



***Participación de las áreas motoras de la corteza cerebral
en la toma de decisiones durante la percepción de
estímulos vibrotáctiles***

Presenta: Adrián Hernández Alva

Director: Dr. Ranulfo Romo Trujillo.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo a:

Norma Isabel Ortega Martínez

Quien un día decidió compartir sus sueños y su vida conmigo. Nuestro camino no ha sido fácil, pero su amor, su pasión y amistad han hecho realidad muchas de nuestras metas.

También lo dedico a nuestra hija

Isabel Cindy Hernández Ortega

Porque a pesar de su rebeldía y su corta edad, valora nuestros consejos, nuestro ejemplo, así como lo poco o mucho que le podemos dar.

**Adrián Hernández Alva
Mayo del 2008**

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales quien además de ser un maestro y guía, también ha sido un gran amigo. Le agradezco el tiempo y la dedicación empleada para revisar este documento.

También quiero agradecer muy especialmente a Jesús Manuel Álvarez López y Mónica Dafne García Granados por sus comentarios sobre este documento, por la especial amistad que nos une y por tantos momentos que hemos compartido.

A todos los compañeros de laboratorio: Luis Lemus, Rogelio Luna, Verónica Nacher, Yuriria Vázquez, Leidy Ana Colín, Liliana Camarillo y Jannet Guerrero quienes con su vitalidad y compañerismo hacen agradable la actividad del laboratorio.

Agradezco a los miembros del jurado de examen de grado, los doctores María Corsi Cabrera, José Bargas Díaz, Ismael Jiménez Estrada, Hugo Merchant Nancy, Gabriel Gutiérrez Ospina y Rafael Gutiérrez Aguilar por el tiempo dedicado a la revisión y los excelentes comentarios con los que este trabajo se ha beneficiado.

Este proyecto es solo una parte de un gran esfuerzo realizado por el Dr. Ranulfo Romo para entender como funciona el cerebro. Agradezco sinceramente al Dr. Romo por brindarme la oportunidad de realizar investigación en neurociencias. También por la paciencia mostrada a lo largo de todos los años que trabajamos juntos.

Índice

Resumen.....	2
Introducción	4
La toma de decisiones.....	4
¿Cómo estudiar la toma de decisiones?.....	5
Antecedentes	7
Adquisición y representación interna de la frecuencia de estímulos vibrotáctiles.....	7
Correlatos neuronales asociados a la memoria de la frecuencia de estímulos vibrotáctiles.....	13
Participación de la corteza motora en la discriminación de frecuencias de estímulos vibrotáctiles	15
¿Dónde y cómo ocurre la toma de decisiones a partir de información táctil?	16
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	19
Objetivo:.....	19
Objetivos particulares:	19
Métodos.....	20
Resultados obtenidos en la corteza premotora medial	23
Discusión de resultados obtenidos en la corteza premotora medial.....	34
Resultados obtenidos en la corteza premotora ventral.....	36
Discusión de resultados obtenidos en la corteza premotora ventral	44
Conclusiones generales.....	45
Referencias.....	47
<u>Artículos donde se reportan estos resultados</u>	53

Resumen

De la capacidad de decidir correctamente depende nuestro bienestar e incluso nuestra supervivencia. Entender los procesos que soportan esta función del sistema nervioso es uno de los objetivos más ambiciosos de las neurociencias.

Hace cuatro décadas Vernon Mountcastle propuso un modelo experimental para estudiar la decisión. En ese modelo, un sujeto recibe dos estímulos vibrotáctiles y debe compararlos para establecer cual de los dos es de mayor frecuencia. El resultado de la comparación lo manifiesta al presionar uno de dos botones. El grupo de Mountcastle y posteriormente Ranulfo Romo y colaboradores han descrito actividad neuronal que explica donde y como se representa la frecuencia de los estímulos. Mas tarde, Romo y colaboradores mostraron como se almacena en memoria de trabajo la frecuencia del primer estímulo. Finalmente, Mountcastle y colaboradores describieron actividad en las áreas motoras que codifica la dirección del movimiento que se ejecuta para presionar los botones. Sin embargo, aún se desconoce cómo y dónde el flujo sensorial del primer y segundo estímulo concurren temporalmente en la corteza cerebral, para que la comparación de las dos magnitudes tenga lugar. También se desconoce cómo la señal resultante de la comparación se transforma en comandos motores.

Neuronas de las áreas premotoras del lóbulo frontal, responden a la aplicación de estímulos sensoriales (táctiles, auditivos o visuales) y participan en la planeación y generación de los movimientos a través de los cuales se manifiesta la decisión. En este trabajo, se usaron técnicas de análisis multivariable para estudiar la actividad de neuronas de monos rhesus entrenados para discriminar la frecuencia de dos estímulos vibrotáctiles. Los resultados muestran que distintas poblaciones de neuronas de las áreas premotora medial y ventral participan en la representación de la frecuencia de los estímulos vibrotáctiles; también en la retención en memoria de trabajo de la información del primer estímulo; así como en la integración (conurrencia temporal) de la información de los dos estímulos a comparar. Esto último, da lugar a una señal que indica cual de los dos estímulos fue mayor. Finalmente, otras neuronas de las mismas áreas, participan en la ejecución motora a través de la cual el mono manifiesta su decisión. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las áreas premotoras del lóbulo frontal participan en los procesos asociados con la toma de decisiones.

Adicionalmente, en este trabajo se comparó la participación de estas áreas premotoras, contra la de otras áreas corticales (cortezas somatosensorial primaria, secundaria y motora primaria) en la solución de la tarea. Esto permite proponer como ocurre el proceso de transmisión y transformación de información desde las áreas sensoriales, pasando por las áreas de asociación hasta llegar a las áreas motoras.

Summary

On the capacity of decision-making depends our well-being and our survival. Understanding the processes that support this function of the nervous system is one of the most ambitious objectives of the neuroscience.

Four decades ago, Vernon Mountcastle proposed an experimental model to study the decision. In this model, a subject receives two vibrotactile stimuli and should compare them to establish which one has the greater frequency; the result is indicated for pressing one of two buttons. The Mountcastle's group and recently Ranulfo Romo and colleagues have described neuronal activity that explains where and how the frequencies of the stimuli are represented. Romo has shown how the frequency of the first stimulus is stored in working memory. Finally, Mountcastle described activity in the motor areas associated to the direction of movement that is executed to press the buttons. Nevertheless, it is not even known how and where the sensorial flow of first and second stimuli, concurs temporarily in the cerebral cortex, for comparing the two magnitudes. Also it is not known how the resulting signal of the comparison is transformed into motor commands.

Neurons of the premotor areas of the frontal lobe respond to the application of sensorial stimuli (tactile, auditory or visual) and participate in planning and generation of the movements through the decision is indicated. In this work, techniques of multivariate analysis were used to study the activity of neurons of monkeys rhesus, who were trained to compare the frequency of two vibrotactil stimuli. The results show that different neural populations from the medial and ventral premotor areas participate in representation of the frequency of the vibrotactile stimuli and keeping in working memory information of the first stimulus. These neurons also participate in the integration of the information of the two stimuli, which gives rise to a signal that indicates which stimulus was greater. Some neurons of these areas have a role in the motor execution through which the monkey indicates the decision. Therefore, these results suggest that premotor areas of the frontal lobe participate in processes associated with the decision making.

Additionally, in this work it was compared the participation of the medial and ventral premotor areas, with regard to primary somatosensory cortex, secondary somatosensory cortex and primary motor cortex in the solution of the task. This allows proposing how occur the process of transmission and transformation of information from the sensorial areas, passing by the association areas until arriving at the motor areas.

Introducción

La toma de decisiones

Los seres humanos frecuentemente debemos tomar decisiones razonadas. Entendiendo por esto, realizar una elección forzada donde se deben evaluar dos o más alternativas y elegir entre ellas la más conveniente; o bien, llegar a una conclusión como resultado de una comparación. Incontables veces a lo largo de la vida, nos encontramos en situaciones críticas, donde debemos tomar decisiones, sabiendo que de las acciones elegidas dependerá nuestro éxito o fracaso, nuestro bienestar o nuestra ruina, y en casos extremos lo que esta en juego es nuestra vida o la de otros. Por lo tanto, de la capacidad de decisión depende nuestro bienestar e incluso nuestra existencia. No es extraño que Paul W. Glimcher haya sugerido que: “**El objetivo del sistema nervioso, en términos evolutivos, es tomar las decisiones que maximicen el bienestar del organismo**” (Glimcher, 2003).

Tomar decisiones es un proceso conductual. Una secuencia de eventos, donde primero adquirimos información relevante de dos o más alternativas. Ponderamos esa evidencia con la finalidad de maximizar una recompensa o disminuir un posible castigo. Finalmente, actuamos en consecuencia.

El sistema nervioso soporta las capacidades cognitivas de alto orden como tomar decisiones, la memoria y el aprendizaje. Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado hasta la fecha por numerosos grupos de neurocientíficos, aún se requiere mucho trabajo para responder cuestionamientos como los siguientes: ¿cuáles son las poblaciones de neuronas involucradas en la toma de decisiones?; ¿cuáles son los procesos que ocurren en esas neuronas?; ¿en qué forma interactúan entre si las neuronas de esas poblaciones durante la toma de decisiones?

Para realizar decisiones razonadas, asumimos que el sistema nervioso debe:

- 1) adquirir y representar mediante los órganos y estructuras sensoriales los atributos relevantes de las alternativas
- 2) mantener en memoria de corto o largo plazo la información sensorial de las distintas alternativas hasta que toda la evidencia se encuentre disponible
- 3) comparar o ponderar la información relevante de las alternativas de acuerdo al contexto en el que se requiere la decisión
- 4) manifestar, mediante las poblaciones motoras correspondientes, el resultado del proceso de decisión

¿Cómo estudiar la toma de decisiones?

Para estudiar la decisión, debemos forzar a un sujeto a elegir. Diversos grupos de investigadores han usado imágenes funcionales del cerebro humano para determinar las áreas que tienen actividad asociada con el proceso de decisión (O'Sullivan et al., 1994). Otra aproximación es la propuesta por la neurofisiología de sistemas usando técnicas electrofisiológicas. En este caso, mediante el estudio de la actividad eléctrica extracelular neuronal, se buscan los diferentes componentes de los procesos perceptivos que se generan en el cerebro.

Idealmente, los estudios sobre la fisiología de la decisión deberían dirigirse al estudio del cerebro humano. Sin embargo, al introducir microelectrodos en el cerebro se producen daños en los tejidos circundantes. Como alternativa, se utilizan como modelo experimental primates subhumanos entrenados, como es el caso de monos rhesus (*macaca mulatta*).

Mountcastle propuso un modelo experimental para estudiar la percepción de la frecuencia de estímulos vibrotáctiles. (Talbot et al., 1968; La Motte y Mountcastle., 1975; Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). En este modelo, se aplican sobre la yema de un dedo, dos vibraciones mecánicas de diferente frecuencia y separadas por un intervalo de tiempo. El sujeto que recibe los estímulos debe reconocer la frecuencia del primer estímulo y recordar esa información (mantenerla en memoria de corto plazo) hasta la presentación del segundo estímulo. Cuando esto ocurre, reconoce la frecuencia del segundo estímulo y procede a la comparación contra lo que recuerda del primer estímulo. Finalmente el sujeto debe indicar el resultado de su evaluación presionando un botón a su derecha si considera que la frecuencia del segundo estímulo es mayor que la del primero, o bien, un botón a su izquierda en el caso contrario.

Al comparar el umbral de discriminación de los monos rhesus contra el obtenido por seres humanos, el grupo de Mountcastle estableció que no existen diferencias significativas entre ambos casos. Este modelo experimental reúne los elementos necesarios para estudiar el proceso de la toma de decisiones.

Los trabajos con este modelo experimental han abarcado más de cuatro décadas de investigación y han revelado procesos fisiológicos asociados a:

- La transducción de la energía mecánica del estímulo vibrotáctil a potenciales de acción en los mecanorreceptores de la piel.

- La transmisión de la información generada en los mecanoreceptores hasta la corteza somatosensorial primaria (Talbot et al., 1968; La Motte y Mountcastle., 1975; Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997).
- El mantenimiento en memoria de corto plazo de la frecuencia del primer estímulo (Romo et al., 1999, Brody et al., 2002).
- La ejecución del movimiento a través del cual se manifiesta la decisión (Mountcastle et al., 1992).

Es decir, gracias al trabajo de varios grupos, se ha descrito actividad neuronal asociada a tres de los cuatro procesos necesarios para que se pueda dar la decisión basada en la evaluación de la información táctil. Sin embargo, aún se desconocía cómo y dónde el flujo sensorial de las diferentes alternativas concurre, espacial y temporalmente en el cerebro, para que la comparación tenga lugar. Tampoco sabemos, cómo la señal resultante de la comparación se transforma en comandos motores.

Antecedentes

Adquisición y representación interna de la frecuencia de estímulos vibrotáctiles

Mountcastle y colaboradores utilizaron como estímulo mecánico una onda senoidal cuya frecuencia fue variada entre 5 y 300 Hertz (La Motte y Mountcastle, 1975). En el rango de frecuencias de 5 a 60 Hertz los humanos perciben el estímulo mecánico como un ligero aleteo sobre los dedos (*flutter*, en inglés). Para este rango, estudiaron la respuesta de las fibras aferentes que inervan a los mecanoreceptores tipo Meissner. Estos mecanoreceptores presentan adaptación rápida (AR) a la presión suave y sostenida. Este grupo encontró que la respuesta de estas fibras replica la estructura periódica del estímulo. También encontraron que la tasa de disparo (número de potenciales de acción generados por segundo) de esas aferentes no estaba asociada al incremento de la frecuencia del estímulo. A partir de esos resultados establecieron la siguiente conclusión: a nivel de las aferentes primarias, existe una representación (código) de la frecuencia del estímulo en el periodo dominante de los intervalos entre los potenciales de acción de las fibras con adaptación rápida.

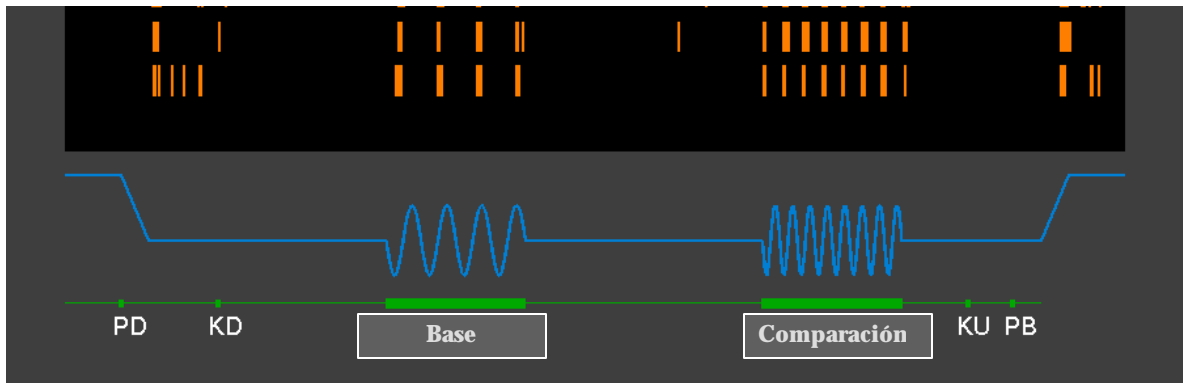


Fig. 1 Respuesta de una aferente primaria asociada a un mecanoreceptor de adaptación rápida. Estas respuestas fueron registradas en una aferente cuando el estímulo vibrotáctil se aplicó sobre su campo receptor. Cada línea vertical naranja indica el instante en que se registró un potencial de acción. La duración de los estímulos fue de 500 ms. Todas las líneas verticales de un mismo renglón corresponden a un ensayo. Se muestran dos ensayos donde el par de frecuencias fue 8 Hertz en el primer estímulo (también llamado estímulo base o f1) contra 16 Hertz en el segundo estímulo (también llamado estímulo de comparación o f2). Las respuestas muestran sincronía con la periodicidad del estímulo. Sin embargo, la tasa de disparo medida durante la aplicación del estímulo no se modula en función de la frecuencia.

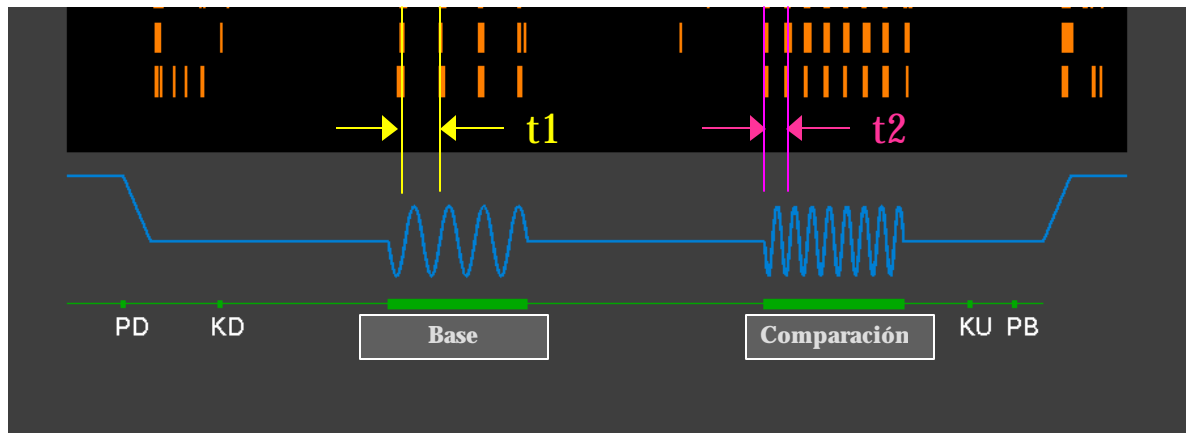


Fig. 2 Propuesta de Mountcastle y colaboradores sobre la representación de la frecuencia de los estímulos vibrotáctiles a nivel de las aferentes primarias. Se observa la capacidad de las aferentes primarias asociadas a mecanorreceptores de adaptación rápida (Meissner) para replicar la periodicidad del estímulo. Mountcastle propuso que al estimar el intervalo entre ráfagas consecutivas, el sistema nervioso puede determinar la frecuencia del estímulo. De acuerdo a esta propuesta el sistema nervioso puede comparar t_1 vs. t_2 (los periodos) para establecer que la frecuencia del segundo estímulo es mayor que la del primero.

Posteriormente, Mountcastle y colaboradores estudiaron como se transforma la información desde las aferentes primarias al transmitirse hasta las áreas sensoriales de la corteza cerebral. Para esto, registraron las respuestas de las neuronas de la corteza somatosensorial primaria (SI) en monos conscientes, mientras estos resolvían la tarea de discriminación de frecuencias (Mountcastle et al., 1990). En estos estudios se observó algo muy similar a los resultados de las aferentes primarias. Específicamente, encontraron neuronas cuya respuesta se sincronizó con la frecuencia del estímulo periódico, esto cuando el estímulo vibrotáctil fue aplicado directamente sobre el campo receptor de la neurona bajo estudio. Sin embargo, nuevamente reportaron que la tasa de disparo de estas neuronas no se moduló en función de la frecuencia del estímulo. Basándose en la capacidad de las neuronas para seguir la periodicidad del estímulo, la conclusión fue: para el rango del flutter, las estructuras más centrales a SI deben ser capaces de extraer la información de la frecuencia que se encuentra codificada en la periodicidad de la actividad de estas neuronas. Debe aclararse que casi veinte años después no se ha encontrado evidencia que soporte dicha propuesta.

Recientemente, Romo y colaboradores (Salinas et al., 2000; Hernández et al., 2000) abordaron nuevamente el problema con el objetivo de encontrar las estructuras y procesos anticipados por Mountcastle.

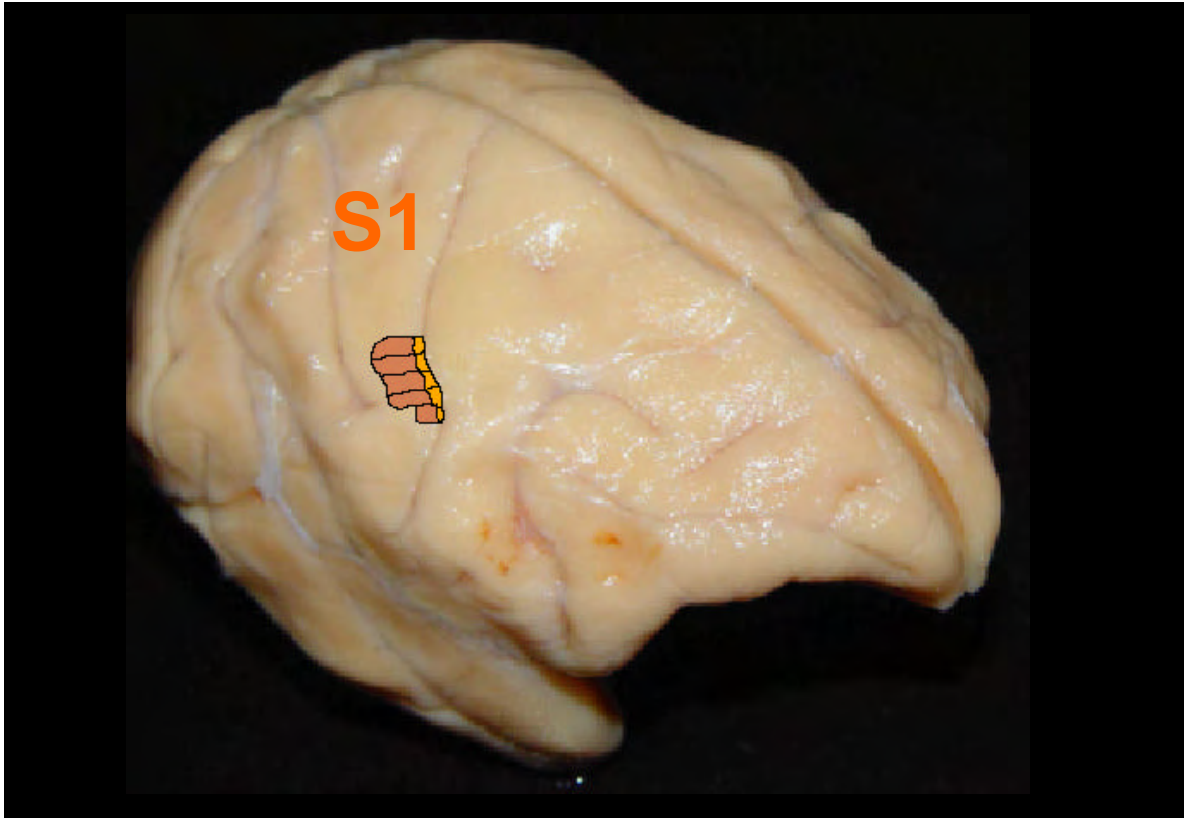


Fig. 3 Región de la corteza somatosensorial primaria del cerebro del mono rhesus que se activa al estimular mecánicamente los campos receptores asociados a los dedos de la mano izquierda.

Romo y colaboradores procedieron a registrar la actividad neuronal en la corteza SI de monos rhesus, cuando estos resolvían la tarea de discriminación de frecuencias. Como resultado de estos experimentos, se observó nuevamente la capacidad de las neuronas AR para replicar la dinámica del estímulo dentro del rango del flutter. Sin embargo, también se observaron (en oposición a lo descrito por Mountcastle), unidades que modularon su tasa de disparo en función de la frecuencia del estímulo (Salinas et al., 2000; Hernández et al., 2000). Es decir, este grupo demostró que en SI existen al menos dos posibles representaciones para codificar la frecuencia del estímulo.

Para tratar de identificar cuál de las dos representaciones es usada por el sistema nervioso para percibir la frecuencia del estímulo táctil, se realizaron análisis basados en la teoría de detección de señales (neurometría) y de psicometría con el objetivo de determinar la cantidad de información proporcionada por cada una de las neuronas estudiadas (Hernández et al., 2000). El resultado estableció que la cantidad de información codificada en la periodicidad permitiría en principio, que el sujeto obtuviera un desempeño diez veces mejor que el mostrado, mientras que la información presente en la tasa de disparo ajustaba con el desempeño mostrado por los primates.

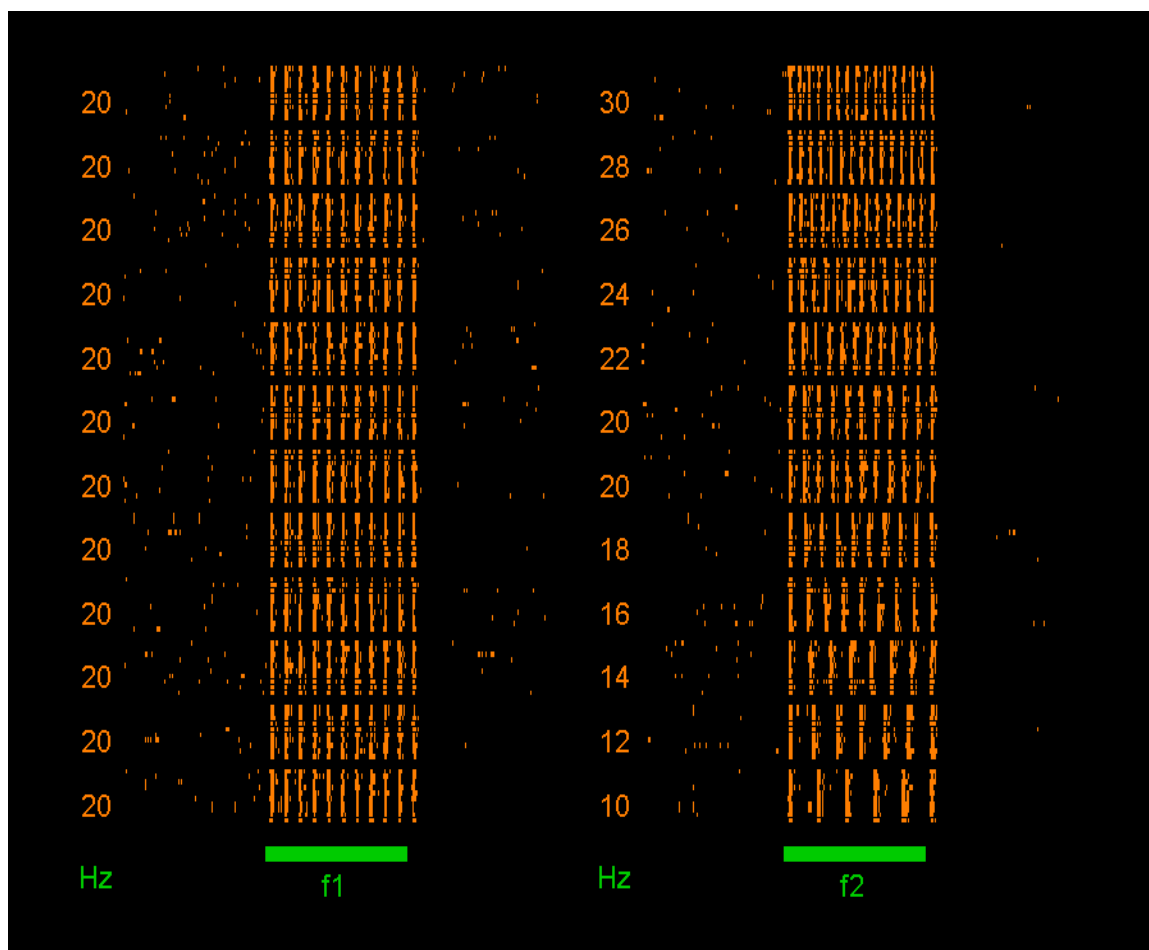


Fig. 4 Respuesta de una neurona de la corteza somatosensorial primaria asociada a la representación de la frecuencia del estímulo. Estas respuestas fueron registradas mientras el mono discriminaba la diferencia entre las frecuencias de los dos estímulos vibrotáctiles. El estímulo fue aplicado sobre el campo receptor de la neurona. Cada punto naranja indica el instante en que la neurona generó un potencial de acción. Todos los puntos de un mismo renglón corresponden a un ensayo, se muestran diez ensayos por cada par de frecuencias. Se emplearon 12 pares de frecuencias durante este experimento. Los diferentes ensayos fueron presentados en forma aleatoria, pero aquí fueron organizados en función de los pares de frecuencias correspondientes. La respuesta de la neurona muestra sincronía con la periodicidad del estímulo. Sin embargo la tasa de disparo de esta neurona no se modula en función de la frecuencia.

Otro experimento realizado por este grupo consistió en aplicar vibraciones mecánicas de las mismas frecuencias pero carentes de periodicidad; esto es, el mismo número de pulsos mecánicos pero distribuidos aleatoriamente en los 500 milisegundos que duran los estímulos. Los monos resolvieron esta nueva versión de la tarea, sin entrenamiento adicional y con un desempeño similar al mostrado con los estímulos periódicos (Romo et al., 1998). Esto puso en duda la conclusión establecida por Mountcastle.

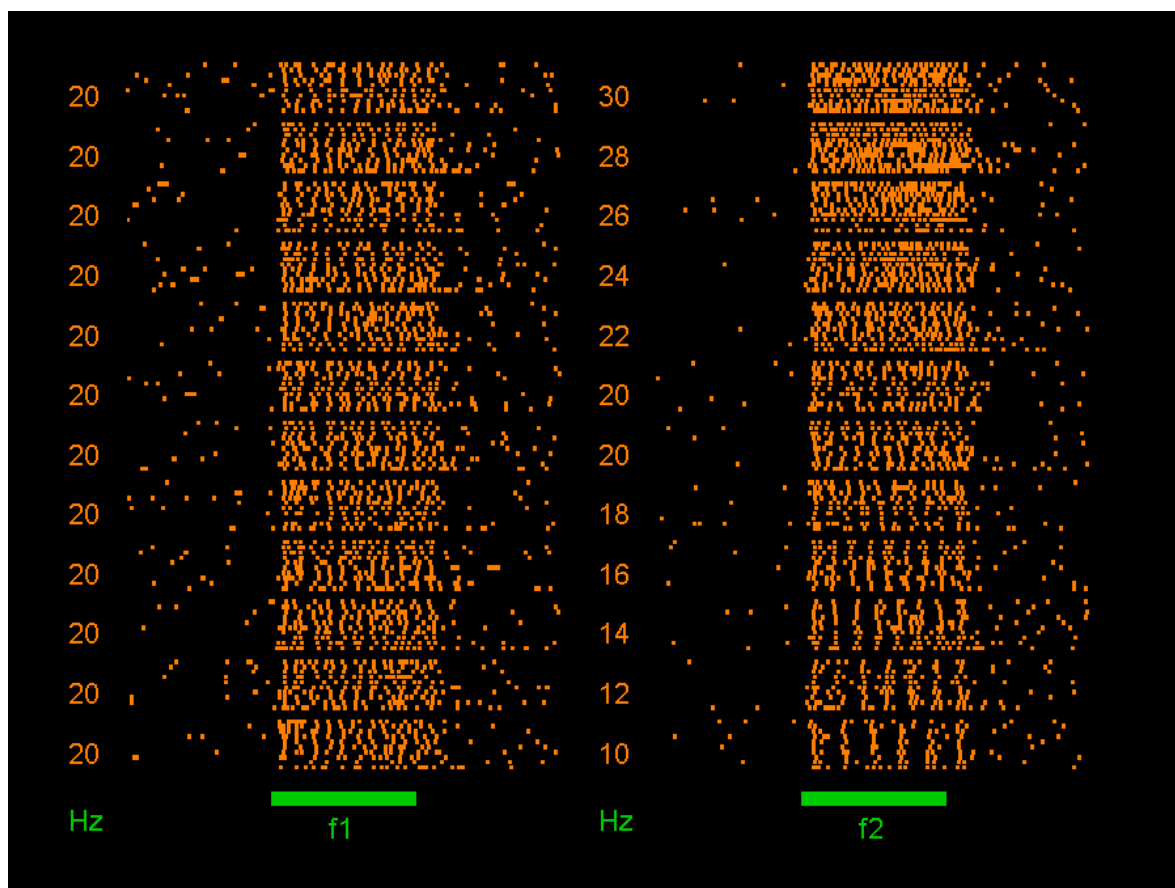


Fig. 5 Respuesta de una neurona de la corteza somatosensorial primaria cuya respuesta no se sincroniza con la onda del estímulo. En este caso se aprecia a simple vista el incremento en el número de espigas al incrementar la frecuencia del estímulo.

Finalmente, la importancia de la representación del estímulo en SI se comprobó mediante experimentos de microestimulación eléctrica. Estos experimentos consistieron en sustituir cada uno de los pulsos mecánicos que se aplicaron sobre la yema del dedo, por un tren de pulsos eléctricos de alrededor de 80 microamperios aplicados directamente en las neuronas de S1. Esto se aplicó en sustitución del segundo estímulo o del primer estímulo (Romo et al., 1998, 2000) o en sustitución de ambos estímulos (Romo et al., 2000). Se probó que al inyectar una señal artificial en la representación de los dedos dentro de SI, es posible inducir un comportamiento similar al obtenido con los estímulos mecánicos aplicados en la yema de los dedos. El desempeño psicofísico de los monos en los experimentos de microestimulación eléctrica fue similar al medido en la condición de estimulación mecánica. Esto sugiere que los monos percibieron ambos tipos de estimulación en forma similar y que la sensación generada por la estimulación eléctrica se pudo memorizar y comparar. También, en estos experimentos se utilizó la microestimulación eléctrica empleando trenes distribuidos aleatoriamente durante los 500 milisegundos, también en esta condición los sujetos mostraron el mismo desempeño que en la condición periódica.

Los resultados descritos muestran que el papel funcional de las aferentes primarias y de las neuronas de SI con campo receptivo sobre el cual se aplicó el estímulo vibrotáctil, corresponde únicamente a proporcionar el flujo de información sensorial. No se encontró en esas neuronas con campo receptor evidencia de actividad asociada a la decisión, a la memoria ni a la ejecución de los movimientos voluntarios. ¿Dónde ocurren esos procesos?

Correlatos neuronales asociados a la memoria de la frecuencia de estímulos vibrotáctiles

Una vez que se aplica la primera vibración mecánica, el sujeto debe mantener en memoria de trabajo esa información. Con ese recuerdo puede realizar la comparación de ambas magnitudes cuando el segundo estímulo sea presentado. Romo y colaboradores (Romo et al., 1999, Brody et al., 2002) mostraron que en la convexidad inferior de la corteza prefrontal (CPF) del mono se realizan esos procesos. La CPF incluye las áreas 9 y 46 de Broadmann en el humano. Estos estudios mostraron que las respuestas neuronales representan en su tasa de disparo la frecuencia del primer estímulo durante el periodo de memoria. Esto es, durante el periodo que separa ambos estímulos, las neuronas de la CPF modulan la intensidad de su respuesta en función de la magnitud de la frecuencia del primer estímulo. Estas respuestas de memoria pueden ser clasificadas como: 1) tempranas, 2) tardías o 3) persistentes, dependiendo de en que parte del periodo entre los dos estímulos codifiquen la frecuencia del primer estímulo.

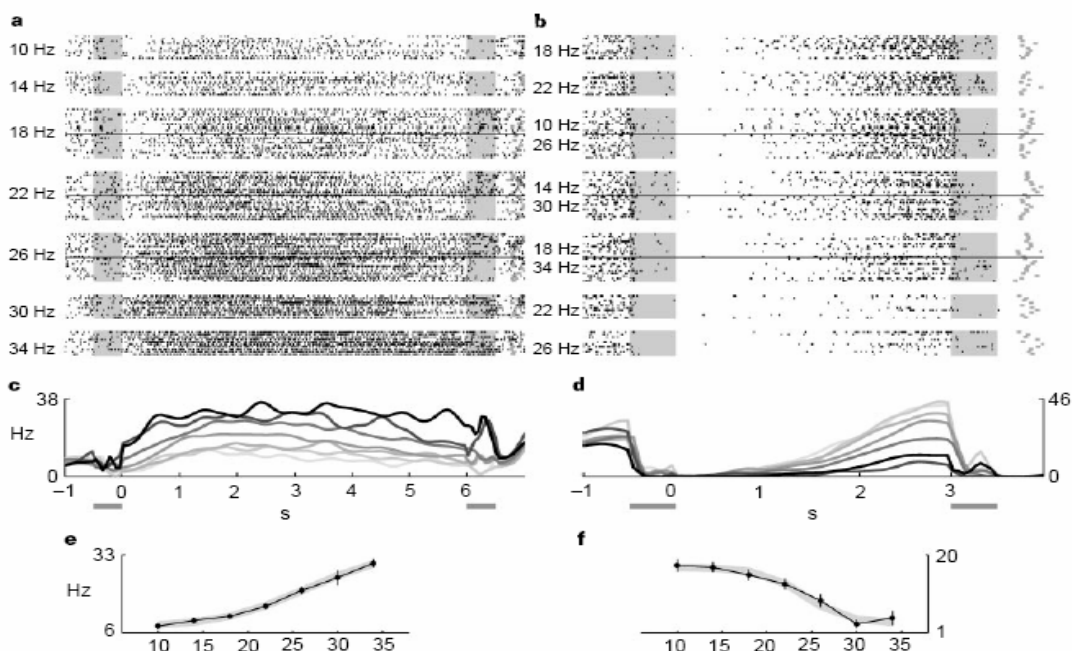


Fig. 6 Respuestas de dos neuronas de la CPF asociadas al mantenimiento de la información del primer estímulo durante el periodo que separa ambos periodos de estimulación. a) Actividad de una neurona que incrementa su tasa de disparo al incrementar la frecuencia del primer estímulo, esta actividad se mantuvo durante todo el periodo entre estímulos (persistente). Cada punto indica el instante en que la neurona disparó y cada línea horizontal de puntos corresponde a un ensayo. Los diferentes ensayos fueron presentados aleatoriamente durante el experimento, pero aquí fueron organizados en función de la frecuencia del primer estímulo. c) Densidades de probabilidad de disparo en función del tiempo para la neurona del panel a, las líneas oscuras corresponden a las frecuencias más altas. e) tasa de disparo en función de la frecuencia del primer estímulo y cuantificada durante todo el periodo entre los dos estímulos. b), d) y f) Similares a los paneles anteriores, pero para una neurona con modulación negativa en función de la frecuencia del primer estímulo. Se observa además que en este caso la neurona presenta la modulación (memoria) hacia el final del periodo entre estímulos (respuesta tardía).

Aproximadamente el 55% de las neuronas asociadas a la memoria, incrementaron su respuesta al aumentar la frecuencia del primer estímulo (modulación positiva). El resto de las neuronas sintonizadas durante el período entre estímulo presentaron decrementos en su respuesta al incrementar la frecuencia de f1 (modulación negativa). En esos trabajos, se demostró que las neuronas de la PFC pueden extender el periodo de su respuesta modulada o bien, desplazar en el tiempo el período donde se modula su tasa de disparo, esto al incrementarse la duración del período entre los dos estímulos. Finalmente, el grupo de Romo también demostró que la variabilidad en la respuesta de estas neuronas a la misma frecuencia de f1 en diferentes ensayos, correlaciona con los aciertos y errores del sujeto.

Participación de la corteza motora en la discriminación de frecuencias de estímulos vibrotáctiles

Mountcastle y colaboradores (Mountcastle et al., 1992) registraron en la corteza motora primaria (M1) de monos rhesus al mismo tiempo que esos sujetos resolvían la tarea de discriminación de frecuencias. El resultado de ese experimento mostró que algunas neuronas registradas incrementaron su respuesta cuando el sujeto se prepara y/o realiza el movimiento del brazo para presionar uno de los dos botones a través de los cuales el mono manifiesta el resultado de la comparación. En esos experimentos nunca se observaron correlaciones entre la actividad de M1 con aspectos relacionados a la representación de la frecuencia de los estímulos, la memoria, ni a la comparación de las dos frecuencias. Además, tampoco se disoció la señal de decisión de la señal puramente motora.

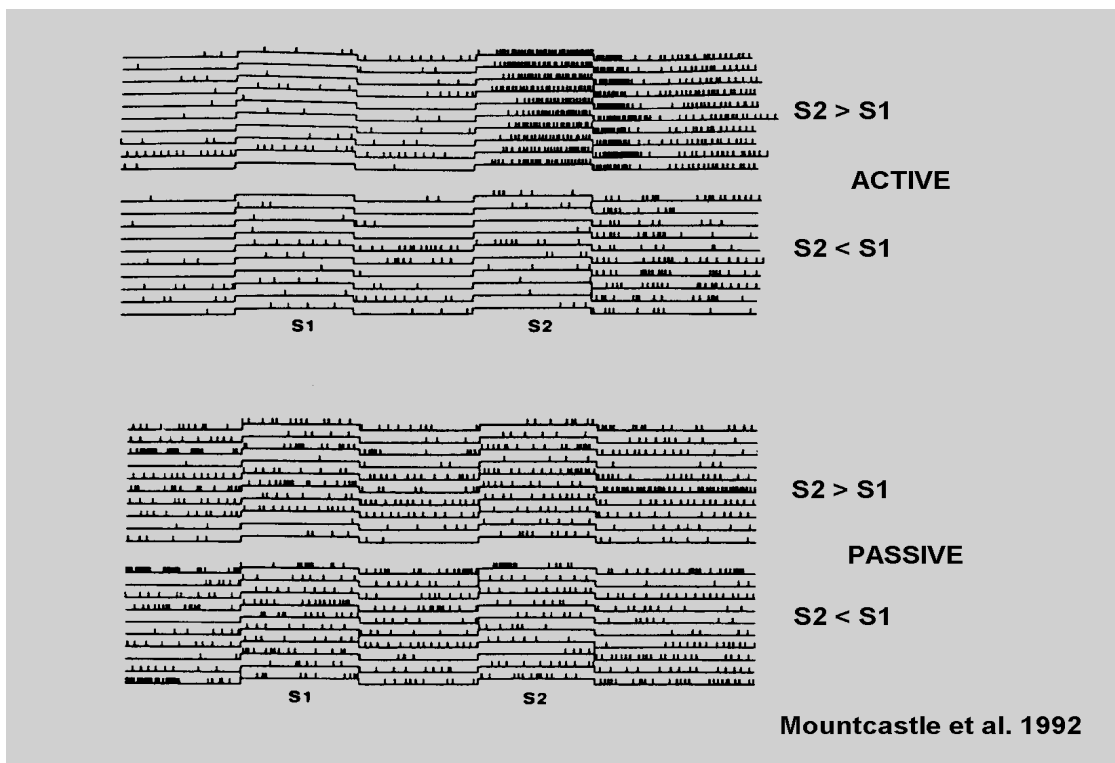


Fig. 7 Actividad de una neurona de la corteza motora primaria. En este trabajo se observó la existencia de neuronas que se activaron selectivamente ya sea para la condición donde el segundo estímulo fue de mayor frecuencia que el primero o bien para el caso contrario. En la condición control donde se aplicaron los mismos estímulos pero el sujeto no realizó movimiento alguno, la actividad selectiva o diferencial desapareció. Es decir, esta actividad correlaciona solo con la señal de preparación y/o ejecución motora (Mountcastle et al. 1992).

¿Dónde y cómo ocurre la toma de decisiones a partir de información táctil?

Es posible que las estructuras motoras del lóbulo frontal participen en la toma de decisiones de la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles. Lo anterior se basa en tres antecedentes:

- (I) estas estructuras participan en la planeación y generación de movimientos voluntarios (Alexander & Crutcher, 1990; Georgopoulos et al., 1993);
- (II) Romo y Salinas (1998) demostraron que las neuronas de la corteza motora primaria codifican en su actividad el reporte de la decisión en una tarea de categorización de estímulos somatosensoriales;
- (III) estas áreas reciben conexiones directas de las áreas somatosensoriales SI y SII (Jones & Powell, 1969; Jones et al., 1978; Tokuno H & Tanji, 1993, Darian-Smith et al., 1993; Luppino et al. 1993; Pandya & Kuypers, 1969).

Una de las estructuras motoras de la corteza cerebral es la corteza premotora medial (CPM). La CPM es un campo cortical que se localiza en el giro frontal superior, en la cara medial de los hemisferios (rostral a MI), extendiéndose desde el banco dorsal del surco del cíngulo hasta un borde lateral (4 a 5 milímetros) a partir de la línea media (fig. 9). Con base en criterios anatómicos y funcionales, se ha subdividido la CPM en una región rostral, que se denomina pre-Área Motora Suplementaria y una región caudal llamada Área Motora Suplementaria propia (Matelli et al., 1991; Luppino et al., 1991; Matsuzaka et al., 1992; Rizzolatti et al., 1996).

Los estudios en primates han reportado que las células de la CPM presentan cambios en su actividad durante la ejecución y planeación de movimientos que deben realizarse en una secuencia particular. Estas respuestas no se presentan cuando el animal realiza la misma tarea, pero con la guía de estímulos visuales (Mushiake et al., 1991, Tanji y Shima, 1994). También se han encontrado células que solo responden después de realizar un movimiento particular y antes de la ejecución de otro movimiento específico, dentro de una tarea de movimientos múltiples (Halsband et al., 1994; Tanji y Shima, 1994). Concordante con estos datos, los resultados clínicos y experimentales sugieren que la CPM participa en la organización de patrones motores que requieren de secuencia temporal y de memoria para su ejecución.

Las neuronas de la CPM responden a estímulos sensoriales externos de diferentes modalidades sensoriales (visión, audición, tacto), que se utilizan como estímulos iniciadores para un movimiento (Kurata y Tanji 1985; Romo y Schultz 1987; Romo y Schultz 1992). Estas respuestas neuronales están asociadas con los estímulos sensoriales, ya que se presentan solo si el animal

las utiliza para iniciar un movimiento; las células no responden cuando los estímulos sensoriales se presentan de manera aislada, sin relación a una tarea motora (Tanji y Kurata, 1985). Estos hallazgos sugieren que las neuronas de la CPM participan en el procesamiento de la información sensorial reflejando posiblemente, la salida de un proceso perceptivo. Esta hipótesis ha sido puesta a prueba con estímulos somestésicos (Romo et al., 1997). Romo y colaboradores entrenaron monos para categorizar la velocidad de un estímulo que se mueve sobre la piel de uno de los dedos de la mano, en velocidades altas y bajas. Los resultados muestran que en la CPM existen neuronas selectivas para cada una de las categorías de los estímulos, esto es: una población incrementa su respuesta cuando las velocidades son bajas, y otra población responde para el grupo de estímulos con velocidades altas. A pesar de existir una correlación perfecta entre la categoría del estímulo y el movimiento, esa actividad no es motora. Lo anterior se concluye porque la mayor parte de las neuronas atenuaron su respuesta cuando se ejecutaron los mismos movimientos, pero guiados por un estímulo visual. Por lo tanto, es más probable que la actividad diferencial esté asociada a la evaluación de los parámetros del estímulo y la identificación de su categoría, que al plan motor que indica el resultado del proceso perceptivo.

La CPM recibe proyecciones de las cortezas premotoras dorsal y ventral, de MI, de la corteza prefrontal (áreas 8a, 9, 11, 12 y 46), de la corteza del cíngulo (área 24), de la ínsula y de las áreas 5 y 7 del lóbulo parietal posterior. También recibe aferentes de las áreas 1 y 2, así como de la corteza somatosensorial secundaria. Las principales aferentes talámicas provienen del núcleo ventral lateral, parte oral y parte caudal.

La CPM proyecta a M1, a las cortezas premotoras dorsal y lateral, al área 5 de la corteza parietal, a la corteza prefrontal (áreas 8, 9 y 46), a la corteza orbital y al banco ventral del surco cingulado (áreas 23 y 24). Otras conexiones eferentes subcorticales terminan en el putamen, el núcleo caudado y el claustrum. De la CPM surgen proyecciones que terminan en la médula espinal, estas proyecciones se organizan de manera somatotópica.

Lo anterior pone de manifiesto que la CPM es una de las estructuras con las características necesarias para servir como interfaz entre los procesos sensoriales y los procesos motores tal como lo requiere la tarea de discriminación de frecuencias.

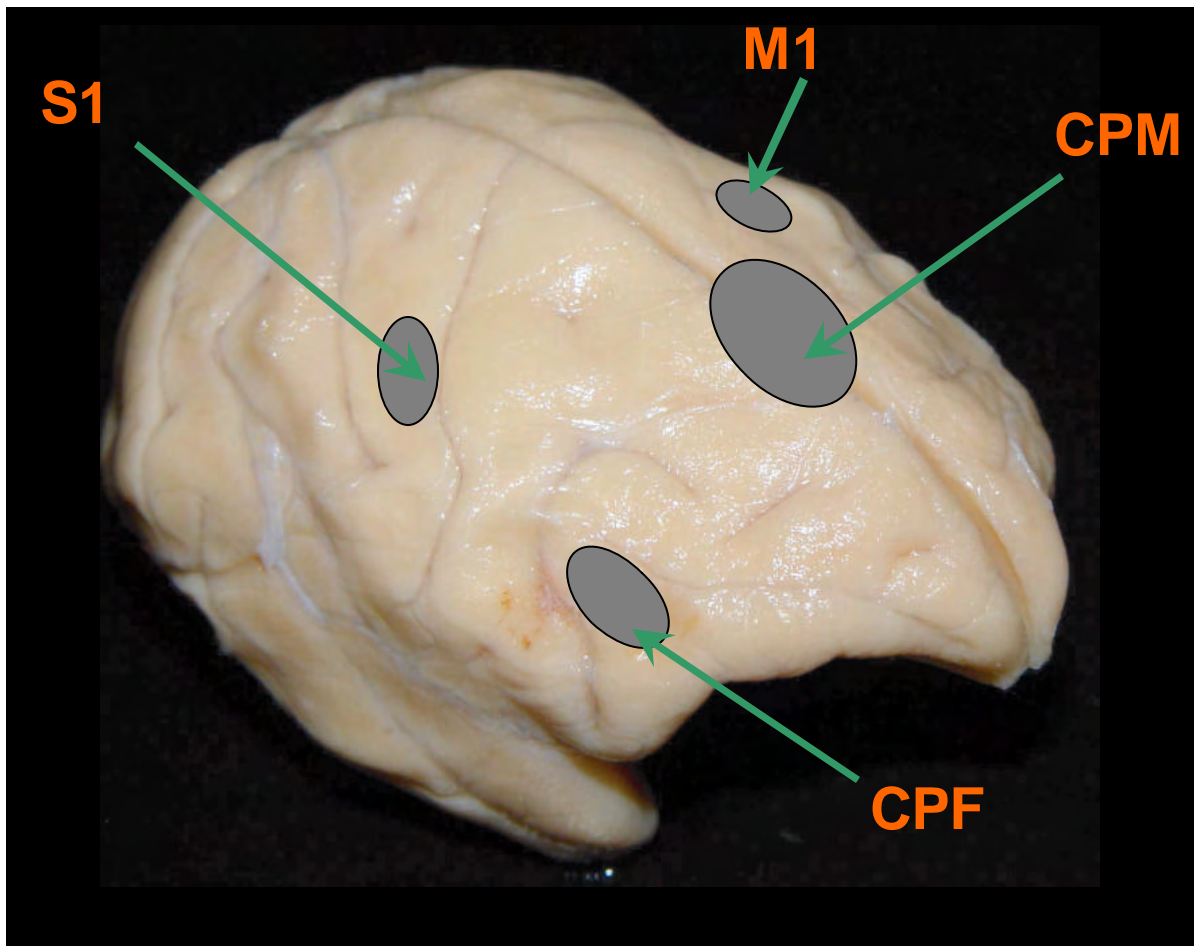


Fig. 9 Localización de la Corteza Premotora Medial (CPM). Se señala además, las regiones donde se ha reportado actividad asociada a la tarea de discriminación de frecuencias de estímulos vibrotáctiles. S1: corteza somatosensorial primaria; CPF: corteza prefrontal; M1: corteza motora primaria.

Planteamiento del problema

Trabajos neurofisiológicos han descrito correlatos neuronales que explican parte de los procesos necesarios para tomar decisiones basadas en la comparación de frecuencias de dos estímulos vibrotáctiles aplicados secuencialmente. Esos correlatos explican la adquisición y representación de la frecuencia de los estímulos, en las aferentes primarias y en las áreas somatosensoriales de la corteza. También explican los mecanismos que permiten retener en memoria de trabajo la información del primer estímulo hasta que el segundo es presentado. Finalmente se ha descrito la actividad de neuronas de la corteza motora primaria que explican los movimientos a través de los cuales los sujetos manifiestan el resultado de la comparación. Sin embargo, aún se desconoce cómo y dónde el flujo sensorial del primer y segundo estímulo concurre temporalmente para que la comparación de las dos magnitudes tenga lugar. También se desconoce como la señal resultante de la comparación se transforma en comandos motores. Las áreas motoras del lóbulo frontal, consideradas como parte de las áreas de asociación, participan en la planeación y ejecución de los comandos motores. Además reciben información sensorial a través de conexiones directas de las áreas somatosensoriales primaria y secundaria. Asimismo, estas áreas proyectan a la corteza motora primaria, a los ganglios basales y a la médula espinal.

Hipótesis

Durante la discriminación de frecuencias de estímulos vibro táctiles, es posible que las áreas motoras del lóbulo frontal participen en la evaluación de la información sensorial, en la construcción de la toma de decisiones, en la elección del plan motor y finalmente en la ejecución de ese plan motor.

Objetivo:

Determinar si las áreas motoras del lóbulo frontal participan en el proceso de toma de decisiones durante la percepción de estímulos táctiles

Objetivos particulares:

- 1. Establecer si es posible observar correlatos neuronales del proceso de comparación de dos estímulos durante la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles.**
- 2. Comparar los resultados obtenidos en las áreas motoras del lóbulo frontal con los observados en otras áreas corticales**

Métodos

Se entrenaron cuatro monos rhesus en la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles (Mountcastle et al. 1990; Hernández et al. 1997; Romo et al. 1998, 1999, 2000). A través de una computadora, se controla la posición de la flecha de un motor lineal. Los desplazamientos de la punta de la flecha pueden describir rampas, senoidales o cualquier forma de onda en función del tiempo y con frecuencias de 1 a 600 Hertz. Esos desplazamientos fueron usados como estímulo táctil. Los estímulos se aplicaron sobre la yema de algún dedo de la mano restringida del mono. El estimulador produjo un desplazamiento inicial de 500 micras en la piel. Al percibir ese contacto, el sujeto debía colocar la mano que no es estimulada, sobre una palanca sensible al contacto. Luego de un periodo de espera variable (de 1.5 a 4.5 segundos), el estimulador presentó dos estímulos vibrotáctiles senoidales consecutivos. La duración fue de 500 milisegundos para cada uno y fueron separados por un periodo de tres segundos. La mano libre fue retirada de la palanca en respuesta a la finalización del segundo estímulo y proyectada hacia uno de dos botones ubicados frente al sujeto. Estos movimientos debían realizarse dentro de una ventana de tiempo mayor a 200 y menor a 600 milisegundos.

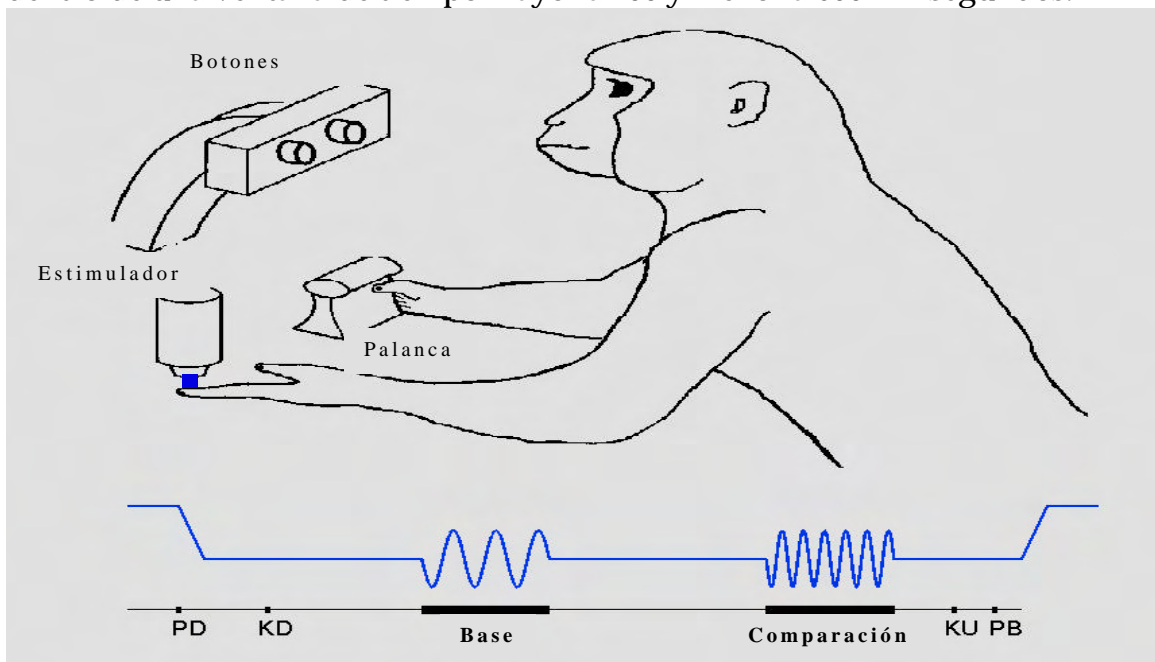


Fig. 8 Elementos de la tarea de discriminación de frecuencias. La punta (en azul) de un estimulador mecánico se desplaza desde su posición de reposo, hacia abajo hasta hacer contacto con la piel en la yema del dedo (PD). Al percibir el contacto, el sujeto coloca su mano sobre la palanca (KD). Después de un intervalo variable, la punta vibra a la frecuencia seleccionada para el primer estímulo (Base). Después de un segundo retardo, durante el cual el sujeto debe recordar la frecuencia del primer estímulo, se presenta el segundo estímulo con una frecuencia distinta (Comparación). En este periodo, el sujeto debe comparar las dos magnitudes y decidir cual de ellas es mayor. Al percibir la finalización del segundo estímulo, el sujeto debe soltar la palanca (KU) y proyectar su mano libre hacia uno de dos botones para presionarlo (PB). El botón lateral se presiona si el sujeto considera que la frecuencia del segundo estímulo fue menor que la del primero; en caso contrario se presiona el otro botón.

El animal fue condicionado para indicar la comparación entre la frecuencia de los estímulos presionando con su mano libre uno de dos interruptores:

cuando el segundo estímulo fue de mayor frecuencia que el primero el mono presionó el interruptor lateral, en caso contrario presionó el interruptor medial. Al inicio del entrenamiento, las diferencias en frecuencias entre los estímulos a comparar fueron fácilmente discriminables (más de ocho Hertz). Cuando los monos lograron un buen desempeño en esta condición (95% de aciertos), se incluyeron pares con diferencias de 6, 4, 2 y cero Hertz. Entonces, se aplicaron técnicas psicométricas para determinar los umbrales de discriminación encontrándose valores semejantes a los descritos en trabajos previos (Mountcastle et al. 1990; Hernández et al. 1997).

Las amplitudes de los estímulos fueron ajustadas en función de la frecuencia para compensar la sensación subjetiva de que al incrementar la frecuencia también aumenta la amplitud (Hernández et al. 1997; Hernández et al. 2000; Salinas et al. 2000)

Una vez que los animales fueron capaces de llevar a cabo la tarea de discriminación, fueron sometidos al siguiente procedimiento quirúrgico: bajo anestesia general y en condiciones de absoluta asepsia, se les implanto sobre la superficie del cráneo un contenedor cefálico y una cámara de acero inoxidable por donde, previa craneotomía, se hicieron penetraciones transdurales con un sistema de multimicroelectrodos (Mountcastle et al. 1990) en las áreas motoras del lóbulo frontal de la corteza cerebral. Todos los componentes metálicos fueron fijados al cráneo con cemento dental. Luego de la recuperación postoperatoria, la cabeza del animal fue sujeta en intervalos de tiempo progresivos hasta completar un periodo de 6 a 7 horas.

La actividad de neuronas individuales de las áreas motoras del lóbulo frontal fue registrada con micro electrodos de una aleación de tungsteno/platino y forrados con cuarzo (diámetro total de 80 micras). Esta fibra es posteriormente estirada por lo que la punta de registro es de 2 a 3 micras de diámetro. Estos microelectrodos fueron introducidos al cerebro transduralmente por medio de una técnica que permite el movimiento individual de cada uno (Mountcastle et al. 1990). El sistema puede introducir hasta 7 microelectrodos en arreglos lineales o en rosetas, con separación entre ellos de 250 micras a un milímetro. Este sistema de registro permite el estudio de microcircuitos corticales. Los impulsos de las neuronas fueron observados en osciloscopios; las descargas neuronales fueron transformadas en señales digitales por medio de un discriminador de voltaje, estos pulsos fueron continuamente observados en el osciloscopio junto con la forma original de la descarga neuronal.

Los resultados del experimento fueron almacenados en formato digital, donde se incluyen los intervalos entre los impulsos sucesivos para cada neurona, los tiempos de los eventos conductuales y los asociados a los

estímulos. Este procedimiento permite una reconstrucción del registro completo de cada ensayo. La actividad neuronal puede ser estudiada con referencia a cualquiera de los eventos. Fueron colectados diez ensayos por cada condición de interés (par de frecuencias).

Resultados obtenidos en la corteza premotora medial

Se entrenaron cuatro monos en la tarea de discriminación de frecuencias. En ellos se registraron e identificaron ochocientos tres neuronas de la CPM (fig. 10), que respondieron a alguno de los aspectos de la tarea (denominadas responsivas, Tabla 1). La identificación se realizó al comparar la tasa de disparo de las neuronas en alguna fase de la tarea, contra la respuesta espontánea de la neurona registrada en un periodo control que antecede el inicio de cada ensayo. Los periodos de interés fueron: primer estímulo (f1), periodo entre estímulos (retardo f1-f2), segundo estímulo (f2), tiempo de reacción (Rt) y tiempo de movimiento (Mt);. Se consideró como neurona responsiva a aquella que, durante al menos un periodo de interés, aumentó o disminuyó su tasa promedio de disparo con respecto a su respuesta durante el periodo control (prueba de Wilcoxon, $p < 0.01$).

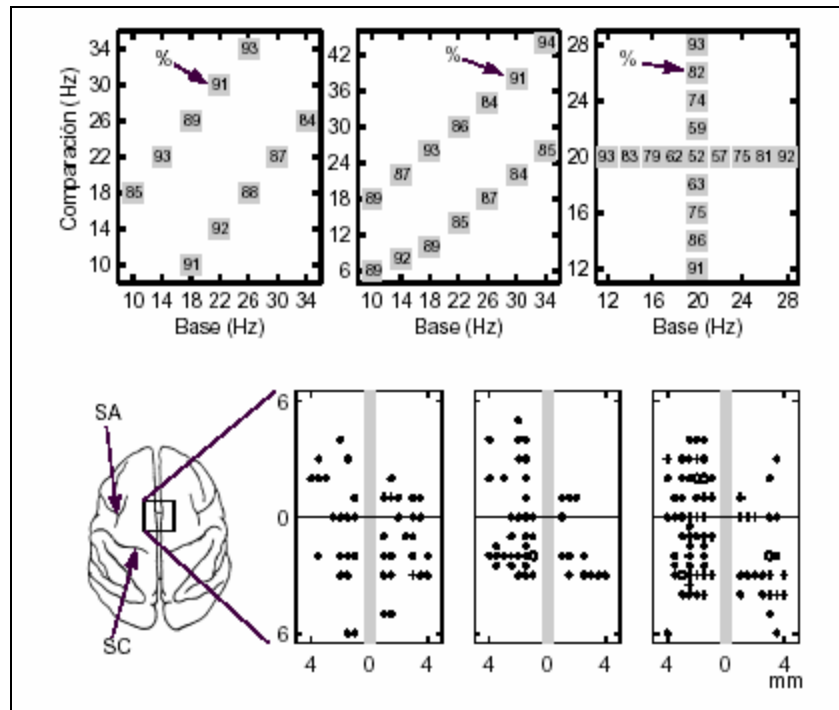


Fig. 10 Pares de frecuencias empleados y lugares de registro. Los paneles superiores muestran los tres grupos de pares de frecuencias usados durante los experimentos. Cada recuadro indica el desempeño promedio que los monos lograron para el par de frecuencias correspondiente. En los paneles inferiores se aprecian las posiciones donde se registraron neuronas asociadas a la tarea de discriminación de frecuencias. La región superior al cero corresponde a la denominada pre-área motora suplementaria. Los círculos cerrados indican de 1 a 4 neuronas registradas, las cruces indican de 5 a 8 neuronas registradas. Finalmente, los círculos abiertos indican zonas con 9 y hasta 12 neuronas asociadas a la tarea.

Tabla 1. Base de datos de la Corteza Premotora Medial (CPM)

	Responsivas	f1	retardo f1-f2	f2	Rt	Mt
SMA Derecha	237	31 (13 %)	77 (32 %)	167 (70 %)	59 (25 %)	51 (21 %)
SMA Izquierda	332	37 (11 %)	109 (33 %)	153 (45 %)	115 (46 %)	64 (19 %)
Pre-SMA Der.	76	18 (24 %)	13 (17 %)	36 (47 %)	27 (36 %)	7 (09 %)
Pre-SMA Izq.	158	29 (18 %)	26 (16 %)	71 (44%)	33 (21 %)	16 (10 %)
Totales	803	115 (14 %)	225 (28 %)	427 (53 %)	234 (29 %)	138 (17 %)

f1: primer estímulo; retardo f1-f2: retardo entre los estímulos; f2: segundo estímulo; Rt: tiempo de reacción; Mt: tiempo de movimiento.

Se encontraron 61 neuronas, (de entre las 115 responsivas durante el primer estímulo) cuya tasa de disparo no solo indicó la presencia del primer estímulo, sino que su respuesta fue modulada por la frecuencia del mismo. Esta modulación fue de dos tipos:

- las neuronas aumentaron su respuesta al aumentar la frecuencia del estímulo;
- la respuesta de la neurona fue más fuerte para los estímulos de frecuencia baja y su respuesta disminuyó con los estímulos de mayor frecuencia.

La modulación en función de la frecuencia del estímulo fue aproximadamente lineal ($Q > 0.05$)¹. A fin de establecer que la modulación en función de la frecuencia (cuantificada como la pendiente del ajuste lineal) es significativa y no el producto del azar, se usó una prueba de permutación ($N = 1000$, $p < 0.01$) considerando como hipótesis nula que las respuestas de la neurona fueron similares, independientemente de la frecuencia del estímulo.

¹ [Q es la calidad del ajuste lineal usando una prueba de bondad ji-cuadrada y se considera significativa para valores mayores a 0.01]

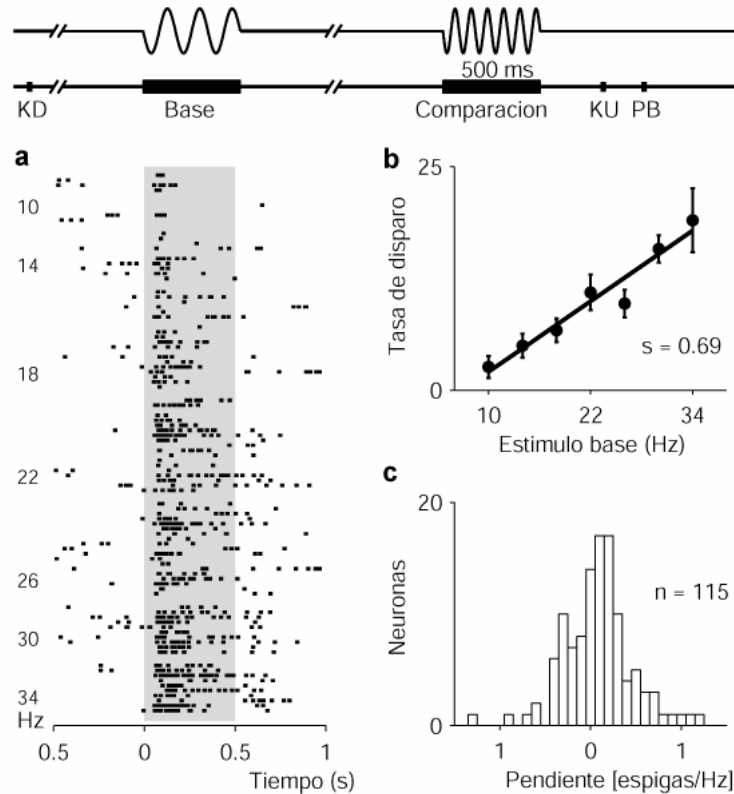


Fig. 11 Neuronas de la CPM asociadas a la representación de la frecuencia del estímulo. (a) Actividad de una neurona modulada positivamente por la frecuencia del estímulo, cada punto indica el instante en que la neurona disparó y cada renglón de puntos corresponde a un ensayo. Los diferentes ensayos fueron presentados en forma aleatoria durante el experimento, pero aquí fueron organizados en función de la frecuencia del primer estímulo. (b) Tasa de disparo promedio en función de la frecuencia del estímulo base y barras de desviación estándar correspondientes para la neurona del panel a. Estos valores fueron cuantificados usando la respuesta de los 500 milisegundos que duró el primer estímulo. También se muestra el ajuste lineal sobre esos datos y el valor de la pendiente correspondiente. (c) Distribución de las pendientes obtenidas para ciento quince neuronas cuya tasa de disparo fue significativamente mayor durante el periodo de estimulación respecto a un periodo control previo al mismo, solo 61 de ellas fueron pendientes significativamente distintas de cero.

Durante el período que separa ambos estímulos se registraron 225 neuronas responsivas. Ochenta y un neuronas mostraron, durante algún período, pendientes significativas en función de la frecuencia del primer estímulo. Al igual que las respuestas durante el primer estímulo, estas modulaciones fueron aproximadamente lineales ($Q > 0.01$) y con pendiente (sensibilidad) significativa (prueba de permutación, $N = 1000$, $p < 0.01$). Dadas sus características, se asume que esta actividad refleja el proceso de memorización o retención de información del primer estímulo.

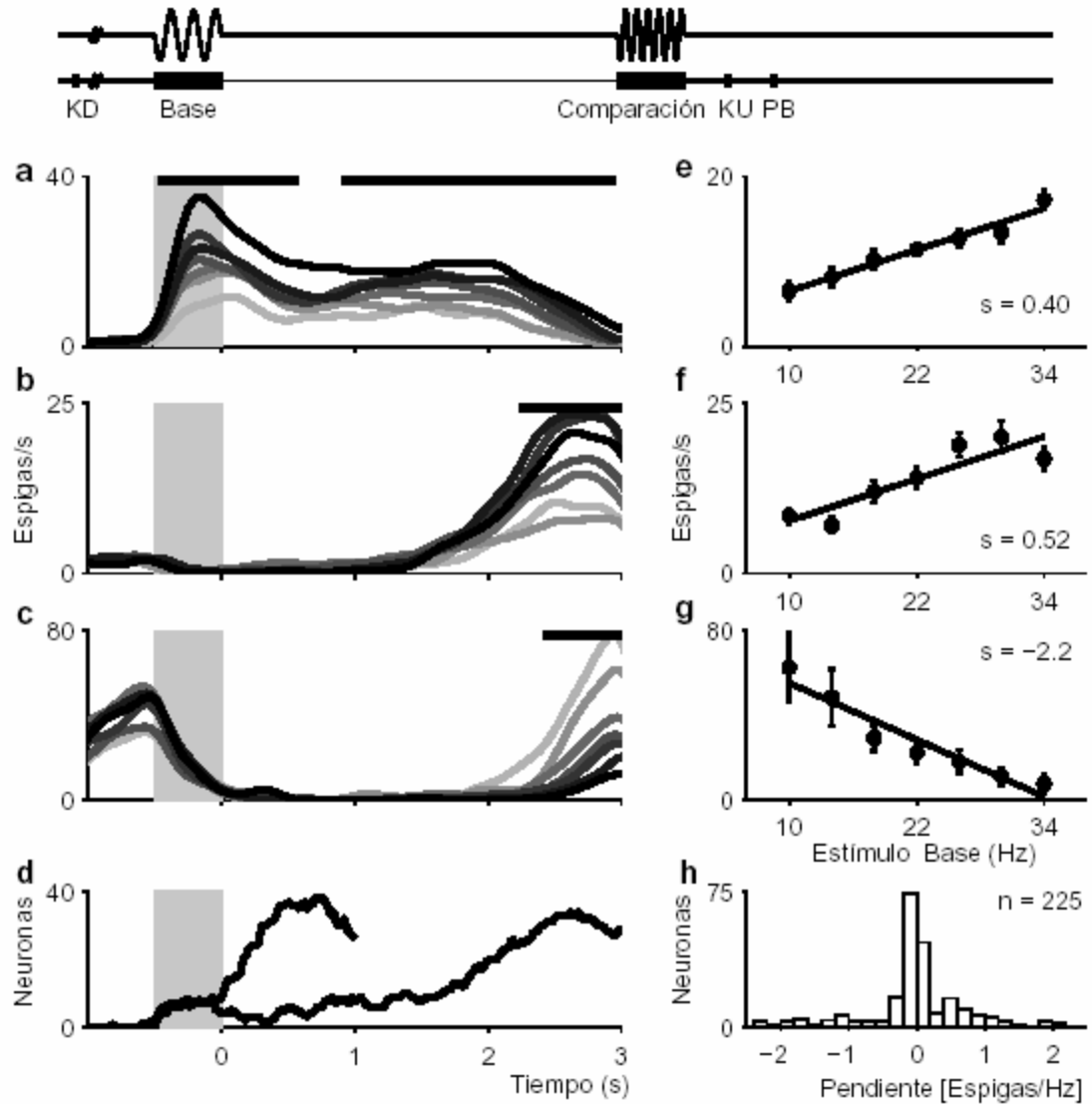


Fig. 12 Neuronas de la CPM asociadas al proceso de memoria. (a) Densidades de probabilidad de disparo en función del tiempo para una neurona con actividad persistente durante todo el periodo que separa ambos estímulos. Las líneas más oscuras corresponden a las frecuencias más altas del primer estímulo. La línea horizontal en la parte superior del panel indica los periodos (de 100 milisegundos) con pendiente significativa. (b) Similar al panel a, pero para una neurona con modulación positiva en la parte tardía del período inter estímulo. (c) Similar al panel b pero para una neurona con modulación negativa, es decir la neurona dispara más cuando la frecuencia del estímulo es baja. (d) Número de neuronas con pendiente significativa para los diferentes instantes de tiempo entre f1 y f2. Se muestran los resultados para cuando el retardo entre f1 y f2 fue de un segundo y cuando éste se cambió a tres segundos. En ambos casos, se observa que las neuronas de esta área contribuyen más al mantenimiento de la información del primer estímulo conforme se acerca el período de comparación. (e), (f) y (g) Regresión lineal sobre la tasa de disparo de las neuronas de los paneles a, b y c respectivamente indicando los valores de pendiente (s) correspondientes. (h) Distribución de los valores de pendiente encontrados para 225 neuronas cuya tasa de disparo fue significativamente mayor durante el periodo entre estímulos respecto a un periodo control previo al primer estímulo, 89 de esas neuronas mostraron pendientes significativamente distintas de cero (prueba de permutación, $N=1000$).

Es importante indicar que esas modulaciones ocurrieron preferentemente hacia el final del período interestímulo, esto contrasta con la actividad registrada en la corteza prefrontal en el mismo paradigma, donde la actividad modulada por la frecuencia del primer estímulo ocurre para algunas neuronas sólo al inicio, para otras sólo al final y para un tercer grupo de neuronas esa actividad sostenida se presenta durante todo el intervalo entre estímulos.

Los resultados hasta aquí descritos sugieren una participación sensorial de la CPM en la solución de la tarea. Por lo tanto se esperaría encontrar durante la aplicación del segundo estímulo, una modulación de la respuesta de las neuronas en función de la frecuencia de ese estímulo, esto no fue así. De las 427 neuronas identificadas como responsivas durante el segundo estímulo, ninguna mostró una modulación que solo dependiera de la frecuencia del segundo estímulo. En vez de ello, se identificó un grupo de neuronas que respondieron en forma exclusiva (selectiva) a los ensayos donde $f_2 > f_1$, aumentando su respuesta en esos casos, en tanto que otro grupo lo hizo para los ensayos donde $f_2 < f_1$, a ese tipo de respuestas selectivas las llamamos *diferenciales*. Es importante reconocer que como consecuencia de la asociación entre estímulos y respuestas motoras, también existe una relación entre las respuestas de estas neuronas con la dirección del movimiento a través del cual el sujeto indica el resultado de la discriminación entre pares de frecuencias.

Usando índices ROC, una herramienta de la teoría de detección de señales que establece la probabilidad de que una distribución sea mayor a otra (Green & Sweets, 1966), evaluamos estadísticamente la probabilidad de encontrar que la respuesta a los ensayos donde $f_2 > f_1$ fuese de mayor intensidad que la respuesta a los ensayos donde $f_2 < f_1$, manteniendo f_2 constante. Se identificaron 146 neuronas cuya tasa de disparo fue mayor en los ensayos donde $f_2 > f_1$ y 118 neuronas cuya respuesta fue mayor para los ensayos donde $f_2 < f_1$ (Fig. 13). A fin de comprobar que los valores ROC eran significativamente distintos de 0.5 (el valor esperado cuando no existe diferencia entre los ensayos $f_2 > f_1$ y $f_2 < f_1$) usamos una prueba de permutación ($N=1000$, $p < 0.01$) bajo la hipótesis nula de que las respuestas bajo ambas condiciones serían iguales.

El siguiente paso fue establecer si las respuestas diferenciales reflejaban el componente motor de la tarea (la dirección del movimiento del brazo) o bien el proceso de comparación entre los dos estímulos. Para esto, se realizó un experimento control en el cual se aplicaron exactamente los mismos estímulos y el sujeto realizó exactamente los mismos movimientos, pero desde el inicio del ensayo se informó al sujeto sobre el botón que debería presionar para obtener la recompensa (iluminando uno de los botones). Bajo esta condición fueron probadas 159 de las 264 neuronas con actividad diferencial (figura 13)

y en todos los casos esa propiedad diferencial disminuyó o bien desapareció (prueba de permutación, $p < 0.01$). Esto sucedió a pesar que, el sujeto ejecutó exactamente los mismos movimientos diferenciales y con los mismos tiempos de reacción. Lo anterior no debió ocurrir si las neuronas hubiesen sido neuronas motoras, por lo que se descartó que esas unidades únicamente reflejaran la salida motora del proceso o codificaran la velocidad (no hubo diferencia significativa en los tiempos de reacción ni en los tiempos de movimiento).

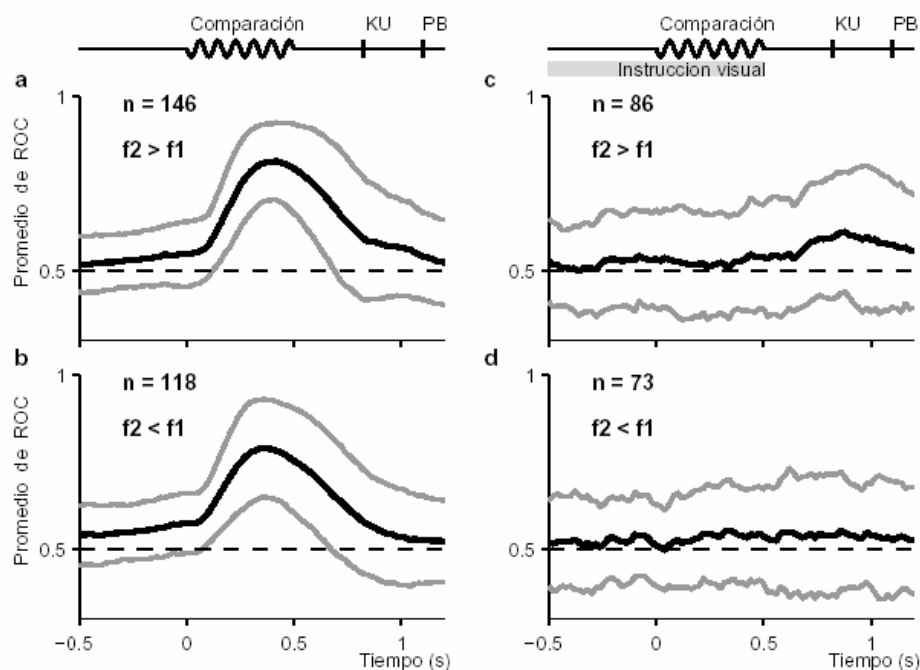


Fig. 13 Análisis de respuestas diferenciales en la CPM. (a) Promedios de valores ROC (curva negra) y su desviación estándar (curvas grises) para la población de neuronas que disparó selectivamente a los pares de frecuencias donde f_2 fue mayor que f_1 durante el segundo estímulo. (b) Promedios de valores ROC para la población de neuronas que disparó selectivamente a los pares de frecuencias donde f_1 fue mayor que f_2 . (c) y (d) El mismo análisis que en los paneles (a) y (b), aplicado al experimento control donde se usó una señal visual para indicar al mono el botón que debía presionar para obtener la recompensa.

Por otro lado, si las neuronas diferenciales participaran en el proceso de comparación, el análisis debería reflejar la integración de información sensorial de ambos estímulos. El correlato neuronal de la comparación de dos magnitudes es uno de los procesos sobre los cuales prácticamente no existían reportes en la literatura del campo. Esto en parte debido a la dificultad de entrenar monos en tareas de más de un estímulo (es más difícil discriminar que detectar o categorizar). Para poder reconocer actividad neuronal asociada al proceso de comparación de dos magnitudes debemos contar con herramientas analíticas apropiadas. La regresión multivariable es una herramienta adecuada para este fin. Esa herramienta analítica es empleada para establecer cuál es la contribución de cada una de dos o más variables independientes en el comportamiento de una variable dependiente.

En el análisis de regresión lineal múltiple usado se tomaron en cuenta dos variables independientes: la frecuencia del primer estímulo y la frecuencia del segundo, contra una sola variable independiente: la tasa de disparo de la neurona (TD) durante un determinado periodo de interés de la tarea. El objetivo fue encontrar el valor de tres parámetros: **a1**, **a2** y **a3**. Los dos primeros representan la sensibilidad de la neurona a f_1 y a f_2 , el tercer parámetro se asocia a la tasa basal o respuesta espontánea de la neurona. Esto se expresa en la ecuación siguiente:

$$TD = a_1(f_1) + a_2(f_2) + a_3. \quad (\text{Ecuación 1})$$

Los resultados del análisis multivariable se pueden graficar en un plano, en donde sobre el eje **x** se ubican los valores a_1 y en el eje **y** se ubica a_2 . En este plano, un punto sobre el eje **x** implica que la respuesta es única y exclusivamente función de la frecuencia del primer estímulo, esto es esperado por ejemplo, si la respuesta neuronal analizada corresponde al primer estímulo de una neurona sensorial o si fue registrada durante el primer estímulo para una neurona de memoria. Por otro lado, para una neurona puramente sensorial al analizar la respuesta durante el segundo estímulo se tendría un punto sobre el eje **y**, esto indica una contribución exclusiva del segundo estímulo. Finalmente una neurona motora (diferencial), es representada por un punto sobre la diagonal negativa (la línea que pasa por los puntos $-5,5$; $-4,4$;...; $0,0$; $1,-1$; etc.) reflejando que la frecuencia de ambos estímulos contribuyen con igual peso pero con signos opuestos, lo cual implica un proceso sustractivo entre f_1 y f_2 . Esto es importante ya que para resolver la tarea debemos establecer el signo de la diferencia entre ambos estímulos.

El usar la ecuación 1 implica utilizar un plano para ajustar la respuesta las neuronas. En el caso de las neuronas diferenciales, su respuesta corresponde a una superficie que aproxima más a una sigmoide que a un plano y se obtienen residuales grandes para los coeficiente a_1 y a_2 . Sin embargo, aún para estas neuronas, la comparación relativa entre los valores de a_1 y a_2 nos indica cual de ellos contribuye más para explicar la respuesta analizada. En el material suplementario del trabajo de Romo y colaboradores del 2002 (Romo et al., 2002) se aborda con detalle este problema.

El análisis de regresión lineal múltiple se uso para estudiar la dinámica de las respuestas neuronales analizando la respuesta de cada neurona en segmentos de 100 milisegundos de duración con un avance de 20 milisegundos entre segmentos consecutivos. Los resultados permitieron identificar 52 neuronas que desde antes del segundo estímulo reflejaban la información de la frecuencia del primer estímulo. A medida que se aplica el segundo estímulo se da una interacción entre ambos estímulos para finalmente dar lugar a una

respuesta diferencial (puntos sobre la diagonal negativa). De igual forma se identificaron 139 neuronas que solamente durante la segunda mitad del segundo estímulo presentaban una respuesta diferencial y esta se extinguía antes de que el sujeto iniciara el movimiento del brazo. Por otro lado, se encontraron 63 unidades cuya actividad diferencial fue máxima durante el tiempo de movimiento. En estos dos últimos grupos las gráficas en el plano siempre caen sobre la diagonal negativa.

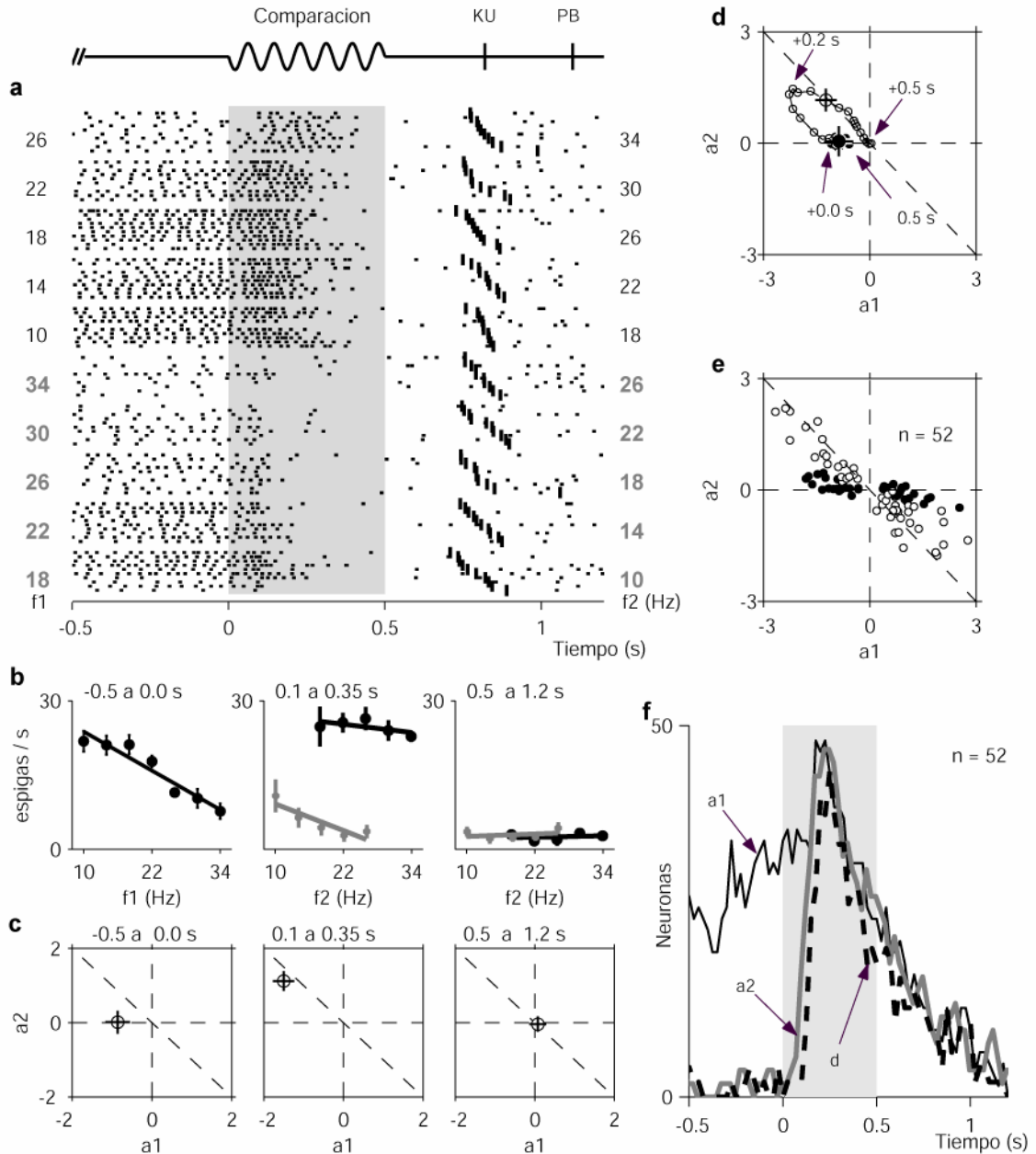


Fig. 14 Dinámica de las neuronas de comparación. (a) Actividad de una neurona de la CPM antes, durante y después del segundo estímulo. Cada punto negro corresponde a un potencial de acción. Se muestran cien ensayos ordenados de acuerdo a los pares de frecuencia empleados en un experimento. Antes del segundo estímulo se observa un gradiente negativo de actividad inmediatamente antes de la

presentación del segundo estímulo, ese gradiente corresponde al mantenimiento de la información del primer estímulo (presentado tres segundos antes). Durante el segundo estímulo la actividad evoluciona hasta ser diferencial, es decir la actividad llega a ser mayor para aquellos pares donde $f_2 > f_1$. La actividad diferencial nos permite predecir la decisión que el sujeto manifestará posteriormente. Esta dinámica sugiere que estas neuronas integran la información mantenida por la memoria de trabajo con la información del segundo estímulo para generar una señal que puede representar la decisión del sujeto. **(b)** Tasa de disparo en función de f_1 o de f_2 para los periodos indicados en el recuadro, donde se confirma lo observado en el panel **a**. **(c)** Resultados para los mismos periodos pero analizando con la regresión lineal múltiple. **(d)** Dinámica de la neurona del panel **a** pero considerando periodos de cien milisegundos, desplazados cada 20 milisegundos. Se observa que antes del segundo estímulo (círculos cerrados) la respuesta neuronal se explica exclusivamente en términos de la frecuencia del primer estímulo (puntos sobre la horizontal); al iniciarse el segundo estímulo, la respuesta neuronal se vuelve función de ambos estímulos hasta dar lugar a la respuesta diferencial (puntos sobre la diagonal negativa). **(e)** Resultado del análisis multivariable para una población de 52 neuronas con las mismas características de la neurona antes descrita. Círculos cerrados corresponden a actividad registrada durante el retardo. Los círculos abiertos corresponden a los últimos 300 milisegundos de f_2 . **(f)** Número de neuronas que contribuyeron en el instante correspondiente con valores significativos exclusivamente para a_1 (memoria de f_1), exclusivamente para a_2 (información sobre f_2) o de ambos pero con signo diferente (respuesta diferencial).

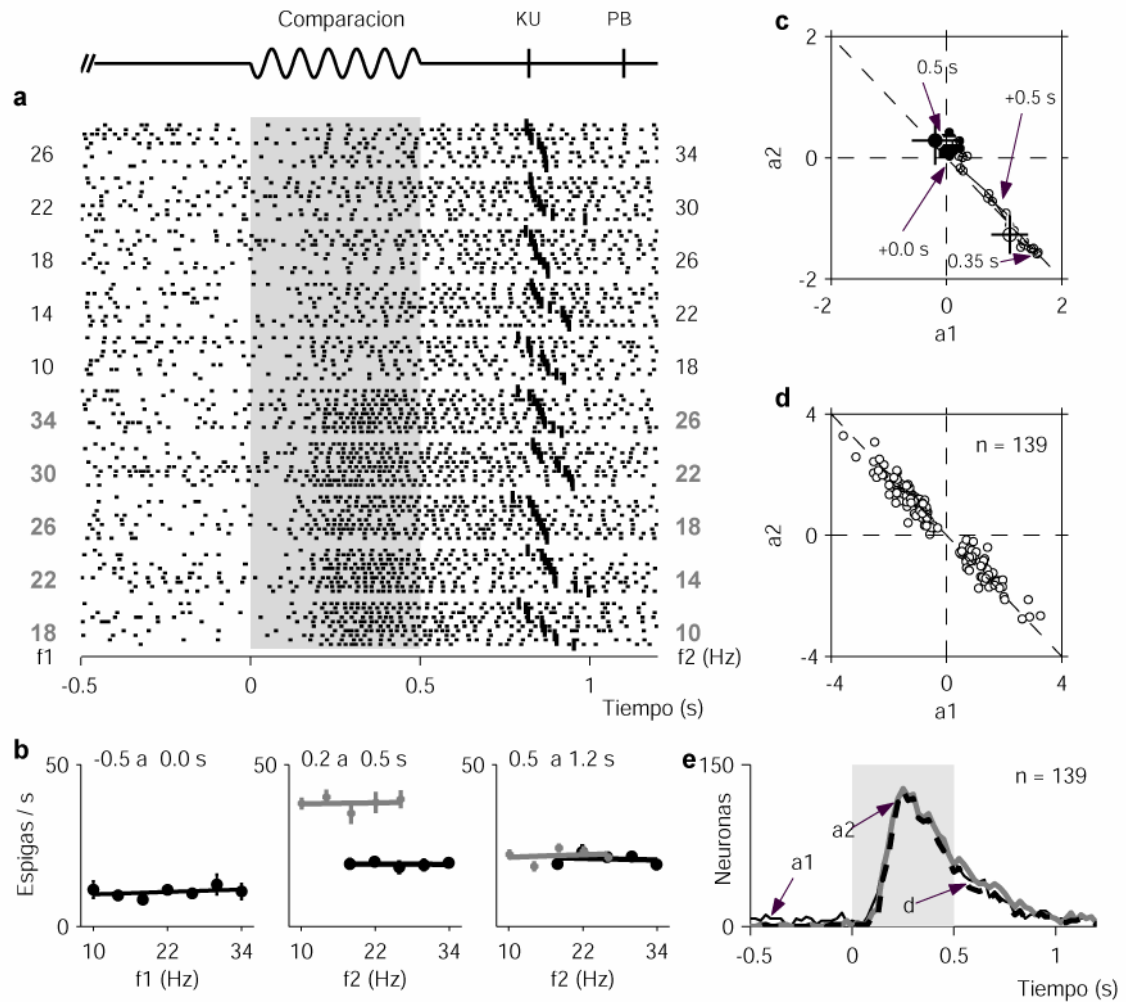


Fig. 15 Dinámica de las neuronas con actividad diferencial más intensa durante el período de comparación. **a)** Actividad de una neurona de la CPM antes, durante y después del segundo estímulo. Antes del segundo estímulo la neurona no muestra ningún tipo de modulación. Durante el segundo estímulo la actividad diferencial emerge intempestivamente alrededor de los 230 milisegundos, en este caso la actividad llega a ser mayor para aquellos pares donde $f_1 > f_2$. **(b)** Tasa de disparo en función de f_1 o de f_2 para los periodos indicados en el recuadro, donde se confirma lo observado en el panel **a**. **(c)** Dinámica de la neurona del panel **a** pero considerando periodos de cien milisegundos muestreados cada 20 milisegundos. Al iniciarse el segundo estímulo, la respuesta neuronal se vuelve una respuesta diferencial (puntos sobre la diagonal negativa). **(d)** Resultado del análisis multivariable para una población de 139 neuronas durante los últimos 300 milisegundos del estímulo de comparación. **(e)** Número de neuronas que contribuyeron en el instante correspondiente con valores significativos exclusivamente para a_1 (memoria de f_1), exclusivamente para a_2 (información sobre f_2) o de ambos pero con signo diferente (respuesta diferencial).

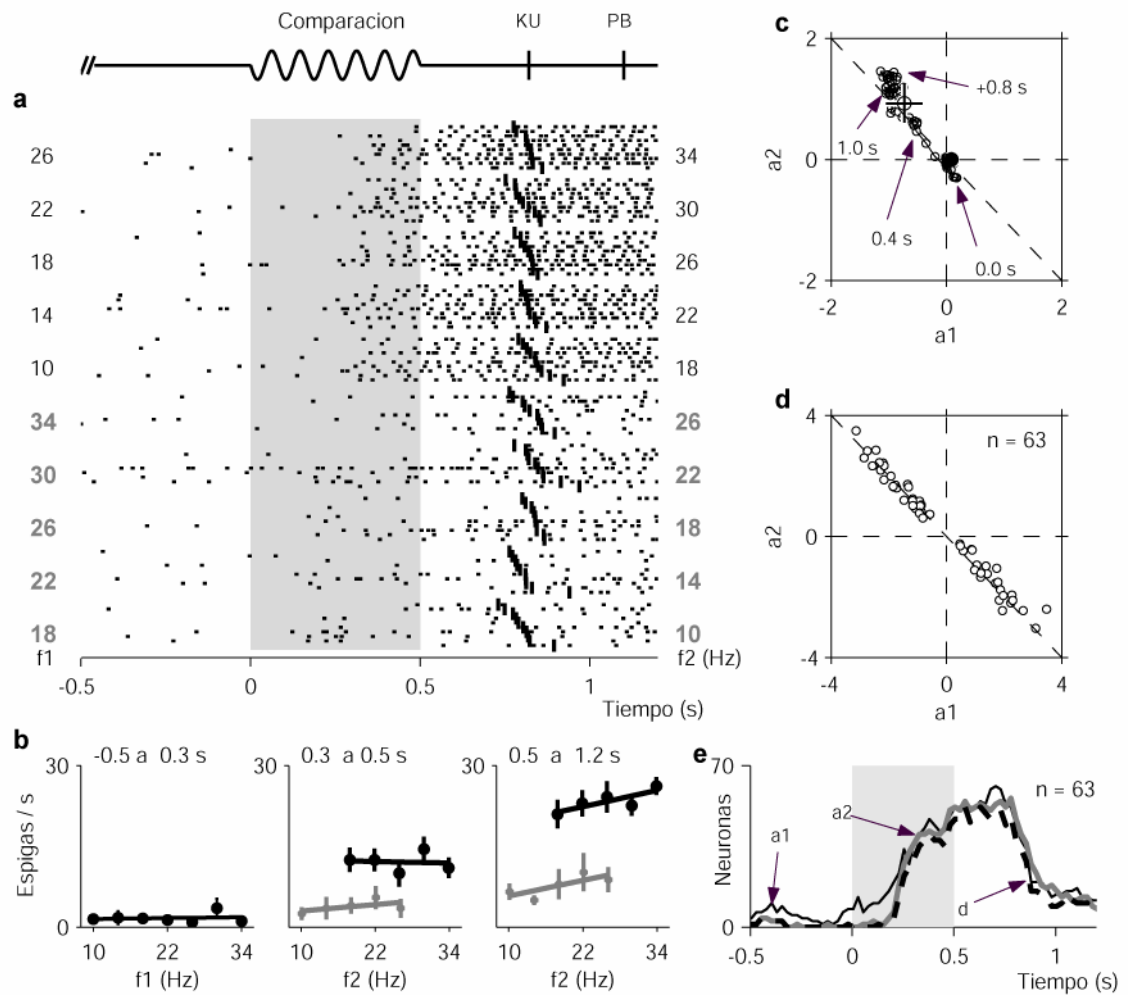


Fig. 16 Dinámica de las neuronas con actividad diferencial más intensa durante el tiempo de reacción y movimiento. (a) Actividad de una neurona de la CPM antes, durante y después del segundo estímulo. Antes del segundo estímulo la neurona no muestra ningún tipo de modulación. Durante el segundo estímulo la actividad diferencial emerge intempestivamente alrededor de los 350 milisegundos, en este caso la actividad llega a ser mayor para aquellos pares donde $f_2 > f_1$. (b) Tasa de disparo en función de f_1 o de f_2 para los periodos indicados en el recuadro. (c) Dinámica de la neurona del panel a pero considerando periodos de cien milisegundos muestreados cada 20 milisegundos. Al iniciarse el segundo estímulo, la respuesta neuronal se vuelve una respuesta diferencial (puntos sobre la diagonal negativa). (d) Resultado del análisis multivariable para una población de 63 neuronas durante los 500 milisegundos posteriores al estímulo de comparación. (e) Número de neuronas que contribuyeron en el instante correspondiente con valores significativos exclusivamente para a_1 (memoria de f_1), exclusivamente para a_2 (información sobre f_2) o de ambos pero con signo diferente (respuesta diferencial).

Discusión de resultados obtenidos en la corteza premotora medial

Tanji y colaboradores (Kurata y Tanji, 1985; Tanji y Kurata, 1985) encontraron que neuronas de la CPM responden a la estimulación táctil. Estos resultados han sido comprobados por otros grupos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la actividad de esas neuronas no solo reflejan la presencia del estímulo. Por el contrario, esa actividad refleja la frecuencia del estímulo. A partir de esa información sensorial se puede dar lugar a procesos de más alto orden como la memoria, la comparación y la decisión.

Trabajos recientes han sugerido que la CPM puede participar en la generación de memoria de trabajo (Petit et al, 1998; LeBar et al, 1999) por lo cual la actividad asociada a periodos de retardo debía ser estudiada con técnicas electrofisiológicas como las utilizadas por Romo en la PFC (Romo et al. 1999) . Los datos obtenidos en este proyecto comprueban que a nivel de neuronas individuales, la CPM puede formar parte de un sistema ampliamente distribuido, dedicado a mantener información sensorial en forma de memoria de trabajo. El que dicha actividad posea una dinámica diferente a la reportada para la corteza prefrontal, sugiere que esa participación no es únicamente un reflejo de un proceso generado en otras áreas del cerebro.

Los resultados más interesantes son aquellos donde se observa la integración de la información sensorial de los dos estímulos a comparar. La evolución temporal de la actividad neuronal, nos muestra durante la parte final del ínter estímulo y durante los primeros 150 milisegundos del estímulo de comparación, existe una señal en la cual podemos identificar la frecuencia del primer estímulo (Fig. 14). El análisis hace evidente que esa señal evoluciona a una señal que es función de la frecuencia de ambos estímulos con un remanente de información sensorial. Durante la parte final del período de comparación se manifiesta una señal exclusivamente diferencial, que coincide con el resultado de la comparación. Es muy importante señalar que la mayor parte de esa actividad diferencial se extingue durante los tiempos de reacción y movimiento. Por otro lado otras neuronas muestran actividad diferencial durante la ejecución del movimiento. A diferencia de trabajos recientes donde se estudia el proceso de la decisión empleando un solo estímulo (Shadlen y Newsome, 1996, 2001), este trabajo permite disociar los aspectos sensoriales de los aspectos motores y nos da la oportunidad de estudiar la decisión cuando está involucrada la memoria de trabajo.

En conclusión: estos resultados ponen en evidencia que: la CPM no solo codifica los parámetros del movimiento a través de los cuales se manifiesta la decisión en la tarea de discriminación de frecuencia de estímulos vibrotáctiles. Además, las neuronas de esta área participan activamente en los

aspectos sensoriales, de memoria de trabajo y de comparación, necesarios en el proceso de toma de decisión.

En ese punto del proyecto debimos preguntarnos: ¿es la CPM la única área motora del lóbulo frontal donde se pueden observar los correlatos asociados con la toma de decisiones? Para responder este cuestionamiento, debimos explorar otras áreas de la corteza cerebral durante la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles. Una región premotora que resulta un buen candidato para relacionar la representación sensorial con la salida motora es la corteza premotora ventral (CPV) la cual comprende las áreas 44 y 45 de Brodmann en el humano, esta área corresponde a F4 y F5 en el mono.

La CPV recibe proyecciones de las áreas sensoriales de la corteza parietal (Godschalk et al., 1984; Matelli et al., 1986; Luppino et al., 1999) y de áreas de asociación de la corteza prefrontal (Lu et al., 1994), y envía proyecciones a otras áreas motoras del lóbulo frontal (Godschalk et al., 1984; Matelli et al., 1986), estructuras subcorticales (McFarland and Haber, 2000), y médula espinal (Keizer y Kuypers, 1989; Dum y Strick, 1991; He et al., 1993). Además, las neuronas de esta área poseen campos sensoriales para las modalidades visuales, somestésicos y auditivos (Rizzolatti et al., 1988; Graciano et al., 1997, 1999), así como campos motores (Gentilucci et al., 1988). Estas neuronas codifican acciones motoras complejas (Gentilucci et al., 1988; Umiltà et al., 2001; Kakei et al., 2001; Rizzolatti and Luppino, 2001). Finalmente, la inactivación de la CPV afecta la ejecución de tareas sensoriomotoras. (Fogassi et al., 2001).

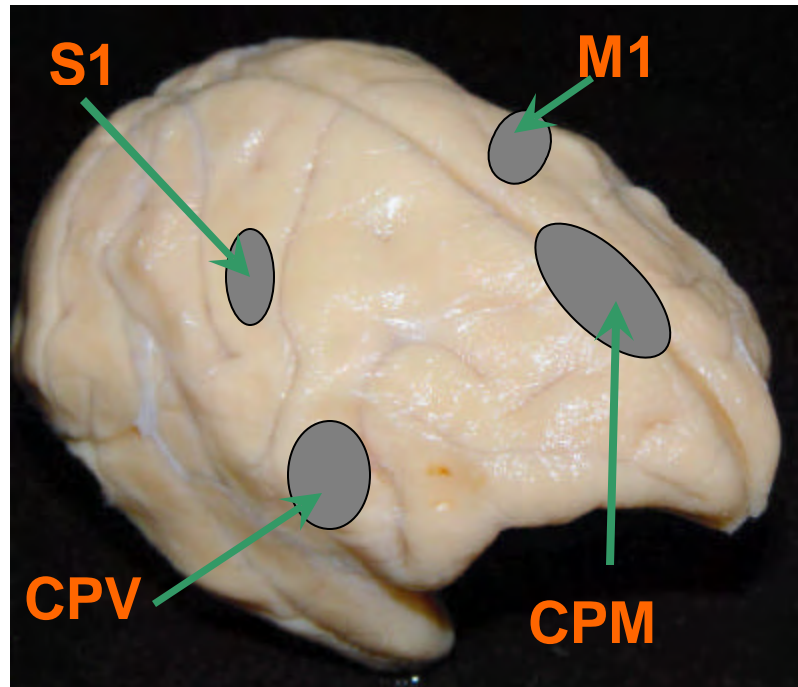


Fig. 17 Localización de la corteza premotora ventral (CPV)

Resultados obtenidos en la corteza premotora ventral

Dos de los cuatro monos rhesus usados para estudiar la CPM fueron usados también para registrar en la CPV durante la ejecución de la tarea de discriminación de estímulos vibrotáctiles. En esta área fueron identificadas 434 neuronas como neuronas responsivas durante al menos alguna etapa de la tarea (prueba de Wilcoxon, $p < 0.01$). Sesenta y seis neuronas modularon su respuesta en función de la frecuencia del primer estímulo durante el periodo de aplicación del mismo (ajuste lineal $Q > 0.01$, con pendiente significativamente distinta de cero, $p < 0.01$); 54 por ciento de ellas incrementaron su respuesta al incrementar la frecuencia del estímulo (pendientes positivas) y 45% disminuyeron su respuesta al incrementar la frecuencia (pendientes negativas). Cincuenta y nueve neuronas modularon su respuesta en función de la frecuencia del primer estímulo durante el periodo que separa ambos estímulos; 52% de esas neuronas mostraron pendiente positiva y 48% con pendiente negativa. Además, se encontraron 28 neuronas que durante el segundo estímulo codificaron en su tasa de disparo, exclusivamente la frecuencia del estímulo de comparación; 15 de ellas (54%) fueron de pendiente positiva y 13 (46 %) fueron de pendiente negativa. Adicionalmente, se encontraron tres neuronas que codificaron durante el período de comparación, la frecuencia del primer estímulo. Por otro lado, noventa y ocho neuronas mostraron actividad selectiva o diferencial asociada al proceso de decisión o actividad motora.

Sin embargo, los resultados más importantes se hicieron evidentes cuando se realizó el análisis de regresión multivariable con el objetivo de observar la dinámica temporal de la actividad de las 434 con actividad responsiva. Esto se realizó considerando intervalos de tiempo de 100 milisegundos con desplazamiento de 20 milisegundos entre segmentos consecutivos. Para ejemplificar los resultados de este análisis, se presentan en la figura 18 cuatro neuronas con respuestas características de la CPV: 1) una neurona sensorial, la cual codifica la frecuencia del primer estímulo o la frecuencia del segundo estímulo durante la aplicación del estímulo correspondiente; 2) una neurona asociada exclusivamente al proceso de memorizar la frecuencia del primer estímulo; 3) una neurona cuya respuesta predice la decisión del sujeto o el resultado de la comparación y, finalmente; 4) una neurona que representa la frecuencia del primer estímulo, participa en la memorización del primer estímulo y, al aplicarse el segundo estímulo, la respuesta es modulada por ambas frecuencias por lo cual correlaciona con el proceso de comparación.

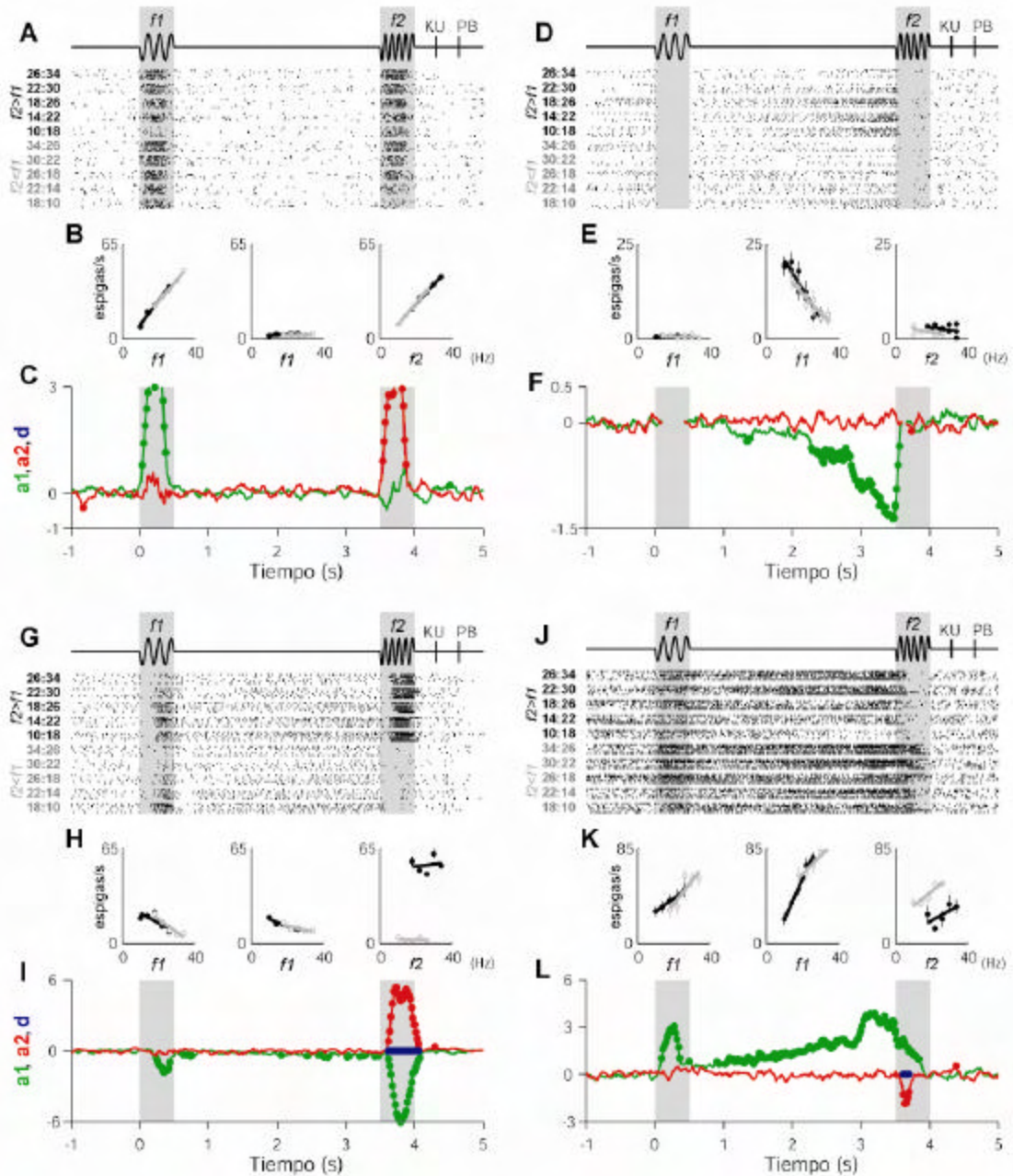


Fig. 18 Dinámica de cuatro neuronas de la CPV. (A) Neurona sensorial, esta neurona responde exclusivamente durante los períodos de estimulación y modula su respuesta positivamente en función de la frecuencia del estímulo correspondiente. (B) Análisis de regresión simple de la tasa de disparo de la neurona de A, durante el primer estímulo y el retardo entre estímulos el análisis se realizó respecto a f_1 , durante el estímulo de comparación la regresión se realizó respecto a f_2 . (C) Análisis de regresión lineal múltiple tomando la respuesta de la neurona en segmentos de 100 ms de duración con un traslape de 20 ms entre segmentos consecutivos. El color verde indica los valores de a_1 (asociado a la frecuencia del primer estímulo), el color rojo indica los valores de a_2 (asociado a la frecuencia del segundo estímulo). Los círculos indican los valores significativamente distintos de cero. Los círculos azules indican los casos donde a_1 y a_2 son estadísticamente indistinguibles pero de signo contrario. (D) Respuesta exclusivamente de memoria. (G) Neurona de comparación con respuesta predominantemente diferencial durante el final del segundo estímulo. (J) Neurona de comparación con respuesta predominantemente de memoria. Los demás paneles son similares a los descritos para B y C.

Para observar el desempeño de la población neuronal en la CPV, procedimos a generar figuras donde se observara la dinámica del número de neuronas con coeficientes a_1 o a_2 significativos. Los resultados se presentaron en dos formatos: 1) Graficando a_1 contra a_2 para diferentes períodos de interés. En la gráfica correspondiente, mostrada como panel A de la figura 19, podemos observar la magnitud de los coeficientes, su tendencia y dispersión. Para esta figura se usaron los colores descritos en la figura 18 y se agregó un cuarto caso en el cual tanto f_1 como f_2 modulan la respuesta en forma significativa y opuesta, pero además entre los valores de a_1 y a_2 existe una diferencia significativa. En esta condición podemos afirmar que la neurona tiene una respuesta diferencial donde existe sobrepuesta una componente sensorial. 2) Graficando en función del tiempo el histograma del número de neuronas con coeficientes significativos; este formato nos permite identificar como y cuando contribuyen diferentes poblaciones a la solución de la tarea.

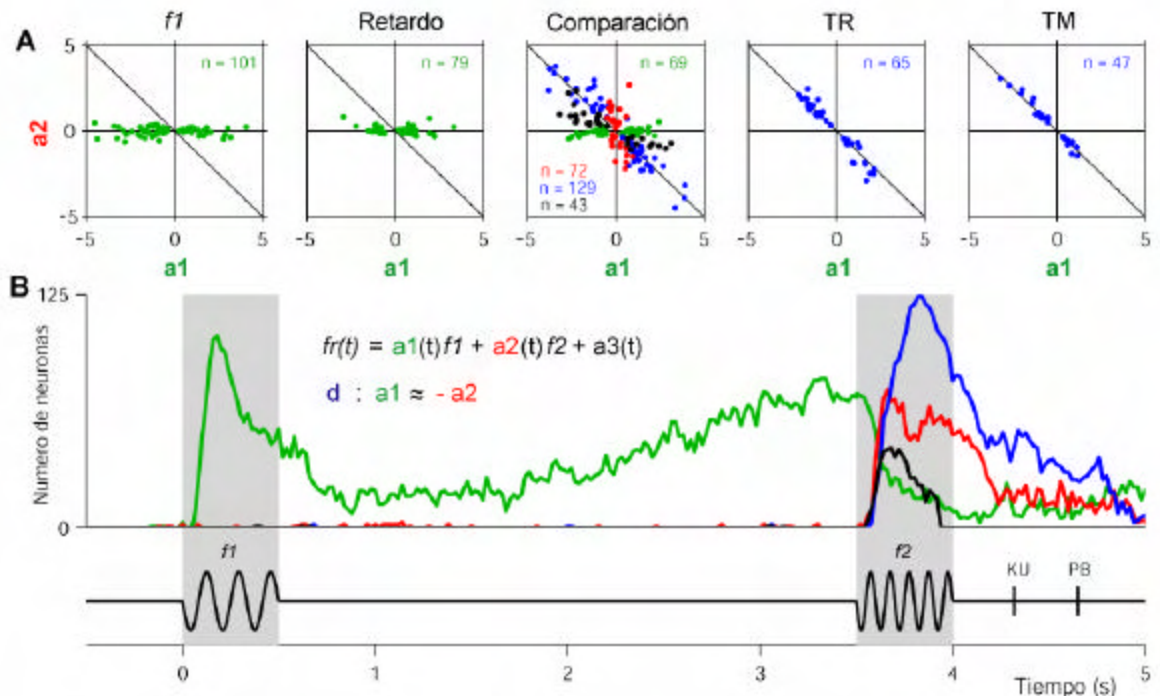


Fig. 19 Participación de la CPV en la tarea de discriminación de frecuencias de estímulos vibrotáctiles. (A) Contraste de los valores de a_1 vs. a_2 para distintos periodos de interés. (B) Histograma en función del tiempo para el número de neuronas con coeficientes significativos. En verde, casos donde exclusivamente a_1 fue significativo; Por lo tanto, las neuronas solo codifican la frecuencia del primer estímulo. En rojo, casos donde exclusivamente a_2 fue significativo, en cuyo caso solo f_2 modula la respuesta. El Azul corresponde a neuronas diferenciales donde las magnitudes de a_1 y a_2 son similares y de signos opuestos. En negro se muestran los casos donde las magnitudes de a_1 y a_2 son significativas y de signos opuestos, pero alguna de las dos es significativamente mayor que la otra. Este último caso se denomina neuronas sensorio-diferenciales porque su respuesta nos indica simultáneamente tanto información de la evidencia sensorial como del resultado de la comparación.

El perfil observado en la figura precedente, puede descomponerse en subgrupos de tal forma que nos permitan observar la dinámica y el tamaño de las poblaciones para los siguientes grupos de neuronas:

- A) Neuronas que solo representen la frecuencia del estímulo durante la aplicación de los mismos. Esto es, neuronas aparentemente sensoriales semejantes a las descritas en S1.
- B) Neuronas que contribuyan al mantenimiento de la memoria sin haber participado en la representación del primer estímulo durante f1.
- C) Neuronas que contribuyan al mantenimiento de la memoria habiendo participado en la representación del primer estímulo durante f1.
- D) Neuronas que iniciaron una señal diferencial durante la presentación del segundo estímulo.
- E) Neuronas que iniciaron una señal diferencial durante el tiempo de reacción.
- F) Neuronas que iniciaron una señal diferencial durante el tiempo de movimiento.

Estas poblaciones son mostradas en la figura 20. Estos datos ponen en evidencia que distintos grupos de neuronas participan en diferentes períodos de la tarea. La letancia de las neuronas sensoriales (panel A) fue significativamente mayor a la que ha sido reportada para las neuronas de S1 y S2 (prueba de permutación, $p < 0.01$); pero la cantidad de información (valores de las pendientes) es semejante (prueba de permutación, $p > 0.05$). En esta área se encontraron preferentemente neuronas con un componente tardío para el mantenimiento de la memoria de la frecuencia del primer estímulo. Sin embargo también se encontraron neuronas con memoria temprana y persistente como reportaron Romo y colaboradores en la corteza prefrontal (Romo et al., 1999, Brody et al., 2002). El número de neuronas que mostró componentes sensoriales previos a la generación de una señal diferencial, fue claramente distinguible de las poblaciones de neuronas con actividad exclusivamente diferencial que se activaron durante el tiempo de reacción y el tiempo de movimiento.

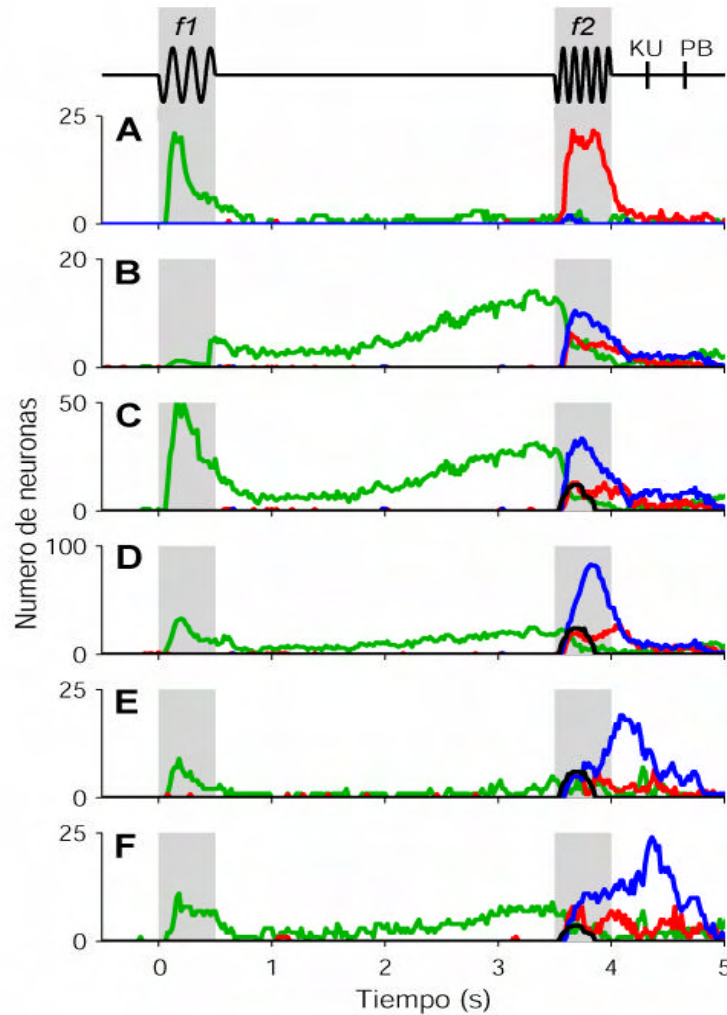


Fig. 20 Dinámica de poblaciones de neuronas de la VPC se muestran subpoblaciones asociadas a los procesos necesarios para resolver la tarea de discriminación de frecuencias, los diferentes paneles corresponden a los grupos descritos en el párrafo superior.

Covariación de la actividad neuronal de la CPM con la conducta

Para establecer si la actividad de las neuronas de la CPV esta asociada con la conducta, se procedió a analizar la dinámica de estas neuronas utilizando un índice conocido como “índice de probabilidad de elección”. Esta herramienta compara, para un par de frecuencias, aquellos ensayos que culminaron en acierto contra aquellos que terminaron siendo un error. Las premisas son muy sencillas: en aquellos casos donde no existe una diferencia significativa entre ambos grupos, esto indica que la neurona puede participar en la tarea pero su actividad no nos dice nada sobre si el sujeto acertará o se equivocará, esto es de esperarse por ejemplo para una neurona que solo refleje los atributos de los estímulos. Por el contrario, un índice significativo nos hará

evidente que la neurona puede predecir si el sujeto acertará o se equivocará al emitir su respuesta. En este grupo esperamos observar aquellas neuronas que participan en la comparación y/o en la preparación y ejecución del movimiento. El análisis lo realizamos sobre tres grupos de neuronas:

- 1) en aquellas neuronas que representaron la frecuencia del segundo estímulo durante el período de comparación (línea roja de la figura 21)
- 2) en aquellas neuronas que mantuvieron memoria del primer estímulo y luego llegaron a ser diferenciales durante el período de comparación (línea negra de la figura 21)
- 3) en aquellas neuronas que respondieron diferencialmente durante el período de comparación (línea azul de la figura 21)

Adicionalmente se realizó un experimento control donde el botón correspondiente al acierto fue iluminado desde el inicio del ensayo permitiéndole al sujeto obtener recompensa sin evaluar la evidencia sensorial, pero ejecutando los mismos movimientos (figura 21, línea color cian). Una neurona puramente motora debería mantener su actividad diferencial durante esta condición. Esta condición control se aplicó a neuronas de los tres grupos señalados en el párrafo anterior.

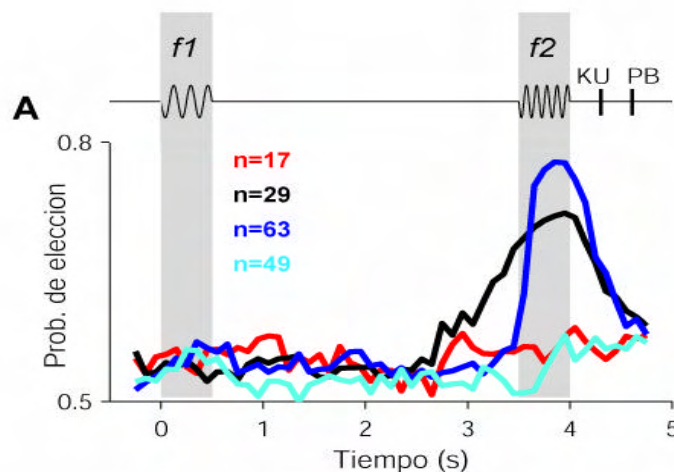


Fig. 21 Covariación de la actividad de neuronas de la CPV con la conducta. Valores del índice de probabilidad de elección cercanos a 1.0 indican que la actividad de las neuronas predicen si el sujeto acertara o se equivocará. Valores cercanos a 0.5 indican que la actividad de la neurona no es diferente entre aciertos y errores. La línea roja corresponde a neuronas sensoriales, la línea negra corresponde a neuronas de comparación, la línea azul son neuronas exclusivamente diferenciales. Finalmente la línea cian representa el experimento control donde el botón fue iluminado para anticiparle al sujeto la acción motora con la cual tendría acceso a la recompensa sin necesidad de realizar la comparación.

Todos estos resultados muestran que la corteza premotora ventral posee poblaciones de neuronas que participan en la representación de la frecuencia de ambos estímulos, en el mantenimiento de la información de f1 en memoria

de trabajo, en la comparación de f_1 contra f_2 para establecer cual de los dos es de mayor frecuencia y finamente en la preparación y ejecución del comando motor a través del cual se manifiesta la decisión. También se ha demostrado que la variabilidad en la respuesta de estas neuronas covaría con la distribución de aciertos y errores, por lo tanto se establece que la actividad de esta área incide en la conducta del sujeto.

Comparación de las cortezas motoras del lóbulo frontal contra otras áreas corticales

El análisis de regresión lineal múltiple, nos permite establecer cómo y cuándo las respuestas de una población de neuronas están asociadas a procesos:

- 1) exclusivamente sensoriales;
- 2) relacionados a la memoria;
- 3) de comparación entre f_1 y f_2 ;
- 4) y a la ejecución de comandos motores.

Este análisis lo hemos aplicado a los datos de las cortezas premotoras. Sin embargo, considerando su flexibilidad decidimos extender el análisis de regresión lineal multivariable a los datos registrados en otras áreas corticales. El resultado es presentado en la figura 22 y nos permitió describir como diferentes áreas cerebrales contribuyen de forma distinta y en tiempo distintos a la solución del problema.

Los datos de S1 corresponden a una población de neuronas sobre cuyo campo receptivo fue aplicado el estímulo y asociadas a mecanorreceptores de adaptación rápida. Estas neuronas solamente respondieron durante los periodos de estimulación y típicamente no entraron en fase con la forma de onda del estímulo táctil tal como lo hicieron las neuronas descritas por Mountcastle en 1990. Nuestro análisis comprobó lo descrito por Romo y colaboradores (Salinas et al., 2000; Hernández et al., 2000). Este grupo de neuronas representa nítidamente la frecuencia de los estímulos, pero no participaron en aspectos de memoria, de comparación y tampoco en la ejecución del movimiento.

Las neuronas de la corteza somatosensorial secundaria (S2) participan principalmente en la representación del a frecuencia de los estímulos. También aparecen un grupo de neuronas que al final del primer estímulo mantiene durante un periodo corto la memoria de ese estímulo (memoria temprana). Así mismo, un grupo menor de neuronas participa en la comparación y en la generación de una señal que correlaciona con la decisión. Pocas neuronas se activan durante el movimiento.

Finalmente, la corteza motora primaria correlaciona fuertemente solo con el movimiento tal como lo mostraron los datos de Mountcastle en 1992. Aspectos de representación sensorial, memoria o comparación no estuvieron presentes en la población de neuronas registradas.

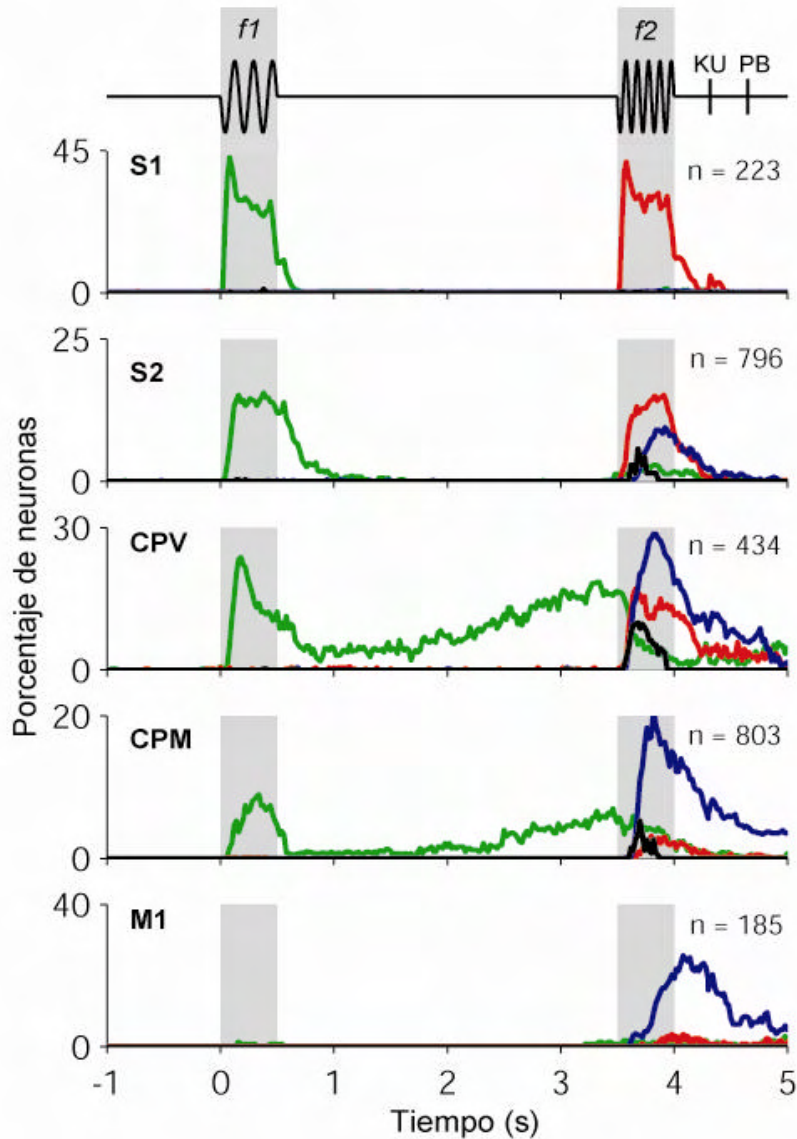


Fig. 22 Dinámica poblacional de cinco áreas corticales del mono rhesus durante la ejecución de la tarea de discriminación de frecuencias vibrotáctiles. S1: corteza somatosensorial primaria, S2: corteza somatosensorial secundaria, CPV: corteza premotora ventral, CPM: corteza premotora medial. M1: corteza motora primaria. En verde, casos donde exclusivamente a1 fue significativo. Por lo tanto las neuronas solo codifican la frecuencia del primer estímulo. En rojo, casos donde exclusivamente a2 fue significativo, en cuyo caso solo f2 modula la respuesta. El azul corresponde a neuronas diferenciales donde las magnitudes de a1 y a2 son similares y de signos opuestos. En negro se muestran los casos donde las magnitudes de a1 y a2 son significativas y de signos opuestos, pero alguna de las dos es significativamente mayor que la otra, este grupo además debía cumplir tener al menos 100 ms con a1 o a2 significativos previos a la actividad diferencial.

Discusión de resultados obtenidos en la corteza premotora ventral

Los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo son consistentes con la observación de que áreas sensoriales, de memoria y motoras se encuentran conectadas anatómicamente con la corteza premotora ventral (Wise et al., 1992; Rizzolatti y Luppino, 2001). Esta posición privilegiada, facilita que la CPV participe en los procesos que permiten ligar la información sensorial con el acto motor a través del cual se manifiesta el resultado de la comparación de la evidencia sensorial. Esta área de la corteza cerebral es reconocida por la existencia de las neuronas espejo; neuronas que se activan cuando un animal o persona desarrolla la misma actividad que está observando ejecutar por otro individuo (Rizzolatti et al. , 1996).

Este trabajo valida estadísticamente la existencia de poblaciones de neuronas que: 1) representan la frecuencia de ambos estímulos; 2) almacenan en memoria de trabajo la frecuencia del primer estímulo y conforme se acerca la presentación del segundo estímulo el número de neuronas con estas propiedades se incrementa; 3) para un grupo significativo de neuronas con memoria de trabajo, se observa que al aplicarse el segundo estímulo esa respuesta que representaba a f_1 es afectada también por f_2 , evolucionando hasta indicar el signo de la diferencia entre f_1 y f_2 ; 4) también se apreciaron grupos de neuronas que durante el tiempo de reacción o bien durante el tiempo de movimiento, manifestaron una actividad exclusivamente diferencial, indicando el movimiento que realizara el sujeto, pero sin brindarnos información sobre la evidencia sensorial que dio origen a dicha señal.

El hecho de encontrar neuronas asociadas al proceso de decisión en un área tradicionalmente asociada al lenguaje y al aprendizaje de habilidades motoras (procesos asociados a las neuronas espejo) nos invita a reflexionar sobre la funcionalidad de las distintas áreas corticales.

Este documento reporta el trabajo realizado durante siete años. Incluye el registro electrofisiológico en áreas sensoriales, de asociación y motoras del cerebro del mono rhesus. Los resultados, nos permiten visualizar a neuronas de diferentes áreas de la corteza cerebral trabajando simultáneamente para resolver un problema. Estos datos son muy valiosos para diseñar nuevos experimentos que permitan descubrir la transferencia de información entre neuronas de distintas áreas, así como la forma en que esas neuronas realizan transformaciones a lo largo de la cadena de procesamiento.

Las dinámicas neuronales descritas en este trabajo no pueden ser observadas aun con técnicas no invasivas (imágenes) por lo cual aun no es posible observar estos mecanismos en el cerebro del humano.

Conclusiones generales

El proceso de tomar decisiones razonadas es fundamental para garantizar el bienestar del ser humano. Revelar los procesos fisiológicos que dan soporte a esa capacidad es uno de los problemas centrales de la neurofisiología de sistemas. Numerosos grupos de investigación han abordado este problema. Por ejemplo, Romo (Romo et al., 1997), Newsome (Newsome et al., 1989; Shadlen y Newsome, 1996; Shadlen y Newsome, 2001) y Riehle (Zhang et al., 1997) han descrito actividad neuronal asociada a la transformación sensorio-motora; sin embargo han usado tareas donde se aplica un solo estímulo. En esas tareas se asume que el estímulo se compara contra referencias almacenadas en memoria de largo plazo a las cuales no se tiene acceso. En contraste, la tarea de discriminación de frecuencias permite estudiar como se realiza la comparación de dos estímulos recientes; y como ese proceso contribuye a la decisión.

Este trabajo se ha valido del análisis de regresión lineal multivariable para hacer evidente que las estructuras motoras del lóbulo frontal correspondientes a la corteza premotora medial y a la corteza premotora ventral, participan en los procesos necesarios para tomar decisiones, esto es:

- a) Representan los atributos relevantes de las alternativas que se contemplan para tomar la decisión;
- b) Mantienen en memoria la información sensorial hasta que toda la evidencia se encuentre disponible;
- c) Ponderan o comparan la información sensorial de las diferentes alternativas;
- d) Elaboran una señal que manifieste el resultado de la comparación;
- e) Participan en la generación de los comandos motores a través de los cuales se manifiesta el resultado del proceso de decisión.

También se ha mostrado que la variabilidad de estas respuestas incide en la conducta del sujeto.

Estudios anatómicos del cerebro del mono y del humano han permitido proponer que existe tanto un procesamiento jerarquizado, como uno concurrente a través de las diferentes estructuras del sistema nervioso. Este trabajo describe como y cuando participan poblaciones de neuronas de áreas sensoriales (S1 y S2), de asociación (VPC y MPC) y motoras (M1) para resolver la tarea de discriminación de frecuencias. Esta aproximación ha revelado participación simultánea de múltiples áreas para representar y mantener la información sensorial (la frecuencia del estímulo) y de igual forma también existe un procesamiento en paralelo para comparar la

frecuencia de los dos estímulos, generar la señal de decisión y también para generar un comando que guíe el movimiento.

Este trabajo ha servido de guía para la realización de estudios en humanos. En ellos se han utilizado técnicas no invasivas y han comprobado la participación de las mismas áreas o áreas análogas en la solución de la tarea de discriminación de frecuencias. Sin embargo, esos estudios carecen de la suficiente resolución espacial y temporal para hacer evidentes procesos como la doble representación en tasa de disparo (modulación positiva y modulación negativa) de la frecuencia de los estímulos vibrotáctiles.

Se ha demostrado en este trabajo que las áreas motoras del lóbulo frontal participan en la toma de decisiones. Futuros experimentos tendrán como objetivos establecer la forma precisa en que las distintas áreas cerebrales colaboran mediante la sincronización, la covariación temporal y/o la generación de ritmos lentos entre otros mecanismos. Para ello, deberemos contar con la posibilidad de registrar en forma simultánea en múltiples áreas del cerebro. Además se deberá incrementar el número de neuronas registradas a fin de maximizar la probabilidad de encontrar neuronas distantes que se encuentren relacionadas. Nuevos métodos de análisis deberán ser diseñados o adaptados. También deberá ser ampliado el rango de frecuencias utilizado para incluir todas las frecuencias perceptibles por el humano y el mono a través del tacto. Los estudios también pueden ser orientados para incluir la percepción de la amplitud y la duración del estímulo que son otros atributos de los estímulos vibrotáctiles. También será necesario identificar los mecanismos que supervisan el desempeño y modifican la estrategia utilizada por el sujeto durante la ejecución de la tarea de discriminación.

Referencias

Alexander, G.E. and Crutcher, M.D. (1990) Preparation for movement: neural representations of intended direction in three motor areas of the monkey. *Journal of Neurophysiology* **64**: 133-150.

Darian-Smith, I. (1984) the sense of touch: performance and peripheral neural processes. In *Handbook of Neurophysiology. The Nervous System, Vol III. Sensory Processes, Part 2*. Edited by Brookhart JM, Mountcastle VB. Bethesda, MD: The American Physiological Society, pp. 739-788.

Darian-Smith, C., Darian-Smith, I., Burman, K. And Ratclife, N. (1993) Ipsilateral cortical projections to areas 3a, 3b and 4 in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology* **335**: 200-213.

Dum, R.P., and Strick, P.L. (1991). The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J. Neurosci.* **11**: 667–689.

Fogassi, L., Gallese, V., Buccino, G., Craighero, L., Fadiga, L., and Rizzolatti, G. (2001). Cortical mechanism for the visual guidance of hand grasping movements in the monkey: a reversible inactivation study. *Brain* **124**: 571–586.

Georgopoulos A.P., Taira, M. and Lukashin, A. (1993) Cognitive Neurophysiology of the motor cortex. *Science* **260**: 47-52.

Gentilucci, M., Fogassi, L., Luppino, G., Matelli, M., Camarda, R., and Rizzolatti, G. (1988). Functional organization of inferior area 6 in the macaque monkey. I. Somatotopy and the control of proximal movements. *Exp. Brain Res.* **71**: 475–490.

Glimcher, P.W. (2003) *Decisions, uncertainty, and the brain: the science of neuroeconomics*. The MIT press. Cambridge, Massachusetts.

Godschalk, M., Lemon, R.N., Kuypers, H.G., and Runday, H.K. (1984). Cortical afferents and efferents of monkey postarcuate area: an anatomical and electrophysiological study. *Exp. Brain Res.* **56**: 410–424.

Graziano, M.S., Hu, X.T., and Gross, C.G. (1997). Visuospatial properties of ventral premotor cortex. *J. Neurophysiol.* **77**: 2268–2292.

Graziano, M.S., Reiss, L.A., and Gross, C.G. (1999). A neuronal representation of the location of nearby sounds. *Nature* **397**: 428–430.

Green, D.M., and Sweets, J.A. (1966) Signal Detection Theory and Sustained activity in the medial wall during working memory delays. *Psychophysics* (New York: John Wiley & Sons).

He, S.Q., Dum, R.P., and Strick, P.L. (1993). Topographic organization of corticospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J. Neurosci.* **13**: 952–980.

Hernández, A., Salinas, E., Garcia, R. & Romo, R. (1997) Discrimination in the sense of flutter: new psychophysical measurements in monkeys. *Journal of Neuroscience* **17**: 6391-6440.

Hernández, A., Zainos, A., Romo R. (2000) Neuronal correlates of sensory discrimination in the somatosensory cortex. *Proc Nat Acad Sci USA* **97**: 6191-6196.

Iwamura, Y., Tanaka, M. And Hikosaka, O. (1980) Overlapping representation of fingers in the somatosensory cortex (area 2) of conscious monkey. *Brain Research* **197**: 516-520.

Johanson, R.S. and Vallbo, A. (1979) Tactile sensitivity in the human hand: relative and absolute densities of four types of mechanoreceptive units in glabrous skin. *Journal of Physiology (Lond.)* **286**: 283-300.

Jones, E.G. and Powell, T.P.S. (1969) Connections of the somatic sensory cortex of the rhesus monkey. I. Ipsilateral cortical connexions. *Brain* **92**: 477-502

Jones, E.G., Coulter, J.D. and Hendry, S.H.C. (1978) Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor and parietal cortex of monkeys. *Journal of Comparative Neurology* **181**:291-384.

Kaas, J.H., Nelson, R.J., Sur, M., Lin, C.S. & Merzenich, M.M. (1979) Multiple representations of the body within the primary somatosensory cortex of primates. *Science* **204**: 521-523.

Takei, S., Hoffman, D.S., and Strick, P.L. (2001). Direction of action is represented in the ventral premotor cortex. *Nat. Neurosci.* **4**: 1020– 1025.

Keizer, K., and Kuypers, H.G. (1989). Distribution of corticospinal neurons with collaterals to the lower brain stem reticular formation in monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp. Brain Res.* **74**: 311–318.

Kurata, K., and Tanji, J. (1985) Contrasting neuronal activity in supplementary and precentral motor cortex of monkeys. II. Responses to movement triggering vs. nontriggering sensory signals. *J. Neurophysiol.* **53**, 142-152.

La Motte, R.H. & Mountcastle V.B. (1975) Capacities of human and monkeys to discriminate between vibratory stimuli of different frequency and amplitude: a correlation between neural events and psychophysical measurements. *J. Neurophysiol.* **38**, 539-552.

Lu, M.T., Preston, J.B., and Strick, P.L. (1994). Interconnections between the prefrontal cortex and the premotor areas in the frontal lobe. *J. Comp. Neurol.* **341**: 375–392.

Luppino, G., Matteli, M., Camarda, (R.M.) and Rizzolatti, G.J. (1993) Cortico-cortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (pre-SMA) in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology* **338**: 114-140.

Luppino, G., Murata, A., Govoni, P., and Matelli, M. (1999). Largely segregated parietofrontal connections linking rostral intraparietal cortex (areas AIP and VIP) and the ventral premotor cortex (areas F5 and F4). *Exp. Brain Res.* **128**: 181–187.

Macefield, G., Gandevia, S.C. & Burke, D. (1990) Perceptual responses to microstimulation of single afferents innervating joints, muscles and skin of the human hand. *Journal of Physiology* **429**: 113-129.

Matelli, M., Camarda, R., Glickstein, M., and Rizzolatti, G. (1986). Afferent and efferent projections of the inferior area 6 in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* **251**: 281–298.

Matelli M, Luppino G, Rizzolatti G (1991) Architecture of superior and mesial area 6 and the adjacent cingulate cortex in the macaque monkey. *J Comp Neurol* **311**: 445–462

McFarland, N.R., and Haber, S.N. (2000). Thalamic relay nuclei of the basal ganglia form both reciprocal and nonreciprocal cortical connections, linking multiple frontal cortical areas. *J. Neurosci.* **20**: 3798–3813.

Mountcastle, V.B. (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology* **20**: 408-434.

Mountcastle, V.B., Talbot, W.H., Sakata, H. & Hyvarinen, J. (1969) Cortical neuronal mechanisms in flutter-vibration studied in unanesthetized monkeys. Neuronal periodicity and frequency discrimination. *Journal of Neurophysiology* **32**: 452-484.

Mountcastle, V.B., Steinmetz, M.A. & Romo, R. (1990) Frequency discrimination in the sense of flutter: psychophysical measurements correlated with postcentral events in behaving monkeys. *Journal of Neuroscience* **10**: 3032-3044.

Nelson, R.J., Sur, M., Felleman, D.J. & Kaas, J.H. (1980) Representations of the body surface in the postcentral parietal cortex of *Macaca fascicularis*. *Journal of Comparative Neurology* **192**: 611-643.

Newsome, W.T., Britten, K.H., Movshon, J.A. (1989) Neuronal correlates of a perceptual decision. *Nature* **341**:52-54.

Ochoa, J. & Torebjork, E. (1983) Sensations evoked by intraneural microstimulation of single mechanoreceptor units innervating the human hand. *Journal of Physiology* **42**: 633-654.

O'Sullivan, B.T., Roland P.E., Kawashima, R. (1994) A PET study of somatosensory discrimination in man. Microgeometry vs. Macrogeometry. *Eur. J. Neurosci.* **6**:137-148

Pandya, D.N. and Kuypers, H.G.J. (1969) Cortico-cortical connections in the rhesus monkey. *Brain Research* **13**: 13-26.

Parker, A.J. & Newsome, W.T. (1998) Sense and the single neuron: probing the physiology of perception. *Annu Rev Neurosci.* **21**:227-277.

Powell, T.P.S. & Mountcastle, V.B. (1959) Some aspects of the functional organization of the cortex of the postcentral gyrus of the monkey: a correlation of findings obtained in a single unit analysis with cytoarchitecture. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* **105**: 133-162.

Rizzolatti G., Fadiga L., Gallese V. and Fogassi L. (1996). Premotor cortex and the recognition of motor actions, *Cognitive Brain Research* **3**: 131-141.

Rizzolatti, G., Camarda, R., Fogassi, L., Gentilucci, M., Luppino, G., and Matelli, M. (1988). Functional organization of inferior area 6 in the macaque monkey. II. Area F5 and the control of distal movements. *Exp. Brain Res.* **71**: 491-507.

Rizzolatti, G., and Luppino, G. (2001). The cortical motor system. *Neuron* **31**: 889–901.

Romo, R., Merchant, H., Zainos, A. & Hernandez, A. (1997) Categorical perception of somesthetic stimuli: psychophysical measurements correlated with neuronal events in primate medial premotor cortex. *Cerebral Cortex* **7**: 317-326.

Romo, R., Hernández, A., Zainos, A. & Salinas E. (1998) Somatosensory discrimination based on cortical microstimulation. *Nature* **392**: 387-390.

Romo, R., Brody, C.D., Hernandez, A. & Lemus, L. (1999) Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* **339**: 470-473.

Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., Brody, C.D., Lemus, L. (2000) Sensing without touching: psychophysical performance based on cortical microstimulation. *Neuron* **26**: 273-278.

Romo, R. & Salinas, E. (2001) Touch and Go: decision-making in somatosensation. *Annu Rev Neurosci.* **24**: 107-137.

Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., Lemus, L., and Brody, C.D. (2002). Neuronal correlates of decision-making in secondary somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* **5**, 1217–1225.

Romo, R., & Salinas, E. (2003) Flutter discrimination: neural codes, perception, memory and decision macking. *Nat Rev Neurosci.* **4**:203-218

Salinas, E. & Romo, R. (1998) Conversion of sensory signals into motor commands in primary motor cortex. *Journal of Neuroscience* **18**: 499-511.

Salinas, E., Hernández, A., Zainos, A., Romo, R. (2000) Periodicity and firing rate as candidate neural codes for the frequency of vibrotactile stimuli. *J Neuroscience* **20**: 5503-5515.

Shadlen, M.N., and Newsome, W.T. (1996) Motion perception: seeing and deciding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 628-633.

Shadlen, M.N., and Newsome, W.T. (2001) Neural basis of a perceptual decision in the parietal cortex (area LIP) of the rhesus monkey. *J. Neurophysiol.* **86**: 1916-1936.

Schultz, W. and Romo, R. (1987) Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey *J. Neurophysiology* **57**: 201-217

Sur, M., Wall, J.T. & Kaas, J.H. (1984) Modular distribution of neurons with slowly adapting and rapidly adapting responses in area 3b of somatosensory cortex in monkeys. *Journal of Neurophysiology* **51**: 724-744.

Talbot, W.H., Darian-Smith, I., Kornhuber, H.H. & Mountcastle, V.B. (1968) The sense of flutter-vibration: comparison of the human capacity response patterns of mechanoreceptive afferents from the monkey hand. *Journal of Neurophysiology* **31**: 301-334

Tanji, J. and Kurata, K. (1985) Contrasting neuronal activity in supplementary and precentral motor cortex of monkeys. I. Responses to instructions determining motor responses to forthcoming signals of different modalities. *J. Neurophysiol.* **53**: 129-141.

Tokuno, H. & Tanji, J. (1993) Input organization of distal and proximal forelimb areas in the monkey primary motor cortex: retrograde double labeling study. *Journal of Comparative Neurology* **333**: 199-209.

Umiltà, M.A., Kohler, E., Gallese, V., Fogassi, L., Fadiga, L., Keysers, C., and Rizzolatti, G. (2001). I know what you are doing. A neurophysiological study. *Neuron* **31**: 155–165.

Vallbo, A.B. & Johansson, R.S. (1984) Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensations. *Human Neurobiology* **3**: 3-14.

Wise, S.P., Di Pellegrino, G., and Boussaoud, D. (1992). Primate premotor cortex: dissociation of visuomotor from sensory signals. *J. Neurophysiol.* **68**: 969–972.

Zhang, J., Riehle A., Requin, J. Komblum S. (1997) Dynamics of single neuron activity in monkey primary motor cortex related to sensorimotor transformation. *J. Neurosci.* **17**: 2227-2246.

Neuronal Correlates of a Perceptual Decision in Ventral Premotor Cortex

Ranulfo Romo,* Adrián Hernández,
and Antonio Zainos
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
04510 México D.F.
México

Summary

The ventral premotor cortex (VPC) is involved in the transformation of sensory information into action, although the exact neuronal operation is not known. We addressed this problem by recording from single neurons in VPC while trained monkeys report a decision based on the comparison of two mechanical vibrations applied sequentially to the fingertips. Here we report that the activity of VPC neurons reflects current and remembered sensory inputs, their comparison, and motor commands expressing the result; that is, the entire processing cascade linking the evaluation of sensory stimuli with a motor report. These findings provide a fairly complete panorama of the neural dynamics that underlies the transformation of sensory information into an action and emphasize the role of VPC in perceptual decisions.

Introduction

Converging lines of evidence suggest that ventral premotor cortex (VPC) is involved in the processes that link sensory information with an action. First, VPC receives projections from sensory areas of the parietal cortex (Godschalk et al., 1984; Matelli et al., 1986; Luppino et al., 1999) and association areas of the prefrontal cortex (Lu et al., 1994), and it sends projections to motor areas of the frontal lobe (Godschalk et al., 1984; Matelli et al., 1986), subcortical structures (McFarland and Haber, 2000), and spinal cord (Keizer and Kuypers, 1989; Dum and Strick, 1991; He et al., 1993). Second, VPC neurons possess both sensory (Rizzolatti et al., 1988; Graziano et al., 1997, 1999) and motor (Gentilucci et al., 1988) fields and encode complex sensorimotor actions (Gentilucci et al., 1988; Umiltà et al., 2001; Kakei et al., 2001; Rizzolatti and Luppino, 2001). Third, inactivation of VPC affects performance of sensorimotor tasks (Fogassi et al., 2001). Thus, VPC seems potentially well suited to evaluate sensory events and convert them into a decision or motor report. But, whether VPC is involved in this cognitive operation is still an open question.

We addressed this question by recording from single neurons in VPC while trained monkeys report a decision based on the comparison of two mechanical vibrations applied sequentially to the fingertips (Figure 1; Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). The task can be conceptualized as a chain of neural operations or cognitive steps: encoding the first stimulus frequency

(f_1), maintaining it in working memory, encoding the second stimulus frequency (f_2), comparing it to the memory trace left by f_1 , and communicating the result of the comparison to the motor apparatus (Romo and Salinas, 2001). Here we report that the activity of VPC neurons reflect the entire processing path required to solving this perceptual task. Many neurons encoded f_1 during both the stimulus presentation and during the delay period between f_1 and f_2 . The responses during the comparison period were a function of both the remembered (f_1) and current (f_2) stimulus and were observed to change, after a few hundred milliseconds, into responses that were correlated with the animal's decision. In addition, we reanalyze and discuss the relative contributions of some other cortical areas responding during the vibrotactile discrimination task (Hernández et al., 2000, 2002; Romo et al., 2002, 2003). The result provides a complete description of the neural dynamics that transforms sensory information into action and emphasizes the role of VPC in perceptual decisions.

Results

Two monkeys (*Macaca mulatta*) were trained in the vibrotactile discrimination task (Figure 1A) until their psychophysical thresholds were stable (Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). After training, we recorded single neurons from VPC (Figure 1E) while monkeys performed the task. We recorded 434 neurons that had task-related responses (see Experimental Procedures). All these neurons were initially recorded using a stimulus set that had large differences between f_1 and f_2 frequencies (Figure 1B). In this set, trials can be divided into two types: those in which $f_2 = f_1 + 8$ Hz (black in Figure 2) and those in which $f_2 = f_1 - 8$ Hz (gray in Figure 2). This corresponds to the monkey's two possible choices. Notice also that, in this set, three comparison frequencies (18, 22, and 26 Hz) can be preceded by base frequencies either 8 Hz higher or 8 Hz lower. In other words, each of these three f_2 frequencies can be judged higher or lower, depending on f_1 . Thus, the neuronal responses across trials can be analyzed as functions of f_1 , f_2 , $f_2 - f_1$, or as functions of the monkey's two possible motor choices.

When the discharges of VPC neurons were analyzed as functions of f_1 , we found 76 neurons (62% of 122 that responded during the f_1 period) that modulated their firing rate as a function of f_1 . Forty-one neurons (54%) varied their firing rate as a positive monotonic function of increasing f_1 (Figures 2A, 2B, 2J, and 2K), while 35 (45%) varied their firing rate as a negative monotonic function of increasing f_1 (Figures 2G and 2H). This type of f_1 encoding was also observed in 59 of 126 neurons (46%) that responded during the delay period between f_1 and f_2 . Of these, 31 (52%) had rates that increased monotonically with increasing f_1 (Figures 2J and 2K), and 28 (47%) had rates that decreased monotonically with increasing f_1 (Figures 2D and 2E). How-

*Correspondence: rromo@ifc.unam.mx

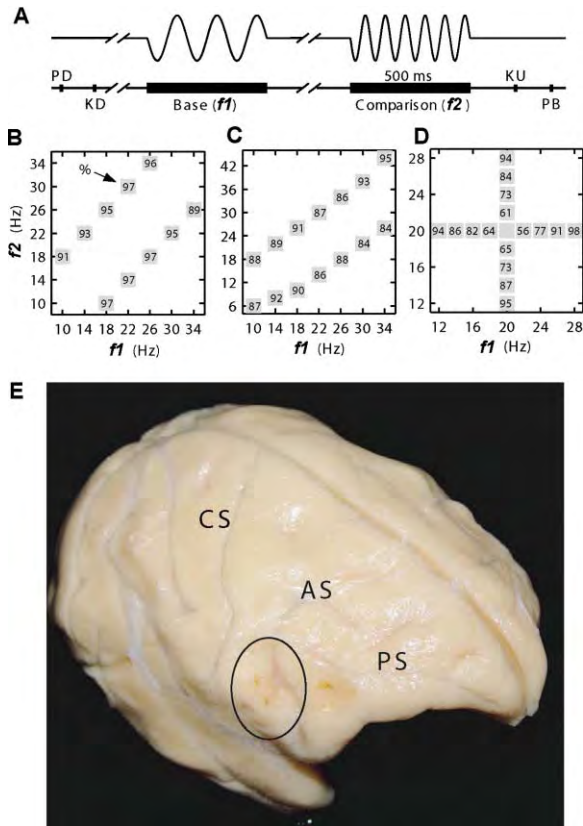


Figure 1. Discrimination Task

(A) Sequence of events during discrimination trials. The mechanical probe is lowered, indenting the glabrous skin of one digit of the hand (PD); the monkey places its free hand on an immovable key (KD); the probe oscillates vertically, at the base stimulus frequency; after a delay, a second mechanical vibration is delivered at the comparison frequency; the monkey releases the key (KU) and presses either a lateral or a medial push button (PB) to indicate whether the comparison frequency was higher or lower than the base.

(B–D) Stimulus sets used during recordings. Each box indicates a base/comparison frequency stimulus pair; the number inside the box indicates overall percentage of correct trials for that base/comparison pair.

(E) Picture of brain surface of one of the two monkeys used in the study. Black circle indicates the site of recordings in VPC (area F5). Abbreviations: AS, arcuate sulcus; CS, central sulcus; PS, principal sulcus.

ever, these monotonic responses recorded during the stimulus presentation and during the delay period could be encoding information about f_1 or future actions. To distinguish between these two possibilities, we studied neurons that encoded f_1 during the stimulus presentation (17 of 76) or during the delay period (8 of 59) with a stimulus set in which the f_1 did not carry information about future actions (Figure 1C). The responses of these neurons during the stimulus set were monotonic functions of f_1 in such a way that the slopes were similar with those obtained during the stimulus set illustrated in Figure 1B (permutation test, $p > 0.05$). These results suggest that VPC neurons with positive and negative slopes encoded f_1 through their firing rates both during the base stimulus and working memory periods of the task.

As the task progressed, responses reflected both f_1 and f_2 . We found 129 neurons (57% of 224 that responded during the f_2 period) that modulated their firing rates during the f_2 period, as described below. Twenty-eight neurons (22%) responded selectively to f_2 : 15 (54%) had rates that varied as positive monotonic functions of f_2 (third panel of Figure 2B), while 13 (46%) had rates that varied as negative monotonic functions of f_2 . Only 3 of the 129 neurons (2%) had firing rates that depended exclusively on f_1 . Thus, considerably fewer neurons had purely sensory responses during the f_2 period than during the f_1 period. However, the task requires that the difference $f_2 - f_1$ be calculated, and the large majority of neurons that responded during the f_2 period reflected this operation. Ninety-eight neurons (76%) discharged differentially during the f_2 period; that is, their responses depended on $f_2 - f_1$. To characterize this activity, we calculated receiver operating characteristic (ROC) curves (Green and Swets, 1966; Hernández et al., 2002; Romo et al., 2002). This analysis was done for each of the three f_2 comparison frequencies (18, 22, and 26 Hz) that could be preceded by lower or higher base frequencies in different trials. This quantified during correct trials how different the distributions of responses to high and low f_1 values were. According to this analysis, 53 neurons (54%) increased their firing rates selectively for $f_2 > f_1$ trials (Figures 2G and 2H) and 45 (46%) did so for $f_2 < f_1$ trials (Figures 2J and 2K). Some of the differential responses invaded the reaction time ([RT] 44%; 43 of 98 neurons) and movement time ([MT] 37%; 36 of 98 neurons) periods, in the latter case continuing until the monkey pressed one of the two push buttons. RTs and MTs were similar for $f_2 > f_1$ trials ($RT = 392.50 \pm 57.55$ ms; $MT = 301.45 \pm 63.84$ ms) and $f_2 < f_1$ trials ($RT = 387.06 \pm 53.87$ ms; $MT = 309.96 \pm 59.99$ ms). Thus, these discharges depended on both f_1 and f_2 , and we investigated this dependence further.

In principle, the response during f_2 could be an arbitrary linear function of both f_1 and f_2 (Draper and Smith, 1966; Hernández et al., 2002; Romo et al., 2002): firing rate(t) = $a_1(t) f_1 + a_2(t) f_2 + a_3(t)$. In this formulation, t represents time, and the coefficients a_1 and a_2 serve as direct measurements of firing rate dependence on f_1 and f_2 , respectively. These measures were calculated in sliding windows of 100 ms moving in steps of 20 ms. To illustrate this analysis, the resulting coefficients a_1 and a_2 for the four neurons of Figure 2 were plotted in panels C, F, I, and L as a function of time. We also plotted the values of a_1 and a_2 against each other to compare the responses at different points during the task (Figure 3A). Three lines are of particular relevance in these plots: points that fall on the $a_2 = 0$ axis represent responses that depend on f_1 only (green dots in Figure 3A); points that fall on the $a_1 = 0$ axis represent responses that depend on f_2 only (red dots in Figure 3A); and points that fall near the $a_2 = -a_1$ line represent responses that depend on the sign of $f_2 - f_1$ (blue dots in Figure 3A). This last consideration is of particular importance, since the sign of the difference between f_1 and f_2 determines correct task performance. However, the result of the analysis is not only restricted to these three conditions. For example, in those hypothetical cases where the modulation imposed by f_1 and f_2 results

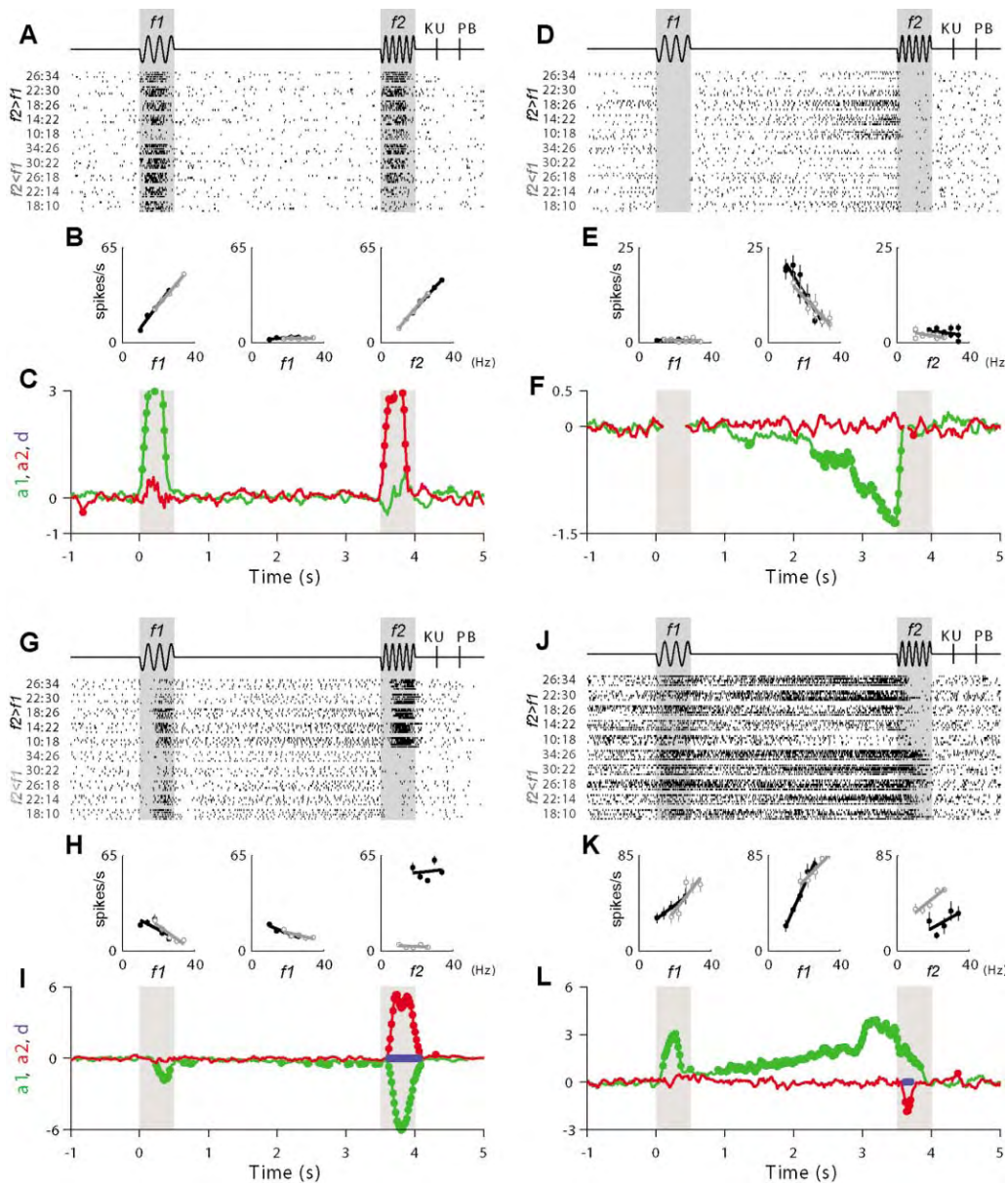


Figure 2. Responses of Four VPC Neurons during the Vibrotactile Discrimination Task

(A) Raster plot of a neuron that responded during f_1 and f_2 stimulation. Each row of ticks is a trial, and each tick is an action potential. Trials were delivered in random order (only 5 trials per stimulus pair are shown; all neurons were tested with 10 trials per stimulus pair). Labels at left indicate f_1 , f_2 stimulus pairs. The stimulus set illustrated in Figure 1B was used.

(B) Average firing rate as a function of f_1 or f_2 . Black indicates $f_2 > f_1$ ($f_2 = f_1 + 8$ Hz for this stimulus set); gray indicates $f_2 < f_1$ ($f_2 = f_1 - 8$ Hz). Data for left and middle panels are displayed as a function of f_1 ; data for right panel are displayed as a function of f_2 .

(C) Coefficients a_1 (green line) and a_2 (red line) as functions of time. Filled circles indicate significant values.

(D–F) Same as in (A)–(C), but for a neuron that encoded information about f_1 during the delay period only.

(G–I) This neuron responds to f_1 during stimulation and during the delay period. However, the strongest response is for condition $f_2 > f_1$ during the f_2 period. Blue circles indicate points at which a_1 and a_2 were significant and of similar magnitude, but had opposite signs.

(J–L) This neuron shows a strong f_1 -dependent response during stimulation and during the delay periods. During f_2 the response is selective for the condition $f_2 < f_1$.

in $f_1 + f_2$, the point would fall close to $a_1 = a_2$ line. In this case, the memory of f_1 is added to the f_2 representation, but this result was rarely observed (see Figure 5f of Romo et al., 2002). Remarkably, the larger area of the plane represents those conditions where the strengths of a_1 and a_2 are significantly different from zero and significantly different in the strengths between them.

This last consideration indicates that the effect imposed by the strength of one of the two stimulus frequencies is more important ($|a_1| \neq |a_2|$; $a_1 \neq 0$; $a_2 \neq 0$; black dots in the comparison panel of Figure 3A and black traces of Figures 3B, 4, and 6).

Figure 3B shows the numbers of cells with significant a_1 or a_2 coefficients, as functions of time. The graph

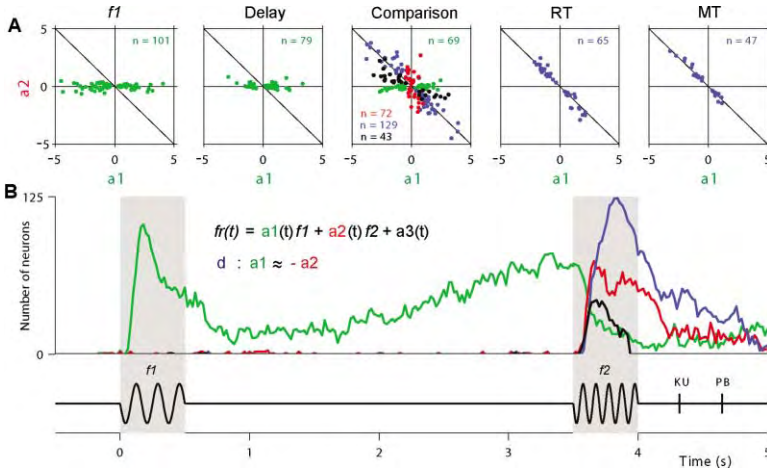


Figure 3. Dynamics of VPC Population Response during the Vibrotactile Discrimination Task

(A) Values of a_1 and a_2 coefficients for all neurons. For each point, at least one coefficient is significantly different from zero. Different plots are for various times of highest peak activity in (B); n = number of neurons. (B) Number of neurons with significant coefficients as a function of time. Green and red traces correspond to a_1 and a_2 , respectively. Blue trace indicates number of neurons with coefficients a_1 and a_2 of opposite sign but similar magnitude; these produce a differential signal. Black trace indicates number of neurons whose coefficient a_1 during the comparison period combines with a_2 , then switch to a differential response. The number of differential responses increases during f_2 and decreases during the actual motor report. RT, reaction time; MT, movement time.

indicates that some VPC neurons encode f_1 , both during the base stimulus period (the beginning of the population response was 61 ± 10 ms [mean \pm standard error (S.E.)] after f_1 onset) and during the working memory period between f_1 and f_2 (green trace). Later, during the comparison, some VPC neurons carry information about f_1 (green trace) while others respond as a function of the current stimulus, f_2 (red trace; the beginning of the response was 101 ± 09 ms after f_2 onset). But, in addition, the information about f_1 and f_2 is combined to generate a differential response (blue trace). An interesting finding is the fact that the dynamic of some neurons during the comparison period switched from an f_1 encoding to a combination with f_2 (black trace), then evolved to a differential response (blue trace). The comparison signal of this group (black trace) began 190 ± 16 ms after f_2 onset, whereas for that group of neurons with purely differential responses (blue trace) it began slightly later (238 ± 18 ms; t test, $p < 0.01$).

Although the graph of Figure 3B shows the dynamics of the entire population as function of time, however, it does not tell us the combinatorial responses of VPC neurons. Figure 4 shows the different subgroups of VPC neurons that contributed to the graph of Figure 3B. Figure 4A shows that there is a group of neurons whose responses were confined exclusively to the stimulation periods (see also Figure 2A). These neurons modulated their firing rates as a function of f_1 (green trace), then later as a function of f_2 (red trace). Some VPC neurons encoded f_1 during the delay period only (Figure 4B; see also Figure 2D), then during the comparison period encoded f_2 and the difference of $f_2 - f_1$. Figure 4C shows the group of neurons that were modulated as a function of f_1 both during the base stimulation period and during the delay period between f_1 and f_2 (green trace). During the f_2 period, some of the neurons of this group responded as a function of $f_2 - f_1$ (blue trace). Notice also that during the f_2 period some of the neurons of this group switched from a f_1 encoding to a combination with f_2 (black trace), then evolved to a differential response (blue trace). Figure 4D shows the neurons whose responses during the f_2 period were functions of $f_2 - f_1$ (blue trace in Figure 4D; see also Figures 2G

and 2J). Few of these neurons also coded f_1 both during the stimulus presentation and during the delay period between f_1 and f_2 (green trace). As for the group of Figure 4C, some of these neurons during the comparison period switched from an f_1 encoding to a combination with f_2 (black trace), then evolved to a differential response (blue trace). Figures 4E and 4F show the groups of neurons with similar activity to Figure 4D, but the $f_2 - f_1$ responses were confined to the RT and MT periods, respectively. Thus, VPC neurons show a rich combinatorial capacity along the temporal evolution of the task. But which neurons predict in their activity the motor choice?

To answer this question, for each neuron we sorted the responses into hits and errors and calculated a choice probability index (Green and Swets, 1966; Britten et al., 1996; Hernández et al., 2002; Romo et al., 2002). This quantified for each (f_1 , f_2) pair whether responses during error trials were different from responses during correct trials. If the responses were exclusively stimulus dependent, they should show little or no difference between error and correct trials. In contrast, if the responses were linked to the monkey's choice, then the responses should vary according to which button the monkey chose to press. We computed a choice probability index separately for (1) neurons that responded as a function of f_2 only (Figure 5A, red trace); (2) neurons that carried information about f_1 and later depended on $f_2 - f_1$ (Figure 5A, black trace); and (3) neurons that depended on $f_2 - f_1$ only (Figure 5A, blue trace). Figure 5A shows that the motor choice was predicted by neurons that had differential responses (groups 2 and 3), but not by those that responded as a function of f_2 only. The result of this analysis shows that there are significant differences between hits and errors during the same stimulus pair of frequencies (f_1 , f_2). These differences were mainly confined to the comparison period, in such a way that they predicted the animal's error. These signals were maintained during the execution of the motor act. Notice that the neuronal population that carried f_1 information during the delay period shows large choice probability values (above 0.5), just before the comparison period (Figure 5A, black trace). We suggest that this activity is related to the working memory

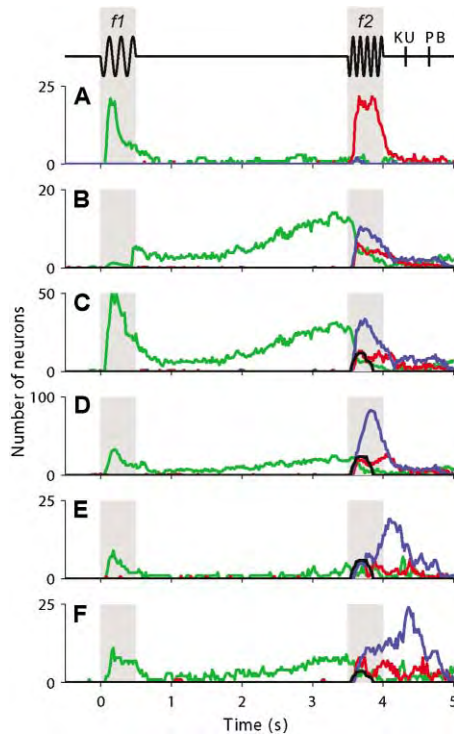


Figure 4. Dynamics of Response Groups of VPC Neurons during the Vibrotactile Discrimination Task

These are groups of neurons of the total number ($n = 434$) that had task-related responses. The same labels as for Figure 3B.

(A) Number of neurons that had $a1$ ($f1$; green trace) or $a2$ ($f2$; red trace) significant coefficients during the stimulus presentation.

(B) Number of neurons that had $a1$ significant coefficient during the delay period between $f1$ and $f2$. During the $f2$ period, some of these neurons had $a1$, $a2$, or $a1 = -a2$ ($f2 - f1$, blue trace) significant coefficients.

(C) Number of neurons that had $a1$ significant coefficients both during the $f1$ stimulation period and during the delay period between $f1$ and $f2$. As for group (B), this group of neurons also showed during the $f2$ period, $a1$, $a2$, or $a1 = -a2$ significant coefficients. Some neurons of this group showed the interaction between the memory trace of $f1$ and $f2$ ($|a1| \neq |a2|$; $a1 \neq 0$; $a2 \neq 0$; black trace).

(D) Number of neurons that had preferentially $|a1| \approx |-a2|$; $a1 \neq 0$; $a2 \neq 0$ significant coefficients during the $f2$ period. Few neurons of this group had $a1$ significant coefficients both during the $f1$ stimulation period and during the delay period between $f1$ and $f2$.

(E) and (F) are similar to (D), but the peaks of $a1 = -a2$ significant coefficients are preferentially during the RT and MT periods, respectively.

component as opposed to the decision component of the task. If trial-by-trial variations of $f1$ encoding during the working memory period correlate with trial-by-trial variations in performance, this will be reflected in the choice probability index values (Brody et al., 2003).

As the monkeys reported their decisions by a motor act, we asked to what extent responses in VPC were reflecting a purely motor signal. In addition to the standard test, some of the neurons of groups 2 and 3 (Figure 5A) were tested in a variant of the task in which the same vibrotactile stimuli were applied and the monkeys made the same push button press motions, but they could choose which push button to press based on visual, not somatosensory, information (see Experimen-

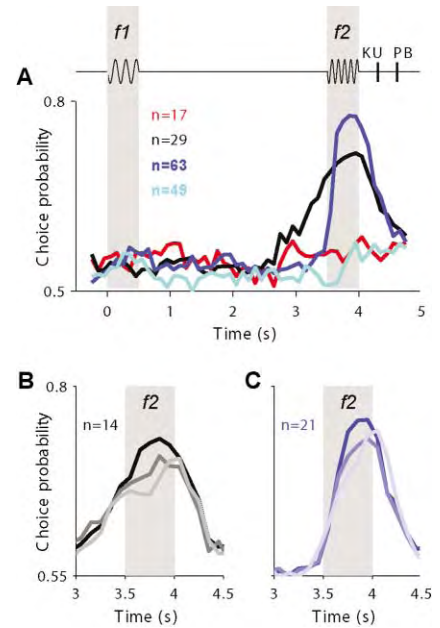


Figure 5. Correlation between Neuronal and Behavioral Responses

(A) Choice probability indices as functions of time for three different groups of neurons. Results are averaged over ($f1$, $f2$) pairs. Red trace, responses that depended only on $f2$ during the comparison period. Black trace, neuronal responses that depended on $f1$ during the delay period and on $f2 - f1$ during the comparison period. Blue trace, neuronal responses that depended on $f2 - f1$ during the comparison period but were not significant during the delay period between $f1$ and $f2$. Cyan trace, neuronal responses that had large choice probability indices (black and blue traces) but tested in a control task in which animals had to follow a visual cue to produce the motor response.

(B and C) Choice probability index calculated separately according to the magnitude of the difference $|f2 - f1|$. Color intensity indicates differences of $|f2 - f1| = 8, 4, 2$ Hz, going from darkest to lightest. Plots are for neurons that responded to $f2 - f1$ during the comparison period and had (B) or did not have (C) $f1$ -dependency.

tal Procedures). Under this condition, the choice probability indices of VPC neurons dropped to near chance levels (Figure 5A, cyan trace). We also asked whether during the comparison period the activity of these neurons reflected the difference between $f1$ and $f2$. When these neurons were tested at psychophysical threshold using the stimulus set illustrated in Figure 1D, they reflected the difference between $f2$ and $f1$ in a graded fashion (Figures 5B and 5C). These tests show that VPC responses reflect both the active comparisons between $f1$ and $f2$ and the motor choice that is specific to the context of the vibrotactile discrimination task.

Discussion

The data obtained in this combined neurophysiological/psychophysical experiment indicate that the neural dynamics in VPC reflect the entire sequence of processing steps that link sensation and action during a perceptual discrimination task. During this sequence, past and present sensory information are combined dynamically, such that a comparison of the two evolves into a behavioral decision.

One could argue that the neuronal events recorded during this task reflect other processes, such as preparation for a future action. This seems unlikely, however, because (1) delay responses depended on $f1$ regardless of subsequent movements, (2) differential responses developed gradually, often depending exclusively on $f2$ or $f1$ early in the comparison, (3) choice probability indices depended on $|f2 - f1|$, and (4) when the same movements were guided by visual cues, the differential activity disappeared. Previous observations suggest that VPC neurons transform the perception of complex visual objects or actions into body movements (Rizzolatti and Luppino, 2001). But precisely what components of this cognitive operation are reflected in the activity of VPC neurons? Actions may depend on the interaction between internal and external factors; in particular, in the vibrotactile discrimination task, a voluntary motor response is triggered by the interaction between current and recalled sensory information. All of these variables—memory of a sensory stimulus, value of a current stimulus, and a comparison between the two—are directly correlated with the activity and dynamics of VPC neurons. Furthermore, the VPC units encoded $f1$ both during the stimulus presentation and working memory periods of the task. Thus, the key issue is how the physical variables that are encoded in the VPC activity are transformed into an action. A mechanistic explanation is still lacking, but some observations can be made.

Our data are consistent with the finding that sensory, memory, and motor-related areas of the brain are anatomically connected with VPC (Rizzolatti and Luppino, 2001). This further supports the idea that premotor cortex is well situated for linking sensory (Hernández et al., 2002) and memory (Miller and Cohen, 2001; Ohbayashi et al., 2003; Hernández et al., 2002) events with motor actions (Wise et al., 1992; Rizzolatti, and Luppino, 2001; Schall, 2001; Hernández et al., 2002; Romo and Salinas, 2003). One crucial question emerges from these results: is the activity of neuronal populations in VPC sufficient to generate the entire perceptual decision process studied here? Considering the activity observed in other cortical areas during the same task, it would seem that this process involves the conjoined responses of many areas (Romo et al., 1999, 2002; Hernández et al., 2000, 2002; Salinas et al., 2000). Thus, a comparison with other responsive cortical areas is instructive.

We reanalyzed data from other areas recorded during the vibrotactile discrimination task (from Hernández et al., 2000, 2002; Romo et al., 2002, 2003), exactly as we did for VPC (present results). Figure 6 compares their neural dynamics and Table 1 indicates the onset of activity for each of the components of the vibrotactile task. The results suggest that the comparison between stored and ongoing sensory information takes place in a distributed fashion. It also suggests that there is a continuum between sensory- and motor-related activity. For example, $f1$ is encoded in multiple cortical areas (green traces of Figure 6). Such encoding seems to proceed in a serial fashion from primary somatosensory cortex (S1) to secondary somatosensory cortex (S2) and VPC, and then to medial premotor cortex (MPC). Although the strength of this signal varies across areas, all them except for S1 store the value of $f1$ at different times during the working memory component of the task (green traces

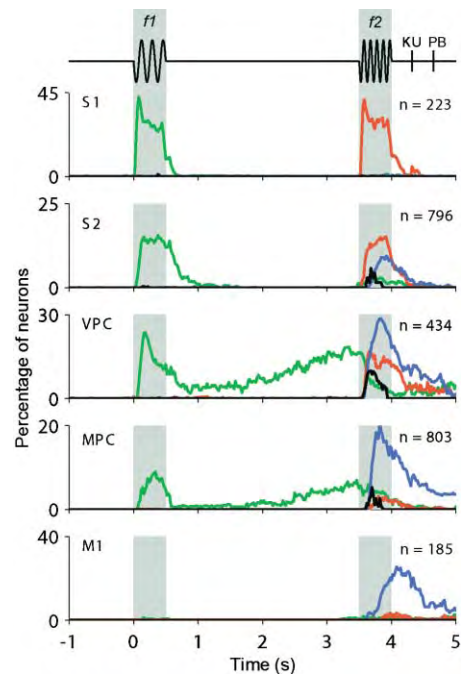


Figure 6. Dynamics of Population Responses of Five Cortical Areas during the Vibrotactile Discrimination Task

Labels as Figure 3B. The responses are expressed as percentage of the total number of neurons (n) that had task-related responses. S1, primary somatosensory cortex; S2, secondary somatosensory cortex; VPC, ventral premotor cortex (present paper); MPC, medial premotor cortex; M1, primary motor cortex. Original data from S1, S2, MPC, and M1 were previously published (Hernández et al., 2000, 2002; Romo et al., 2002) and were analyzed exactly as we did for VPC (present paper).

of Figure 6). This is consistent with the proposal that there is a large cortical network that dynamically stores sensory information during working memory (Fuster, 1997). During the comparison period, $f2$ is processed similarly by the same cortical areas (red traces in Figure 6 and Table 1). The comparison between stored and ongoing sensory information is observed in S2, VPC, and MPC (black traces in Figure 6 and Table 1), again with various strengths across cortical areas (Figure 6 and Table 1). This comparison signal evolves into a signal that is consistent with the motor choice (blue traces in Figure 6); this is again stronger in some areas than in others, but is widespread nonetheless (Figure 6 and

Table 1. Population Response Latencies

	$f1$	$f2$	Comparison	Differential
S1	41 ± 08	43 ± 10		
S2	58 ± 06	81 ± 05	181 ± 23	235 ± 17
VPC	61 ± 10	101 ± 09	190 ± 16	238 ± 18
MPC	135 ± 22	141 ± 19	194 ± 27	227 ± 24
M1				302 ± 25

$f1$, first stimulus; $f2$, second stimulus; Comparison (interaction between the memory of $f1$ with the current input, $f2$; Differential ($f2-f1$); S1, primary somatosensory cortex; S2, secondary somatosensory cortex; VPC, ventral premotor cortex; MPC, medial premotor cortex; M1, primary motor cortex. Values expressed as mean ± standard error in ms.

Table 1). The resulting motor signal is also observed in primary motor cortex (M1), but M1 does not seem to participate in the sensory, memory, and comparison components of the task. Also, the signal in M1 is considerably delayed in comparison to S2, VPC, and MPC (Figure 6 and Table 1).

This comparative analysis shows that, in this task, S1 is predominantly sensory and M1 is predominantly motor, but otherwise there is broad overlap in response characteristics across all other cortical areas studied. These similarities probably reflect dynamic cross-talk between areas. The differences between S2, VPC, and MPC might best be characterized as shifts in the distributions of response types. For instance, compare VPC and MPC: their response latencies were significantly different, with the $f1$ and $f2$ signals beginning slightly earlier in VPC than MPC (Table 1); the percentages of neurons that encoded each component of the discrimination task were also different (Figure 6). These findings suggest that the premotor areas coordinate the sensory, memory, and decision components of the task but that these processes are first coordinated in VPC. This result, however, should be interpreted cautiously, since recordings were made in different animals and the sample population from each cortical area may vary from animal to animal.

To conclude, the dynamics of VPC neurons during the vibrotactile discrimination task reflect processing that links sensory information with action. Given the task, this processing proceeds in a hierarchical or serial fashion: (1) encoding $f1$ both during the stimulus presentation and working memory periods, (2) encoding the interaction between the current sensory input ($f2$) and the memory trace of $f1$, and (3) encoding the animal's decision report. We suggest that these steps are not unique to the evaluation of somatosensory information; VPC also processes auditory (Graziano et al., 1999) and visual (Rizzolatti et al., 1988; Graziano et al., 1997) information, so it may participate in transforming sensation into action in these modalities as well. It appears that VPC is only one of several cortical areas engaged in this cognitive operation. Indeed, other premotor areas show neuronal responses quite close to those found in VPC during the task used here (Hernández et al., 2002). Thus, further studies are needed to tease apart the unique contributions of the various elements of the cortical network underlying the transformation from sensation into action. This is fundamental for understanding the cortical network mechanisms that underlie perceptual processes such as the one studied here.

Experimental Procedures

Discrimination Task

Stimuli were delivered to the skin of the distal segment of one digit of the restrained hand, via a computer-controlled stimulator (BME Systems, Inc.; 2 mm round tip). Initial probe indentation was 500 μm . Vibrotactile stimuli were trains of mechanical sinusoids. Stimulus amplitudes were adjusted to equal subjective intensities; for example, 71 μm at 12 Hz and 51 μm at 34 Hz (a decrease of $\sim 1.4\%$ per Hz). In each trial, two vibrotactile stimuli were delivered consecutively, separated by an interstimulus delay of 3 s, and the animal was rewarded for correct discrimination with a drop of liquid. Discrimination results were indicated by pressing with the free hand/arm one of two push buttons (for details, see legend of Figure 1). Performance

was quantified through psychometric techniques (Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). Animals were handled according to institutional standards of the NIH and Society for Neuroscience.

Recordings

Neuronal recordings were obtained with an array of seven independent, moveable microelectrodes (Mountcastle et al., 1990) (2–3 M Ω) inserted in VPC (area F5; see Figure 1E) contralateral to the responding hand/arm. Standard histological procedures were used to construct surface maps of all penetrations.

Data Analysis

We considered a neuron's response as task-related if during any of the relevant periods ($f1$, delay between $f1$ and $f2$, $f2$, reaction time [RT], or movement time [MT]) its mean firing rate was significantly different from a control period preceding the initial probe indentation at the beginning of each trial (Wilcoxon test, $p < 0.01$) (Siegel and Castellan, 1988). By definition, $f1$ and $f2$ correspond to the base and comparison periods, respectively. The delay was divided in intervals of 500 ms beginning at the end of $f1$ up to the beginning of $f2$. For the RT, we used that period from the end of $f2$ to the beginning of the key up (KU) (Figure 1A). For the MT, we used that period from the end of KU to the beginning of the push button press (PB) (Figure 1A).

The $f1$ -dependent responses during the stimulus period (500 ms) and during the delay between $f1$ and $f2$ (at least 500 of the 3000 ms) were defined as those that had an acceptable linear fit (χ^2 goodness-of-fit probability, $Q > 0.05$) (Press et al., 1992) for the mean firing rate as a function of stimulus frequency, where the slope was significantly different from zero (permutation test, $n = 1000$, $p < 0.01$) (Siegel and Castellan, 1988).

The dependence on $f1$ and $f2$ was obtained through multivariate regression analysis (Draper and Smith, 1966; Hernández et al., 2002; Romo et al., 2002). Errors in fit coefficients $a1$ and $a2$ were derived from the variance in responses to the individual ($f1$, $f2$) stimulus pairs and resulted in a full 2D covariance matrix of errors. Coefficients were considered significantly different from (0, 0) if they were more than 2 standard deviations away. Neuronal responses were defined unambiguously as dependent on either $f1$ or $f2$ if the coefficients of the planar fit were within 2 standard deviations away of one of the two $a2 = 0$ or $a1 = 0$ lines; responses were considered dependent on $f2 - f1$ (Figures 2–4 and 6) if the coefficients were more than 2 standard deviations away from these two lines and within 2 standard deviations of the $a2 = -a1$ line. Responses not satisfying this criterion were classified as "mixed." The dynamics of these coefficients were analyzed using a sliding window of 100 ms duration moving in steps of 20 ms.

The beginning of the $f1$ tuned response (latency) was estimated for each neuron by identifying the first of three consecutive 20 ms bins after $f1$ onset, in which $a1$ was significantly different from zero and $a2$ was not significantly different from zero (Table 1). The beginning of the $f2$ tuned response was similarly estimated for each neuron as for the $f1$ response, but $a2$ was significantly different from zero and $a1$ was not significantly different from zero (Table 1). The beginning of the comparison response was estimated for each neuron by identifying the first of three consecutive 20 ms bins after $f2$ onset, in which $a1$ and $a2$ were significantly different from zero. We also required that $a1$ or $a2$ was two standard deviations away from $a2 = -a1$ line; that the signs of $a1$ and $a2$ were opposite and that only $a1$ was significantly different from zero between 500 ms before and 100 ms after $f2$ onset; and that the response became differential ($f2 - f1$) during the last 300 ms of $f2$ (these responses fall between the $a2 = 0$ and $a1 = -a2$ lines in Figure 3A; see Table 1 for the values). The beginning of the differential response was estimated for each neuron by identifying the first of three consecutive 20 ms bins, in which the coefficients $a1$ and $a2$ were significantly different from zero and both coefficients were within two standard deviations of the $a2 = -a1$ line (these values fall close to the diagonal as shown in Figure 3A).

The choice probability index was calculated using methods from signal detection theory (Green and Swets, 1966; Hernández et al., 2002; Romo et al., 2002; Britten et al., 1996). This quantity measures the overlap between two response distributions, in this case be-

tween hits and errors for each ($f1$, $f2$) pair. We restricted the analysis for each ($f1$, $f2$) pair, where animals had a minimum of 30% up to a maximum of 70% errors. Notice that a value of 0.5 indicates full overlap and 1 indicates completely separate distributions. Thus, the choice probability index quantifies selectivity for one or the other outcome of the discrimination process. To compute it at different times, we used a sliding window of 500 ms duration moving in 100 ms steps, beginning 1000 ms before $f1$ and ending 1000 ms after the $f2$ comparison period. To establish when the choice probability index value significantly deviates from 0.5, the responses of each neuron from a control period (500 ms) immediately before $f1$ were shuffled 1000 times. We then calculated the choice probability index value from two response distributions in each of the 1000 repetitions (permutation test). The values calculated in each repetition served to calculate a mean average choice probability index for each neuron and in the neuronal population. The resulting average was of 0.55 ± 0.05 (mean \pm standard deviation [SD]).

Trials in the control task proceeded exactly as described in Figure 1A, but at the probe down (PD) the correct target push button was illuminated. Vibrotactile stimuli were delivered while the light was kept on and, at the end of $f2$, the probe was lifted from the skin and the light was turned off; the monkey was rewarded for pressing the previously illuminated push button. Hand/arm movements in this situation were identical to those in the somatosensory discrimination task but were cued by visual stimuli. Under this condition, the choice probability indices were calculated by comparing the response distributions for lateral versus medial push button presses (Figure 5A).

Acknowledgments

The research of R.R. was partially supported by an International Research Scholars Award from the Howard Hughes Medical Institute, grants from the Millennium Science Initiative-CONACYT, and DGAPA-UNAM. We thank Carlos Brody, Emilio Salinas, and Mike Shadlen for invaluable comments and discussions. We appreciate the technical assistance of Luis Lemus and Sergio Méndez.

Received: August 12, 2003

Revised: October 28, 2003

Accepted: November 15, 2003

Published: January 7, 2004

References

- Britten, K.H., Newsome, W.T., Shadlen, M.N., Celebrin, S., and Movshon, J.A. (1996). A relationship between behavioral choice and the visual responses of neurons in macaque MT. *Vis. Neurosci.* **13**, 87–100.
- Brody, C.D., Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2003). Timing and neural encoding of parametric working memory in macaque prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* **13**, 1196–1207.
- Draper, N., and Smith, H. (1966). *Applied Regression Analysis*, Second Edition (New York: John Wiley and Sons).
- Dum, R.P., and Strick, P.L. (1991). The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. *J. Neurosci.* **11**, 667–689.
- Fogassi, L., Gallese, V., Buccino, G., Craighero, L., Fadiga, L., and Rizzolatti, G. (2001). Cortical mechanism for the visual guidance of hand grasping movements in the monkey—a reversible inactivation study. *Brain* **124**, 571–586.
- Fuster, J.M. (1997). Network memory. *Trends Neurosci.* **20**, 451–459.
- Gentilucci, M., Fogassi, L., Luppino, G., Matelli, M., Camarda, R., and Rizzolatti, G. (1988). Functional organization of inferior area 6 in the macaque monkey. I. Somatotopy and the control of proximal movements. *Exp. Brain Res.* **71**, 475–490.
- Godschalk, M., Lemon, R.N., Kuypers, H.G., and Runday, H.K. (1984). Cortical afferents and efferents of monkey postarcuate area: an anatomical and electrophysiological study. *Exp. Brain Res.* **56**, 410–424.
- Graziano, M.S., Hu, X.T., and Gross, C.G. (1997). Visuospatial properties of ventral premotor cortex. *J. Neurophysiol.* **77**, 2268–2292.
- Graziano, M.S., Reiss, L.A., and Gross, C.G. (1999). A neuronal representation of the location of nearby sounds. *Nature* **397**, 428–430.
- Green, D.M., and Swets, J.A. (1966). *Signal Detection Theory and Psychophysics* (New York: John Wiley).
- He, S.Q., Dum, R.P., and Strick, P.L. (1993). Topographic organization of corticospinal projections from the frontal lobe: motor areas on the lateral surface of the hemisphere. *J. Neurosci.* **13**, 952–980.
- Hernández, A., Salinas, E., Garcia, R., and Romo, R. (1997). Discrimination in the sense of flutter: new psychophysical measurements in monkeys. *J. Neurosci.* **17**, 6391–6400.
- Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2000). Neuronal correlates of sensory discrimination in the somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6191–6196.
- Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2002). Temporal evolution of a decision-making process in medial premotor cortex. *Neuron* **33**, 959–972.
- Kekei, S., Hoffman, D.S., and Strick, P.L. (2001). Direction of action is represented in the ventral premotor cortex. *Nat. Neurosci.* **4**, 1020–1025.
- Keizer, K., and Kuypers, H.G. (1989). Distribution of corticospinal neurons with collaterals to the lower brain stem reticular formation in monkey (*Macaca fascicularis*). *Exp. Brain Res.* **74**, 311–318.
- Lu, M.T., Preston, J.B., and Strick, P.L. (1994). Interconnections between the prefrontal cortex and the premotor areas in the frontal lobe. *J. Comp. Neurol.* **341**, 375–392.
- Luppino, G., Murata, A., Govoni, P., and Matelli, M. (1999). Largely segregated parietofrontal connections linking rostral intraparietal cortex (areas AIP and VIP) and the ventral premotor cortex (areas F5 and F4). *Exp. Brain Res.* **128**, 181–187.
- Matelli, M., Camarda, R., Glickstein, M., and Rizzolatti, G. (1986). Afferent and efferent projections of the inferior area 6 in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* **251**, 281–298.
- McFarland, N.R., and Haber, S.N. (2000). Thalamic relay nuclei of the basal ganglia form both reciprocal and nonreciprocal cortical connections, linking multiple frontal cortical areas. *J. Neurosci.* **20**, 3798–3813.
- Miller, E.K., and Cohen, J.D. (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 167–202.
- Mountcastle, V.B., Steinmetz, M.A., and Romo, R. (1990). Frequency discrimination in the sense of flutter: psychophysical measurements correlated with postcentral events in behaving monkeys. *J. Neurosci.* **10**, 3032–3044.
- Ohbayashi, M., Ohki, K., and Miyashita, Y. (2003). Conversion of working memory to motor sequence in the monkey premotor cortex. *Science* **301**, 233–236.
- Press, W., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., and Flannery, B.T. (1992). *Numerical Recipes in C*, Second Edition (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Rizzolatti, G., and Luppino, G. (2001). The cortical motor system. *Neuron* **31**, 889–901.
- Rizzolatti, G., Camarda, R., Fogassi, L., Gentilucci, M., Luppino, G., and Matelli, M. (1988). Functional organization of inferior area 6 in the macaque monkey. II. Area F5 and the control of distal movements. *Exp. Brain Res.* **71**, 491–507.
- Romo, R., and Salinas, E. (2001). Touch and go: decision-making mechanisms in somatosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 107–137.
- Romo, R., and Salinas, E. (2003). Flutter discrimination: neural codes, perception, memory and decision making. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 203–218.
- Romo, R., Brody, C.D., Hernández, A., and Lemus, L. (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* **399**, 470–473.
- Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., Lemus, L., and Brody, C.D. (2002). Neuronal correlates of decision-making in secondary somatosensory cortex. *Nat. Neurosci.* **5**, 1217–1225.
- Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., and Salinas, E. (2003). Correlated neuronal discharges that increase coding efficiency during perceptual discrimination. *Neuron* **38**, 649–657.

- Salinas, E., Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2000). Periodicity and firing rate as candidate neural codes for the frequency of vibrotactile stimuli. *J. Neurosci.* 20, 5503–5515.
- Schall, J.D. (2001). Neural basis of deciding, choosing and acting. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 33–42.
- Siegel, S., and Castellan, N.J. (1988). *Nonparametric Statistics for Behavioral Sciences* (New York: McGraw-Hill).
- Umiltà, M.A., Kohler, E., Gallese, V., Fogassi, L., Fadiga, L., Keysers, C., and Rizzolatti, G. (2001). I know what you are doing. A neurophysiological study. *Neuron* 31, 155–165.
- Wise, S.P., Di Pellegrino, G., and Boussaoud, D. (1992). Primate premotor cortex: dissociation of visuomotor from sensory signals. *J. Neurophysiol.* 68, 969–972.

Temporal Evolution of a Decision-Making Process in Medial Premotor Cortex

Adrián Hernández, Antonio Zainos,
and Ranulfo Romo¹
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
04510 México, D.F.
México

Summary

The events linking sensory discrimination to motor action remain unclear. It is not known, for example, whether the motor areas of the frontal lobe receive the result of the discrimination process from other areas or whether they actively participate in it. To investigate this, we trained monkeys to discriminate between two mechanical vibrations applied sequentially to the fingertips; here subjects had to recall the first vibration, compare it to the second one, and indicate with a hand/arm movement which of the two vibrations had the higher frequency. We recorded the activity of single neurons in medial premotor cortex (MPC) and found that their responses correlate with the diverse stages of the discrimination process. Thus, activity in MPC reflects the temporal evolution of the decision-making process leading to action selection during this perceptual task.

Introduction

Most perceptual tasks require several sequential steps to be carried out. This must be the case, for example, when subjects discriminate the difference in frequency between two mechanical vibrations applied sequentially to their fingertips (Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). This perceptual task can be understood as a chain of neural operations that include encoding the two consecutive stimulus frequencies, maintaining the first stimulus in working memory, comparing the second stimulus to the memory trace left by the first stimulus, and then communicating the result of the comparison to the motor apparatus. Studying this chain of neural operations in different brain areas may lead to an understanding of how the brain accomplishes such sensory discrimination tasks (Romo and Salinas, 2001).

Recent studies have shown that neurons in the primary somatosensory cortex (S1) generate a neural representation of vibrotactile stimuli that correlates closely with psychophysical performance (Hernández et al., 2000; Salinas et al., 2000). Discrimination based on microstimulation patterns injected into clusters of S1 neurons is indistinguishable from that produced by natural stimuli (Romo et al., 1998, 2000). These findings thus establish a strong link between the neuronal activity of S1 and the sensory component of this task. However, where and in what form this sensory representation is transformed into a motor response that indicates discrimination is still unclear.

Anatomical studies in monkeys have shown that S1 and the second somatosensory cortex (S2) are serially connected (Pons et al., 1987, 1992; Burton and Fabri, 1995; Burton et al., 1995; Krubitzer et al., 1995) and that one of the major outputs from S2 leads to the motor areas of the frontal lobe (Jones and Powell, 1969; Pandya and Kuypers, 1969; Jones et al., 1978; Jürgens, 1984; Luppino et al., 1993; Cipolloni and Pandya, 1999). Thus, in principle, S2 could process the S1 representation of vibrotactile stimuli and transmit its output to the motor cortices (Luppino et al., 1993). S2 neurons show a transformation of the S1 vibrotactile representation (Salinas et al., 2000) and appear to reflect activity associated with the comparison between the two stimuli (R.R., A.Z., and A.H., unpublished data). The question that arises then is whether there is a truly clear distinction between those areas presumably dedicated to sensory processing and those traditionally viewed as motor. There are two possibilities. First, the motor areas could process a fully formed decision signal in order to generate an appropriate set of motor commands. In this case, information and processes used before reaching a decision should be mostly absent from motor cortical activity. Second, the motor areas could participate more actively in the decision process; in which case, they should reflect details about the sensory inputs regardless of the motor outcome.

We tested these alternatives by recording from single neurons in two motor areas (the presupplementary motor area [pre-SMA] and the supplementary motor area-proper [SMA-proper]) of the medial premotor cortex (MPC) while the monkeys performed the vibrotactile discrimination task. These two subdivisions of the MPC show motor-related responses, but their activity also reflects cognitive components of various tasks (Chen et al., 1995; Thaler et al., 1995; Tanji, 1996; Shen and Alexander, 1997; Shima and Tanji, 1998, 2000). We show here that MPC contains neurons that signal the different components of the discrimination task in a manner that is conjectured to be a chain of neural operations leading to the selection of a motor action. At one extreme, MPC neurons signal the base stimulus frequency, while at the other, they generate a neural signal that correlates with the output of the animal's decision. Remarkably, in the middle of this chain, MPC neurons represent the memorized base stimulus frequency and the result of the comparison process; that is, during the comparison period, MPC neurons indicate the recall of the base stimulus, the current comparison stimulus, and the difference between the two stimuli. We suggest that the neuronal events recorded in MPC are evidence that the motor areas of the frontal lobe combine past and current sensory information for the selection of a voluntary motor action.

Results

Four monkeys (*Macaca mulatta*) were trained to perform the vibrotactile discrimination task up to their psychophysical thresholds (Figures 1A and 1D) (Hernández et

¹Correspondence: rromo@ifisiol.unam.mx

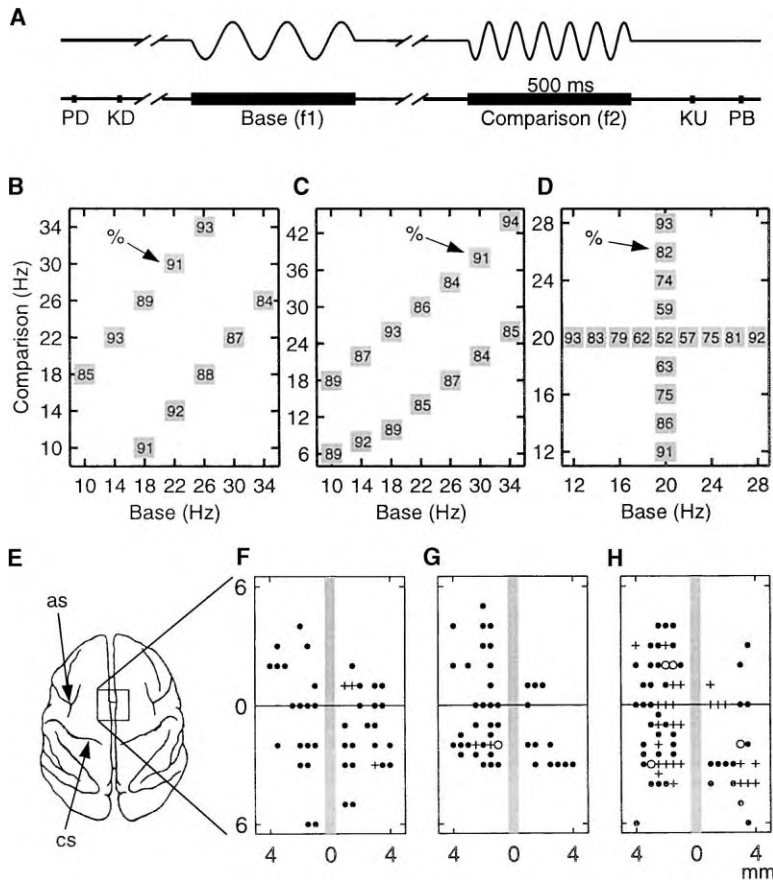


Figure 1. Discrimination Task

(A) Sequence of events during discrimination trials. The mechanical probe is lowered, indenting the glabrous skin of one digit of the restrained hand (PD); the monkey places his free hand on an immovable key (KD); the probe oscillates vertically, at the base stimulus frequency; after a delay, a second mechanical vibration is delivered at the comparison frequency; the monkey releases the key (KU) and presses either a laterally placed or a medially placed push button (PB) to indicate whether the comparison frequency was higher or lower than the base. (B–D) Stimulus sets used during recordings. Each box indicates a base frequency/comparison frequency stimulus pair used; the number inside the box indicates overall percent correct trials for that base/comparison pair. (E) Top view of the medial premotor cortex (MPC). MPC was subdivided by a line passing from the midline to the posterior edge of the arcuate sulcus (AS); rostral to this line is the presupplementary motor area (pre-SMA), and posterior to this line is the SMA-proper. Symbols in the insets indicate microelectrode penetrations for the four animals in which stimulus (F), delay (G), and differential responses (H) were recorded. Closed circles indicate 1–4 neurons recorded in that location; plus signs indicate 5–8 neurons recorded in that location; open circles indicate 9–12 neurons recorded in that location. CS, central sulcus.

al., 1997). To avoid variations in task difficulty, two of the stimulus sets (Figures 1B and 1C) had large differences between base (f_1) and comparison (f_2), compared with the monkey's psychophysical threshold. After training, neurophysiological recordings were made in MPC, which comprises the pre-SMA and the SMA-proper (Matsuzaka et al., 1992), while the monkeys performed the task. Based on off-line statistical tests, we identified 803 neurons that had task-related responses. Neurons from the pre-SMA and the SMA-proper of the two hemispheres were considered together because of similar activity during the vibrotactile discrimination task (Table 1). The total number of responsive neurons is exceeded because a neuron may participate in more than one period of the task.

Responses to Base Stimuli

During the vibrotactile discrimination task (Figures 1A–1D), monkeys first pay attention to f_1 . Based on this information, they must then elaborate the subsequent component of the discrimination process. We found 61 MPC neurons (53%, of 115 that responded to f_1) that modulated their firing rate as a function of f_1 ; Figure 1F shows their locations. Figure 2A shows an example. This neuron varied its firing rate as a positive monotonic function of f_1 (Figure 2B). Forty two neurons (69%) varied their firing rate as a positive monotonic function of the increasing f_1 , while 19 others (31%) varied their firing rate as a negative monotonic function of the increasing f_1 (Figure 2C). The response latency of the neuron shown in Figure 2A after the onset of f_1 was 60 ms; for the

Table 1. Database of Medial Premotor Cortex (MPC)

	Responsive	f_1	Delay f_1 - f_2	f_2	Rt	Mt
R. SMA-proper	237	31 (13%)	77 (32%)	167 (70%)	59 (25%)	51 (21%)
L. SMA-proper	332	37 (11%)	109 (33%)	153 (45%)	115 (34%)	64 (19%)
R. pre-SMA	76	18 (24%)	13 (17%)	36 (47%)	27 (36%)	7 (9%)
L. pre-SMA	158	29 (18%)	26 (16%)	71 (44%)	33 (21%)	16 (10%)
Totals	803	115 (14%)	225 (28%)	427 (53%)	234 (29%)	138 (17%)

f_1 , first stimulus; delay f_1 - f_2 , delay between the stimuli; f_2 , second stimulus; Rt, reaction time; Mt, movement time; R. SMA-proper, right supplementary motor area proper; L. SMA-proper, left supplementary motor area proper; R. pre-SMA, right presupplementary motor area; L. pre-SMA, left presupplementary motor area.

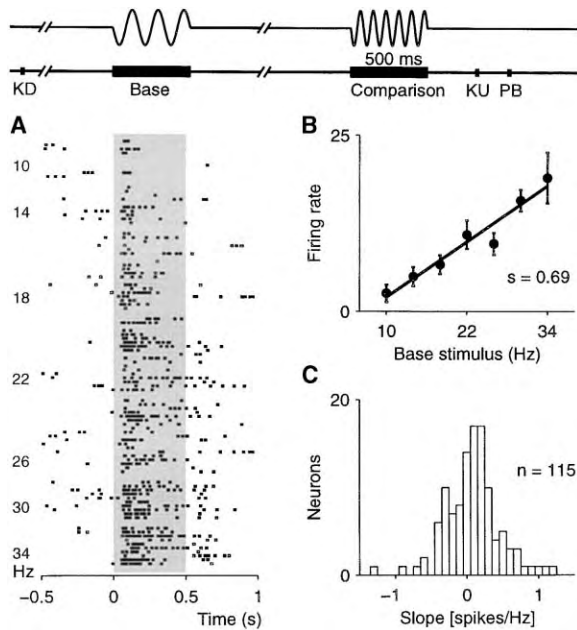


Figure 2. Firing Rate Modulation as a Function of the Base Stimulus Frequency

(A) Raster plots of a MPC neuron during base stimuli. Each row of ticks represents a trial, and each tick represents an action potential. Trials were delivered in random order and displayed as a function of the increasing base stimuli. Gray box indicates the timing of base stimuli, which lasted 500 ms. The vibration frequencies of the base stimuli are indicated by the numeric labels.
 (B) Mean firing rate (\pm SD) as a function of the base stimulus frequency.
 (C) Distribution of slopes from linear fits to the rate-versus-frequency curves of all neurons that responded to base stimuli.

population, the latency was 67 ± 13 ms (mean \pm SD). Thus, during the vibrotactile discrimination task, f1 is encoded directly in the firing rates of MPC neurons in a smoothly graded fashion.

Representation of the Base Stimulus during the Delay Period

The comparison of f2 is made against the memory trace left by f1. During the vibrotactile discrimination task (Figures 1A and 1C), we recorded 89 MPC neurons (39.5% of 225 that had delay activity) whose discharge rates varied during the delay period between f1 and f2 as a monotonic function of f1; Figure 1G shows their locations. Some of these MPC neurons discharged most weakly after stimulation with the lowest f1 and increased their firing rates steadily for increasing f1 (positive monotonic encoding, $n = 57$, 64%). Two examples are in Figures 3A and 3B; Figures 3E and 3F show the respective firing rates during the delay period as a function of f1. Others had discharge rates that varied in the opposite direction (negative monotonic encoding, $n = 32$, 36%). An example is shown in Figure 3C, with the firing rate during the delay period as a function of f1 shown in Figure 3G. Sixty-two percent of the time the firing rates of these MPC neurons were smooth functions (linear or soft sigmoid; see Experimental Procedures) of f1 (Figure 3H). Some of the neurons that displayed monotonic en-

coding of f1 during the delay period also responded in a similar fashion during the f1 period ($n = 16$). Thus, f1 is encoded directly in the neurons' firing rate in a smoothly graded fashion during the delay period between f1 and f2.

The monotonic encoding of f1 during the delay period between f1 and f2 was not static. We studied 43 of the 89 neurons that had fixed delays of 3 s, and 46 with fixed delays of 1 s, while the monkeys worked with the stimulus set shown in Figure 1C. In these two fixed interstimulus delay periods, monkeys could anticipate the timing of f2, and the MPC neurons often reflected this fact. For each neuron, we determined the times during the delay period in which their firing rates encoded a significant monotonic signal of f1. Most neurons could be described as falling into three main groups. "Early" neurons carried a signal about f1 during the first third, but not during the last third, of the delay period. "Persistent" neurons (Figure 3A) carried a signal about f1 during the entire delay period. "Late" neurons carried a signal about f1 during the last third, but not during the first third, of the delay period (Figures 3B and 3C). Figure 3D shows that most neurons studied that had fixed delay periods of 3 s manifested monotonic encoding of f1 just at the end of the delay period (31 of 43, 72%), whereas few manifested this property during the early component of the delay period (7 of 43, 16%) or during the entire delay period (5 of 43, 12%). Numbers were similar for the 46 neurons that encoded f1 during the fixed delay period of 1 s: most neurons showed monotonic encoding of f1 just at the end of the delay period (25 of 46, 54%), and few did during the early component (12 of 46, 26%) or during the entire delay period (9 of 46, 20%). Thus, regardless of the length of the delay period between f1 and f2, most MPC neurons manifested information about f1 at the end of the delay period. These results suggest that this anticipatory activity carries information about f1. This activity could also indicate the animal's motor plan, but this is unlikely given the design of the stimulus set used to study these MPC neurons (Figure 1C). This set was such that the correct motor plan could only be implemented after comparison of f2 against f1. The stimulus by itself could not give rise to a probability of correct discrimination higher than chance (50%), whereas the monkey's actual performance was between 84% and 94% correct discriminations.

Responses during the Comparison Period

To solve the vibrotactile discrimination task, the monkey had to compare f2 against the memory trace left by f1, decide whether f2 is higher or lower than f1, and then indicate its decision by pressing one of two push-buttons with its free hand. We recorded neurons in MPC that responded differentially during the comparison f2 period; for some neurons, this activity was prolonged to the reaction and movement time periods. By "differential" we mean that the activity is selective either for the comparison $f2 > f1$ or for $f2 < f1$ during correct discriminations. We wondered whether the responses quantified during f2 depended on f1, even though f1 had been applied 3 s earlier, or whether they simply reflected their association with the motor responses.

We examined f1 dependence during f2 as follows. In the stimulus set illustrated in Figure 1B, three f2 compar-

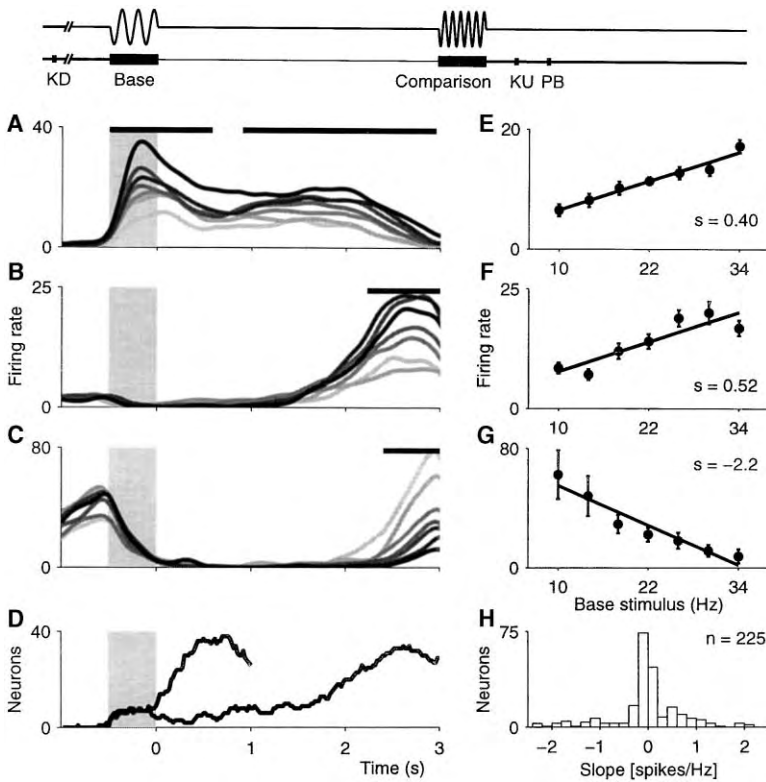


Figure 3. Monotonic Responses during the Delay between Base and Comparison Stimuli (A–C) Time-dependent spike densities for each base frequency stimulus condition in three MPC neurons. Neurons in (A) and (B) are positive monotonic encoding of the increasing base stimulus. Neuron in (C) is negative monotonic encoding of the increasing base stimulus. Gray boxes in (A–D) indicate the base stimulus periods: the lightest grey line corresponds to 10 Hz, and the darkest line corresponds to 34 Hz. The dark horizontal bars above each plot indicate times during which a neuron’s firing rate carried significant monotonic encoding. (D) Total number of recorded neurons (during fixed 1 or 3 s delay period runs) carrying a significant signal about the base stimulus, as a function of time. Zero indicates to the beginning of the delay period. Individual neurons may participate in more than one bin. (E–G) Mean firing rates as a function of base stimulus averaged across the entire delay periods, where slopes were significant for neurons in (A–C), respectively. Small vertical bars in (E–G) are \pm SEM. (H) Distribution of the neurons that had delay periods in which the slopes were significant.

ison frequencies (18, 22, and 26 Hz) are preceded by f1 frequencies such that in some trials, f1 is 8 Hz higher, and in some trials, it is 8 Hz lower than f2. For each of these f2 frequencies, we computed the area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve (Green and Sweets, 1966), which quantifies how discriminable the distributions of responses to high and low f1 values were. According to their responses during f2, we classified the neurons into two groups: those with higher firing rates for f2 > f1 trials than for f2 < f1 trials, and those with higher rates for f2 < f1 trials than for f2 > f1 trials. We then used ROC analysis to determine how well each neuron could discriminate between these two conditions. A value of 1 indicates, for one of the groups, that all the responses during f2 for f2 > f1 trials had more spikes than any of the responses for f2 < f1 trials. For the other group, it indicates that all the responses during f2 for f2 < f1 trials had more spikes than any of the responses for f2 > f1 trials. A value of 0.5 indicates that the two sets of responses were similar. For each neuron, we took the average of the area under the ROC curve for each of the relevant f2 frequencies and designated this as the neuron’s “ROC index” (Britten et al., 1992; Kim and Shadlen, 1999; Dodd et al., 2001). We found 264 MPC neurons (62% of 427 that responded during the comparison period) that had ROC indices significantly different from 0.5, thus indicating significant f1 dependence (permutation test, n = 1000 shuffles for each neuron, p < 0.01) (Siegel and Castellán, 1998); Figure 1H shows their locations. To study the temporal dynamics of the 264 neurons, we computed the ROC index in each neuron’s response using a sliding window of 100 ms duration in steps of 20 ms increments from a period

beginning 1000 ms before and ending 1000 ms after the comparison period. A total of 146 neurons (out of 264, 55%) deviated their ROC indices above 0.5 at some point during the comparison period or during the reaction and movement time periods due to the strongest activity for f2 > f1 correct discriminations (Figure 4A), whereas others (n = 118, 45%) deviated their ROC indices above 0.5 due to the strongest activity for f2 < f1 correct discriminations (Figure 4B).

A crucial question, as indicated above, is whether these differential responses indicate the comparison between f1 and f2, or the differential motor response that is implemented to indicate discrimination. We ruled out the presence of a simple differential motor activity associated with the push-button presses by testing these MPC neurons in a control task where the same vibrotactile stimuli were used (Figure 1A), but animals had to follow a visual cue to produce the motor response. In this condition, all neurons reduced the deviation of their ROC indices from 0.5 (Figure 4C represents the analysis of a subpopulation of neurons from Figure 4A; Figure 4D represents the analysis of a subpopulation of neurons from Figure 4B). Thus, when a comparison between f1 and f2 was not needed in order to determine the appropriate motor response, most of the differential activity disappeared. These results suggest that the differential activity observed during the comparison period depends on the actual computation between f1 and f2 and do not reflect a purely motor response aimed to press one of the two push-buttons.

An important question is whether the MPC neurons reflect the estimation of which of two motor outputs is the more likely on the basis of the sensory inputs re-

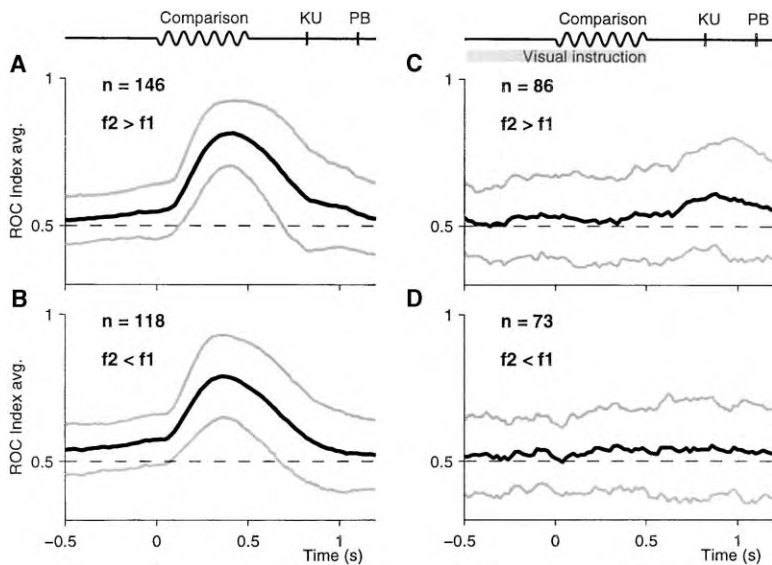


Figure 4. Differential Responses (ROC Indices) of MPC Neurons during the Comparison Process

(A) Population average ROC index for neurons that discharged more strongly during f2 when $f2 > f1$, and (B) for neurons that discharged more strongly during f2 when $f2 < f1$. (C and D) Population average ROC index for some of the neurons shown in (A) and (B) but tested during the control task in which identical motor responses were triggered by visual cues. Continuous dark and gray lines are mean \pm SD of ROC indices as functions of time.

ceived during the f2 period, and not to the comparison between f1 and f2. If MPC neurons show in their activity a predictive motor signal, neurons that increase their firing rate during the f1 period as a function of the highest f1 would indicate that the monkey knows in advance that f2 will be lower than f1 and, so, the corresponding motor response. If this were the case, the MPC neurons would increase their firing rate during the comparison period when $f2 < f1$ (selective for lower frequencies). The 61 neurons that had monotonic responses during the f1 period are quite appropriate for determining whether their activities predict the f2 response and the corresponding push-button press. A total of 43 of the 61 neurons responded differentially during the f2 period, but for 28 (65%) neurons, the f2 and motor responses could not be predicted on the basis of f1 responses. For example, the neurons that increased their firing rate during the f1 period as a positive monotonic function of the increasing f1 also increased their firing rate during the f2 period when $f2 > f1$: in other words, in the opposite direction according to a motor prediction signal. Thus, these neuronal correlates suggest that monkeys do not anticipate their motor reactions based only upon sensory inputs, but rather, need to compare the two stimuli.

Dynamics of the Comparison Process

Assuming that the discharges during the comparison period depend on the information of f1 and f2, then the trace of f1 and the current f2 could be observed during the comparison period before the discharges indicated the motor responses. The neuron shown in Figure 5A illustrates these processes. This neuron discharges more strongly during the comparison period when the monkey judges that $f2 > f1$, than in trials where $f2 < f1$ (middle panel of Figure 5B). The responses are a function of the interaction between f1 and f2. For example, when f2 is equal to 18, 22, and 26 Hz it can be judged higher or lower, depending on f1 (middle panel of Figure 5B), and the response reflects this. Notice also that this neuron carries information of f1 during the delay period preceding f2 (Figure 5A and left panel of Figure 5B).

Responses as functions of both f1 and f2 disappeared for this neuron during the second half of the comparison period (right panel of Figure 5B). The examples in Figures 6A and 7A indicate that these differential responses can be observed also in the second half of the comparison period (middle panel of Figure 6B) and during the comparison, reaction, and movement time periods (middle and right panels of Figure 7B).

To further quantify the interaction between f1 and f2 during the comparison period and beyond it, we used a multivariate regression analysis (Draper and Smith, 1981). We fit the activity of each differential response over the periods before, during, and after the comparison period as a linear function of both f1 and f2. The responses, which in principle could be an arbitrary function of both f1 and f2, were reasonably well approximated by a general linear fit to both f1 and f2:

$$\text{firing rate} = a_1 \times f_1 + a_2 \times f_2 + a_3. \quad (1)$$

In this formulation, the coefficients a1 and a2 serve as direct measurements of firing rate dependence on f1 and a2, respectively. To illustrate this analysis, the resulting coefficients a1 and a2 for the neuron in Figure 5A are plotted in Figure 5C. Three lines are of particular importance in these fits. Points that fall on the $a_2 = 0$ axis represent responses that are a function of f1 (the memory trace of f1; represented by the open circle in panel left of Figure 5C). Points that fall on the $a_1 = 0$ axis represent responses that are a function of f2 (the sensory evidence of f2). And points that fall on the $a_1 = -a_2$ line represent responses that are functions of the difference between f1 and f2 (open circle in middle panel of Figure 5C). This last consideration is of particular importance because in this task, correct behavior depends on the sign of the difference between f1 and f2.

Based on this analysis, 139 of the 264 neurons whose strongest responses occurred during the f2 period (Figure 6A) fall always on the diagonal (Figure 6D); 63 neurons had similar responses but showed the highest discharges during the reaction and movement time periods

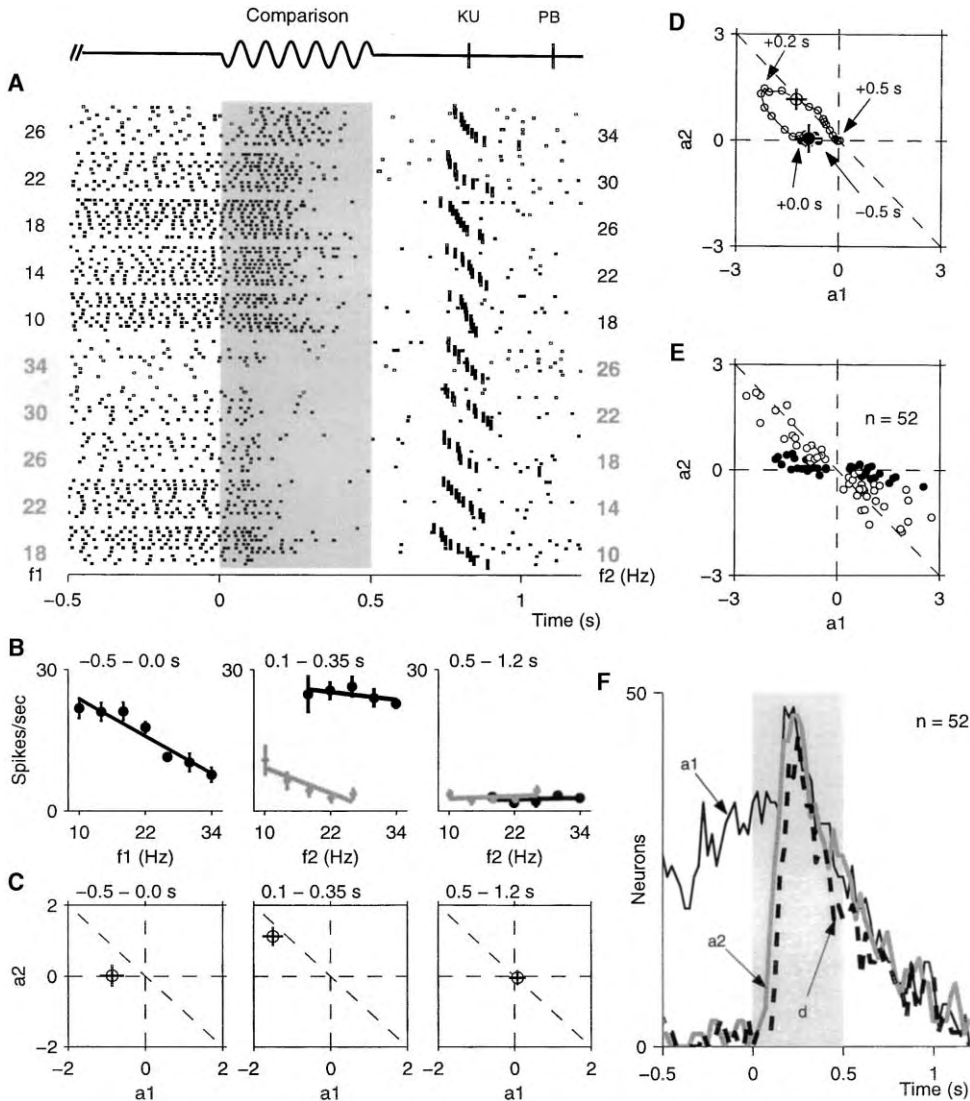


Figure 5. Differential Responses during the Comparison Period Preceded by Delay Activity

For this figure, data from 52 neurons with significant activity and differential responses during the comparison period were used.

(A) Raster plot for a single neuron showing responses around the comparison period. Comparison period lasts 500 ms (gray box). Base (f_1) and comparison (f_2) frequencies are indicated by the numeric labels at the left and right of each block. Blocks with $f_2 > f_1$ are labeled in black, blocks when $f_2 < f_1$ are labeled in gray. Data from f_1 periods are not shown.

(B) Mean firing rates before (left), during (middle), and after (right) f_2 period for the neuron in (A). In the left panel, data were fit separately as a function of f_1 during the delay period, while in middle and right panels, they were fit separately as a function of f_2 when $f_2 > f_1$ (black circles and lines) and $f_2 < f_1$ (gray dots and lines).

(C) Coefficients from f_1 and f_2 responses plotted as a function of f_1 and f_2 before (left), during (middle), and after (right) the f_2 period. In the left panel the open circle falls on the $a_2 = 0$ axis, indicating a response that is a function of f_1 only; this corresponds to the memory trace of the base stimulus. In the middle panel, the open circle falls on the $a_1 = -a_2$, indicating a response that is a function of f_1 and f_2 ; coefficients for f_1 and f_2 contribute equally but with opposite signs, resulting in a differential response that is a function of $f_2 - f_1$. This signal is lost after the comparison period (panel right of [C]).

(D) Dynamical change in coefficients a_1 and a_2 for the neuron in (A). The neuron carries information about f_1 (closed circles) before and during the beginning of the comparison period, and later becomes differential and falls in the diagonal (a function of $f_2 - f_1$).

(E) Coefficients a_1 and a_2 for the 52 neurons with delay activity. Black circles indicate values computed during the delay period; open circles indicate values computed during the comparison period. Each circle corresponds to one single neuron.

(F) Number of neurons with significant coefficients a_1 and a_2 values as a function of time; "d" indicates cases where coefficients a_1 and a_2 are of almost similar magnitude, but of opposite signs (falling on the diagonal as shown in [E]).

(Figure 7A) and fall on the diagonal (Figure 7D). However, not all neurons indicated the difference between frequencies equally clearly. During the comparison period, we found 81 neurons whose activities indicated information of f_1 and shifted later to the diagonal. This corre-

sponds to a memory recall of the base stimulus during the early part of the comparison. Fifty-two of these neurons carried information of f_1 during the delay period (Figure 5E; closed circles represent f_1 values, and open circles represent the difference between f_1 and f_2), and

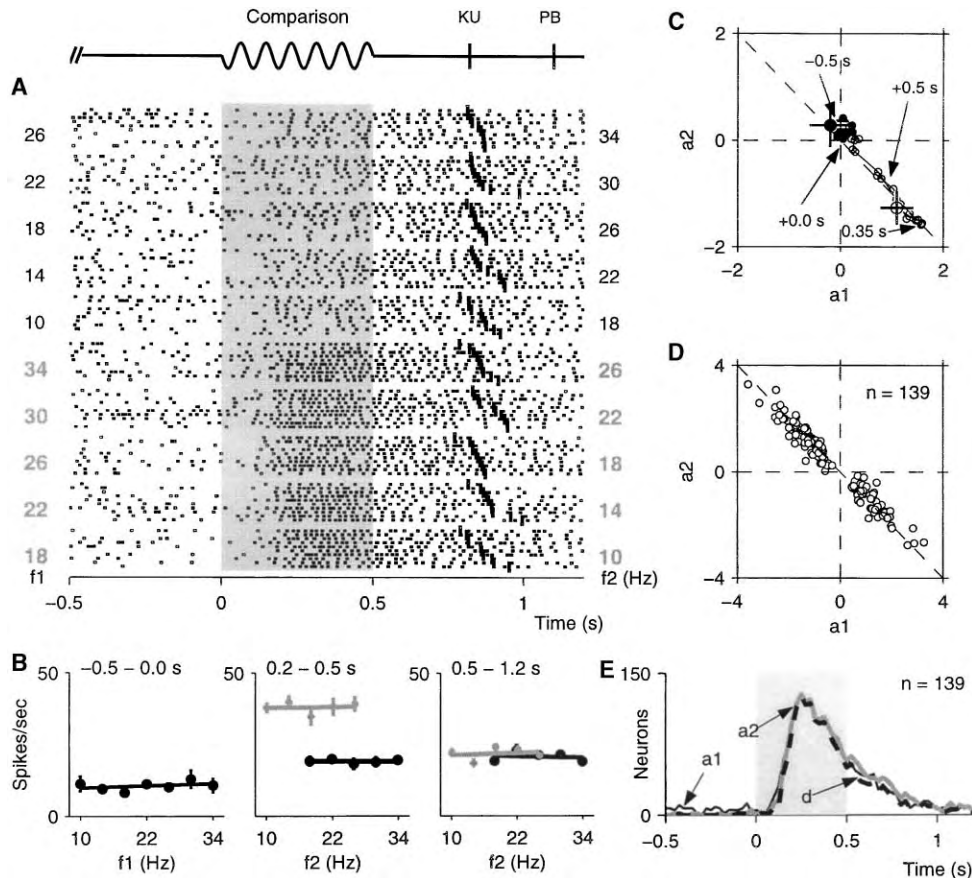


Figure 6. Differential Responses during the Comparison Period

Plots and axes as in Figure 5. For this figure, we used data from 139 neurons without delay activity and with differential responses that were strongest during the comparison period.

(A) Raster plots; (B) mean firing rates; (C) dynamics of the coefficients a_1 and a_2 associated with f_1 and f_2 ; (D) diagonal responses; and (E) number of neurons with coefficients a_1 and a_2 ; “d” indicates cases where a_1 and a_2 are of almost similar magnitude, but of opposite signs.

29 neurons indicated the memory recall during the early component of the comparison period (data not shown). We found only 18 MPC neurons whose responses during the comparison period displayed information of f_2 and shifted later to the diagonal (data not shown; coefficients values fall in the vertical axis). Thus, what is typically observed in MPC during the comparison is that initially some neurons encode f_1 or f_2 , and later these and other units encode the differences between f_1 and f_2 .

The comparison between f_1 and f_2 is not a static operation. We therefore analyzed it as a function of time. We measured the firing rate using a sliding window of 100 ms duration in 25 ms increments and then fit the responses as functions of both f_1 and f_2 with time-dependent coefficients. Figures 5D, 6C, and 7C show the time-dependent fits to the responses of the neurons shown in Figures 5A, 6A, and 7A, respectively. The neuron shown in Figure 5A carried information of f_1 about 750 ms (we show only 500 ms) before the onset of f_2 (Figure 5D) and maintained this information during the early component of the comparison period. Then, approximately 200 ms into the comparison period, the neuron’s response shifted to the diagonal, to a purely differential response. The population response (Figure 5E) is replotted in a different format in Figure 5F. Here the

number of neurons with significant coefficients of both f_1 and f_2 are plotted as a function of time. Clearly, these neurons carry information about f_1 during the delay and comparison periods. The result of the comparison between f_1 and f_2 is evident only later in the comparison, beginning with a differential population response of 159 ± 81 ms (\pm SD) after f_2 onset.

Neurons that only indicated the difference between f_1 and f_2 were more abundant in the database ($n = 139$; Figure 6D). These cells had no delay activity and produced their strongest differential responses during the comparison period. Analysis of this population as a function of time shows that the differential signal occurs during the second half of the comparison period, beginning with a differential population response of 201 ± 66 ms (Figure 6E). The response decreases sharply at the beginning of the reaction time period. The initiation of the differential response was significantly delayed for this population compared with the neurons that carried information of f_1 during the delay period (Wilcoxon-Mann-Whitney test, $p < 0.01$) (Siegel and Castellan, 1988).

We also looked at MPC neurons that carried information about the comparison between f_1 and f_2 during the motor reaction. We found 63 neurons with strongest

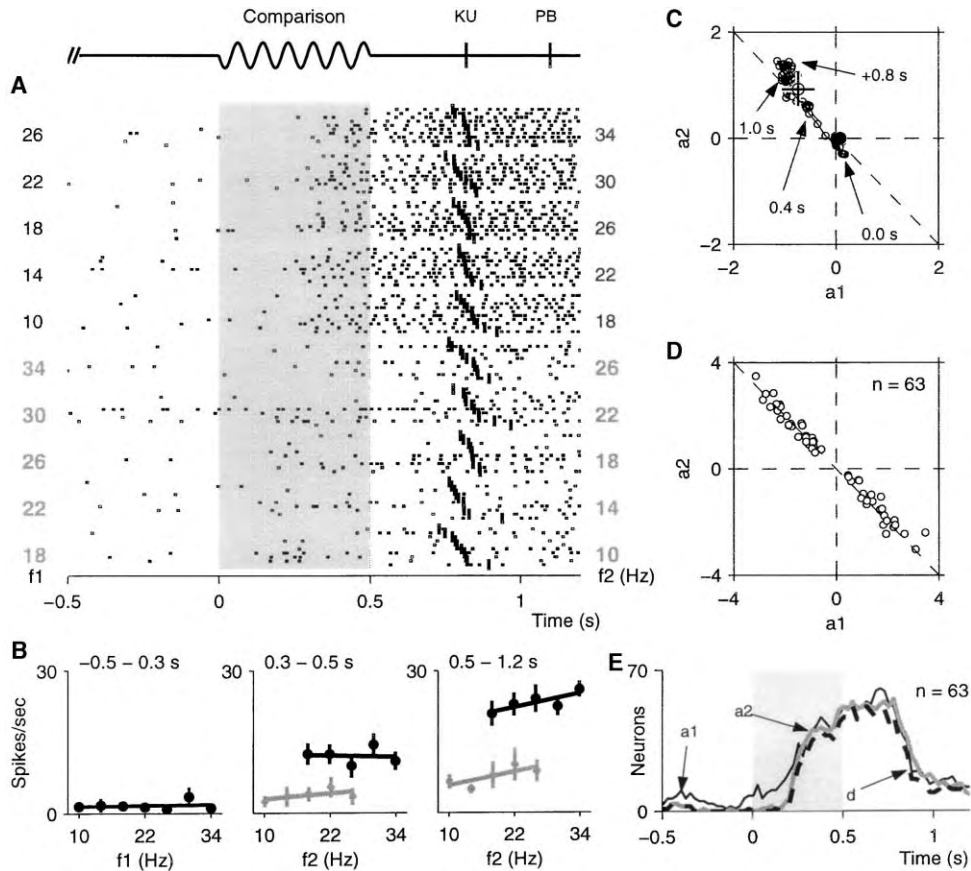


Figure 7. Differential Responses throughout the Reaction and Movement Time Periods

Plots and axes as in Figure 5. For this figure, we used data from 63 neurons that had no delay period and produced the strongest differential response signals during the reaction time period. These neurons initiated the differential response during the second half of the comparison period and extended this activity to the reaction and movement time periods.

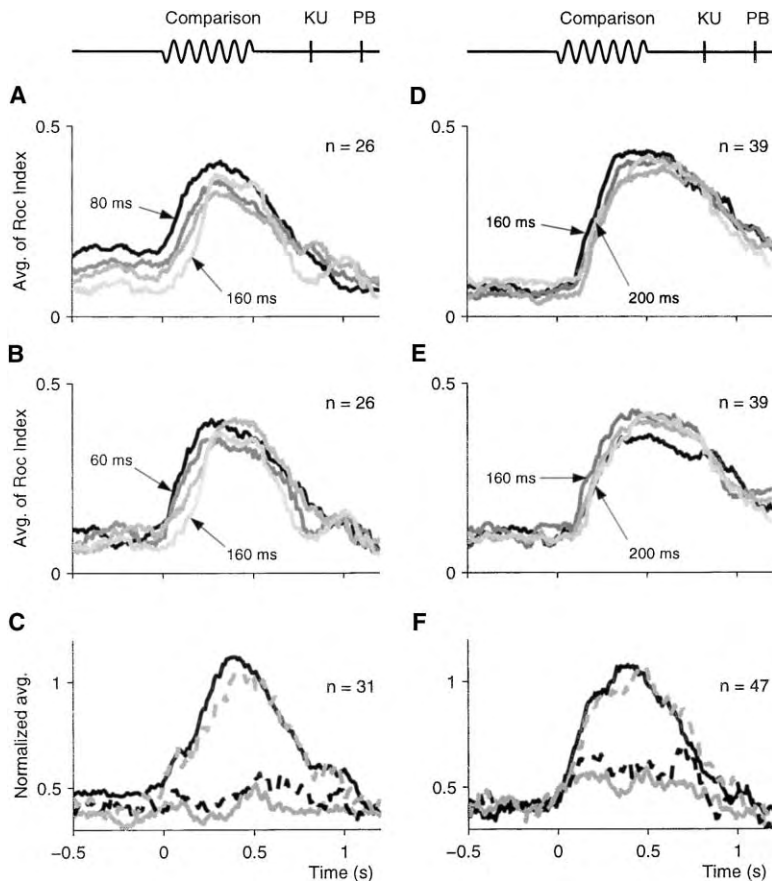
(A) Raster plots; (B) mean firing rates; (C) Dynamics of the coefficients a_1 and a_2 associated with f_1 and f_2 ; (D) Diagonal responses; and (E) number of neurons with coefficients a_1 and a_2 ; “d” indicates cases where a_1 and a_2 are of almost similar magnitude, but of opposite signs.

differential activity during the reaction time period (Figures 7A and 7D). The differential response for these cells is typically initiated during the comparison period (364 ± 104 ms; Figure 7E). These neurons started firing significantly later than the neurons with the strongest differential activity during the comparison period (Wilcoxon-Mann-Whitney test, $p < 0.01$) (Siegel and Castellán, 1988). Only 23 of these neurons initiated the differential response during the reaction time period, and 14 maintained it through the movement time period. None of the neurons that responded differentially during the reaction and movement times indicated any information of f_1 or f_2 only. Thus, their activity may be related to the comparison process or to the associated motor commands; in the present task, it is difficult to distinguish between these alternatives after the comparison stimulus.

Dynamics of the Discrimination Process

As mentioned above, the differential response of MPC neurons with significant delay activity developed earlier. We looked at this result more carefully through additional analysis. For this we used a stimulus set in which monkeys performed at psychophysical thresholds (Fig-

ure 1D). In half of the trials, f_2 was held fixed and f_1 varied from trial to trial, and in the other half of the trials, f_2 varied and was compared against a fixed f_1 . The onset of the differential signal (the ROC index) was calculated separately for different combinations of f_1 and f_2 . We studied 26 neurons that carried significant f_1 information during the delay when f_1 or f_2 varied across trials. The results are shown in Figures 8A and 8B. The y axes in these plots show the ROC index regardless of whether the neuron fires more strongly when $f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$. Each curve represents the mean average of the temporal evolution of the ROC indices for differences of 0, 2, 4, and 8 Hz between f_1 and f_2 . These were measured using a sliding window of 100 ms duration in 20 ms increments. Trials of 0 Hz of difference between f_1 and f_2 were grouped according to the push-button presses. The onset of the comparison signal for these neurons varied as a function of the difference between f_1 and f_2 (Figures 8A and 8B). For example, for f_2 fixed at 20 Hz, when the difference between f_1 and f_2 was 8 Hz, the latency of the differential signal was 80 ms relative to the start of f_2 , whereas with 0 Hz difference, the onset of the differential response was 160 ms (Figure 8A). Intermediate response latencies between two values were ob-



shown for correct trials in the preferred condition (continuous, black line) and nonpreferred condition (continuous, gray line). Broken lines indicate incorrect trials. The preferred condition is either $f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$, whichever produces a stronger response for a given neuron. Traces were calculated from trials with differences of 4 Hz between f_1 and f_2 . Activities were normalized with respect to the highest firing rates during correct trials.

Figure 8. Discrimination Capacities of MPC Neurons

These neurons were tested with the stimulus set illustrated in Figure 1D.

(A and B) The vertical axes show the average across neurons of ROC index, which measures the average strength of the differential response regardless of whether it corresponds to $f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$. This quantity is shown as a function of time. Differences between base (f_1) and comparison (f_2) frequencies are indicated by gray level; differences were 0 (lightest), 2, 4, and 8 Hz (darkest). Traces in (A) were computed from trials in which f_1 changed from trial to trial and were compared against a fixed f_2 . Traces in (B) were computed from trials in which f_1 stayed fixed and f_2 varied from trial to trial. Notice that neurons carrying information about f_1 during the delay show stronger ROC indices during the delay. The differential activity increases during the comparison. (D and E) Strength of differential activity for MPC neurons that did not carry information about f_1 during the delay. These neurons were tested with the same stimulus set (Figure 1D) as those in (A) and (B). These neurons do not show significant ROC indices during the delay period. Their differential responses during the comparison begin later than in (A) and (B). Arrows and numbers in (A), (B), (D), and (E) are the onsets (in milliseconds) of the discrimination process. These correspond to the initiation of the differential responses. (C and F) Normalized neuronal responses as a function of time for neurons with (C) and without (F) significant delay activity. Separate traces are

tained when the difference between f_1 and f_2 was 2 (140 ms) and 4 Hz (120 ms), respectively. Similar latencies were obtained when f_2 varied from trial to trial and f_1 remained fixed at 20 Hz (Figure 8B).

We repeated the analysis using the same stimulus set for 39 differential neurons that had no significant f_1 during the delay period. Figures 8D and 8E show that the initiation of the differential population responses were significantly longer than those of the population with delay activity: 160 and 200 ms for 8 and 0 Hz differences between f_1 and f_2 , respectively. Thus, although the response levels of the two neuronal populations were similarly affected by the task difficulty, their latencies were quite different. Neurons that carry information about f_1 during the delay period interact earlier with f_2 .

Correct versus Incorrect Discriminations

An important question is whether the comparison responses are associated with discrimination performance. In general, this is hard to prove; however, a strategy that may be useful is to compare evoked neural responses for correct and incorrect trials (Shadlen and Newsome, 1996; Salinas and Romo, 1998b; Kim and Shadlen, 1999). This was done for the neurons that discharged differentially. Separate analyses were performed for the neurons that carried information about

f_1 during the delay period (Figure 8C) and for those that did not (Figure 8F). We considered all trials where the difference between f_1 and f_2 was 4 Hz and sorted the responses into hits and errors according to sign of $f_2 - f_1$, normalizing the activity against the mean response of the last 300 ms of the comparison period from trials where $f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$, depending on the preference neuron's response. The dynamics of the neuronal population around the comparison period was determined using a sliding window of 100 ms duration incremented in 20 ms, beginning 1000 ms before and ending 1000 ms after the comparison period.

Figures 8C and 8F show the results. Black and gray lines indicate preferred and nonpreferred responses, respectively (for $f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$, depending on the preference neuron's response); continuous and broken lines indicate correct and incorrect trials, respectively. When the subject discriminates incorrectly, the preferred and nonpreferred responses shift in opposite directions (black and gray dashed lines). The differences between correct and incorrect responses with opposite preferences were not significantly different (Wilcoxon-Mann-Whitney test, $p = 0.12$). Thus, a movement to the lateral push-button, for instance, on average evoked similar activity whether it corresponded to a correct or incorrect discrimination. The differential activity could

thus be interpreted as encoding the motor response, because the same movements are associated with similar levels of evoked activity. However, as shown in Figures 4C and 4D, the differential discharges were not observed when the motor responses were guided by visual cues (all neurons for the analysis of Figures 8C and 8F lost their differential activity in this condition). Therefore, the differential activity may represent either the final decision for the trial ($f_2 > f_1$ or $f_2 < f_1$) or the motor plan that results from the comparison process and that is specific to the context of the somatosensory discrimination task.

Discussion

The results indicate that activity in the MPC reflects many aspects of the vibrotactile discrimination task, not just the motor component. Most notably, MPC neurons are activated during the presentation of the first stimulus, during the delay period, and during the period where the comparison between stimuli presumably takes place. Furthermore, in the early stages of a trial, the evoked activity varies systematically as a function of stimulation parameters, as would be expected from sensory responses, and only later during the presentation of the second stimulus does it become consistent with the motor component of the task. It is conjectured that this chain of neuronal operations may represent the links between sensation and motor action.

Sensory Processing

Tanji and colleagues recorded neurons in MPC that responded to auditory, visual, and somatosensory cues that triggered or instructed a voluntary movement (Kurata and Tanji, 1985; Tanji and Kurata, 1985). Though subsequent studies confirmed this finding (Romo and Schultz, 1987, 1992), none of them inquired as to whether these stimulus-related responses carried detailed information about stimulus features. Our vibrotactile discrimination task allows us to make this inquiry. The responses of S1 and S2 neurons are monotonic functions of vibrotactile stimulus frequency (Hernández et al., 2000; Salinas et al., 2000). The responses of many MPC neurons had similar dependencies on stimulus frequency, especially when compared to S2, except that they appeared later (Salinas et al., 2000). Neurons in S1 respond to base stimulus with a latency of 20.2 ± 4.5 ms, those in S2 respond with a latency of 29.9 ± 7.4 ms (R.R., A.Z., and A.H., unpublished data), and those in MPC respond with a latency of 67 ± 13 ms. Thus, information about the base stimulus frequency appears to reach the MPC after S1 and S2. This is consistent with anatomical studies demonstrating that S2 projects to MPC (Luppino et al., 1993; Geyer et al., 2000), but the large difference in latencies between S2 and MPC suggests that other inputs to MPC may be necessary or that MPC activity develops relatively slowly. In fact, S2 neurons project to the posterior part of MPC (SMA-proper) but not to the anterior part of MPC (pre-SMA) (Luppino et al., 1993), although neurons in the two regions of MPC respond to somatosensory stimuli (Matsuzaka et al., 1992) and to the vibrotactile stimuli. Thus, the vibrotactile stimulus used in this task is represented

in the firing rate of MPC neurons, an S1 transformation of the vibrotactile stimulus that took place in S1 and S2 (Hernández et al., 2000; Salinas et al., 2000). This representation could be used in the subsequent operations of the vibrotactile discrimination task.

Working Memory Processing

Previous studies have shown delay activity in MPC (Kurata and Tanji, 1985; Tanji and Kurata, 1985; Tanji, 1996; Romo and Schultz, 1987, 1992), and other recent studies have sought evidence of working-memory processing in MPC (Petit et al., 1998; LaBar et al., 1999; Pollmann and von Cramon, 2000). The somatosensory discrimination task offers an unprecedented opportunity to probe whether the activity during the delay between the two stimuli carries information of the parameter of the base stimulus frequency. Our results show that some MPC neurons encode the vibrotactile stimuli in a smoothly graded fashion. Interestingly, this representation is not different from that found in the S2 and in the prefrontal cortex during the vibrotactile discrimination task (Romo et al., 1999; Salinas et al., 2000). The main difference between these structures is that S2 encodes the base stimulus frequency during the early component of the delay period (Salinas et al., 2000); prefrontal cortex neurons show early, persistent, and late encoding (Romo et al., 1999); and MPC neurons show late delay activity, just before the beginning of the second comparison stimulus. Could the memory-related responses in MPC be driven by the prefrontal cortex? Anatomical studies show that the prefrontal cortex is directly connected with the anterior (pre-SMA) but not the posterior part of MPC (SMA-proper) (Luppino et al., 1993). However, similar responses were found in pre-SMA and SMA-proper. One possibility is that this activity is imposed by S2. However, S2 is anatomically connected with the SMA-proper and not with the pre-SMA (Luppino et al., 1993; Geyer et al., 2000). Thus, it is not clear to what extent the delay activity in MPC depends on S2 and prefrontal inputs, or to what extent it is elaborated by the MPC circuits. It could also be argued in this case that the delay activity in MPC shows expectation for the second stimulus, or preparation for the later motor plan to report discrimination rather than memory. However, the same arguments mentioned before apply here: the activity is a monotonic function of the base stimulus frequency, and the stimulus set used hinders the prediction of the second stimulus and the early implementation of the motor plan used to report discrimination. Based on these results, we suggest that MPC forms part of large cortical network (Fuster, 1997) that combines past and current sensory information to generate motor actions.

Comparison Processing

Previous studies have revealed neural correlates of decision processes in sensory, association, and motor areas of the brain (Mountcastle et al., 1992; Romo et al., 1993, 1997; Shadlen and Newsome, 1996; Merchant et al., 1997; Zhang et al., 1997b; Kim and Shadlen, 1999; Horwitz and Newsome, 1999; Dodd et al., 2001). These studies are based on paradigms that require the interpretation of a sensory stimulus, and any such interpretation

must combine current sensory evidence with a sensory referent stored in memory (Johnson, 1980a, 1980b, 2000), whether this referent is stored in long-term memory, as a result of training, or in working-memory, as in the task used here. The responses we recorded from MPC seem to reflect a transformation from a sensory representation to a representation of the animal's decision. During the early part of the comparison period, some MPC neurons responded as if they were recalling the memorized base stimulus, whereas others displayed a signal correlated with the current comparison stimulus. This sensory-like activity lasted roughly 100 ms and was followed by what appeared to be a comparison process. The differential activity that then developed was strong, and it correlated with the animal's motor response. This decision signal indicating one of two alternatives is comparable to that observed in discrimination tasks that used a sensory referent stored in long-term memory (Romo et al., 1993, 1997; Shadlen and Newsome, 1996; Salinas and Romo, 1998a; Kim and Shadlen, 1999; Horowitz and Newsome, 1999; Dodd et al., 2001). Thus, the perceptual act does seem to employ some common mechanisms whether the current sensory evidence is compared against a short- or long-term memory referent. On the other hand, it is not clear whether the development of the final differential activity reflects the comparison process itself or the generation of the motor command used to express the output of the decision-making process. This is a crucial problem. In general, however, decision correlates are neither purely sensory nor purely motor (Shadlen and Newsome, 1996, 2001; Salinas and Romo, 1998a). This is consistent with our data as well. A recent study by Gold and Shadlen (2000) suggests that, in fact, the consolidation of the decision and preparation for movement may be indistinguishable. Our findings support this idea, which should be explored more carefully.

It may be argued that the neuronal responses during the task's periods simply reflect the monkey's moment-to-moment estimation of which of the two motor outputs is the more likely on the basis of the sensory inputs received up to that moment, and not to the evolution of the decision-making process. This would be true if, for example, monkeys predicted their behavioral decisions from the beginning of the task's sequence. The stimulus sets rule out this possibility, and the base stimulus responses—as shown in Results—did not predict the behavioral decision, which required the comparison between base and comparison stimuli. In their activities, some of the neurons reflected the difficulties of the discrimination process—which is determined by the difference between the two stimulus frequencies—and many reflected the temporal evolution of the decision-making process. This may be consistent with the interpretation that MPC forms part of a cortical network that compares past and current sensory information at the service of motor decisions.

Concluding Remarks

The present discrimination task involves perceiving a stimulus, storing it in working-memory, combining the stored trace with current sensory input, and producing a decision, which is communicated to the motor appara-

tus. All of these processes are important ingredients of a perceptual act (Leon and Shadlen, 1998; Schall, 2001; Shadlen and Newsome, 2001). Our results indicate that the MPC does not simply wait for a signal-encoding decision, but instead, participates in every step of its generation by integrating working-memory and sensory inputs. This neural operation may represent the actual decision-making process leading to the selection of a motor action. Whether this is a unique property of MPC remains to be investigated, in this and similar perceptual tasks.

Experimental Procedures

Discrimination Task

The sensory discrimination task used here has already been described (LaMotte and Mountcastle, 1975; Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). Briefly, stimuli were delivered to the skin of the distal segment of one digit of the left, restrained hand via a computer-controlled stimulator (2 mm round tip, BME Systems, MD). The initial indentation was 500 μm . Vibrotactile stimuli were mechanical sinusoids. Stimulation amplitudes were adjusted to produce equal subjective intensities (LaMotte and Mountcastle, 1975; Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). During trials, two vibrotactile stimuli (f1 and f2) were delivered consecutively to the glabrous (hairless) skin, separated by a fixed interstimulus delay period, often 3 s, and the animal was rewarded for correct discriminations with a drop of liquid. Discrimination was indicated by pressing one of two push-buttons with the right hand. The two push-buttons were located in front of the animal, 25 cm away from the shoulder, and at eye level. The centers of the switches were located 7 and 10 cm to the right of the midsagittal plane; the medial push-button was used to indicate that f2 was lower than f1, while the lateral one was used to indicate that f2 was higher than f1. Performance was measured using psychophysical techniques (Mountcastle et al., 1990; Hernández et al., 1997). Monkeys were handled according to the institutional standards of the National Institutes of Health and Society for Neuroscience.

Visual Instruction Task

A simpler task, in which the same vibrotactile stimuli were delivered to the skin but the hand/arm movements were triggered by visual cues, was used as a control. Trials in this test began exactly as described above and in Figure 1A, with the probe touching the skin and one of the target switches being illuminated; after which the monkey had to hold the immovable key. Then, after a variable delay period during which the light was kept on and the two consecutive stimuli were delivered exactly as in the vibrotactile discrimination task, the light was turned off, and the probe was simultaneously lifted from the skin. The monkey was rewarded for pressing the previously illuminated push-button. Arm movements in this situation were identical to those in the discrimination task but were cued by visual stimuli.

Recordings

Neuronal recordings were obtained with an array of seven independent microelectrodes (2–3 M Ω) inserted into the MPC, contralateral and ipsilateral to the stimulated hand (Mountcastle et al., 1990, 1991; Romo et al., 1998). We used well-established criteria to distinguish between the two subdivisions of the MPC (Matsuzaka et al., 1992). The locations of the penetrations were confirmed through standard histological techniques. Recording sites changed from session to session.

Data Analysis

We considered a neuron with task-related responses if during one of the periods of the task (f1, delay between f1 and f2; f2, reaction [RT] and movement [MT] times) its mean firing rate was significantly different from a control period (Wilcoxon test, $p < 0.01$). The control period was the same duration as that of the relevant period, and it was recorded in each trial during the immediate period preceding

the probe tip that indented the skin. The delay period was divided in intervals of 500 ms beginning from the end of f1 to the beginning of f2. By the definition, f2 corresponds to the comparison period. For the Rt, we used that period from the end of f2 to the beginning of the KU (Figure 1A). For the Mt, we used that period from KU to PB (Figure 1A).

Responses tuned to f1 were defined as neurons that had a good linear fit (χ^2 goodness-of-fit probability, $Q > 0.05$) (Press et al., 1992) of the mean firing rate values (calculated over the entire f1 period, 500 ms) as a function of the stimulus frequency and had a slope of this linear fit that was significantly different from zero (permutation test, $n = 1000$ shuffles for each neuron, $p < 0.01$) (Siegel and Castellan, 1988). Response latency to f1 was estimated using a method based on the cumulative sum of the poststimulus histogram (bin width of 10 ms, $n = 5$) (Falzett et al., 1985).

To compute the delay activity between f1 and f2, a continuous-time data analysis was used. Single-neuron spike trains were convolved with gaussian kernel ($\sigma = 100$ ms) to obtain time-dependent spike density functions for each trial. A time-dependent spike rate mean and time-dependent spike rate standard error of the mean (SEM) were computed from the set of density functions for each f1 condition. At each point in time, we computed the best linear fit as a function of f1; using the standard errors, we computed whether the slope of the linear fit was significantly different from zero (Ross, 1987; Press et al., 1992). We also computed the χ^2 goodness-of-fit probability Q of a linear fit (2 degrees of freedom) and a sigmoidal (4 degrees of freedom) fit to the data (Press et al., 1992). Response time was calculated using the point in time at which the linear regression slope became "significantly" different from zero ($p < 0.01$), while the linear fit was considered as "significantly monotonic"; this required $Q > 0.05$ (dark horizontal lines in Figures 3A–3C). These times were further marked as "linear" or "sigmoidal" according to which fit had the higher Q . Neurons with significantly monotonic responses during a continuous period of at least 300 ms duration in the delay period were marked as delay period signal-carrying neurons (Figure 3D).

Differential responses during the f2 period were evaluated by ROC analysis. Each point of a ROC curve represents the proportion of trials of the condition $f2 > f1$, where the response (firing rate) was higher than a criterion value k , against the proportion of trials of the condition $f2 < f1$ that exceeded the same criterion; the criterion varied from 0 to 200 in increments of 1. This ROC value was estimated using equation:

$$ROC_{index} = \int_{-\infty}^{\infty} Pr(r_1 = k) Pr(r_2 < k) dk. \quad (2)$$

In this formulation, r_1 and r_2 are the response distributions for trials where $f2 > f1$ and trials where $f2 < f1$, respectively. Each neuron was tested in this condition where at least three different f2 frequencies (18, 22, and 26 Hz) were preceded by an f1 that was 8 Hz lower or higher than f2. Keeping f2 fixed guarantees that the responses marked as differential during the comparison period are the result of the interaction between f1 and f2 correct discriminations (Kim and Shadlen, 1999). For each neuron, we took the average of the ROC curve area for each of the relevant f2 frequencies and designated as the neuron's ROC index (Britten et al., 1992; Shadlen and Newsome, 1996; Kim and Shadlen, 1999). The permutation test ($n = 1000$ shuffles for each neuron, $p < 0.01$) (Siegel and Castellan, 1988) was used to identify significant ROC index values that were significantly different from 0.5, the value expected when the two response distributions were similar (Zhang et al., 1997a; Kim and Shadlen, 1999; Hernández et al., 2000; Dodd et al., 2001). To study its dynamics, we computed the ROC indices using a sliding window of 100 ms duration incremented steps of 20 ms, from a period beginning 1000 ms before and ending 1000 ms after the comparison period. In Figures 8A, 8B, 8D, and 8E, each curve represents the mean average of the ROC index for differences between f1 and f2 of 0, 2, 4, and 8 Hz. For example, for a 4 Hz difference, we compared the response distribution for 24 versus 20 Hz against the response distribution for 16 versus 20 Hz. For trials with identical f1 and f2 (0 Hz difference), we grouped trials according to the push-button presses.

The dependences between f2 and f1 were obtained through multi-

variate regression analysis. Errors in fit coefficients a_1 and a_2 were derived from the variance in responses to the individual (f1, f2) stimulus pairs (Draper and Smith, 1981; Press et al., 1992) and resulted in the full 2-D covariance matrix of errors (a_1, a_2). Coefficients were considered significantly different from (0, 0) if they were more than 2 SD away. Neuronal responses were defined unambiguously as dependent of f1, f2 if the coefficients of the planar fit were within 2 SD of one of the two lines $a_2 = 0$ or $a_1 = 0$; responses were considered dependent of the difference between f2 and f1 (labeled as "d" in Figures 5F, 6E, and 7E) if the coefficients were more than 2 SD away from these two lines and within 2 SD of the line $a_2 = -a_1$. Responses not satisfying this criterion were classified as "mixed" type responses. The dynamics of these coefficients were analyzed using a sliding window of 100 ms duration incremented in steps of 25 ms, from a period beginning 1000 ms before and ending 1000 ms after the comparison period. The beginning of the differential response (latency) was estimated for each neuron by identifying the first bin (25 ms) of three consecutive bins (75 ms) in this period where the coefficients a_1 and a_2 were significantly different from 0, and the difference between their magnitudes was not significant (labeled as "d" in Figures 5F, 6E and 7E; these values fall close to the diagonal as shown in Figures 5E, 6D, and 7D).

Acknowledgments

The research of R.R. was supported in part by an International Research Scholars Award from the Howard Hughes Medical Institute and grants from the Millennium Science Initiative, CONACyT, and DGAPA-UNAM. We thank Carlos Brody and Emilio Salinas for invaluable comments and discussions. We appreciate the technical assistance of Luis Lemus and Sergio Méndez.

Received: July 19, 2001

Revised: January 22, 2002

References

- Britten, K.H., Shadlen, M.N., Newsome, W.T., and Movshon, J.A. (1992). The analysis of visual motion: a comparison of neuronal and psychophysical performance. *J. Neurosci.* **12**, 4745–4765.
- Burton, H., and Fabri, M. (1995). Ipsilateral intracortical connections of physiologically defined cutaneous representations in areas 3b and 1 of macaque monkeys: projections in the vicinity of the central sulcus. *J. Comp. Neurol.* **355**, 508–538.
- Burton, H., Fabri, M., and Alloway, K. (1995). Cortical areas within the lateral sulcus connected to cutaneous representations in areas 3b and 1: a revised interpretation of the second somatosensory area in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* **355**, 539–562.
- Chen, Y.C., Thaler, D., Nixon, P.D., Stern, C.E., and Passingham, R.E. (1995). The functions of the medial premotor cortex. II. The timing and selection of learned movements. *Exp. Brain Res.* **102**, 461–473.
- Cipolloni, P.B., and Pandya, D.N. (1999). Cortical connections of the frontoparietal opercular areas in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* **403**, 431–458.
- Dodd, J.V., Krug, K., Cumming, B.G., and Parker, A.J. (2001). Perceptually bistable three-dimensional figures evoke high choice probabilities in cortical area MT. *J. Neurosci.* **21**, 4809–4821.
- Draper, N., and Smith, H. (1981) *Applied Regression Analysis*, Second Edition (New York: John Wiley & Sons, Inc.)
- Falzett, M., Moore, R.K., Petry, H.M., and Powers, M.K. (1985). A method for determining threshold from single-unit neural activity. *Brain Res.* **347**, 127–131.
- Fuster, J.M. (1997). Network memory. *Trends Neurosci.* **20**, 451–459.
- Geyer, S., Matelli, M., Luppino, G., and Zilles, K. (2000). Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. *Anat. Embryol. (Berl.)* **202**, 443–474.
- Gold, J.I., and Shadlen, M.N. (2000). Representation of a perceptual decision in developing oculomotor commands. *Nature* **404**, 390–394.

- Green, D.M., and Sweets, J.A. (1966) Signal Detection Theory and Psychophysics (New York: John Wiley & Sons).
- Hernández, A., Salinas, E., García, R., and Romo, R. (1997). Discrimination in the sense of flutter: new psychophysical measurements in monkeys. *J. Neurosci.* 17, 6391–6400.
- Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2000). Neuronal correlates of sensory discrimination in the somatosensory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6191–6196.
- Horwitz, G.D., and Newsome, W.T. (1999). Separate signals for target selection and movement specification in the superior colliculus. *Science* 284, 1158–1161.
- Johnson, K.O. (1980a). Sensory discrimination: decision process. *J. Neurophysiol.* 43, 1771–1792.
- Johnson, K.O. (1980b). Sensory discrimination: neural processes preceding discrimination decision. *J. Neurophysiol.* 43, 1793–1815.
- Johnson, K.O. (2000). Neural coding. *Neuron* 26, 563–566.
- Jones, E.G., and Powell, T.P.S. (1969). Connexions of the somatic sensory cortex of the rhesus monkey. I. Ipsilateral cortical connexions. *Brain* 92, 477–502.
- Jones, E.G., Coulter, J.D., and Hendry, S.H. (1978). Intracortical connectivity of architectonic fields in the somatic sensory, motor and parietal cortex of monkeys. *J. Comp. Neurol.* 181, 291–347.
- Jürgens, U. (1984). The efferent and afferent connections of the supplementary motor area. *Brain Res.* 300, 63–81.
- Kim, J.N., and Shadlen, M.N. (1999). Neural correlates of a decision in the dorsolateral prefrontal cortex of the macaque. *Nat. Neurosci.* 2, 176–185.
- Krubitzer, L., Clarey, J., Tweendale, R., Elston, G., and Calford, M. (1995). A redefinition of somatosensory areas in the lateral sulcus of macaque monkeys. *J. Neurosci.* 15, 3821–3839.
- Kurata, K., and Tanji, J. (1985). Contrasting neuronal activity in supplementary and precentral motor cortex of monkeys. II. Responses to movement triggering vs. nontriggering sensory signals. *J. Neurophysiol.* 53, 142–152.
- LaBar, K.S., Gitelman, D.R., Parrish, B.T., and Mesulam, M.M. (1999). Neuroanatomic overlap of working memory and spatial attention networks: a functional MRI comparison within subjects. *Neuroimage* 10, 695–704.
- LaMotte, R.H., and Mountcastle, V.B. (1975). Capacities of humans and monkeys to discriminate vibratory stimuli of different frequency and amplitude: a correlation between neural events and psychophysical measurements. *J. Neurophysiol.* 38, 539–559.
- Leon, M.I., and Shadlen, M.N. (1998). Exploring the neurophysiology of decisions. *Neuron* 21, 669–672.
- Luppino, G., Matelli, M., Camarda, R.M., and Rizzolatti, G.M. (1993). Cortico-cortical connections of area F3 (SMA-proper) and area F6 (Pre-SMA) in the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 338, 114–140.
- Matsuzaka, Y., Aizawa, H., and Tanji, J. (1992). A motor area rostral to the supplementary motor area (presupplementary motor area) in the monkey: neuronal activity during a learned motor task. *J. Neurophysiol.* 68, 653–662.
- Merchant, H., Zainos, A., Hernández, A., Salinas, E., and Romo, R. (1997). Functional properties of primate putamen neurons during the categorization of tactile stimuli. *J. Neurophysiol.* 77, 1132–1154.
- Mountcastle, V.B., Steinmetz, M.A., and Romo, R. (1990). Frequency discrimination in the sense of flutter: psychophysical measurements correlated with postcentral events in behaving monkeys. *J. Neurosci.* 10, 3032–3044.
- Mountcastle, V.B., Reitboeck, H.J., Poggio, G.F., and Steinmetz, M.A. (1991). Adaptation of the Reitboeck method of multiple microelectrode recording to the neocortex of the waking monkey. *J. Neurosci. Methods* 36, 77–84.
- Mountcastle, V.B., Atluri, P.P., and Romo, R. (1992). Selective output-discriminative signals in the motor cortex of waking monkeys. *Cereb. Cortex* 2, 277–294.
- Pandya, D.N., and Kuypers, H.G.J.M. (1969). Cortico-cortical connections in the rhesus monkey. *Brain Res.* 13, 13–36.
- Petit, L., Courtney, S.M., Ungerleider, L.G., and Haxby, J.V. (1998). Sustained activity in the medial wall during working memory delays. *J. Neurosci.* 18, 9429–9437.
- Pollmann, S., and von Cramon, D.Y. (2000). Object working memory and visuospatial processing: functional neuroanatomy analyzed by event-related fMRI. *Exp. Brain Res.* 133, 12–22.
- Pons, T.P., Garraghty, P.E., Friedman, D.P., and Mishkin, M. (1987). Physiological evidence for serial processing in somatosensory cortex. *Science* 237, 417–420.
- Pons, T.P., Garraghty, P.E., and Mishkin, M. (1992). Serial and parallel processing of tactual information in somatosensory cortex of rhesus monkeys. *J. Neurophysiol.* 68, 518–527.
- Press, W. H., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T., and Flannery, B.P. (1992) Numerical Recipes in C, Second Edition (Cambridge, UK: Cambridge University Press,).
- Romo, R., and Salinas, E. (2001). Touch and go: decision-making mechanisms in somatosensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 107–137.
- Romo, R., and Schultz, W. (1987). Neuronal activity preceding self-initiated or externally timed arm movements in area 6 of monkey cortex. *Exp. Brain Res.* 67, 656–662.
- Romo, R., and Schultz, W. (1992). Role of primate basal ganglia and frontal cortex in the internal generation of movements. III. Neuronal activity in the supplementary motor area. *Exp. Brain Res.* 91, 396–407.
- Romo, R., Ruiz, S., Crespo, P., Zainos, A., and Merchant, H. (1993). Representation of tactile signals in primate supplementary motor area. *J. Neurophysiol.* 70, 2690–2694.
- Romo, R., Merchant, H., Zainos, A., and Hernández, A. (1997). Categorical perception of somesthetic stimuli: psychophysical measurements correlated with neuronal events in primate medial premotor cortex. *Cereb. Cortex* 7, 317–326.
- Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., and Salinas, E. (1998). Somatosensory discrimination based on cortical microstimulation. *Nature* 392, 387–390.
- Romo, R., Brody, C.D., Hernández, A., and Lemus, L. (1999). Neuronal correlates of parametric working memory in the prefrontal cortex. *Nature* 399, 470–473.
- Romo, R., Hernández, A., Zainos, A., Brody, C.D., and Lemus, L. (2000). Sensing without touching: psychophysical performance based on cortical microstimulation. *Neuron* 26, 273–278.
- Ross, S.M. (1987) Introduction to Probability for Scientists and Engineers (New York: John Wiley & Sons).
- Salinas, E., and Romo, R. (1998a). Conversion of sensory signals into motor commands in primary motor cortex. *J. Neurosci.* 18, 499–511.
- Salinas, E., and Romo, R. (1998b) Neuronal representations in a categorization task: sensory to motor transformations. In *Computational Neuroscience: Trends in Research* 98, J. Bower, ed. (New York: Plenum Press) pp. 599–604.
- Salinas, E., Hernández, A., Zainos, A., and Romo, R. (2000). Periodicity and firing rate as candidate neural codes for the frequency of vibrotactile stimuli. *J. Neurosci.* 20, 5503–5515.
- Schall, J.D. (2001). Neural basis of deciding, choosing and acting. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 33–42.
- Shadlen, M.N., and Newsome, W.T. (1996). Motion perception: seeing and deciding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 628–633.
- Shadlen, M.N., and Newsome, W.T. (2001). Neural basis of a perceptual decision in the parietal cortex (area LIP) of the rhesus monkey. *J. Neurophysiol.* 86, 1916–1936.
- Shen, L., and Alexander, G.E. (1997). Preferential representation of instructed target location versus limb trajectory in dorsal premotor area. *J. Neurophysiol.* 77, 1195–1212.
- Shima, K., and Tanji, J. (1998). Both supplementary and presupplementary motor areas are crucial for the temporal organization of multiple movements. *J. Neurophysiol.* 80, 3247–3260.
- Shima, K., and Tanji, J. (2000). Neuronal activity in the supplementary and presupplementary motor areas for temporal organization of multiple movements. *J. Neurophysiol.* 84, 2148–2160.

- Siegel, S., and Castellan, N.J. (1988) *Nonparametric Statistics for Behavioral Sciences* (New York: McGraw-Hill).
- Tanji, J. (1996). New concepts of the supplementary motor area. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 782–787.
- Tanji, J., and Kurata, K. (1985). Contrasting neuronal activity in supplementary and precentral motor cortex of monkeys. I. Responses to instructions determining motor responses to forthcoming signals of different modalities. *J. Neurophysiol.* *53*, 129–141.
- Thaler, D., Chen, Y.C., Nixon, P.D., Stern, C.E., and Passingham, R.E. (1995). The functions of the medial premotor cortex. I. Simple learned movements. *Exp. Brain Res.* *102*, 445–460.
- Zhang, J., Riehle, A., and Requin, J. (1997a). Analyzing neuronal processing locus in stimulus-response association tasks. *J. Math. Psychol.* *41*, 219–236.
- Zhang, J., Riehle, A., Requin, J., and Kornblum, S. (1997b). Dynamics of single neuron activity in monkey primary motor cortex related to sensorimotor transformation. *J. Neurosci.* *17*, 2227–2246.