

MIDIENDO EL PASO DEL TIEMPO CON VARIOS CRONÓMETROS NEURONALES

HUGO MERCHANT

*Instituto de Neurobiología, UNAM
Campus Juriquilla, Qro.*

INTRODUCCIÓN

El tiempo es una variable fundamental en la conducta y por lo tanto, los organismos han desarrollado diferentes estrategias para cuantificar el paso del tiempo en una escala muy grande de duraciones que cubren desde los microsegundos hasta los ritmos circádicos (Karmarkar y Buonomano, 2007). Por ejemplo, los retardos axonales interaurales en la escala de los microsegundos son críticos para las conductas de ecolocación, mientras que la actividad del núcleo supraquiasmático regula de manera circádica diferentes variables fisiológicas, incluyendo al ciclo sueño-vigilia (figura 1A). En la escala intermedia tenemos los rangos de los milisegundos y los segundos. En ambos casos el estudio de las bases neurobiológicas de la cuantificación del paso del tiempo es relativamente reciente y no se conoce con mucho detalle. Por lo tanto, desde el 2004 en nuestro laboratorio hemos empezado a estudiar los procesos asociados a la cuantificación del tiempo en la escala de los cientos de los milisegundos. En esta escala se desarrollan una serie de conductas interesantes, como es la intercepción de blancos en mo-

vimiento, la evitación de colisiones, la percepción y producción del lenguaje, así como la apreciación y ejecución musical (Merchant y Georgopoulos, 2006; Merchant *et al.*, 2008a, b; 2009; 2011a). De hecho, en todas estas conductas de alto orden se deben cuantificar de manera simultánea diferentes aspectos del paso del tiempo. En tareas de intercepción, por ejemplo, una de las variables más críticas a calcular es el tiempo requerido para que el blanco llegue a la zona de intercepción. A esto se le llama tiempo de contacto y está involucrado en prácticamente todos los deportes y en conductas dirigidas a evitar colisiones (Merchant *et al.*, 2004; figura 1B). En otros casos, lo que se tiene que procesar es más bien el tiempo transcurrido con respecto a un evento particular y esto es obvio en tareas donde hay vocalización (figura 1C). Finalmente, hay ocasiones en las que los sujetos necesitan cuantificar de manera abstracta el tiempo, como sucede con los músicos profesionales que pueden representar de manera abstracta los intervalos que hay entre las notas de una melodía (figura 1D).

NEUROFISIOLOGÍA DEL PROCESAMIENTO TEMPORAL

Diferentes estudios de imagen funcional de pacientes con lesiones cerebrales o con enfermedades neurodegenerativas, así como de psicofísica en sujetos normales han sugerido la existencia de un mecanismo general de procesamiento temporal (Buhusi y Meck, 2005; Ivry y Schlerf, 2008). Éste es un mecanismo que puede estar involucrado en una amplia gama de tareas donde se cuantifica el tiempo, tanto de nivel perceptual como de nivel motor, y que tiene un carácter multimodal (Merchant *et al.*, 2008a,b; 2011a). Se ha observado que las áreas cerebrales que se activan sistemáticamente durante la cuantificación temporal en varios con-

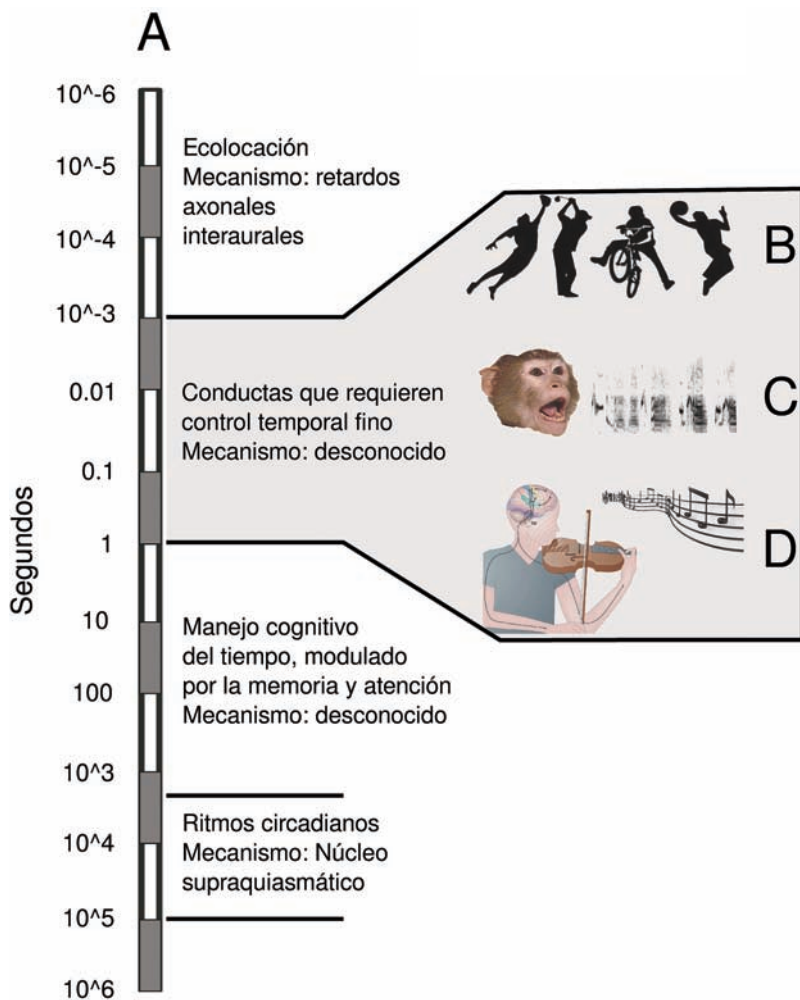


FIGURA 1

Escalas temporales. **A**, escalas de tiempo para las cuales los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de procesamiento. **B**, conductas de intercepción donde se cuantifica el tiempo restante para una acción. **C**, las vocalizaciones dependen del procesamiento del tiempo transcurrido desde un evento sensorial. **D**, los músicos profesionales codifican de manera abstracta los intervalos entre las notas de una melodía. Las conductas de B a D se llevan a cabo en cientos de milisegundos.

textos son el área motora suplementaria y presuplementaria de la cara medial del lóbulo frontal, la corteza parietal posterior, la corteza prefrontal dorsolateral, así como los ganglios basales y el cerebelo (figura 2) (Lewis y Miall, 2003). Por lo tanto, este circuito de áreas estrechamente conectadas puede ser la red neuronal dedicada al procesamiento del paso del tiempo. Sin embargo, existen muy pocos datos sobre cómo funciona este circuito a nivel electrofisiológico. Así, en nuestro laboratorio decidimos diseñar un programa de investigación para determinar las propiedades funcionales de diferentes áreas del circuito ganglios basales-corteza-tálamo durante la ejecución de secuencias motoras con una estructura temporal muy estricta.

CORRELATOS NEURONALES DE LA ESTRUCTURA SECUENCIAL Y TEMPORAL DE LA CONDUCTA MOTORA

Entrenamos dos monos en un paradigma de producción de intervalos múltiples llamado tarea de sincronización-continuación. En esta tarea, al principio de cada ensayo, el mono debía colocar su mano en una palanca y mantenerla allí por un intervalo variable de tiempo, después del cual se presentaba una secuencia de estímulos breves (33 ms) con intervalos constantes entre ellos (figura 3A). Entonces, el animal tenía que oprimir un botón de manera sincrónica con los estímulos, produciendo así tres intervalos y después debía seguir temporalizando su conducta por otros tres intervalos, pero ya sin el beneficio de la guía sensorial (figura 3B). El animal recibía una recompensa en forma de unas gotas de líquido si el error de sus respuestas temporales era menor a un valor determinado. Por lo tanto, ésta es una tarea que tiene una fase en la que se temporalizan las respuestas con base en un metrónomo sensorial seguida de una

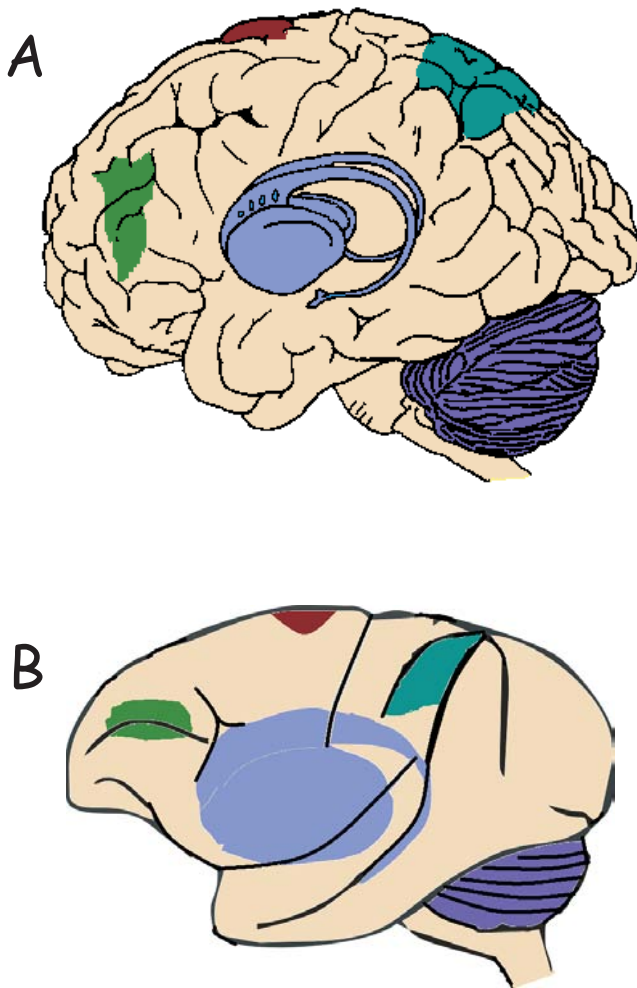


FIGURA 2

Circuito de procesamiento temporal en el humano **A**, y en el mono *Rhesus* **B**, las áreas premotoras mediales se ilustran en rojo, la corteza prefrontal en verde claro, la corteza parietal posterior en verde oscuro, los ganglios basales en morado claro y el cerebelo en morado oscuro.

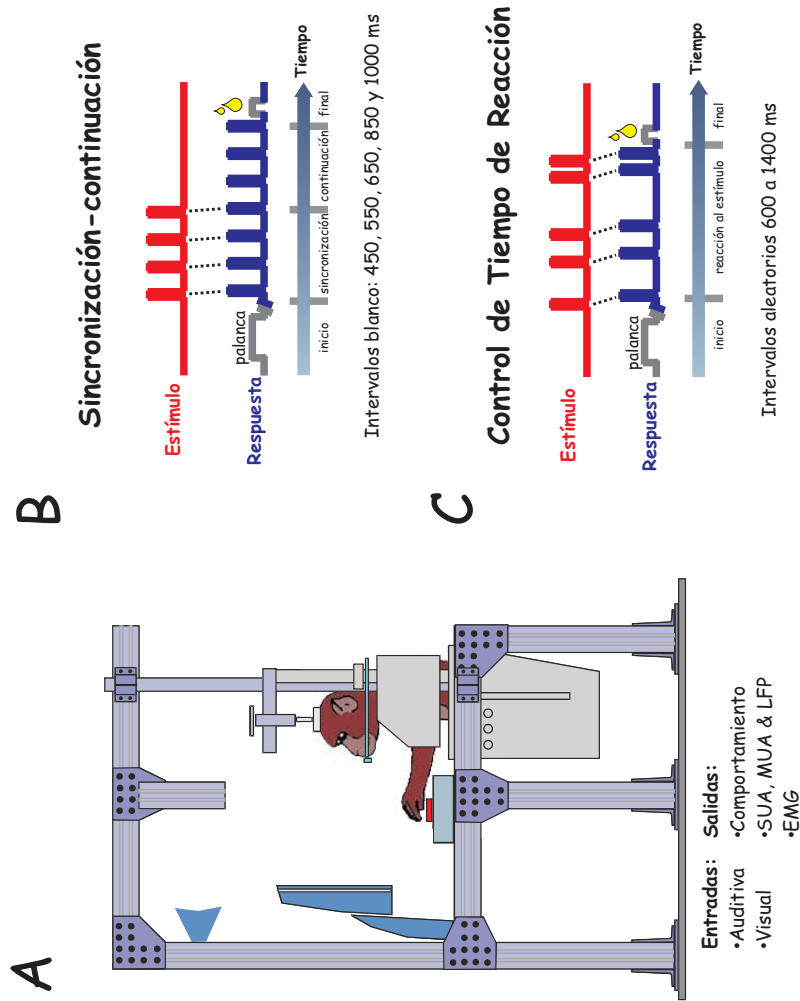


FIGURA 3

Paradigmas conductuales. **A**, infraestructura experimental para el registro de la conducta temporal y el registro electrofisiológico. SUA: actividad unitaria; MUA: actividad multiunitaria; LFP: potenciales locales de campo. **B**, tarea de sincronización-continuación. **C**, tarea control de tiempo de reacción secuencial.

fase en la que se temporalizan las respuestas de manera endógena, es decir, tenemos una fase de sincronización y una de continuación de la conducta temporal. Los intervalos que utilizamos tuvieron un rango entre los 450 y los 1,000 milisegundos con estímulos de la modalidad auditiva o visual. Adicionalmente, los monos fueron entrenados en una tarea control de tiempo de reacción en la cual los estímulos y las respuestas secuenciales de golpeteo del botón fueron prácticamente las mismas que en la tarea de sincronización-continuación. Sin embargo, en este caso los intervalos entre los estímulos fueron aleatorios, lo cual previno la temporalización explícita de la conducta motora (figura 3C).

La experiencia que hemos adquirido entrenando y registrando monos *Rhesus* nos ha enseñado que estos animales son excelentes para temporalizar intervalos únicos en diferentes contextos (Merchant y Perez, 2009). Sin embargo, fue sorprendente encontrar que los monos tuvieron muchos problemas para realizar la tarea de sincronización-continuación. Tardamos más de dos años en entrenar a los monos en este paradigma apropiadamente (Zarco *et al.*, 2009). Nuestra hipótesis en este sentido es que la producción de intervalos múltiples bien temporalizados no es parte del repertorio natural de conductas en el mono *Rhesus*. Por lo tanto, tuvimos que entrenar intensamente a los monos para que al fin pudieran ejecutar la tarea de sincronización-continuación. En contraste, este paradigma resulta fácil de realizar en los seres humanos. De manera congruente con nuestra hipótesis, estudios comparativos en diversas especies de vertebrados sugieren que sólo los animales con capacidad de vocalizar y de imitar pueden producir intervalos múltiples sincronizados a diferentes intervalos (Patel *et al.*, 2009). Los monos *Rhesus* no tienen la capacidad de imitar vocalizaciones.

Es importante hacer notar que una vez que logramos entrenar a los monos en la sincronización-continuación, su

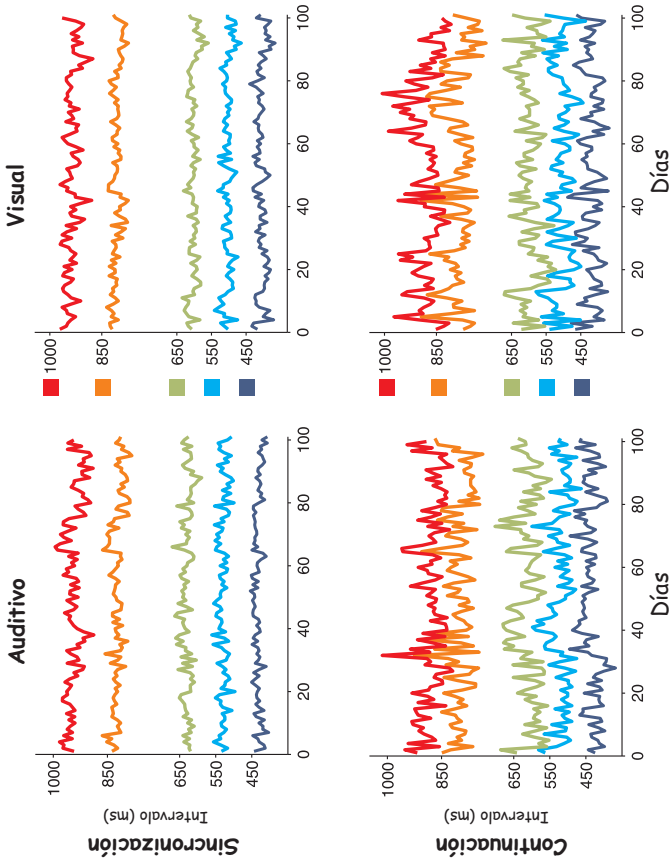


FIGURA 4

Promedio de los intervalos producidos por el mono I durante cien días para cada intervalo blanco en código de colores en la fase de sincronización (superior) y continuación (inferior), y para los estímulos auditivos (izquierda) y visuales (derecha). Modificado de Zarco *et al.*, 2009.

conducta fue bastante homogénea a lo largo de los días. En la figura 4 se muestra la duración promedio del intervalo producido en el primer mono a lo largo de cien días para los diferentes intervalos blanco que utilizamos ilustrados con un código de color. En la parte superior de la figura 4 se muestra la conducta para la fase de sincronización y en la inferior para la fase de continuación, con los estímulos auditivos a la izquierda y los visuales a la derecha. Es importante recalcar que la variabilidad de conducta en la fase de continuación fue más alta que en la fase de sincronización. Además, se observó un incremento lineal en la variabilidad de la temporalización en función de la duración del intervalo producido en ambas fases de la tarea (datos no mostrados, pero ver Zarco *et al.*, 2009). Dicho incremento lineal sigue la propiedad escalar de procesamiento temporal descrita en otras especies y en varios paradigmas conductuales (Gibbon *et al.*, 1997). Por lo tanto, los monos despliegan una conducta temporal similar a la descrita en otras especies.

Cuando los monos tuvieron una ejecución adecuada en la tarea, se empezó el registro electrofisiológico de la actividad extracelular del área presuplementaria y suplementaria utilizando un sistema de registro de siete canales (figura 5). En el presente artículo, estas áreas serán denominadas “premotoras mediales”. Los datos que se incluyen en este manuscrito provienen de una base de datos de más de mil neuronas registradas en los dos monos en las cuatro combinaciones de tareas que utilizamos. Sin embargo, los resultados se centrarán en la actividad neuronal asociada al procesamiento temporal durante la condición de estímulos auditivos.

Una de las propiedades más evidentes de las neuronas premotoras mediales fue su selectividad a la fase de la tarea de sincronización-continuación. Así, encontramos neuronas con actividad selectiva tanto durante la fase de sincro-

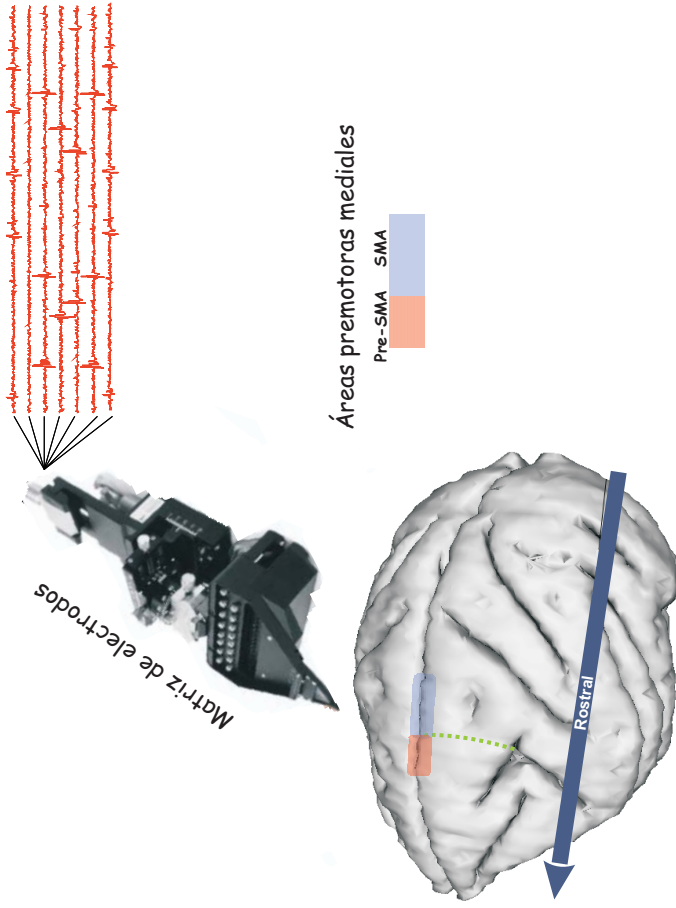


FIGURA 5

Esquema de la matriz de siete electrodos utilizados para registrar las señales electrofisiológicas del área motora (SMA) y pre-suplementaria (pre-SMA) junto con la ubicación de estas estructuras en la corteza cerebral del mono visualizada mediante resonancia magnética.

nización como en la de continuación (figura 3A). Esta propiedad se ejemplifica en las rasters de la figura 6, donde la neurona que se muestra a la izquierda tiene una actividad selectiva durante la fase de sincronización, mientras que la de la derecha es selectiva durante la fase de continuación. Estos son rasters para cada uno de los intervalos base probados con cinco ensayos por intervalo, que están alineados al primer movimiento de la fase de continuación (línea vertical gris gruesa), y donde los puntos grises representan los tiempos en el que el animal presionó el botón. Se ve claramente que la actividad selectiva de las neuronas es consistente a lo largo de las diferentes duraciones probadas. Por consiguiente, las respuestas diferenciales podrían estar asociadas a la cuantificación del paso del tiempo cuando los movimientos son guiados por estímulos externos o son internamente generados. Sin embargo, es importante aclarar que los grupos de Jun Tanji y Daeyeol Lee demostraron previamente que el área motora suplementaria codifica la estructura ordinal de las secuencias motoras (Tanji, 2001; Lee y Quessy, 2003). Así, las respuestas selectivas que registramos podrían estar vinculadas con la secuencia y no con la temporalización de la conducta durante la tarea de sincronización-continuación. Con el propósito de probar esta hipótesis, registramos las neuronas en la tarea secuencial de tiempo de reacción que diseñamos como control y que tiene una estructura ordinal similar a la sincronización-continuación, pero que impide la temporalización explícita de la conducta (figura 3C). Los resultados mostraron que la mayoría de estas neuronas no respondieron selectivamente durante la tarea control. Como se observa en el panel inferior de la figura 6, las dos neuronas con actividad selectiva durante la sincronización (izquierda) o durante la continuación (derecha) no mostraron respuestas diferenciales durante la tarea control. Además, realizamos un análisis de varianza sobre la población de neuronas registradas, el cual

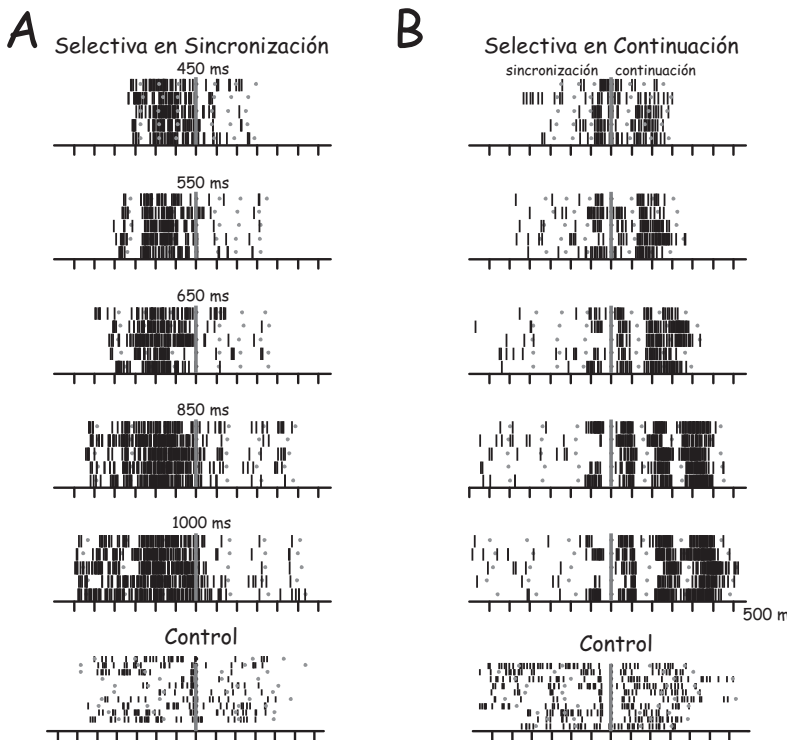


FIGURA 6

Rasters de dos neuronas con actividad selectiva durante la fase de sincronización **A**, o continuación **B**, cada línea vertical en el raster representa el tiempo de ocurrencia de un potencial de acción y cada fila corresponde a un ensayo en la tarea para una duración determinada. Los rasters están alineados con el primer movimiento de la fase de continuación (línea vertical gris gruesa) y los puntos grises ilustran los tiempos del golpeteo del botón. En la parte inferior se muestran los rasters de las mismas neuronas durante la tarea control de tiempo de reacción. En esta tarea los rasters están alineados al tercer movimiento. Modificado de Merchant *et al.*, 2011b.

mostró que la mayoría de las neuronas que tienen una actividad selectiva durante la tarea de sincronización-continuación no respondieron de la misma forma durante la tarea control (figura 7A). Estos hallazgos apoyan la idea de que una población importante de neuronas de las áreas premotoras mediales participan en el procesamiento de la información temporal cuando la conducta rítmica es guiada por un metrónomo sensorial o cuando es internamente generada. La figura 7B muestra la tasa de disparo promedio para las neuronas selectivas, para la sincronización en círculos vacíos y para la continuación en círculos llenos. Es evidente que estas neuronas muestran respuestas diferenciales muy pronunciadas en los extremos de la fase de sincronización o continuación, acompañadas de respuestas con un cambio gradual durante la transición entre la sincronización y la continuación (S3-C1 en la figura 7B). Es probable entonces que estas poblaciones interactúen para mantener el golpeteo del botón con una temporalidad homogénea a lo largo de todo el ensayo de la tarea.

Por otro lado, la intersección del diagrama de Venn ilustrado en la figura 7A apunta hacia la existencia de una población neuronal que efectivamente codifica para la estructura ordinal presente en ambas tareas, ya que estas neuronas respondieron selectivamente en los dos paradigmas. En conclusión, estos resultados sugieren que las áreas premotoras mediales representan en su actividad, tanto la estructura ordinal, como temporal de la conducta rítmica de la tarea de sincronización-continuación (Merchant *et al.*, 2011b). Un proceso similar podría ocurrir en otras conductas rítmicas como la ejecución musical.

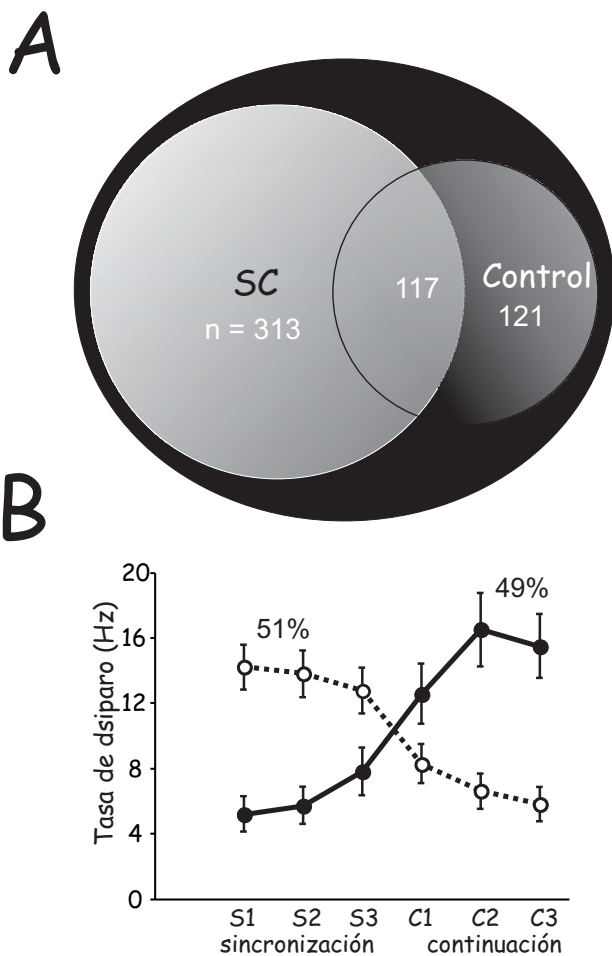


FIGURA 7

Análisis de la actividad selectiva para la fase de la tarea. **A**, diagrama de Venn de las neuronas con efectos significativos para una de las fases en la tarea de sincronización-continuación (SC, círculo gris grande) y la tarea control (círculo pequeño). **B**, tasa de disparo promedio de las neuronas selectivas durante la fase de sincronización (círculos abiertos, línea punteada) o la fase de continuación (círculos llenos, línea continua). S1 - S3 corresponden al primer y tercer intervalo de la sincronización y C1 - C3 corresponden al primer y tercer intervalo de la continuación. Modificado de Merchant *et al.*, 2011b.

ACTIVIDAD EN RAMPA QUE REPRESENTA EL TIEMPO RESTANTE PARA UNA ACCIÓN

La siguiente pregunta en este estudio fue: ¿cómo es que estas poblaciones neuronales se encargan de procesar información temporal cuando la conducta es guiada por estímulos externos *versus* cuando los movimientos son generados internamente? Es decir, ¿cómo es que las dos poblaciones de neuronas con respuestas selectivas durante la sincronización o la continuación codifican el paso del tiempo? Para resolver estas preguntas, lo primero que hicimos fue analizar la actividad de las neuronas antes de la inicialización del movimiento de golpeteo del botón. Rápidamente encontramos neuronas con respuestas motoras descritas muchas veces en la literatura de las áreas premotoras mediales (Tanji, 2001). Estas neuronas responden alrededor de doscientos milisegundos antes de la iniciación del movimiento, con un patrón de respuesta muy similar a lo largo de diferentes fases de la tarea y entre los distintos intervalos utilizados. En la figura 8A se muestra un ejemplo típico de una neurona con rampas motoras. En este caso, el raster está alineado a la línea vertical gris gruesa que corresponde al tiempo de ocurrencia del segundo golpeteo del botón en la fase de continuación. Es indudable que las respuestas de esta neurona son muy parecidas para todos los movimientos generados, independientemente de la fase de la tarea y del intervalo blanco utilizados (figura 8A).

Por otro lado, también encontramos un tipo de rampa temporal que presentó una modulación en su respuesta, tanto en magnitud como en duración, en función de la duración del intervalo blanco. Por ejemplo, la figura 8B muestra una neurona que modula la duración y magnitud de su tasa de disparo en función del intervalo. Este fenómeno es más evidente cuando se calculan las densidades de espigas

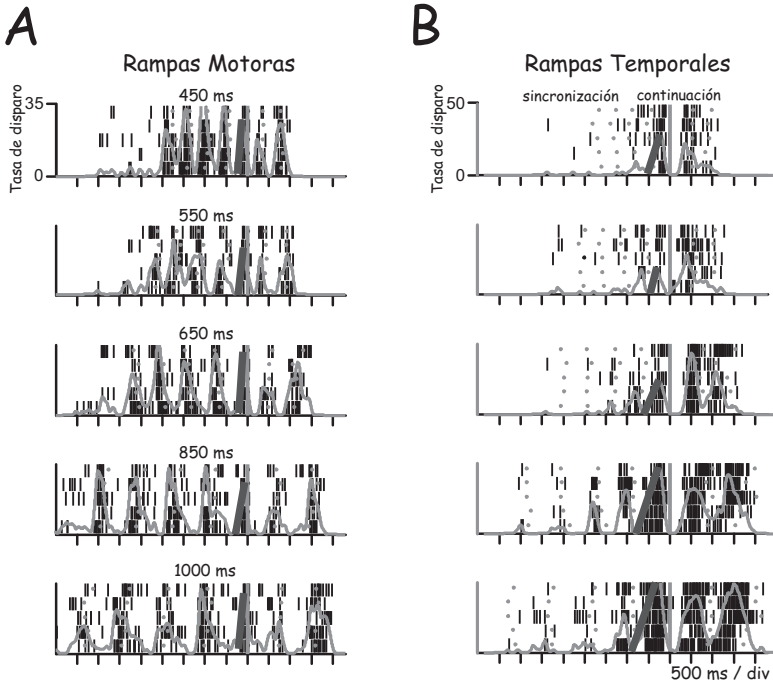


FIGURA 8

Actividad en rampa ascendente. **A**, raster de una neurona con rampas motoras alineado al segundo movimiento de la fase de continuación. **B**, raster de una neurona con rampas temporales. La línea gris claro en la base de cada raster corresponde a la función de densidad de espigas. La línea gruesa en gris oscuro corresponde al ajuste lineal de la actividad instantánea de la neurona antes del quinto movimiento en la tarea. Obsérvese que la pendiente de las rampas temporales se modifica en función del intervalo a producir, lo cual no sucede con las rampas motoras. Otras convenciones como en la figura 6. Modificado de Merchant *et al.*, 2011b.

(función continua que representa la actividad instantánea promedio, ilustrada como la línea gris clara que empieza en la base de los rasters de la figura 8). Posteriormente, se ajustó un modelo lineal a las densidades de espigas alineadas a la ejecución motora (línea gruesa color gris oscuro en la figura 8). Los resultados de las regresiones mostraron que tanto la duración como la pendiente de estas rampas, pueden ser moduladas en función de la duración de los intervalos generados. Con el fin de cuantificar este fenómeno de una manera sistemática, desarrollamos un algoritmo iterativo que genera el mejor modelo lineal para representar la actividad instantánea de las neuronas en nuestra tarea (Merchant *et al.*, 2011b). Esta herramienta cuantitativa nos permitió caracterizar de manera independiente las respuestas en rampa de las neuronas durante la producción de cada uno de los intervalos en la tarea de sincronización-continuación.

Utilizando este algoritmo encontramos neuronas que mostraron cambios sistemáticos en su tasa de disparo instantánea en función del intervalo. En la figura 9A se muestra el raster de una neurona con respuestas selectivas durante la fase de sincronización cuya actividad en rampa claramente incrementa su duración en función del intervalo blanco. El cálculo de las respuestas en rampa obtenidas por nuestro algoritmo se muestra en el panel B de la misma figura, donde es evidente que existe un incremento en la duración y un decremento en la pendiente de las rampas en función de la duración del intervalo blanco. Estas respuestas, además, tienden a alcanzar su máximo pico de actividad en un instante similar antes de la generación del movimiento para todas las duraciones (figura 9B; Merchant *et al.*, 2011b). De manera interesante, estas propiedades funcionales han sido descritas previamente en neuronas que codifican el tiempo restante para la ejecución de un

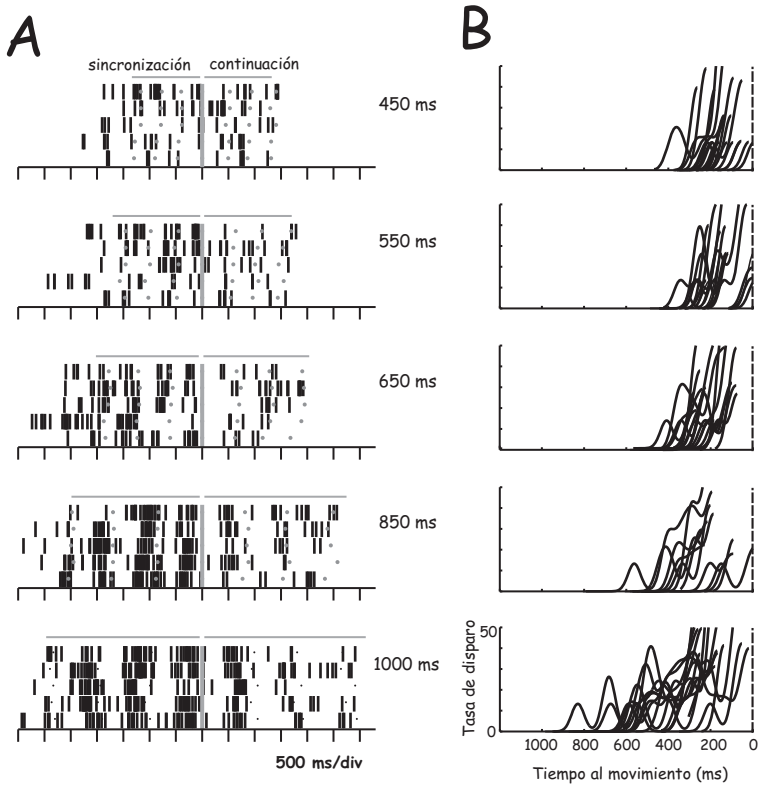


FIGURA 9

Raster de una neurona con actividad selectiva durante la fase de sincronización A, y sus rampas correspondientes detectadas con el algoritmo iterativo B.

movimiento temporalizado (Merchant *et al.*, 2009). Por lo tanto, los resultados sugieren que las neuronas con rampas temporales de nuestro estudio podrían cuantificar el tiempo que falta para disparar el comando motor de ejecución del movimiento de golpeteo del botón; de tal forma que, cuando su actividad en rampa alcanza un umbral particular, este comando motor es generado.

Posteriormente, ubicamos las neuronas que modularon sus respuestas en rampa de manera significativa, mostrando un incremento en la duración y un decremento en la pendiente en función del intervalo blanco, como se mostró anteriormente. Las rampas de todas estas neuronas se ilustran en la figura 10A, que muestran una respuesta poblacional bastante compleja. Es claro que la duración de cada rampa no necesariamente abarca todo el periodo del intervalo y que el fin de las rampas, con respecto al inicio del tiempo del movimiento, puede variar de manera sustancial (figura 10A). Con el propósito de caracterizar estas respuestas variables de manera cuantitativa, primero se calculó la densidad de respuesta de la población. El panel B de la figura 10 muestra dicha densidad en código de color, donde se grafica el número de neuronas que responden a una tasa de disparo, en particular en un momento preciso con respecto a la iniciación del movimiento. Después, ajustamos una distribución normal de dos dimensiones, que adquiere una forma elipsoide, sobre estas densidades de actividad (figura 10B). La distribución normal en 2D representa al comportamiento gaussiano de la magnitud de las respuestas poblacionales en el tiempo. De las elipses podemos calcular una serie de parámetros útiles y estos parámetros se pueden caracterizar utilizando un solo valor, al cual le llamamos vector de distribución normal, y que corresponde al diámetro mayor de la elipse de distribución normal que ajustamos a las densidades (figura 11A). Dichos parámetros son: la duración de las respuestas poblacionales, la pendiente de actividad con respecto al tiempo, el pico máximo de actividad de la población y el tiempo en el que se adquiere este pico con respecto a la inicialización del movimiento (figura 11A).

Las densidades y sus correspondientes distribuciones normales fueron calculadas no sólo para los cinco interva-

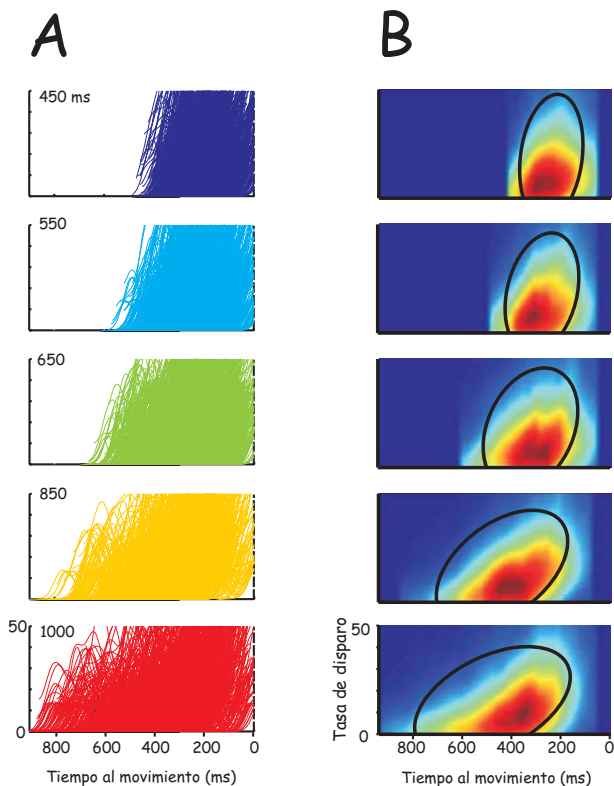


FIGURA 10

A, agrupamiento de todas las rampas de las neuronas con regresiones lineales que presentaron un incremento significativo en la duración y un decremento significativo en la pendiente de las rampas. Se muestran las rampas con diferente color para cada intervalo blanco. **B**, densidades del número de neuronas por tasa de disparo para diferentes instantes de tiempo con respecto al movimiento de golpeteo del botón. El código de color va de cero neuronas en azul oscuro hasta el máximo número de neuronas en rojo oscuro. Las elipses en negro corresponden a las distribuciones normales en 2D de las densidades correspondientes. La escala temporal y de tasa de disparo es la misma en A y B.

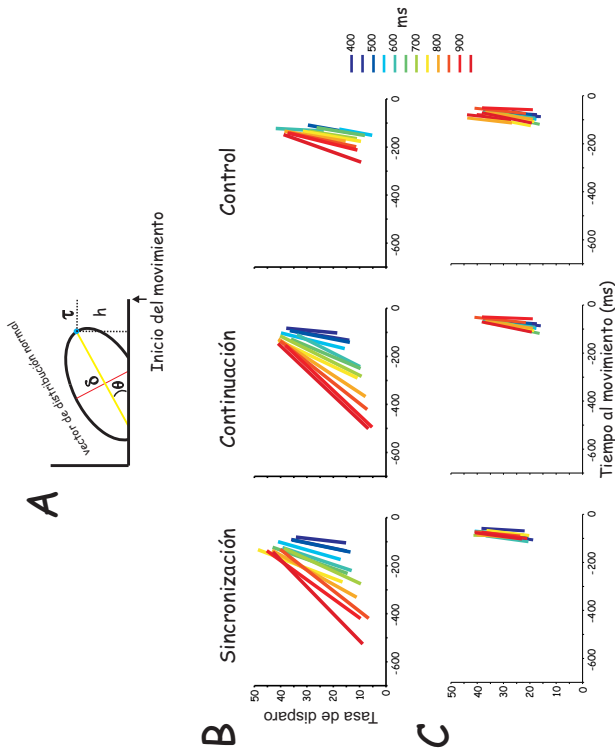


FIGURA 11

Vectores de distribución normal. **A**, diagrama de los parámetros que se extraen del vector de distribución normal que corresponde al diámetro mayor de la elipse de distribución normal en 2D, duración, pendiente, y h tiempo y magnitud del pico con respecto al inicio del movimiento, respectivamente. **B**, vectores de distribución normal para las neuronas con rampas temporales positivas durante la sincronización, continuación y la tarea control. **C**, vectores de distribución normal para las neuronas motoras durante la sincronización-continuación y la tarea control. La escala de color asociada con la duración de los intervalos producidos se muestra en la extrema derecha.

los blanco, que constituyen el tiempo teórico que procesaron los animales, sino también para los intervalos que realmente produjeron los monos durante la tarea. Esto implica que las rampas de actividad fueron asignadas a los intervalos producidos por los monos durante su registro electrofisiológico, dividiendo los intervalos producidos de 400 a 950 milisegundos en pasos de 50 ms. En la figura 11B se muestran en código de color los vectores de distribución normal para los intervalos producidos durante la sincronización y la continuación, así como para la tarea control. Se observa que los vectores muestran un incremento sistemático en su duración y un decremento en su pendiente en función de la duración del intervalo producido. Además, los vectores alcanzan su pico de actividad en un momento similar para todas las duraciones. Estos resultados no sólo ratifican la idea de que este tipo de rampas de actividad ascendente codifica el tiempo restante para la ejecución del movimiento, sino que también enfatizan la necesidad de un código poblacional para la representación precisa de esta variable en las áreas premotoras mediales del primate. De manera interesante, las mismas neuronas no mostraron este patrón de actividad durante la tarea control, en la cual no existe figura 11B panel derecho). En contraparte, las rampas motoras mostraron vectores de distribución normal muy similares entre fases de la tarea de sincronización-continuación, entre las dos tareas, y entre las duraciones de los intervalos producidos (figura 11C). Estos hallazgos sugieren que las rampas motoras codifican para las variables dinámicas y cinemáticas del movimiento del golpeteo del botón y que este movimiento estereotipado no varía en función de los parámetros de las tareas.

Resumiendo, existe un grupo de neuronas en las áreas premotoras mediales que muestran una actividad ascendente en rampa, cuya duración incrementa y su pendiente

disminuye en función del intervalo producido. Se sugiere que cuando dicho grupo neuronal alcanza un umbral de actividad, se dispara el comando de ejecución del movimiento. Éste es un correlato neural de índole poblacional de la cuantificación del tiempo que resta para una acción motora (Merchant *et al.*, 2011b).

UN RELOJ NEURONAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL TIEMPO TRANSCURRIDO

Utilizando el mismo algoritmo iterativo, encontramos otra población de neuronas que mostraron una disminución lineal en su actividad instantánea cuando las respuestas se alinearon al inicio de cada estímulo. Estas rampas también tuvieron un patrón variable de actividad de ensayo a ensayo en la tarea, por lo que decidimos analizarlas nuevamente con un enfoque poblacional. La figura 12 muestra los vectores de distribución normal de las neuronas con rampas negativas para los cinco intervalos blanco. Se puede observar que las rampas disminuyen su actividad en función del tiempo, tanto en la fase de sincronización donde el cero indica el tiempo de presentación del estímulo (figura 12A), como en la fase de continuación, donde el cero está asociado con un estímulo virtual de naturaleza interna (figura 12B). Es evidente que estas rampas con pendientes negativas muestran para todos los intervalos blanco un decremento sistemático en la tasa de disparo en función del tiempo transcurrido desde la presentación del estímulo. Esto implica que entre mayor sea la disminución en la actividad de estas neuronas, mayor es el tiempo transcurrido desde el estímulo. Por consiguiente, este patrón de actividad podría estar asociado al cálculo del tiempo transcurrido desde un evento sensorial relevante (Merchant *et al.*, 2011b).

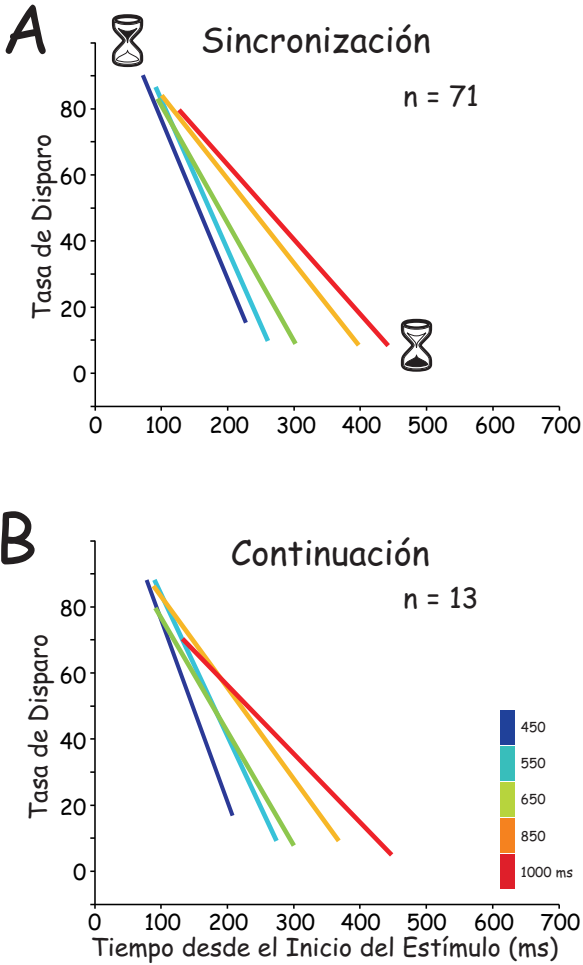


FIGURA 12

Vectores de distribución normal para las neuronas con rampas de actividad descendente cuando las respuestas se alinearon con la presentación del estímulo real durante la sincronización **A**, o con el estímulo virtual en la continuación **B**, estas neuronas miden el paso del tiempo transcurrido desde el estímulo como un reloj de arena (figurín en **A**), donde a menor actividad poblacional, mayor tiempo transcurrido.

En conclusión, nuestros experimentos sugieren la existencia de dos tipos de rampas temporales, uno que incrementa su tasa de disparo en función del tiempo y que podría estar involucrado en el cálculo del tiempo restante para la ejecución motora y otro que disminuye su actividad en función del tiempo, y que parecen funcionar como un reloj de arena, es decir, que conforme su actividad disminuye, se cuantifica el tiempo que ha transcurrido desde la presentación del estímulo. En ambos casos, es un requisito la integración poblacional de la actividad en rampa para obtener una codificación precisa del paso del tiempo, además, es muy posible que la interacción entre estos dos tipos de relojes neuronales sea fundamental para la expresión cíclica de la conducta motora en la tarea de sincronización-continuación (Merchant *et al.*, 2011b).

CODIFICACIÓN ABSTRACTA DEL TIEMPO: SINTONÍA NEURONAL A LA DURACIÓN DEL INTERVALO

Además de la actividad en rampa ascendente o descendente, las neuronas de las áreas premotoras mediales mostraron una propiedad interesante que refleja el procesamiento abstracto del paso del tiempo. Esta propiedad es la sintonía a la duración de los intervalos presentados en la tarea, es decir, las neuronas mostraron un cambio sistemático en su tasa de disparo global en relación a la duración de los intervalos. Por ejemplo, la figura 13A muestra una neurona que responde durante la fase de sincronización con una tasa de disparo mayor para los intervalos largos. En cambio, la figura 13B ilustra la actividad de otra neurona que responde selectivamente durante la fase de continuación, pero con una tasa de disparo mayor para los intervalos cortos. En la parte inferior de ambas figuras se muestra

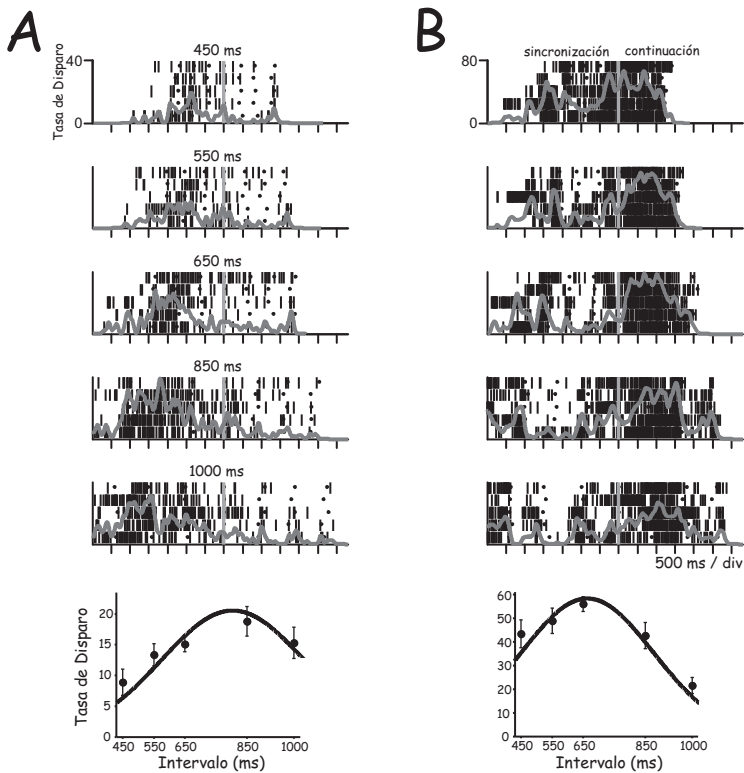


FIGURA 13

Rasters de actividad para dos neuronas sintonizadas a la duración de los intervalos blanco. **A**, neurona con actividad selectiva durante la sincronización que responde principalmente durante los intervalos largos. **B**, neuronal con respuestas selectivas a la fase de continuación que responde con mayor tasa de disparo para los intervalos cortos. En la parte inferior de ambos paneles se muestra la tasa de disparo global de las neuronas en función de los cinco intervalos blanco. En negro se despliega el ajuste gaussiano sobre los datos que define la función de sintonización. Modificado de Merchant *et al.*, 2012.

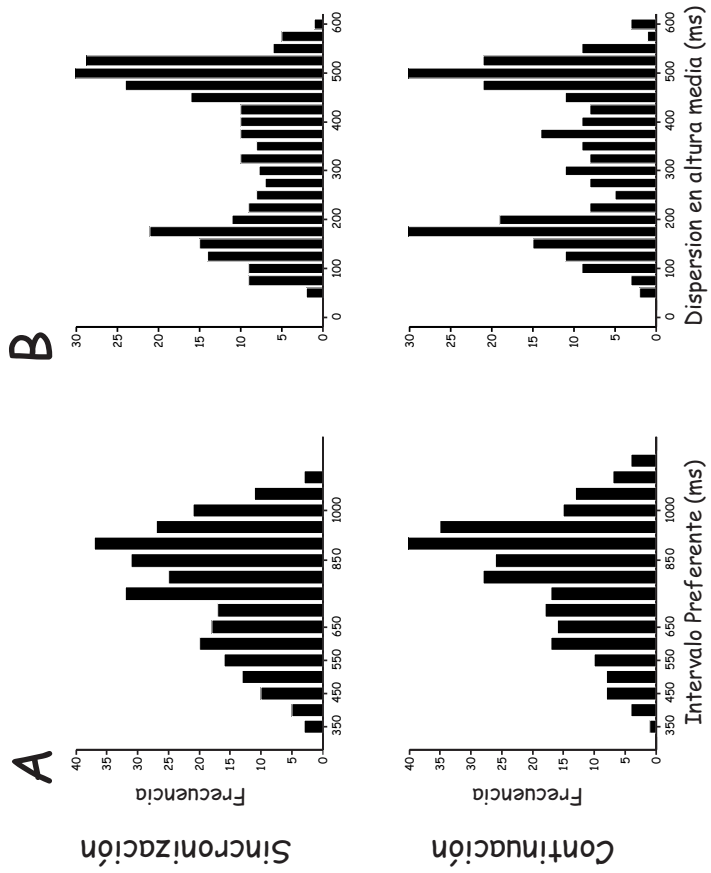


FIGURA 14

Distribuciones de los intervalos preferentes A, y la dispersión en altura media de las curvas de sincronización B, para la población de neuronas con ajustes gaussianos significativos en las áreas premotoras mediales. En el panel superior se muestran los datos para la fase de sincronización y en la inferior para la fase de continuación. Modificado de Merchant *et al.*, 2012.

la función de sintonización para las dos neuronas, donde se grafica la tasa de disparo en relación al intervalo blanco y posteriormente se ajusta una función gaussiana a los datos. La función gaussiana permite calcular dos parámetros importantes de la sintonización. El primero es el intervalo preferente de la neurona que corresponde al intervalo asociado a la máxima tasa de disparo de las neuronas, y el segundo es la dispersión o la especificidad de las respuestas con respecto al tiempo. Este tipo de representación neuronal también implica un código poblacional, en el cual el intervalo preferente de cada neurona tiene una contribución que es ponderada tanto por la magnitud de la respuesta en el intervalo preferente, como por la dispersión de la función de sintonización (Georgopoulos *et al.*, 1986). Por lo tanto, la cuantificación abstracta de la magnitud de un intervalo depende de una población de neuronas, cuyos intervalos preferentes deben cubrir todas las duraciones posibles en el rango de tiempo utilizado (Merchant *et al.*, 2012). Efectivamente, al graficar la distribución de los intervalos preferentes de la población, se observa que las neuronas cubren todos los intervalos cuantificados en la tarea, aunque es obvio que existe un sesgo importante para los intervalos largos (figura 14A). Con respecto a la especificidad o dispersión de la curva de sintonización, encontramos que ésta tiene una distribución bimodal con picos para las dispersiones extremas (figura 14B).

En conclusión, una población de neuronas de las áreas premotoras mediales se sintoniza a la duración de los intervalos en ambas fases de la tarea. Ésta es una representación abstracta de la magnitud de los intervalos que necesita de una población de neuronas sintonizadas a un rango amplio de duraciones para poder representar todos los intervalos posibles.

CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro programa de investigación en la tarea de sincronización-continuación sugieren que las áreas premotoras mediales participan activamente en la cuantificación de diferentes aspectos del paso del tiempo. Por un lado, registramos neuronas cuya actividad instantánea presenta un patrón en rampa con pendientes positivas o negativas. Nuestros hallazgos demuestran que las neuronas con actividad ascendente codifican el tiempo restante para la ejecución motora, de tal manera que cuando su actividad alcanza un valor umbral, se dispara el comando motor para el golpeteo del botón. Además, las neuronas con actividad descendente funcionan como relojes de arena, representando con la disminución en su tasa de disparo instantánea, el tiempo transcurrido desde la presentación de un estímulo. Los dos tipos de respuestas en rampa parecen estar asociados a la cuantificación del tiempo de manera dinámica, donde el resultado de la codificación neuronal afecta directamente la ejecución en línea de los sujetos en la tarea. En contraparte, también encontramos una señal neurofisiológica que representa de manera abstracta la magnitud del intervalo cuantificado, es decir, registramos una población de neuronas sintonizadas a la duración del intervalo. La distribución de intervalos preferentes en estas neuronas cubre todos los intervalos utilizados.

Los tres tipos de cronómetros neuronales son de índole poblacional y posiblemente interactúen de manera compleja durante el desarrollo de conductas con un componente rítmico, como es la tarea de sincronización-continuación. Más aún, nuestros resultados nos permiten sugerir que el peso de estos tres cronómetros neuronales en la cuantificación temporal es contexto dependiente. Así, en una tarea de intercepción, las neuronas que calculan el tiempo restante para la acción tendrán un peso mayor, mientras que

en una tarea de categorización de intervalos, las neuronas sintonizadas a la magnitud del intervalo tendrán un papel más preponderante. Es evidente que nuevos experimentos son necesarios para probar estas hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la colaboración de Wilbert Zarco, Oswaldo Pérez, Ramón Bartolo, Juan Carlos Méndez, Germán Mendoza, Jorge Gámez y Luis Prado. Se agradece la ayuda experta en la adquisición de imágenes de resonancia magnética de Juan José Ortiz y la asistencia técnica de Raúl Paulín. Este trabajo fue apoyado parcialmente por los donativos Conacyt: 053944, PAPIIT: IN20 6508 y FIRCA: TW007224-01A1.

REFERENCIAS

- BUHUSI CV & MECK WH (2005) What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:755-765.
- GEORGOPOULOS AP, SCHWARTZ AB & KETTNER RE (1986). Neuronal population coding of movement direction. *Science* 233:1416-1419.
- GIBBON J, MALAPANI C, DALE CL & GALLISTEL C (1997) Toward a neurobiology of temporal cognition: advances and challenges. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:170-184.
- IVRY RB & SCHLERF JE (2008) Dedicated and intrinsic models of time perception. *Trends Cogn. Sci.* 12:273-280.
- KARMARKAR UR & BUONOMANO DV (2007) Timing in the absence of clocks: encoding time in neural network states. *Neuron* 53:427-438.
- LEE D & QUESSY S (2003) Activity in the supplementary motor area related to learning and performance during a sequential visuo-motor task. *J. Neurophysiol.* 89:1039-1056.
- LEWIS PA & MIALL RC (2003) Distinct systems for automatic and cognitively controlled time measurement: evidence from neuroimaging. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:250-255.

- MERCHANT H & GEORGOPOULOS AP (2006) Neurophysiology of perceptual and motor aspects of interception. *J. Neurophysiol.* 95:1-13.
- MERCHANT H, BATTAGLIA-MAYER A & GEORGOPOULOS AP (2004) Neural responses during interception of real and apparent circularly moving targets in Motor Cortex and Area 7a. *Cereb Cortex* 14:314-331.
- MERCHANT H, ZARCO W & PRADO L (2008)a. Do we have a common mechanism for measuring time in the hundreds of millisecond range? Evidence from multiple-interval timing tasks. *J. Neurophysiol.* 99:939-949.
- MERCHANT H, ZARCO W, BARTOLO R & PRADO L (2008)b. The context of temporal processing is represented in the multidimensional relationships between timing tasks. *PLoS ONE* 3(9) e3169: 1-9.
- MERCHANT H, ZARCO W, PRADO L & PEREZ O (2009) Behavioral and neurophysiological aspects of target interception. *Adv. Exp. Med. Biol.* 629:201-220.
- MERCHANT H & PEREZ O (2009). Neurophysiology of interceptive behavior in the primate: encoding and decoding target parameters in the parietofrontal system. Coherent Behavior in Neural Networks. Josic K., Matias M., Romo R., Rubin J. (Eds). *Springer Series in Computational Neuroscience* Vol 3, New York. Cap 10. pp 191-206.
- MERCHANT H, ZARCO W, PEREZ O, PRADO L & BARTOLO R (2011) Measuring time with different neural chronometers during a synchronization-continuation task *PNAS* 108(49):19784-19789.
- PATEL AD, IVERSEN JR, BREGMAN MR & SCHULZ I (2009) Experimental evidence for synchronization to a musical beat in a nonhuman animal. *Curr. Biol.* 19:827-830.
- TANJI J (2001) Sequential organization of multiple movements: involvement of cortical motor areas. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:631-651.
- ZARCO W, MERCHANT H, PRADO L & MENDEZ JC (2009) Subsecond timing in primates: comparison of interval production between human subjects and rhesus monkeys. *J. Neurophysiol.* 102:3191-202.