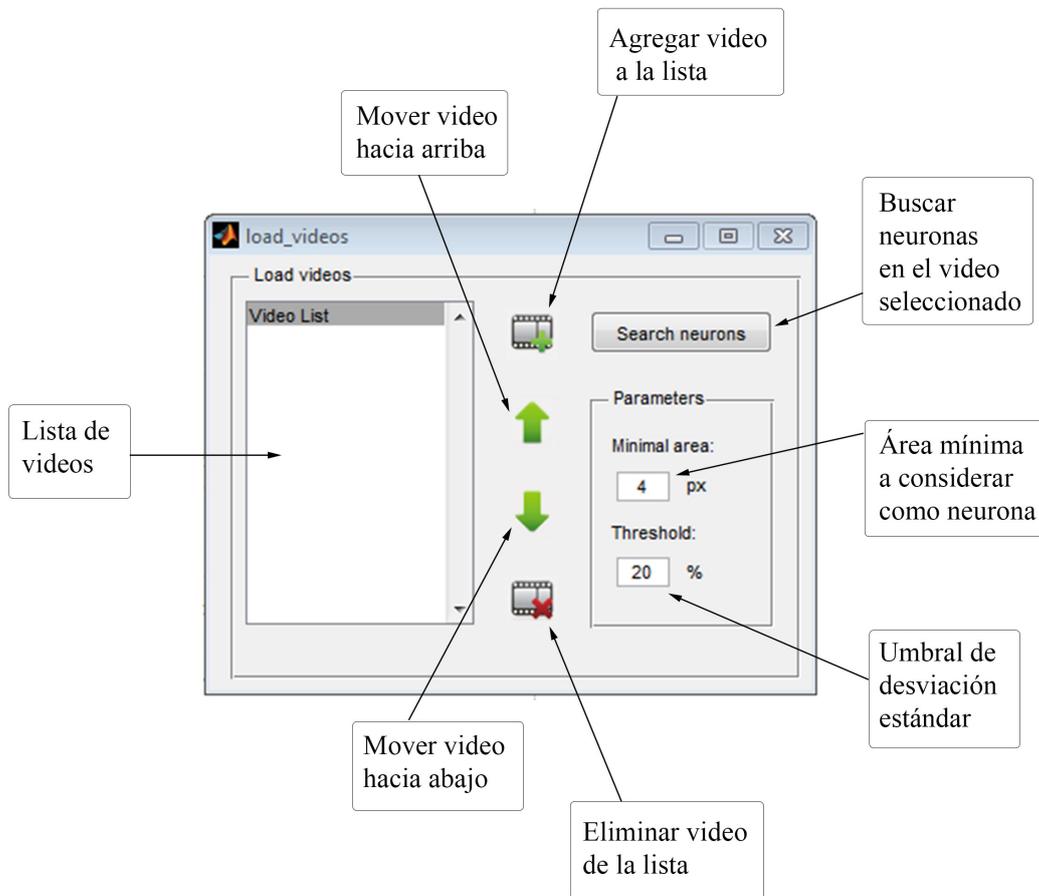


Figura A.1.: Imagen de la primera pantalla del sistema. Se trata de la pantalla de selección del video a analizar.

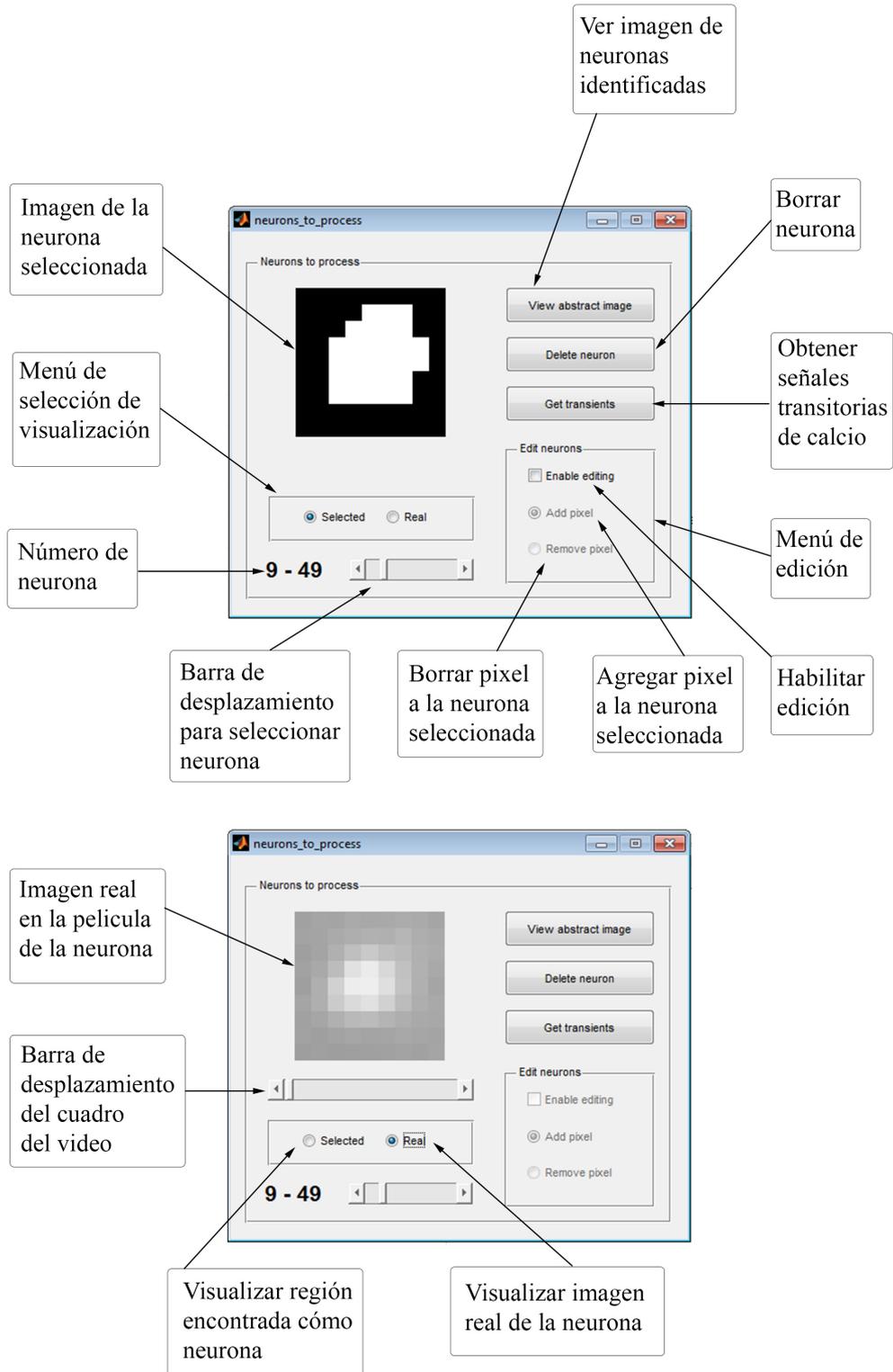


Figura A.2.: Segunda pantalla del sistema. En ella se puede editar el área de las neuronas identificadas, observarlas en el video original o eliminarlas.

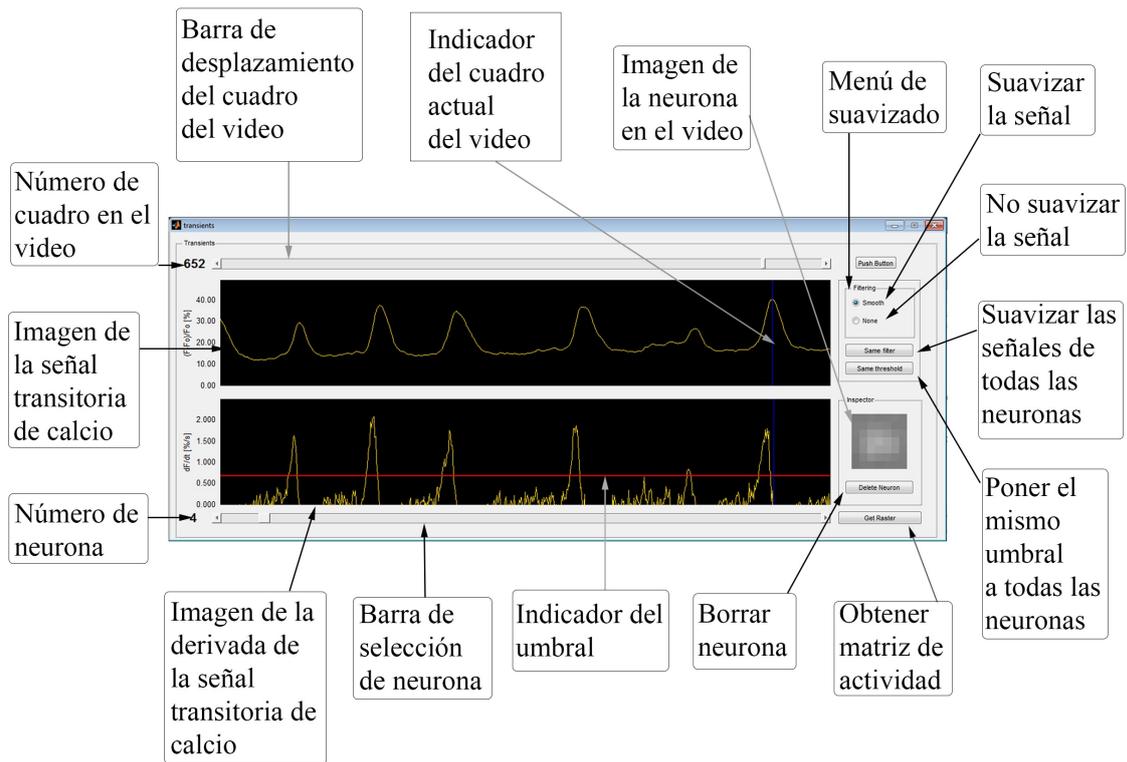


Figura A.3.: Tercera pantalla del sistema. Ésta sirve para observar y manipular las señales transitorias de calcio.

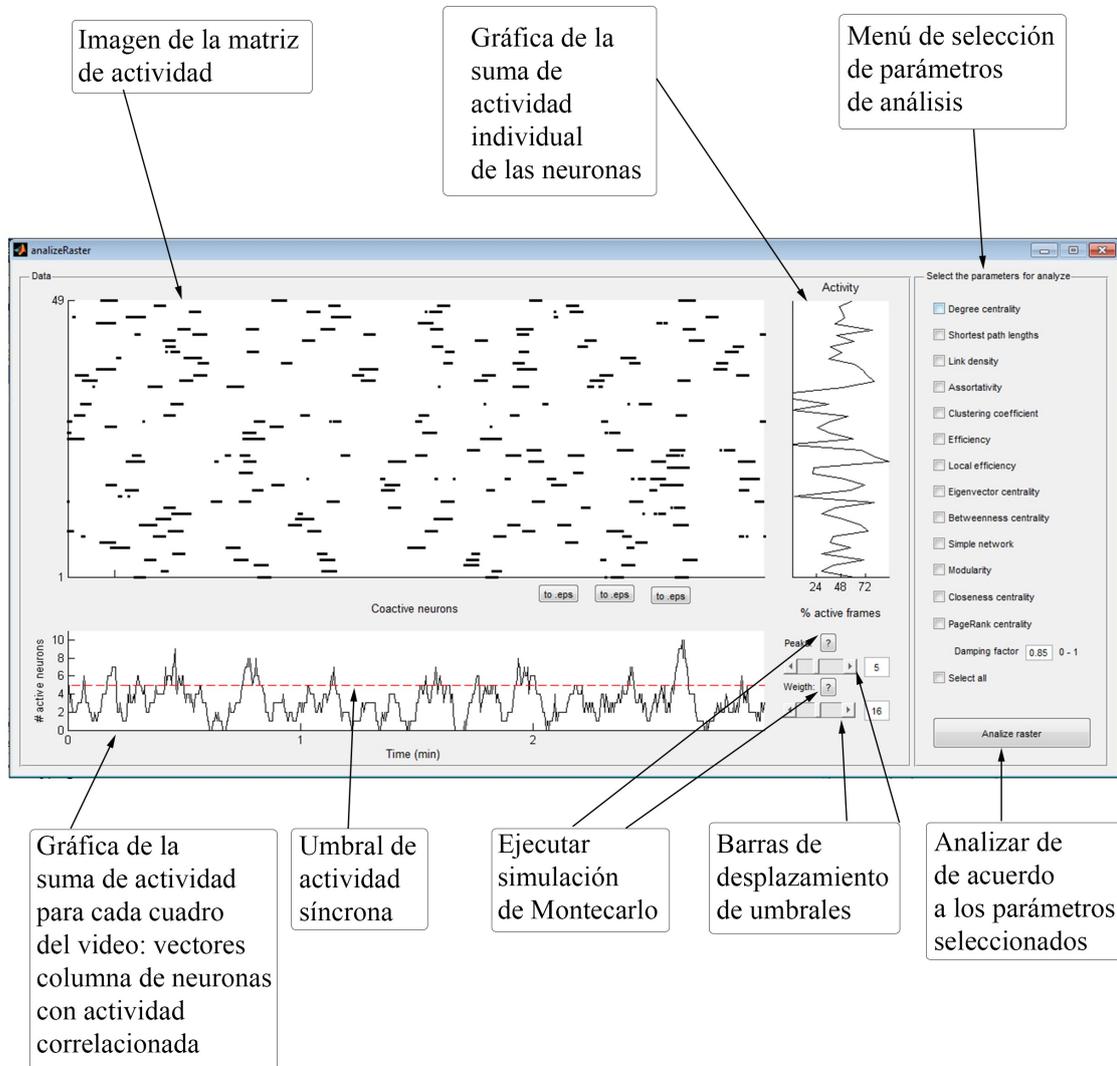


Figura A.4.: Cuarta pantalla del sistema. Aquí se puede escoger qué parámetros analizar.

Bibliografía

- [1] Sherrington C. *The Integrative Action of the Nervous System*, 2nd ed. New Haven: Yale Univ. Press. 1947.
- [2] Swanson, L. W. *Brain Architecture*. Oxford Univ. Press. Oxford. 2003.
- [3] Ramón y Cajal S. *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme & des Vertébrés*, Vol. 2. L Azoulay (transl). Paris: Maloine; 1955. Reprint. Madrid: Instituto Ramón y Cajal. 1911.
- [4] Plenz D, Thiagarajan TC. The organizing principles of neuronal avalanches: cell assemblies in the cortex? *Trends Neurosci* 30: 101-110. 2007.
- [5] Carrillo-Reid L, Tecuapetla F, Tapia D, Hernandez-Cruz A, Galarraga E, Drucker-Colin R, Vargas J. Encoding network states by striatal cell assemblies. *J Neurophysiol* 99: 1435-1450. 2008.
- [6] Ikegaya Y, Aaron G, Cossart R, Aronov D, Lampl I, Ferster D, Yuste R. Synfire chains and cortical songs: temporal modules of coartical activity. *Science* 304: 559-564. 2004.
- [7] Mao BQ, Hamzei-Sichani F, Aronov D, Froemke RC, Yuste R. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron* 32: 883-898. 2001.
- [8] Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52: 751-766. 2006.
- [9] Hebb DO. *The Organization of Behavior*. New York: John Wiley & Sons. 1949.
- [10] Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331-356. 1973.
- [11] Cossart R, Aronov D, Yuste R. Attractor dynamics of network UP states in the neocortex. *Nature* 423: 283-288. 2003.
- [12] Boccaletti, S., Latora, V., Moreno, Y., Chavez, M., Hwang, D.U. Complex networks: Structure and dynamics. *Phys. Rep.* 424, 175–308. 2006.
- [13] Strogatz, S.H. Exploring complex networks. *Nature* 410, 268–276. 2001.
- [14] Newman, M.E.J. The structure and function of complex networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256. 2003.
- [15] Börner, K., Sanyal, S. & Vespignani, A. Network science. *Annu. Rev. Inform. Sci. Technol.* 41, 537–607. 2007.

-
- [16] Milgram, S. The small world problem. *Psychol. Today* 1, 61–67. 1967.
- [17] Watts, D. J. & Strogatz, S. H. Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* 393, 440–442. 1998.
- [18] Reijneveld, J. C., Ponten, S. C., Berendse, H. W. & Stam, C. J. The application of graph theoretical analysis to complex networks in the brain. *Clin. Neurophysiol.* 118, 2317–2331. 2007.
- [19] Sporns, O., Chialvo, D., Kaiser, M. & Hilgetag, C. C. Organization, development and function of complex brain networks. *Trends Cogn. Sci.* 8, 418–425. 2004.
- [20] Bassett, D. S. & Bullmore, E. T. Small world brain networks. *Neuroscientist* 12, 512–523. 2006.
- [21] Albert, R. & Barabási, A. L. Statistical mechanics of complex networks. *Rev. Mod. Phys.* 74, 47–97. 2002.
- [22] Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y. Metastability of active CA3 networks. *J Neurosci* 27: 517-528. 2007.
- [23] Silberberg, G., Grillner, S., LeBeau, F. E. N., Maex, R. & Markram, H. Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci.* 28, 541–551. 2005.
- [24] Ed Bullmore, Olaf Sporns. *Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems.* Macmillan Publishers Limited. 2009.
- [25] Amaral, L. A. N., Scala, A., Barthelemy, M. & Stanley, H. E. Classes of small-world networks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 11149–11152. 2000.
- [26] Barabási, A. L. & Albert, R. Emergence of scaling in random networks. *Science* 286, 509–512. 1999.
- [27] Newman, M.E.J. Assortative mixing in networks. *Phys. Rev. Lett.* 89, 2087011–2087014. 2002.
- [28] Nešetřil, Jaroslav; Ossona de Mendez, Patrice. *From Sparse Graphs to Nowhere Dense Structures: Decompositions, Independence, Dualities and Limits.* European Congress of Mathematics. European Mathematical Society. pp. 135–165. 2010.
- [29] Freeman, L.C. Centrality in networks: I. Conceptual clarification. *Social Networks* 1: pp. 215-239. 1979.
- [30] Latora, V. & Marchiori, M. Efficient behaviour of small-world networks. *Phys. Rev. Lett.* 87, 198701. 2001.
- [31] Lohmann G, Margulies DS, Horstmann A, Pleger B, Lepsien J, et al. Eigenvector Centrality Mapping for Analyzing Connectivity Patterns in fMRI Data of the Human Brain. *PLoS ONE* 5(4): e10232. doi:10.1371/journal.pone.0010232. 2010.

- [32] Newman, M. E. J. *The mathematics of networks*. Center for the Study of Complex Systems, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109–1040. 2006.
- [33] Girvan, M. & Newman, M. E. J. Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 7821–7826. 2002.
- [34] Guimerà, R., Mossa, S., Turtschi, A. & Amaral, L. A. The worldwide air transportation network: anomalous centrality, community structure and cities' global roles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 7794–7799. 2005.
- [35] A. Broder, R. Kumar, F. Maghoul, P. Raghavan, S. Rajagopalan, R. Stata, A. Tomkins, J. Wiener, *Computer Networks* 33-309. 2000.
- [36] Humphries, M. D. & Gurney, K. Network “small-worldness”: a quantitative method for determining canonical network equivalence. *PLoS ONE* 3, e0002051. 2008.