

# Cultius neuronals: un sistema model per entendre la complexitat del cervell

Jordi Soriano i Jaume Casademunt

Departament d'Estructura i Constituents de la Matèria, Universitat de Barcelona

## RESUM

*Milions de neurones interconnectades exhibeixen patrons dinàmics i fenomenologies d'una riquesa exquisida. Entendre les lleis que governen aquests fenòmens és una fita fonamental en neurociència que, al llarg de les últimes dècades, ha rebut un ajut important per part de la modelització biofísica i d'experiments en sistemes senzills com ara cultius neuronals. Molts dels resultats obtinguts i moltes de les eines desenvolupades no només estan ajudant a desxifrar el funcionament del cervell humà, sinó que estan obrint potents línies de recerca per modelitzar i tractar malalties neurodegeneratives.*

Doi: <http://dx.doi.org/10.2436/20.2001.01.11>

## 1 La complexitat del cervell i l'ús de sistemes model

El fet de comprendre el funcionament del cervell humà va més enllà de la intrínseca curiositat humana. És la clau per entendre les seves disfuncions a causa de danys o malalties i per dissenyar estratègies de cara a preveure-les i corregir-les [1,2]. El problema, però, és que el cervell és un sistema amb unes  $10^{11}$  neurones,  $10^{14}$  connexions i que sempre està actiu, estigui fent una tasca específica o no. A més, el cervell exhibeix una combinació de característiques estables, com ara una activitat periòdica de gran precisió o la transmissió acurada d'informació, que es combinen amb d'altres que semblen erràtiques, com ara una gran quantitat de soroll (entès com a neurones que s'activen aleatòriament) o canvis sobtats en la sincronia de milions de neurones [3]. El primer grup de característiques dona estabilitat i robustesa al sistema, mentre que el segon el proveeix de mecanismes d'alerta i flexibilitat per fer front a l'entorn en el qual vivim, alhora que proporciona recursos per a tasques tan difícilment quantificables com el pensament abstracte o la imaginació.

Com es combinen aquests dos mons sense que el cervell es col·lapsi o es torni tan monòton i previsible com inútil és un gran misteri que s'investiga de manera cada cop més multidisciplinària, i combinant disciplines que van des de la neurociència cognitiva fins a la física o les matemàtiques. La raó d'aquesta aliança de la comunitat és doble.

En primer lloc, és impossible conèixer l'estat de totes les neurones del cervell humà i el seu acoblament en un temps determinat, cosa que obliga a dissenyar estratègies per estudiar el cervell a diferents escales temporals i espacials [4]. Les imatges de ressonància magnètica funcional (RMf) permeten, per exemple, captar l'activitat de tot el cervell, però en grups de milions de neurones i amb

poca resolució temporal [5]. Aquestes dades són la base per entendre la dinàmica col·lectiva del cervell i la seva alteració a causa de malalties, però són difícils d'analitzar i requereixen eines matemàtiques sofisticades per interpretar-les correctament. En l'altre extrem de detall, les mesures que es fan mitjançant elèctrodes implantats al cervell permeten seguir amb precisió l'activitat d'un centenar de neurones en una regió molt concreta [6], a canvi de perdre el context de la dinàmica col·lectiva en què participen.

Aquestes mesures, però, són la clau per desenvolupar models físics acurats que permeten finalment lligar el microcosmos de l'activitat neuronal individual amb el macrocosmos de la col·lectiva [7]. La realitat, doncs, és que avui en dia és impossible avançar en la comprensió del cervell humà sense combinar experiments a diferents nivells amb models físicomatemàtics, una combinació tan fructífera que en l'última dècada ha revolucionat la nostra visió de com funciona el cervell. Un dels descobriments més sorprenents, per exemple, ha estat el de l'activitat espontània [8]. S'ha vist que el cervell és tan actiu o més quan està en repòs que quan es dedica a una tasca concreta, com ara quan sincronitza els moviments del cos mentre correm o coordina pensament i articulació mentre parlem. Aquesta activitat espontània és fonamental per ajudar a canviar de tasca ràpidament o a prendre decisions noves, i s'ha vist que moltes malalties psiquiàtriques i neurodegeneratives estan associades justament a alteracions importants en els patrons d'activitat espontània [9,10].

En segon lloc, el cervell humà és un sistema altament delicat que no és possible de pertorbar o manipular lliurement per descobrir-ne els seus secrets. Per tant, la comunitat ha buscat estratègies alternatives en el que es coneix com a *sistemes neuronals model*, i que inclouen experiments en xarxes més accessibles i senzilles conjuntament amb models físics del sistema. Aquests models proporci-

onen una base sòlida per entendre mecanismes bàsics de la dinàmica de les xarxes neuronals que sovint es poden extrapolar al cervell amb èxit.

Des d'un punt de vista experimental, una primera aproximació consisteix a estudiar xarxes neuronals naturals relativament senzilles. El cuc *C. elegans* i el peix d'aigua dolça *D. rerio* (peix zebra) constitueixen dos dels organismes model «senzills» més explorats en neurociència. *C. elegans* conté 302 neurones que s'estenen al llarg del seu cos, i s'ha aconseguit descriure completament [11] les aproximadament 7.000 connexions (connectoma). El peix zebra té unes 100.000 neurones en estat embrionari organitzades de manera que formen un cervell [12], i el seu connectoma està en procés de ser totalment identificat. En ambdós casos és rellevant que en experiments recents s'hagi pogut gravar simultàniament l'activitat de cada una de les neurones d'aquests animals, cosa que permet lligar l'activitat individual amb la col·lectiva [13]. A més, la petita dimensió d'aquestes xarxes neuronals està permetent fins i tot manipular neurones i connexions individualment, per exemple estimulant-ne o silenciant-ne de concretes, i això permet estudiar l'efecte de perturbacions controlades en la dinàmica del sistema.

L'únic obstacle d'aquests organismes model és que la seva xarxa neuronal està fixada genèticament, cosa que impedeix estudiar, per exemple, com un circuit concret dóna lloc a dinàmiques específiques, o com un grup de neurones aïllades es connecten entre elles per formar un circuit amb una gran riquesa estructural i dinàmica. Els cultius neuronals responen a aquesta necessitat en ser fàcilment accessibles i manipulables, com veurem més endavant.

Des d'un punt de vista teòric i numèric, el cervell humà i els seus anàlegs «simplificats» s'estudien a base de desenvolupar models amb diferents nivells de descripció físicomatemàtica i precisió biològica, depenent del problema concret que es vulgui entendre. A grans trets, els models biofísics actuals han d'incorporar tres blocs descriptius fonamentals perquè una xarxa neuronal tingui unes propietats dinàmiques mínimament representatives: la dinàmica neuronal, la distribució de connexions, i les fluctuacions o soroll inherents a un sistema biològic.

La física de sistemes complexos aplicada a la neurociència ha fet —i de fet està fent— un bon ús d'eines de física estadística i física no lineal per aportar les eines necessàries per descriure aquests tres blocs fonamentals i la seva interacció mútua. El gran potencial que tenen és que no només poden predir i reproduir de manera acurada els patrons d'activitat neuronal observats experimentalment, sinó que poden revelar mecanismes universals i fins i tot treure a la llum mecanismes ocults. Els recursos disponibles són extensos i inclouen l'ús de models biofísics per a la descripció de les neurones [14,15], eines de teoria de xarxes per descriure la connectivitat [16,17], descripcions

de sistemes dinàmics per entendre l'estabilitat dels patrons d'activitat [18] i teoria de fluctuacions per incloure els efectes del soroll [19-21].

## 2 Cultius neuronals

Els cultius neuronals [22,23] es preparen típicament a base d'aïllar un teixit neuronal concret, com per exemple l'escorça cerebral de rates embrionàries, dissociant tot seguit les neurones i cultivant-les en un substrat com ara vidre. El potencial autoorganitzatiu de les neurones és tan gran que en pocs dies tornen a establir una xarxa amb una activitat espontània rica. La grandària i la forma dels cultius es poden controlar mitjançant diferents mètodes (com ara patrons foradats, figura 1A) [24], que permeten preparar diferents cultius que poden ser estudiats en paral·lel. Aquestes preparacions són una de les eines de recerca més importants del nostre grup a Barcelona [24-26].

Les neurones en cultiu apareixen com a objectes circulars (figura 1B), i les connexions són tan nombroses i

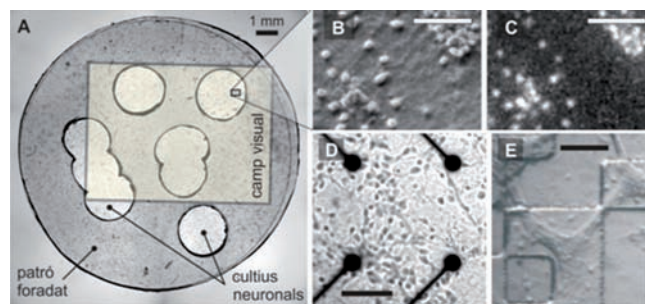


Figura 1: *Cultius neuronals.* (A) Substrat de vidre combinat amb un patró foradat on se sembren les neurones dissociades, que donen lloc a cultius petits que contenen unes 3000-5000 neurones. Aquestes es connecten ràpidament entre elles i constitueixen una nova xarxa en uns deu dies. Els cultius encaixen en el camp visual d'una càmera de fluorescència, cosa que permet enregistrar l'activitat espontània en diferents cultius en paral·lel. (B) Detall d'una petita regió d'un cultiu, on es poden veure les neurones com petits objectes circulars de 10 µm de diàmetre. (C) La mateixa regió del cultiu visualitzada amb fluorescència, i on les neurones actives apareixen com punts brillants. (D) Neurones cultivades en un substrat que conté una graella d'elèctrodes (estructures negres en la imatge), i que enregistren directament l'activitat elèctrica de les neurones. (E) Cultiu amb connectivitat dirigida mitjançant un patró topogràfic, i on les neurones es dipositen i creixen en la seva part alta. L'estructura de la xarxa segueix la forma del patró, i això dóna lloc a colls d'ampolla i un circuit altament anisòtrop. Les barres d'escala són 100 µm per als panells B-E.

denses que no es poden resoldre. L'activitat en aquests cultius es mesura mitjançant dues tècniques bàsiques: fluorescència de calci [27] i elèctrodes [6]. Les tècniques de calci es basen en l'ús de marcadors fluorescents que detecten el flux de calci durant l'activitat neuronal, cosa que permet visualitzar neurones actives com a objectes brillants (figura 1B-C). Els elèctrodes, en canvi, mesuren directament (i amb molt bona sensibilitat i resolució temporal) l'activitat elèctrica de les neurones, però el seu potencial està limitat pel nombre d'elèctrodes disponibles i la proximitat de les neurones al punt de mesura (figura 1D). A efectes pràctics, quan el centre d'estudi és la dinàmica col·lectiva d'una xarxa neuronal, la fluorescència de calci ofereix molt bones possibilitats.

Es diu que els cultius neuronals són *homogenis* quan les neurones cobreixen el substrat uniformement i es connecten de manera similar en totes direccions (figura 1B), mentre que en els cultius *dissenyats* la posició de les neurones i les connexions estan dirigides d'alguna manera, la qual cosa permet configuracions complexes o circuits amb característiques específiques [28,29]. Una de les moltes opcions per «dissenyar» circuits inclou l'ús de motlles topogràfics (figura 1E), on les neurones creixen a la part superior o inferior d'un cert patró amb dues alçades i donen lloc a un circuit fortament anisòtrop.

### 3 La importància de l'activitat espontània

Dins l'ampli espectre de patrons dinàmics que pot oferir el cervell, el més important és l'associat amb l'activitat espontània. Aquesta activitat no és una «activitat aleatòria trivial» com s'havia pensat durant dècades, sinó que són patrons dinàmics ben estructurats que cobreixen fins a quatre dècades d'escala temporal (de 2 ms a 20 s) i on poden participar-hi des d'una dotzena de neurones fins a milions [3]. L'activitat espontània participa en el desenvolupament i la interconnectivitat dels circuits en formació i, en el cervell adult, té un paper fonamental en la selecció d'estímuls sensorials, el processament d'informació i la consolidació de memòria, entre molts altres aspectes.

Encara que sembli sorprenent, els mecanismes que inicien i mantenen l'activitat espontània en circuits neuronals encara estan poc entesos, tant des d'una perspectiva fisiològica com de la modelització biofísica [30]. A més, circuits tan diversos com la retina [31], la medulla espinal [32], seccions fines de l'escorça cerebral [33], i cultius de neurones prèviament dissociades exhibeixen patrons d'activitat espontània rics i sostinguts. Això suggereix l'existència de mecanismes universals robustos que condueixen qualsevol teixit neuronal cap a la generació d'activacions espontànies ben estructurades en l'espai i el temps.

Aquest paradigma tan important s'està investigant actualment mitjançant diferents escales i sistemes, des de

mesures i modelització a l'escala del cervell fins a preparacions més accessibles i controlables en forma de cultius neuronals, i que són el nucli central de recerca del nostre grup.

L'activitat espontània en cultius neuronals homogenis es caracteritza per episodis quasiperiòdics de gran activitat col·lectiva (esclats) combinats amb intervals de relatiu silenci (figura 2A-B) [24, 26, 34]. Aquests esclats estan fortament associats a la dinàmica intrínseca de les neurones i a la connectivitat del circuit, i la seva modelització física en un treball nostre recent ha permès entendre els mecanismes generals que controlen la iniciació i el manteniment de l'activitat espontània en circuits neuronals, com veurem després.

En cultius tipus patró, la presència d'inhomogeneïtats en la connectivitat dona lloc a una dinàmica ben diferent. Un exemple força il·lustratiu i que també és focus de recerca al nostre laboratori consisteix a preparar agregats de neurones connectats entre ells (figura 2C) [25]. Cada agregat forma una «neurona efectiva» o node de la xarxa, que redueix molt el nombre d'elements del sistema. De fet, aquestes xarxes mostren una activitat espontània espaciotemporal molt més variada que la dels cultius homogenis, i on cada node pot activar-se dins d'un esclat amb veïns diferents (figura 2D). La gran diferència entre els cultius homogenis i els agregats mostra com pot ser de rica (i complexa) la relació entre activitat neuronal, connectivitat i dinàmica col·lectiva.

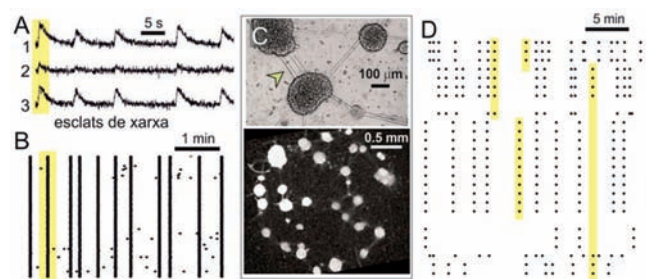


Figura 2: Patrons d'activitat neuronal. (A) Exemples de traces d'activitat espontània per a tres neurones (en un cultiu que en conté 3000). El contorn groc indica un esclat de xarxa, és a dir l'activació conjunta de neurones. (B) Activitat de xarxa estesa a 200 neurones, i on cada punt indica una activació, cosa que il·lustra la gran coherència de la xarxa i la periodicitat dels esclats. (C) Cultiu neuronal dissenyat en forma d'agregats neuronals interconnectats. La imatge superior mostra un detall de la xarxa; la inferior, una imatge de fluorescència durant l'activitat. La fletxa indica connexions físiques entre agregats. (D) Activitat espontània de la xarxa, on cada punt marca l'activació d'un agregat. Els agregats s'activen en grups de grandària i ocurrència variable (caixes grogues), i esbossen una activitat global molt més rica que en el cas homogeni.

## 4 Models de neurona

Una neurona es pot veure com una «caixa negra» caracteritzada per la seva habilitat de rebre impulsos (inputs) d'altres neurones i de generar finalment un senyal de sortida (output) si el nombre d'inputs rebuts en una certa finestra temporal és suficientment gran. La variable fonamental en la descripció d'una neurona activa és el potencial de membrana, el qual canvia segons la natura dels inputs, que poden ser excitadors o inhibidors. Els primers augmenten el potencial de membrana, mentre que els segons el disminueixen. El ritme d'arribada dels inputs, així com la seva força i integració final en la membrana, són els aspectes fonamentals que donen forma a la resposta d'una neurona i a la dinàmica col·lectiva de la xarxa. És precisament el processament complex dels inputs per la neurona, així com la característica *on/off* de la sortida, el que confereix a la neurona el seu comportament no lineal [14,35].

De models neuronals, n'hi ha molts, ja que partint de la descripció qualitativa anterior un pot establir primer una base físicomatemàtica mínima per després anar afegint detalls biològics. Així, el model més senzill i intuïtiu per a una neurona es coneix com d'*integració i activació* [14], i ve donat per:

$$\tau \frac{du(t)}{dt} = -u(t) + \sum_k \sum_i g_k \Phi(t - t_i) + \xi(t),$$

on  $u(t)$  és el potencial de membrana i  $\tau$  el seu temps característic de recuperació. El sumatori sobre  $k$  indica totes les connexions d'entrada de la neurona, i on cada connexió pot tenir una força  $g_k$ , mentre que el sumatori sobre  $i$  indica els inputs que arriben a temps  $t_i$  al llarg d'una connexió concreta. Així, per exemple, un tren continuat d'inputs en una connexió feble pot ser més important que uns inputs molt espaiats al llarg d'una connexió forta. La funció  $\Phi$  descriu la integració d'aquests inputs per la membrana, i  $\xi(t)$  és un terme de soroll que té en compte petites fluctuacions (per exemple en forma de petits inputs espontanis) en el potencial de membrana. En aquest model,  $u(t)$  es manté en un estat de repòs  $u_r$  (amb petites fluctuacions) mentre no hi ha inputs, augmenta a mesura que la neurona rep estímuls fins que, per un valor llindar  $u_r$ , la neurona s'activa i emet un output en forma de potencial d'acció.  $u(t)$  després retorna al seu estat de repòs original  $u_r$ . El potencial d'acció viatja al llarg de l'axó i acaba sent l'input de les neurones amb què connecta.

Aquest model aporta la base matemàtica per fer simulacions numèriques de xarxes neuronals, i es pot adequar i refinar per descriure bé una gran varietat de sistemes. Una variant amb molt d'èxit es coneix com a model d'Izhikevich [14], i en molts casos ens dóna una descripció

suficient de la dinàmica neuronal amb un cost computacional mínim, cosa que el fa molt interessant per desenvolupar models *in silico* de milers de neurones, per exemple per reproduir amb èxit la dinàmica que s'observa en petites regions cerebrals o en cultius [24]. A l'altre extrem, el model de Hodgkin-Huxley [36], malgrat ser el pioner i ser reconegut amb el Premi Nobel de Medicina, és tan detallat biològicament i ric matemàticament que només és pràctic per simular sistemes molt específics i relativament petits.

## 5 Descripció de les xarxes neuronals

La connectivitat és l'*alma mater* d'un sistema neuronal. Mentre que la distribució de connexions esbossa els circuits de la xarxa, l'equilibri entre excitació i inhibició assegura una correcta operativitat dels circuits. En l'epilèpsia, per exemple, un desequilibri cap a un excés d'excitació porta el cervell a un estat de sobresincronització que el torna totalment inoperant durant la durada de l'atac.

La descripció de la connectivitat en xarxes neuronals ha avançat significativament al llarg de les últimes dues dècades gràcies al gran desenvolupament de teoria de xarxes, la qual estudia les propietats estadístiques de xarxes complexes en sistemes tan diversos com Internet, grups d'amics, interaccions entre proteïnes, xarxes de transport i teixits neuronals [16,17]. La identificació dels *nodes* d'una xarxa i les *connexions* entre ells pot semblar senzill en alguns casos, com per exemple en el cas d'aeroports i rutes aèries, però quan s'investiguen xarxes neuronals la tasca és més complicada [37].

D'una banda, el concepte de connexió en neurociència pot prendre dues formes, que es coneixen com *estructural* i *funcional* [38]. Les connexions estructurals corresponen al teixit físic que lliga i comunica les neurones entre elles, mentre que les connexions funcionals representen el camí per on flueix la informació entre neurones actives [39]. En aquest últim cas, els «l·ligams funcionals» entre dues neurones s'entenen en un sentit general com correlacions estadístiques entre els seus patrons dinàmics [40]. Així, les traces d'activitat de la figura 2A mostren com les neurones #1 i #3 desapareixen juntes sistemàticament, i per tant és raonable suposar que estan fortament lligades. A més, com que els l·ligams funcionals reflecteixen el flux d'informació al llarg dels camins neuronals, han d'estar lligats d'alguna manera a l'estructura subjacent de la xarxa. Entendre aquesta relació és de fet un problema molt complicat i un tema d'investigació per si mateix [38,41], ja que un mateix circuit físic pot oferir una enorme varietat de camins possibles per on la informació pot fluir.

D'altra banda, l'habilitat d'identificar connexions estructurals decreix ràpidament amb la grandària de la xarxa que estudiem. L'activitat d'una dotzena de neurones en

cultiu es pot seguir fàcilment i fins i tot les seves connexions es poden arribar a identificar a cert nivell, però en cultius de pocs milers de neurones, i evidentment el cervell, aquesta tasca és extraordinàriament difícil. No obstant això, estudis en aquesta direcció en xarxes senzilles són de fet molt importants per entendre la relació entre estructura i funció, sobretot perquè ajuden a desenvolupar nous formalismes matemàtics i estratègies d'estudi que després es poden aplicar a sistemes grans. Així, en el nostre laboratori a Barcelona fem servir els cultius agregats de la figura 2C com a model senzill per estudiar aquest problema. A partir de les dades d'activitat de la figura 2D construïm la xarxa funcional d'un cultiu donat a base d'assignar connexions a aquelles parelles de nodes que desapareixen més properament en el temps i amb més freqüència, tal com es mostra en la figura 3A-B [25]. La descripció matemàtica rigorosa de l'assignació d'aquestes connexions funcionals és de fet molt complicada i un tema de recerca fascinant que encara està en fase de desenvolupament. El que és important des d'un punt de vista experimental, però, és que els cultius es poden pertorbar, per exemple eliminant nodes o connexions físiques, cosa que dona molta informació sobre la relació entre estructura i funció [25]. També permet estudiar com de robusta o sensible és una xarxa a certes alteracions, i això permet fer models *in vitro* de malalties neurodegeneratives.

En aquest context de com la pertorbació d'una xarxa pot donar informació important sobre les seves propietats, la física de fenòmens crítics ha proveït els investigadors d'eines molt interessants. Una d'elles és la percolació [42,43]. Una xarxa 'percola' quan hi ha un o més camins que uneixen una fracció significativa dels seus nodes. Com s'il·lustra en els diagrames de la figura 3C, una xarxa totalment connectada inicialment va perdent camins i nodes connectats a mesura que perd connexions, però manté una 'component gegant' que encara conté la majoria dels nodes. Per un valor crític de connexions perdudes, la component gegant es desintegra en unitats petites i aïllades, cosa que impedeix per exemple l'existència d'una dinàmica col·lectiva o la transmissió d'informació. Aspectes com ara el valor de connectivitat crítica i com de ràpid decau la component gegant s'han estudiat experimentalment i teòricament amb cultius neuronals, i han permès extreure informació molt valuosa com ara la distribució de connexions a la xarxa i la connectivitat mitjana de les neurones [43].

## 6 Soroll en sistemes neuronals

El soroll és un exemple de canvi de paradigma en neurociència gràcies a la física: el que es considerava inicialment com a fluctuacions molestes es va reconèixer finalment com un mecanisme fonamental en la dinàmica de circuits neuronals [20]. Des d'un punt de vista general,

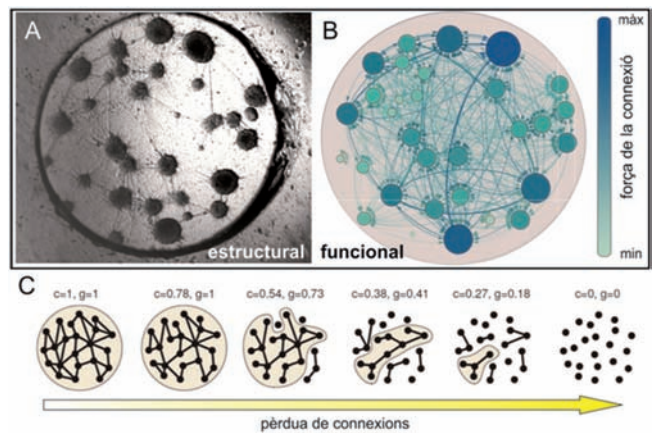


Figura 3: Anàlisi i modelització de xarxes neuronals. (A) Cultiu format per agregats de neurones (objectes circulars foscos), connectats entre ells per axons (filaments rectes). El conjunt configura la xarxa estructural. (B) Partint de dades d'activitat espontània, es pot construir la xarxa funcional equivalent, per exemple suposant que dos agregats que desapareixen molt propers en el temps i de manera sistemàtica estan fortament acoblats. En el diagrama, com més forta és una connexió més fosca i gruixada és la línia que uneix dos agregats; i com més fortes són les connexions totals que rep un node, més fosc és el seu color. (C) Esquema que il·lustra el concepte de percolació en xarxes neuronals. Un paràmetre de control  $c$  estableix la fracció de connexions que hi ha en el sistema a un temps donat, i un paràmetre d'ordre  $g$  mesura la fracció de neurones que segueixen unides formant la unitat més gran, la qual s'indica amb el contorn puntejat. Per a danys petits a la xarxa ( $c = 0,78$  o 78 % de connexions intactes) la xarxa segueix tota unida. La xarxa va perdent unitat a mesura que el dany augmenta, però hi ha un nucli de neurones (component gegant) que es manté connectat i que encara pot abastar gran part del sistema. Per a un valor crític de  $c$  al voltant de 0,27 la xarxa s'ha desintegrat en petites illes desconnectades i de grandària similar. Per a desintegracions més grans, tots els nodes formen unitats independents.

el soroll es pot entendre com el conjunt de fluctuacions aleatòries inherents a qualsevol sistema físic amb un gran nombre de graus de llibertat. En el context de neurones, fluctuacions tèrmiques, de l'entorn bioquímic, o de la concentració de neurotransmissors, faciliten l'emissió espontània de petits senyals elèctrics que es coneixen com a *miniactivacions*. Aquestes emissions configuren a gran escala el 'soroll de xarxa', és a dir trens d'impulsos de baixa amplitud que contínuament bombardegen neurones i circuits. Aquestes miniactivacions poden amplificar-se a través de la pròpia xarxa, un mecanisme que de fet pot ajudar finalment a desencadenar una activitat macroscòpica en el sistema. El que fa

fascinants els circuits neuronals és la seva habilitat per o bé aprofitar el soroll o bé per filtrar-lo, depenent de les necessitats del sistema i el seu estat dinàmic.

Un exemple il·lustratiu dels beneficis del soroll és el que es coneix com a *ressonància estocàstica* [44]. Una neurona pot rebre un tren d'impulsos periòdics (per exemple en forma de senyal sinusoidal) però prou febles per mantenir-la sempre just per sota del llindar d'activació, cosa que faria que no disparés mai a no ser que se l'estimulés externament. No obstant això, un soroll d'amplitud adequada pot induir l'activació de la neurona just al pic del senyal periòdic dèbil, ja que aporta els impulsos addicionals necessaris. Com que el soroll està sempre present en xarxes neuronals, aquest «ressonador» facilita en gran manera l'amplificació de senyals petits, o fins i tot la seva detecció. Aquest és de fet un dels mecanismes que el cervell dels depredadors fa servir per detectar pertorbacions molt petites en l'entorn i que assenyalen l'aproximació d'una presa [45].

## 7 Focalització de soroll: un nou concepte per entendre l'activitat espontània en cultius

La importància del soroll en sistemes neuronals, i com s'integra en la modelització de neurones i xarxes, són aspectes que queden palesos en el context d'un enfocament innovador per entendre els mecanismes que inicien l'activitat espontània en cultius neuronals. La recerca, desenvolupada pel nostre grup a Barcelona, s'ha centrat a dilucidar la base física de l'aparició de l'activitat espontània coherent en aquestes xarxes relativament simples i controlades [24]. Específicament, utilitzant tècniques d'imatge de calci en cultius neuronals, combinades amb un detallat model *in silico* dels cultius, hem estudiat la transició des de l'estat d'emissió espontània completament a l'atzar de les neurones fins a l'aparició coherent d'esclats de xarxa (figures 2B i 4A).

Aquest fenomen és molt robust, ja que es dona pràcticament en qualsevol xarxa homogènia i sota condicions de cultiu molt diferents, cosa que desafia la nostra intuïció com a procés autoorganitzat. És certament sorprenent que una activitat tan robusta i periòdica no requereixi la guia d'algun tipus de rellotge intern o marcapassos, o fins i tot la presència d'algunes neurones diferenciades que actuarien com a líders de l'activitat col·lectiva. Així ho demostren clarament les simulacions per ordinador del nostre model, i que permeten assegurar que una xarxa de neurones idèntiques reproduïen perfectament el comportament dels experiments amb cultius. El model conté els tres ingredients descrits anteriorment i incorpora una dinàmica per a les neurones de tipus «integració i activació», una xarxa de neurones homogeniament distribuïdes en un substrat amb una

estructura de connexions que reproduïx observacions experimentals, i un soroll a base de petites activacions aleatòries a les neurones.

La primera observació experimental important en el nostre estudi en cultius és que els esclats globals d'activitat del cultiu prenen la forma d'una ona d'excitació que es propaga de manera molt ràpida a través del cultiu. Aquesta ona no havia estat observada abans ja que la seva rapidesa requereix una alta resolució temporal en l'experiment (figura 4A). Una vegada aquestes ones van ser resoltes en l'espai i el temps, es va observar que prenen la forma d'ones circulars, com les d'un estany, i que s'iniciaven preferentment i de manera repetida, en uns punts ben localitzats característics de cada cultiu (figura 4B). L'observació sorprenent va ser que la nucleació d'aquestes ones en diferents punts es produïa en una seqüència completament aleatòria, tot i que els successius esclats d'activitat es reproduïen gairebé periòdicament en el temps. L'aleatorietat en l'alternança dels diferents punts d'origen de les ones clarament indicava que era un fenomen induït pel soroll, és a dir, per l'emissió espontània de les neurones individuals. A la vegada, però, el període quasi constant entre ones successives suggeria que estava fixat per una escala de temps intrínseca de la recuperació de les connexions sinàptiques, després de cada explosió d'activitat. Aquests resultats sorprenents s'expliquen sobre la base del nou mecanisme que hem anomenat *focalització de soroll*.

La idea bàsica és d'aplicació a qualsevol xarxa d'elements que necessiten rebre una quantitat mínima d'estímul per respondre, com és el cas de les neurones, que emeten un senyal quan acumulen un nivell suficient d'estímul en un curt interval de temps. Una part d'aquest estímul és aleatori, originat en descàrregues espontànies d'origen molecular que tenen lloc a les sinapsis neuronals. De tant en tant, aquest «soroll» de fons que senten les neurones supera el llindar mínim que fa emetre el senyal nerviós cap a altres neurones. És el que anomenem *emissió espontània*.

El cas és que l'estructura de connexions en xarxa de les neurones fa que la propagació d'aquests senyals espontanis s'amplifiqui de manera no trivial, tant pel caràcter no lineal del comportament de les pròpies neurones com per la multiplicitat de camins que connecten diferents punts de la xarxa, que pot afavorir la propagació en determinades direccions o amplificar-la en determinades zones. Una sola emissió espontània pot així induir una cascada d'activitat en un grup de neurones. El resultat és que l'estructura de la xarxa dota l'activitat originada pel «soroll» de fons d'una estructura espaciotemporal no trivial que no està relacionada d'una manera senzilla amb la connectivitat específica de la xarxa, sinó que implica una complexa interacció entre topologia i dinàmica. A nivell col·lectiu el que veiem és una su-

perposició d'allaus d'activitat de totes les mides, seguint una distribució de llei de potència. Una acurada anàlisi estadística d'aquesta activitat de fons revela a nivell funcional una xarxa efectiva formada per les connexions més actives (figura 4C) que té una distribució autosimilar

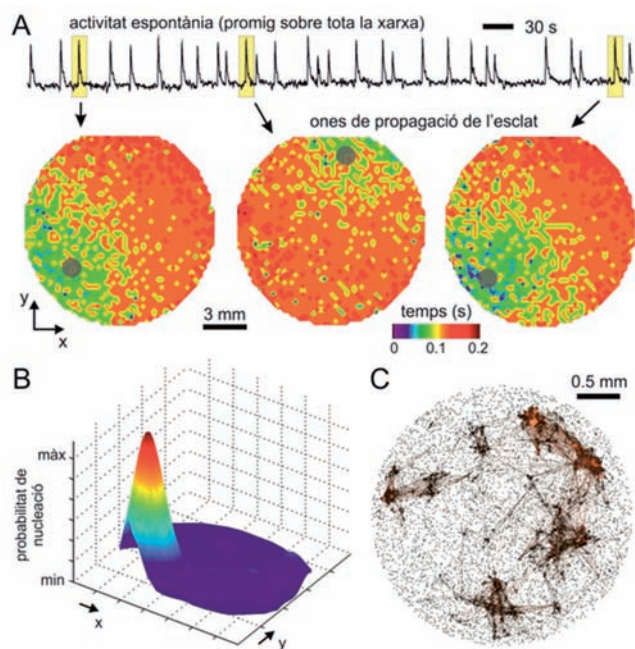


Figura 4: Iniciació i propagació d'activitat en cultius homogenis. (A) Traça de fluorescència mitjana de tota una xarxa, corresponent a 10 min d'activitat espontània en un cultiu de 13 mm de diàmetre que conté unes 50.000 neurones. Els esclats són pics en activitat, és a dir episodis d'activació coherent de totes les neurones. L'anàlisi en detall de cada un dels esclats permet reconstruir la dinàmica espaciotemporal de l'activitat espontània. Tres exemples il·lustren mitjançant mapes de colors com l'activitat espontània comença en una petita regió del cultiu (punts de nucleació, àrea grisosa) i es propaga com a ona circular cap als extrems del cultiu. Els mapes esquerre i dret tenen punts de nucleació pràcticament idèntics. (B) Distribució de probabilitat dels punts de nucleació en l'espai. Un pic ben marcat apareix a la part inferior esquerra del cultiu. El 80 % dels esclats mesurats s'inicien en aquest punt. (C) Exemple d'una simulació numèrica d'un cultiu neuronal, on tant l'estructura de la xarxa com la dinàmica de les neurones exhibeixen comportaments realistes. Les neurones apareixen com a petits punts negres. Les neurones més actives s'indiquen com cercles més grans de tons vermellorsos. Les línies representen les connexions funcionals més importants entre neurones. La interacció entre xarxa estructural, dinàmica intrínseca de les neurones i soroll dona lloc a àrees de gran amplificació de fluctuacions i concentració d'activitat que, a la llarga, defineixen els punts de nucleació.

(sense escales), totalment diferent de la xarxa original, amb una distribució gaussiana [24,42].

En aquest marc, la selecció dels punts de nucleació s'origina en els mecanismes altament heterogenis i anisòtrops d'amplificació del soroll introduïts per la dinàmica no lineal de les neurones conjuntament amb el nivell de recurrència de la xarxa. Aquesta amplificació local és molt sensible als detalls de com han quedat connectades les neurones en el procés de cultiu a cada punt. Els punts especials on s'observa l'inici de les ones resulten ser com els escoladors a on va a parar el flux mitjà d'activitat en forma d'allaus. O, dit d'una altra manera, serien els punts de confluència de camins d'alta amplificació de l'activitat espontània. Així doncs, una font primària de soroll distribuïda de forma homogènia, és a dir l'espontània i aleatòria de les neurones, es propaga i s'amplifica de manera molt heterogènia i anisòtropa, induint una concentració d'activitat fortament localitzada en determinats punts específics. Aquesta concentració espaciotemporal de l'activitat de fons és el que anomenem *focalització de soroll*.

Com a fenomen físic subjacent, cal esperar que aquest comportament sigui genèricament present a les xarxes neuronals, a menys que processos de regulació específica o altres efectes més forts impedeixin la seva manifestació. Al seu torn, aquest és un bon exemple de com la física dona forma als escenaris on els dissenys biològics s'han d'adaptar. Així, la regulació bioquímica controlada per la genètica ha d'operar en un context físic no trivial donat, per tal de construir la complexa arquitectura funcional dels teixits neuronals reals tot controlant i potser, utilitzant, forces i comportaments físics bàsics com els que hem mostrat.

## 8 Conclusions

La comprensió del cervell humà fascina la humanitat tant com l'estructura de l'univers i les lleis que el governen. No obstant això, el que inicialment va començar com una feina exclusiva de neurobiòlegs ha evolucionat en poques dècades en un camp de recerca altament multidisciplinari on la física no lineal i la teoria de xarxes en són pilars fonamentals. Aquestes branques del coneixement han proveït els investigadors d'una gran varietat de recursos i eines de modelització que, conjuntament amb sistemes experimentals de fàcil accés i manipulació, han revolucionat la nostra visió dels ingredients principals que modelen la dinàmica del cervell i la seva complexitat. Els conceptes descrits al llarg d'aquest article són només una fracció de tot el potencial que pot oferir la física. Si el segle XXI ha de ser el «segle del cervell» estem segurs que la física de sistemes complexos hi tindrà un paper ben important.

## Bibliografía

- [1] B. Y. A. ABBOTT, Neuroscience: Solving the brain. *Nature*, **499**, 272-274 (2013).
- [2] O. SPORNS, The non-random brain: efficiency, economy, and complex dynamics. *Front. Comput. Neurosci.*, **5(5)**, (2011).
- [3] G. BUZSÁKI, A. DRAGUHN, Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, **304(5679)**, 1926-1929 (2004).
- [4] J. W. LICHTMAN, W. DENK, The big and the small: challenges of imaging the brain's circuits. *Science*, **334(6056)**, 618-623 (2011).
- [5] N. K. LOGOTHETIS, What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, **453(7197)**, 869-878 (2008).
- [6] M. E. SPIRA, A. HAI, Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat. Nanotechnol.*, **8(2)**, 83-94 (2013).
- [7] G. DECO, V. K. JIRSA, P. A. ROBINSON, M. BREAKSPEAR, K. FRISTON, The dynamic brain: From spiking neurons to neural masses and cortical fields. *PLoS Comput. Biol.*, **4(8)** (2008).
- [8] G. DECO, V. K. JIRSA, A. R. MCINTOSH, Resting brains never rest: computational insights into potential cognitive architectures. *Trends Neurosci.*, **36(5)**, 268-274 (2013).
- [9] M. D. FOX, M. GREICIUS, Clinical applications of resting state functional connectivity. *Front. Syst. Neurosci.*, **4(June)**, 19 (2010).
- [10] M. D. GREICIUS, K. SUPEKAR, V. MENON, R. F. DOUGHERTY, Resting-state functional connectivity reflects structural connectivity in the default mode network. *Cereb. Cortex*, **19(1)**, 72-78 (2009).
- [11] L. R. VARSHNEY, B. L. CHEN, E. PANIAGUA, D. H. HALL, D. B. CHKLOVSKII, Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. *PLoS Comput. Biol.*, **7(2)**, e1001066 (2011).
- [12] M. B. AHRENS, M. B. ORGER, D. N. ROBSON, J. M. LI, P. J. KELLER, Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat. Methods*, **10(5)**, 413-420 (2013).
- [13] R. PREVEDEL, Y.-G. YOON, M. HOFFMANN, N. PAK, G. WETZSTEIN, S. KATO, T. SCHRÖDEL, R. RASKAR, M. ZIMMER, E. S. BOYDEN, A. VAZIRI, Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy. *Nat. Methods*, **11(7)**, 727-730 (2014).
- [14] E. M. IZHIKEVICH, Which model to use for cortical spiking neurons? *IEEE Trans. Neural Netw.*, **15(5)**, 1063-1070 (2004).
- [15] W. GERSTNER, W. M. KISTLER, *Spiking neuron models: Single neurons, populations, plasticity*. Cambridge university press (2002).
- [16] E. BULLMORE, O. SPORNS, Complex brain networks: graph theoretical analysis of structural and functional systems. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10(3)**, 186-198 (2009).
- [17] S. BOCCALETTI, V. LATORA, Y. MORENO, M. CHAVEZ, D. HWANG, Complex networks: Structure and dynamics. *Phys. Rep.*, **424(4-5)**, 175-308 (2006).
- [18] E. M. IZHIKEVICH, *Dynamical Systems in Neuroscience*: MIT Press (2007).
- [19] F. SAGUÉS, J. SANCHO, J. GARCÍA-OJALVO, Spatiotemporal order out of noise. *Rev. Mod. Phys.*, **79(3)**, 829-882 (2007).
- [20] M. D. MCDONNELL, L. M. WARD, The benefits of noise in neural systems: bridging theory and experiment. *Nat. Rev. Neurosci.*, **12(7)**, 415-426 (2011).
- [21] G. B. ERMENTROUT, R. F. GALÁN, N. N. URBAN, Reliability, synchrony and noise. *Trends Neurosci.*, **31(8)**, 428-434 (2008).
- [22] J. ECKMANN, O. FEINERMAN, L. GRUENDLINGER, E. MOSES, J. SORIANO, T. TLUSTY, The physics of living neural networks. *Phys. Rep.*, **449(1-3)**, 54-76 (2007).
- [23] L. J. MILLET, M. U. GILLETTE, Over a century of neuron culture: from the hanging drop to microfluidic devices. *Yale J. Biol. Med.*, **85(4)**, 501-521 (2012).
- [24] J. G. ORLANDI, J. SORIANO, E. ALVAREZ-LACALLE, S. TELLER, J. CASADEMUNT, Noise focusing and the emergence of coherent activity in neuronal cultures. *Nat. Phys.*, **9(9)**, 582-590 (2013).
- [25] S. TELLER, C. GRANELL, M. DE DOMENICO, J. SORIANO, S. GÓMEZ, A. ARENAS, Emergence of assortative mixing between clusters of cultured neurons. *PLoS Comput. Biol.*, **10(9)**, e1003796 (2014).
- [26] E. TIBAU, M. VALENCIA, J. SORIANO, Identification of neuronal network properties from the spectral analysis of



- calcium imaging signals in neuronal cultures. *Front. Neural Circuits*, **7**(December), 199 (2013).
- [27] C. GRIENBERGER, A. KONNERTH, Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, **73**(5), 862-885 (2012).
- [28] B. WHEELER, G. BREWER, Designing neural networks in culture. *Proc. IEEE*, **98**(3) (2010).
- [29] O. FEINERMAN, A. ROTEM, E. MOSES, Reliable neuronal logic devices from patterned hippocampal cultures. *Nat. Phys.*, **4**(12), 967-973 (2008).
- [30] A. G. BLANKENSHIP, M. B. FELLER, Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**(1), 18-29 (2010).
- [31] M. M. SYED, S. LEE, S. HE, Z. J. ZHOU, Spontaneous waves in the ventricular zone of developing mammalian retina. *J. Neurophysiol.*, **91**(5), 1999-2009 (2004).
- [32] E. WARP, G. AGARWAL, C. WYART, D. FRIEDMANN, C. S. OLDFIELD, A. CONNER, F. DEL BENE, A. B. ARRENBURG, H. BAIER, E. Y. ISACOFF, Emergence of patterned activity in the developing zebrafish spinal cord. *Curr. Biol.*, **22**(2), 93-102 (2012).
- [33] B. Q. MAO, F. HAMZEI-SICHANI, D. ARONOV, R. C. FROEMKE, R. YUSTE, Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron*, **32**(5), 883-898 (2001).
- [34] D. A. WAGENAAR, J. PINE, S. M. POTTER, An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.*, **7**, 11 (2006).
- [35] E. M. IZHIKEVICH, Simple model of spiking neurons. *IEEE Trans. Neural Netw.*, **14**(6), 1569-1572 (2003).
- [36] A. L. HODGKIN, A. F. HUXLEY, A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, **117**(4), 500-544 (1952).
- [37] Y. HE, A. EVANS, Graph theoretical modeling of brain connectivity. *Curr. Opin. Neurol.*, **23**(4), 341-350 (2010).
- [38] O. SPORNS, Structure and function of complex brain networks. *Dialogues Clin. Neurosci.*, **15**(3), 247-262 (2013).
- [39] K. J. FRISTON, Functional and effective connectivity: a review. *Brain Connect.*, **1**(1), 13-36 (2011).
- [40] O. STETTER, D. BATTAGLIA, J. SORIANO, T. GEISEL, Model-free reconstruction of excitatory neuronal connectivity from calcium imaging signals. *PLoS Comput. Biol.*, **8**(8), e1002653 (2012).
- [41] M. RUBINOV, O. SPORNS, Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. *Neuroimage*, **52**(3), 1059-1069 (2010).
- [42] O. COHEN, A. KESELMAN, E. MOSES, M. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, J. SORIANO, T. TLUSTY, Quorum percolation in living neural networks. *EPL (Europhysics Lett.)*, **89**(1), 18008 (2010).
- [43] J. SORIANO, M. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, T. TLUSTY, AND E. MOSES, Development of input connections in neural cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**(37), 13758-13763 (2008).
- [44] K. WIESENFELD, F. MOSS, Stochastic resonance and the benefits of noise: from ice ages to crayfish and SQUIDS. *Nature*, **373**(6509), 33-36 (1995).
- [45] D. F. RUSSELL, L. A. WILKENS, F. MOSS, Use of behavioural stochastic resonance by paddle fish for feeding. *Nature*, **402**(6759), 291-294, (1999).