

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



DINÁMICA NEURONAL HIPOCAMPAL COMO SUSTRATO  
NEUROFISIOLÓGICO DEL APRENDIZAJE OBSERVACIONAL EN  
RATAS

YERKO ANDRÉS FUENTEALBA ESCOBAR

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Dr. José Luis Valdés G.

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**YERKO ANDRÉS FUENTEALBA ESCOBAR**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Marzo de 2018.

**Prof. Dr. José Luis Valdés Guerrero**

Director de Tesis

Departamento de Neurociencias

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr, Paul Délano R.**  
Presidente Comisión de Examen

**Prof. Dra. Andrea Paula-Lima**

**Prof. Dr. Pedro Maldonado A.**

**Prof. Dr. Pablo Fuentealba D.**

## **AGRADECIMIENTOS**

## INDICE DE CONTENIDOS

Índice de figuras	6
Índice de Tablas	8
Abreviaturas	9
Resumen	10
Abstract	12
Introducción	
Aprendizaje	
Conceptos y categorías	14
La imitación	15
Evidencia neurofisiológica del aprendizaje social.	16
Evidencia de aprendizaje observacional en roedores	18
Bases neurofisiológicas de la navegación espacial	
Hipocampo y <i>place cells</i>	22
Fenómeno del remapeo en <i>place cells</i>	25
Actividad rítmica poblacional como parte del sistema de navegación	26
Hipótesis	31
Objetivos	32
Métodos	
Animales	33
Tareas Conductuales	34
Experimentos	35
Variables conductuales evaluadas	39
Cirugías e implantes	41
Fármacos e inyección	42
Adquisición y análisis de datos electrofisiológicos	43
Perfusión e histología	49
Análisis estadístico	50
Resultados	
Verificación de la capacidad de aprender por observación en ratas	52
Análisis de la eficiencia del aprendizaje	61
Papel del hipocampo en el aprendizaje observacional	66
Dinámica neuronal durante la observación	74
Poder espectral en banda theta	86
Discusión y conclusiones	88

Presentaciones a congresos	102
Anexo I: tablas con resultados de análisis estadísticos	103
Anexo II: Certificado de autorización bioética de la investigación	110
Referencias	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Animales no humanos y la capacidad de comprender las acciones de otros	20
Figura 2. Bases neurofisiológicas de la navegación espacial.	29
Figura 3. Paradigma experimental	35
Figura 4. Experimento conductual	37
Figura 5. Experimento farmacológico	39
Figura 6. Adquisición de datos electrofisiológicos	44
Figura 7. Obtención de neuronas únicas	45
Figura 8. Procedimiento para calcular contenido de información real y aleatorizado	47
Figura 9. Posición y proyección de cánulas para inyección intrahipocampal de bupivacaína y de <i>hyperdrive</i> con electrodos para registro electrofisiológico	50
Figura 10. Trayectorias representativas de la conducta de los distintos grupos durante la tarea de navegación espacial	53
Figura 11. Tasa de éxito experimento conductual.	55
Figura 12. Razón de distancias experimento conductual.	56
Figura 13. Latencia experimento conductual.	58
Figura 14. Número de errores experimento conductual	60
Figura 15. Análisis de la conducta en los grupos que aprenden	63
Figura 16. Distancia total recorrida y velocidad promedio durante el experimento conductual.	65
Figura 17. Tasa de éxito experimento farmacológico	67
Figura 18. Tasa de éxito combinada entre los experimentos conductual y farmacológico.	68
Figura 19. Razón de distancias experimento farmacológico	69
Figura 20. Latencias experimento farmacológico	70
Figura 21. Número de errores experimento farmacológico	72

Figura 22. Distancia total recorrida y velocidad promedio durante el experimento farmacológico	73
Figura 23. Parámetros conductuales en animales registrados electrofisiológicamente	75
Figura 24. Ejemplos de <i>observational-place cells</i>	77
Figura 25. Ejemplos de neuronas no clasificadas como <i>observational-place cells</i>	78
Figura 26. Mapas de frecuencia de las 62 neuronas clasificadas como <i>observational-place cells</i>	79-80
Figura 27. Mapas de frecuencia de 35 neuronas clasificadas como <i>place cells</i> .	81
Figura 28. Comparación de la proporción de neuronas que generan representaciones espaciales con uno o más <i>place fields</i> ,	82
Figura 29. Características de OPC y <i>place cells</i>	83
Figura 30. Estimación de remapeo espacial y de frecuencia de descarga	85
Figura 31. Poder espectral en la banda theta	87

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de neuronas seleccionadas	76
Tabla A1. Resumen de comparación estadística de la tasa de éxito experimento conductual.	103
Tabla A2. Resumen de comparación estadística de la probabilidad acumulada de éxito	103
Tabla A3. Resumen de comparación estadística de la razón de distancias experimento conductual	104
Tabla A4. Resultado de la correlación y regresión lineal de la razón de distancias	104
Tabla A5. Resumen de comparación estadística de la latencia experimento conductual	105
Tabla A6. Resultado de la correlación y regresión lineal de la latencia	105
Tabla A7. Resumen de comparación estadística del número de errores experimento conductual	106
Tabla A8. Resultado de la correlación y regresión lineal del número de errores	106
Tabla A9. Resultado de la correlación y comparación de regresiones de las variables normalizadas	107
Tabla A10. Resumen de comparación estadística de la distancia total recorrida, experimento conductual	107
Tabla A11. Resumen de comparación estadística de la velocidad promedio, experimento conductual	108
Tabla A12. Comparación estadística entre resultados de tasa de éxito en experimento conductual y farmacológico	108
Tabla A13. Comparación y valores de correlación para las tres variables continuas en los tres experimentos: conductual, farmacológico y electrofisiológico	109

## ABREVIATURAS

CA: Cornus Ammonis del hipocampo

GD: Giro Dentado del hipocampo

OPC: *Observational-place cells* / células de lugar de observación

PC: *Place cells* / células de lugar

LFP: *Local field potential* / potencial de campo local

ACC: Corteza cingulada anterior

PFC: Corteza prefrontal

mPFC: Corteza prefrontal medial

EC: Corteza entorrhinal

LA: Amígdala lateral

MeA: Amígdala medial

MEC: Corteza entorrinal medial

LEC: Corteza entorrinal lateral

HD: hipocampo dorsal

HV: hipocampo ventral

AP: Antero-posterior

ML: Medio-lateral

DV: Dorso-ventral

## RESUMEN

El aprendizaje observacional es la capacidad de imitar una conducta dirigida a metas, a partir de la observación de un congénere que actúa como demostrador de una conducta. Este tipo de aprendizaje fue inicialmente descrito en conductas humanas, pero hoy sabemos que muchas especies animales, incluyendo vertebrados e invertebrados, pueden aprender a partir de la experiencia de otros. A pesar de su importancia, se desconocen las bases neurofisiológicas que sustentan el aprendizaje observacional.

Roedores han demostrado la capacidad de aprender por observación en distintos paradigmas conductuales, incluyendo tareas de navegación espacial. Sabemos que la capacidad de un animal para orientarse en su entorno está determinada por la actividad neuronal concertada de varias regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo. En esta región, neuronas piramidales conocidas como *place cells* codifican porciones del ambiente atravesadas por el animal (llamadas *place fields*). La población de *place cells* genera una representación completa del entorno, que se denomina mapa cognitivo. Este mapa es modulado por cambios en las características espaciales y no espaciales del entorno, en un proceso conocido como remapeo (*remapping*). Actualmente se desconoce si el mapa cognitivo se genera exclusivamente en representación de la posición del mismo animal o si puede también representar la posición de congéneres. En la presente tesis, hipotetizo que la actividad neuronal hipocampal de un animal puede codificar la posición de otro animal, y que dicha codificación es necesaria para el aprendizaje del observador a partir de la experiencia de un congénere.

Para evaluar el rol del hipocampo en el aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial, ratas naïve observaron a un demostrador bien entrenado mientras éste resolvía un laberinto espacial. Tras el periodo de observación, el animal naïve pasó a resolver el mismo laberinto espacial y medimos parámetros de aprendizaje en este animal. Si el observador puede adquirir información sobre la tarea de navegación espacial a partir de la experiencia del demostrador, espero que dicho

observador muestre una mejora en su desempeño conductual, comparado con animales que observaron demostradores no entrenados o que no observaron congéneres.

Los resultados experimentales indican que efectivamente los observadores mejoran su desempeño conductual sólo cuando observaron un demostrador bien entrenado. Este aprendizaje fue suprimido después de inhibir farmacológicamente la actividad hipocampal durante el periodo de observación, lo que sugiere que esta estructura juega un rol clave en la adquisición del aprendizaje observacional. Registros electrofisiológicos extracelulares de la actividad hipocampal indican la existencia de una población neuronal en CA1 que específicamente codifican la posición del animal demostrador en el laberinto espacial (llamadas *observational-place cells*, OPC). Esto sugiere que el hipocampo genera representaciones espaciales de la posición de un congénere. Además, dichas representaciones hipocampales cambian cuando el animal pasa de observar al congénere, a resolver la tarea espacial, indicando remapeo global del mapa cognitivo.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren fuertemente que la actividad hipocampal es esencial para las mejoras conductuales asociadas a un proceso de aprendizaje observacional. Los mecanismos subyacentes a esta mejora conductual están probablemente asociadas a la actividad neuronal hipocampal que genera una representación interna de la posición del congénere que en esta tarea actúa como demostrador, a través de las *observational-place cells*.

## ABSTRACT

Observational learning is the ability to imitate a goal-directed behavior from the observation of a congener that acts as a demonstrator of behavior. This type of learning was initially described for human behavior, but today we know that many species, including vertebrates and invertebrates, can learn from the experiences of others. However, the neurophysiological underpinnings of observational learning remain elusive.

Rodents can learn by observation within different behavioral paradigms, including spatial navigation tasks. We know that the animal's ability to orientate in an environment is determined by the concerted neuronal activity of several brain regions, including the hippocampus. Hippocampal pyramidal neurons known as *place cells* encode portions of the environment traveled by the animal: the *place fields*. The population of *place cells* generates a complete representation of the environment, known as cognitive map. This map is modulated by changes both of spatial and non-spatial features in the environment, by a process called remapping. Currently it is unknown if a cognitive map is generated exclusively in representation of the animal own position or whether it can also represent the position of congeners. In this thesis I hypothesize that the activity of hippocampal neurons of an animal encodes the positions of another animal, and that this encoding is necessary for the observer's learning from a demonstrator's experience.

To evaluate the role of the hippocampus for observational learning of a spatial navigation task, naïve rats observed a well-trained demonstrator rat solving a spatial maze. After the observation epoch, the observer was left to solve the same maze to evaluate learning. If the observer can acquire information about the spatial navigation task from observing the experience of the demonstrator, I expect an improvement of the performance of the naïve animal compared to animals that observed an untrained demonstrator, or did not observe a demonstrator prior to the task.

The results of this experiment indicate that observers improve their performance in the spatial navigation task only after watching an experienced demonstrator animal. This

learning was completely abolished after pharmacological inactivation of hippocampal activity during observation epochs, suggesting the hippocampus to play a key role in observational learning. Extracellular recordings of hippocampal activity indicate the existence of a population of neurons in CA1 which are specifically encoding the position of the demonstrator rat in the maze (observational-place cells, OPC). This suggests that the hippocampus generates spatial representations of a congener's position. Additionally, these representations changed when the animal shifted from observing to actively navigating in the maze, indicating a global remapping of the cognitive map.

The results obtained in the framework of this dissertation strongly suggest that hippocampal activity is essential for an observational learning-dependent improvement of behavior. The underlying mechanisms of this improvement are likely explained by the activity of hippocampal neurons generating an internal representation of the navigation performed by a congener that acts as a demonstrator, through *observational-place cell* activity.

## INTRODUCCIÓN

### Aprendizaje

#### *Conceptos y categorías.*

El aprendizaje es la capacidad del sistema nervioso de incorporar información del medio externo y expresarla como un cambio conductual. Este cambio conductual puede luego ser almacenado para ser reutilizado posteriormente, mediante los mecanismos de memoria (Schacter y Wagner, 2004). Así, aprendizaje y memoria están íntimamente relacionados, pero corresponden a momentos distintos de un proceso continuo.

Dentro de los tipos de aprendizaje hay al menos tres tipos que se han encontrado en un gran número de animales, tanto vertebrados como invertebrados: el condicionamiento clásico (Pavlov, 1927), condicionamiento operante (Thordnike 1898; Skinner, 1938), y el aprendizaje imitativo (Thorpe, 1963).

Los dos primeros conllevan aprendizaje mediante la asociación entre un efecto y una respuesta, y se basan en los estudios de Pavlov (1927) y luego la escuela conductista de la psicología (Watson, 1913), liderada por Skinner y Watson, entre otros. Mientras en el condicionamiento clásico de Pavlov los animales aprenden que ciertos estímulos ambientales funcionan como un predictor de una recompensa o un castigo (Maren, 2001), el condicionamiento operante de Skinner es un tipo de aprendizaje controlado por las consecuencias, es decir, la conducta de los mismos animales determina si estos obtienen más recompensa o evitan un castigo (Skinner 1937; Staddon y Cerutti, 2003). Estos tipos de aprendizaje han sido ampliamente documentados tanto en términos conductuales como neurobiológicos, y se siguen usando como una aproximación conductual a fenómenos cognitivos.

En esta tesis, sin embargo, nos centraremos en el aprendizaje imitativo, es decir, aquél en el que un animal obtiene información sobre la resolución de una tarea a partir de la observación de la conducta de un congénere, y luego utiliza dicha información para resolver por sí mismo la tarea en cuestión.

## *La imitación*

La imitación se entiende como “la copia de un acto novedoso de un animal (improbable de ejecutar o articular, o un acto para el cual no hay una tendencia instintiva clara), por parte de otro animal que no ha desarrollado previamente dicho acto” (Zentall T.R., 1996). Esto no significa que los animales reproducen punto a punto la conducta que imitan, sino que más bien reproducen el sentido o el objetivo del acto copiado (Galef 1988).

Para entender el rol clave que juega la imitación en disciplinas que van de la evolución a la psicología, hay que entender sus orígenes. A fines del siglo XIX, Darwin y Wallace (cofundadores de la teoría de la evolución, Darwin, 1859; Wallace 1858) diferían respecto de la aplicación de esta teoría a la evolución de las capacidades cognitivas de la mente humana. Por una parte, Wallace insistía en que la mente y la conciencia eran un producto exclusivamente humano y por tanto no había huella evolutiva ni ancestros de estas cualidades. En cambio, Darwin sostenía que la mente humana, así como todas las propiedades de las especies, evolucionó lentamente a través de formas de vida menos complejas. Esto último implicaría que podríamos encontrar entre los animales actualmente existentes en el planeta, “formas primitivas de facultades morales y mentales propias de los humanos” (Galef 1988; Romanes 1883).

El aprendizaje imitativo es uno de los aspectos cognitivos que mejor representan esta discusión, ya que primeramente fue definido para conductas humanas (Bandura 1969), y luego se trasladó a estudios en animales, por lo que al afirmar hoy que animales no humanos muestran características de aprendizaje imitativo entrega evidencia a las ideas de Darwin (Darwin, 1871, Thorpe 1963) de que dichas habilidades cognitivas serían las huellas evolutivas de nuestras actuales habilidades cognitivas como humanos.

Para los propósitos de esta tesis el aprendizaje observacional o imitación se entiende como la capacidad de un animal de adquirir nuevas capacidades de respuesta a un estímulo a través de la observación de un congénere que actúa como experto o modelo

de la respuesta. Por ejemplo, cuando un grupo de animales aprende una operación al observar un grupo control, que ya es experto en la tarea o que en ese mismo momento está aprendiendo a resolverla. Esto implica que la observación de congéneres es suficiente para la adquisición de respuestas dirigidas a metas que no son parte del repertorio de respuestas innatas de la especie (como el apareamiento o la alimentación), y que el animal puede seguir desarrollando posteriormente en ausencia del experto (Galef, 1988; Heyes, 1994; Bandura 1969). Una ventaja evolutiva que podría heredarse a partir del aprendizaje observacional es la capacidad de los animales de adquirir conductas sin perder tiempo en el aprendizaje asocial vía ensayo y error (Petrosini, 2007).

Si bien ha sido complejo concertar marcos teóricos y definiciones que limiten con precisión las conductas que son atribuibles a genuino aprendizaje imitativo versus aquellas que son nada más que una reproducción de la conducta de otros, sin reproducir necesariamente el sentido de la acción copiada. Un ejemplo de este último tipo de conductas es el *local enhancement*, en el cual la presencia de un animal en un cierto lugar del entorno aumenta la relevancia de dicho lugar para un animal observador externo. Si en dicho lugar, por ejemplo, se esconde una recompensa y el animal observador forrajea en dicho sitio después que lo hizo el demostrador, es argumentable que la conducta no corresponde necesariamente a un aprendizaje 'de un animal forrajeando por una recompensa', sino más bien que el observador se acercó al lugar de la recompensa simplemente porque ahí antes estuvo un congénere. Para determinar que una conducta imitativa es realmente un aprendizaje observacional se sugiere descartar conductas que no conlleven aprendizaje, como el *local enhancement* y otras (Galef 1988; Heyes, 1996).

### *Evidencia neurofisiológica del aprendizaje social: las neuronas espejo*

La primera evidencia neurofisiológica de la capacidad de imitar, aparecida a principios de los 90's, agitó aún más el debate evolucionista. Los experimentos llevados a cabo por el grupo de Giacomo Rizzolatti en Italia mostraron que un grupo de neuronas en la corteza parieto-frontal de monos se activaban no sólo cuando el animal realizaba un

movimiento, sino también cuando observaba a un congénere (o el experimentador), realizar el mismo movimiento (Di Pellegrino y cols., 1992; Rizzolatti y Cragheiro, 2004, figura 1a). A partir de ahí se identificó toda una red en la corteza fronto-parietal que respondía a las acciones, emociones e incluso “vitalidad”<sup>1</sup> de las acciones de otros, y cuya función sería unificar la percepción de una acción con la ejecución de la misma permitiendo a un individuo entender la acción de otros ‘desde dentro’, es decir, dándole una comprensión en primera persona de dicha acción.

El mecanismo opera de modo que cada vez que un individuo observa a otro realizar un cierto movimiento, se activan neuronas que codifican dicha acción en la corteza motora del observador. Esta activación, sin embargo, no conlleva necesariamente la realización de dicho comando motor por parte del observador, y por ello el nombre ‘neuronas espejo’, ya que representan la acción de un otro en términos de actividad neuronal, en quien observa (Rizzolatti y Cragheiro, 2004).

Este mecanismo se ha documentado en monos, humanos y aves (Rizzolatti y Sinigaglia, 2010; Prather y cols., 2008; Keller y Hahnloser, 2009; Mukamel y cols., 2010) pero no en otras especies. Además, si bien este mecanismo sigue reportándose en experimentos con humanos y animales, sólo aplica al caso de aprendizajes motores (y auditivos, en aves) y no se ha reportado evidencia de actividad tipo espejo en tareas de aprendizaje explícito, ya sea en condicionamientos o tareas de imitación no motora (von Gog y cols., 2009). También la interpretación de la actividad espejo y su impacto en las funciones cognitivas, aún está en discusión, ya que no existen pruebas concluyentes que relacionen causalmente la actividad del circuito espejo y la capacidad de ‘entender el sentido’ de la acción motora de un congénere (Steinhorst y Funke, 2014).

---

<sup>1</sup> El término “vitalidad” se refiere a “estados afectivos, estado de ánimo y actitudes de los agentes que caracterizan cómo se muestran y experimentan sus acciones y emociones (Rizzolatti y Sinigaglia, 2016).

### *Evidencia de aprendizaje observacional en roedores*

En ratas el aprendizaje observacional ha sido descrito en múltiples condiciones. Un experimento clásico consiste en una caja separada en dos por una rejilla. Solo en una de las mitades cuelga un joystick del techo y existe un pocillo donde pueden caer recompensas; mientras que en la otra mitad hay un animal que puede observar cómo un congénere aprende que cada vez que mueve el joystick hacia la izquierda, obtiene una recompensa. Desde la perspectiva del observador, su congénere obtiene la recompensa al mover la palanca a la derecha, lo que fue usado por los autores para diferenciar si es que la conducta imitativa corresponde a la mera repetición motora, o si el observador entiende la tarea desde el punto de vista del experto. Los resultados confirman que el observador, al realizar la tarea, mueve el joystick mayormente hacia la izquierda, lo que indica que dicho animal es capaz de representar y aprender la tarea desde el punto de vista de la rata demostradora (Heyes y Dawson, 1990).

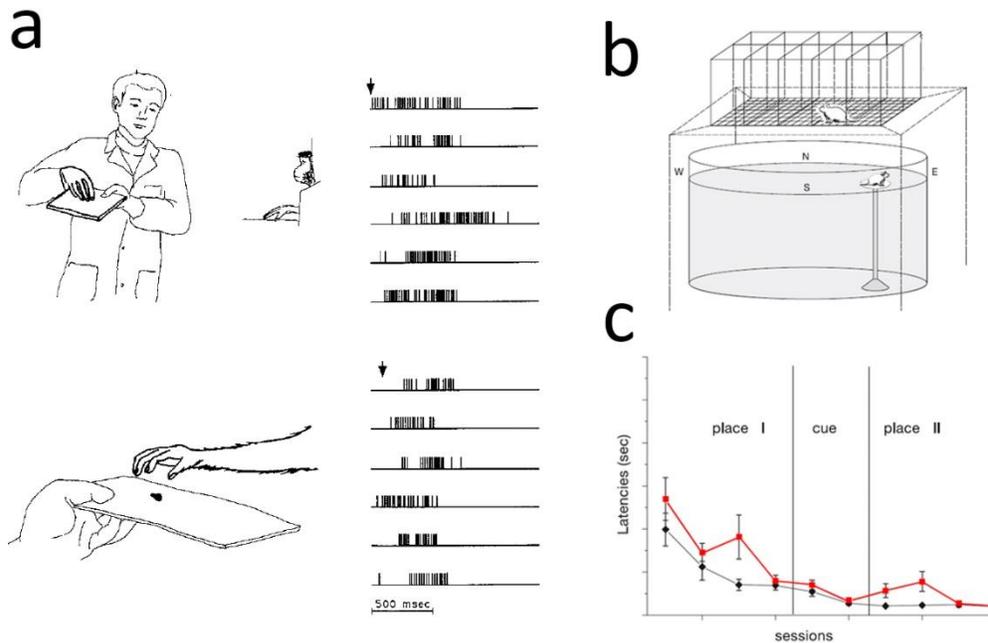
También se ha corroborado la capacidad de aprender por observación tareas de condicionamiento operante. En este caso un animal *naïve* observa a un experto presionar una palanca para conseguir una recompensa. Tras la observación los autores reportaron que los observadores presionaron más veces la palanca respecto a los que no observaron. Además, estimularon eléctricamente en la corteza prefrontal (PFC), el *nucleus accumbens* (NAc) y la región CA1 del hipocampo del observador cada vez que el demostrador apretaba la palanca, midiendo el efecto en el aprendizaje. La estimulación en la PFC impidió el aprendizaje, en el NAc generó una mejora en el desempeño del observador, mientras que la estimulación en CA1 no provocó cambios. Esta evidencia indica que distintas regiones cerebrales juegan papeles distintos en esta clase de tareas: mientras la estimulación de la PFC interrumpe el aprendizaje, la estimulación en el NAc lo promueve (Jurado-Parras y cols., 2012).

En un paradigma de condicionamiento al miedo, en tanto, se ha comprobado que los animales que observan a un congénere sometido a una pequeña descarga eléctrica (sin que el observador reciba el shock), genera respuestas conductuales como si estuviera siendo sometido al condicionamiento (*freezing*). Los autores muestran que la corteza cingulada anterior (ACC) juega un rol clave ya que su inactivación

farmacológica previo a la observación suprime el aprendizaje. Además, describen un aumento de la sincronización en el ritmo theta (4-12 Hz) entre la amígdala y la ACC, dos estructuras que participan de las respuestas al miedo, lo que podría interpretarse como un aumento de la comunicación entre la ACC y la amígdala lateral, y ha sido propuesto como un sustrato neurofisiológico del aprendizaje en este paradigma (Jeon y cols., 2010).

De hecho, reportes recientes muestran que un circuito intra-amigdalario (amígdala lateral, LA – amígdala medial, MeA) es fundamental para que el observador genere respuestas de *freezing* mientras se desarrolla la tarea. Los autores ilustran la importancia de esta red utilizando un ratón mutante de neuroxina (*Nrx1*, gen asociado a autismo), el cual no responde a estímulos sociales (como respuestas imitativas al miedo), y además presenta una hipofunción de esta red intra-amigdalario. Al aumentar el funcionamiento de la MeA con un receptor metabotrópico diseñado para activarse sólo con fármacos específicos (DREADD, *designer receptor exclusively activated by designer drugs*), se obtiene una reversión parcial de la respuesta a estímulos sociales en los animales mutantes, lo que indica que este circuito permite al observador relacionar el contenido afectivo de ciertas claves sociales con el contexto en el que se encuentra el animal demostrador (Twining y cols., 2017).

Además de condicionamiento operante y al miedo, existe evidencia de aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial en ratas. Disponiendo de pequeñas cajas sobre un tanque de agua, María G. Leggio y colaboradores, en el laboratorio de la Dra. Laura Petrosini, permitieron que un grupo de animales observara a otro grupo que resolvía el laberinto acuático de Morris (es decir, que debían encontrar la ubicación de una plataforma en un tanque de agua, figura 1b). Al evaluar a los observadores que nunca antes se habían sometido a esta prueba encontraron que éstos tenían un mejor desempeño comparado con los animales que no observan (figura 1c). Evaluaron también el papel del cerebelo en este aprendizaje a través de una lesión hemisférica previa o posterior a la observación, y descubrieron que los animales lesionados previo a la observación no mejoraron su desempeño, pero aquellos animales lesionados



**Figura 1.** Animales no humanos y la capacidad de comprender las acciones de otros. (a). Primera evidencia de neuronas espejo. Una neurona de la corteza premotora del mono incrementa sus descargas tanto cuando observa que el experimentador toma un objeto (arriba, *raster plot* a la derecha), como cuando el mismo animal toma dicho objeto (abajo, extraído de di Pellegrino y cols., 1992). (b). Diagrama del aparato usado para evaluar aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial: una serie de cubículos contienen ratas individuales que pueden observar a una congénere mientras busca la plataforma escondida en el tanque de agua. (c). Resultado de la latencia de animales observadores (línea negra) y animales naïve (línea roja). El protocolo experimental fue el siguiente: las primeras cuatro sesiones la plataforma estaba escondida, luego siguieron dos sesiones en que la plataforma estuvo visible, y finalmente cuatro en que la plataforma fue escondida en una nueva ubicación (extraído y modificado de Leggio y cols., 2003).

después de la observación sí pudieron desempeñar con éxito la tarea. Este resultado se replica en los animales no observadores, quienes sólo resuelven la tarea si la aprendieron a resolver antes de sufrir la lesión, de lo contrario, no son capaces de orientarse y nadan continuamente en círculos, sin encontrar la plataforma aún cuando esta es visible (Leggio y cols., 2000; Leggio y cols., 2003; Petrosini y cols., 2003). Estos resultados sugieren que el cerebelo participa de la adquisición de nuevos patrones de movimiento, los cuales pueden ser almacenados como memoria tanto si son observados como si son realizados por el animal. Sin embargo, una vez que dichos movimientos son aprendidos, el cerebelo no es requerido para mantener la conducta.

Si tomamos el conjunto de trabajos que proponen sustratos neurofisiológicos para el aprendizaje observacional en roedores podemos advertir que hay coincidencia entre las estructuras cerebrales que participan de la respuesta individual de dichas habilidades, y las estructuras que participarían durante el aprendizaje social. Así en el caso de condicionamiento al miedo, participan la amígdala (a través del circuito MeA-LA) y la ACC, ambas estructuras relacionadas con la representación, memoria y respuesta a estímulos aversivos; en el condicionamiento operante participan la mPFC y el NAc, relacionadas con la organización temporal de respuestas orientadas a metas y codificación de recompensas; y existe evidencia de que en tareas de navegación espacial participa el cerebelo, parte del circuito motor y de navegación espacial. Incluso, Las neuronas espejo del circuito fronto-parietal, que participan de la representación de actos motores, se ubican en regiones corticales motoras y pre-motoras. Así, esta evidencia (la más avanzada en cuanto a una propuesta mecanística de la capacidad de aprender por observación) sigue la idea de que las estructuras cerebrales que participan de las habilidades cognitivas del propio individuo están también activas durante el aprendizaje social.

La evidencia presentada aquí se puede agrupar en dos grandes hipótesis:

- i. los animales no humanos pueden expresar habilidades cognitivas complejas, como el aprendizaje observacional, tal como la expresan los humanos.
- ii. Para aprender a partir de la experiencia de otros, el cerebro utilizaría las estructuras que se activan cuando el animal realiza activamente dichas tareas o acciones, representando la intención de la acción de otros y luego incorporando dicha información al abanico de conductas del mismo animal.

Creemos que para abordar estas posibilidades es necesario centrarse en un paradigma de aprendizaje observacional en una tarea cognitiva como, por ejemplo, la navegación espacial. Esta capacidad se ha relacionado fuertemente a la actividad del hipocampo, la corteza motora y regiones subcorticales como los ganglios de la base y el cerebelo (Kandel 2004). En el siguiente apartado veremos sucinta y concisamente

porque el hipocampo representa una oportunidad única para responder las interrogantes planteadas, dado el detallado conocimiento que tenemos sobre el funcionamiento de la red hipocampal que permite a los animales orientarse en su entorno, aprender y almacenar memorias respecto al contenido tanto espacial como no espacial de los ambientes que recorren.

### **Bases neurofisiológicas de la navegación espacial**

Entendemos la navegación espacial como la capacidad de planear y ejecutar trayectorias dirigidas a un objetivo o meta. Para ello, el individuo requiere conocer su posición respecto al medio en el que se encuentra, de modo que sea capaz de alcanzar su objetivo aún en ausencia de información sensorial (Gallistel 1990). La pregunta sobre las bases neurofisiológicas de esta capacidad ha congregado multitud de esfuerzos en los últimos 40 años. Sin ir más lejos, mientras se desarrollaba esta tesis, tres investigadores fueron galardonados con el premio Nobel de fisiología por sus contribuciones en el campo (Abbot y Callaway, 2014). A continuación, revisaremos los mecanismos generales implicados en esta capacidad.

#### *Hipocampo y place cells*

Una región fundamental para la codificación y navegación espacial es el hipocampo. El hipocampo es una arquicorteza bilateralizada ubicada en los lóbulos temporales mediales en humanos y en roedores extendida rostrocaudalmente en forma de C hacia el lóbulo temporal (Witter y Amaral, 2004). La disfunción hipocampal (ya sea mediante lesiones o drogas) provoca una profunda pérdida de la capacidad de orientación espacial en ratas (Morris y cols, 1982; Riedel y cols., 1999, figura 2a). Esto coincide con estudios en humanos que correlacionan el deterioro hipocampal (a través de la sintomatología clínica), con pérdida de la capacidad de orientación espacial (Vliecek y Laczó, 2014).

El hipocampo está organizado en tres regiones distinguibles morfológicamente: el giro dentado (GD), los Cornu Ammonis (CA) 1, 2, 3 y 4, y el Subículum. Todas estas

regiones siguen una organización trilaminar de modo que en la capa central (*stratum pyramidale*) se ubican los somas de las neuronas principales y muchas interneuronas. La capa superior (hilus en el GD, *stratum oriens* en CA1, 2 y 3) e inferior (capa molecular en el DG, *stratum radiatum* en CAs) contiene fibras aferentes y eferentes (según la región) así como algunas interneuronas (Witter y Amaral, 2004). El subículum es un área de transición entre la a paleocorteza entorrinal y la arquicorteza hipocampal (Andersen y cols., 2007).

A nivel de conectividad, el hipocampo recibe aferencias desde las capas II y III de la corteza entorrinal (EC) tanto medial como lateral. Aferencias de la capa II de la EC hacen sinapsis con neuronas del GD y CA3, mientras que las de la capa III de la EC lo hacen en el árbol dendrítico de las neuronas de CA1. La vía 'clásica' de la conectividad hipocampal comienza con las fibras musgosas (*mossy fibers*) que salen del GD y alcanzan CA3, desde donde se proyectan las colaterales de Schaffer hacia CA1, que a su vez proyecta al subículum, donde finalmente la información vuelve a las capas V/VI de la EC. A dicha ruta se añaden las proyecciones directas desde la capa III de la EC a CA1, así como los *inputs* provenientes del septum medial y la banda diagonal de Broca, que hacen sinapsis en CA3 (Torrealba y Valdés, 2008; Van-Strien y cols., 2009).

A nivel anatómico-funcional, se pueden reconocer 3 regiones en el eje septo-temporal del hipocampo: dorsal (HD), intermedio y ventral (HV) (Moser y Moser, 1998; Fanselow y Dong, 2010). Estudios mediante lesión hipocampal muestran que específicamente la porción dorsal es necesaria para el aprendizaje en tareas de navegación espacial (Moser y cols., 1995), mientras que el hipocampo ventral modularía procesos afectivos y emocionales (Henke, 1990).

En todo el hipocampo encontramos neuronas que aumentan su tasa de descarga cuando el animal cruza una ubicación específica del ambiente. Dichas neuronas se conocen como *place cells*, y el lugar codificado o campo receptivo se conoce como *place field*, es decir, la porción del espacio codificado por dicha *place cell* (O'Keefe y Dostrovsky 1971). La sumatoria de *place fields* representados por distintas *place cells*

genera un mapa espacial que representa el espacio total recorrido por el animal (O'Keefe y Nadel, 1978).

Encontramos *place cells* en las porciones tanto dorsales como ventrales del hipocampo, a contramano de la segregación funcional en el eje dorso-ventral comentada anteriormente. Sin embargo, en el HV encontramos una proporción mucho menor de *place cells* comparado con el HD (Jung y cols., 1994), y la métrica de los *place fields*, es decir, el área del espacio recorrido que representa cada *place field*, se incrementa a medida que se recorre el eje dorso-ventral. Así, mientras en el hipocampo dorsal encontramos *place fields* del orden de centímetros, en el HV encontramos *place fields* del orden de los metros (Kjelstrup y cols., 2008).

La evidencia de que un animal puede volver a su punto de partida incluso con las luces de la sala de experimentación apagadas (Mittelstaedt y Mittelstaedt, 1980) y que la pérdida de información visual tras el apagado de luces no modifica la actividad de las *place cells* (Quirk y cols, 1990) indica que esta actividad no depende únicamente de la entrada de información sensorial, en este caso por la vía visual, sino que puede sostenerse en ausencia de ésta, y por tanto funcionar como un sistema de orientación del animal respecto a si mismo y al entorno (Burgess, 2006).

Investigaciones posteriores mostraron que el hipocampo no es la única región implicada en el proceso de navegación espacial. Existen neuronas ubicadas en la corteza entorrinal medial que descargan en múltiples ubicaciones en el espacio, pero siguiendo un arreglo en forma de grilla de triángulos equiláteros, de forma que cada *place field* representa un vértice de dicho triángulo (Haftor y cols., 2005). La actividad de estas neuronas, conocidas como *grid cells*, se interpreta como un mapa de coordenadas del entorno y pueden ser moduladas por las características del mismo (Moser y cols, 2008). En la misma corteza entorrinal y en otras regiones se han encontrado neuronas que codifican la orientación de la cabeza del animal, conocidas como *head direction cells* (Stackman y Thaupe, 1997). Recientemente, además, se ha reportado que neuronas de la MEC son capaces también de codificar la velocidad de desplazamiento del animal, conocidas como *speed cells* (Kropf y cols., 2015).

Así, la actividad organizada de estas neuronas da lugar a la vía de integración, que es el mecanismo propuesto por el cual el animal es capaz de determinar su orientación en el entorno, incluso en ausencia de claves sensoriales. Este mecanismo es modulado por dos vías principales, por una parte, las entradas de información sensoriales del medio externo, y por otro, la información propioceptiva, vestibular y sobre el estado mental general del animal (McNaughton y cols, 2006; Etienne y Jeffery, 2004).

Toda esta evidencia da soporte neurobiológico a la idea que teorizara Tolman a fines de la década del 40' sobre los mapas cognitivos. Esta teoría propone que el cerebro genera un mapa cognitivo que representa las características del ambiente, y sobre este mapa cognitivo realiza las asociaciones entre un estímulo y la respuesta conductual apropiada para dicho estímulo. Así, el sistema gana autonomía, flexibilidad y versatilidad, al representar de una vez las distintas características del entorno, en vez de realizar meras asociaciones entre un estímulo y una respuesta. Surge como una alternativa a la idea predominante de la época que decía que el sistema nervioso es un muy buen operador de relaciones 'estímulo-respuesta', en donde el aprendizaje no es más que el fortalecimiento de algunas conexiones neuronales en desmedro de otras, lo que finalmente se ve reflejado en las distintas conductas del animal (Tolman, 1948). Hoy en día, incluso, algunos autores contemporáneos postulan la idea de que el cerebro puede alojar más de un mapa espacial en forma simultánea, y comienzan a hablar del "atlas cognitivo", como la capacidad de alojar múltiples mapas cognitivos en simultáneo (Geva-Sagiv y cols., 2017).

#### *Fenómeno del remapeo de las place cells.*

Se ha observado que los *place fields* responden fuertemente a cambios en el entorno. Si las condiciones ambientales no cambian, y el animal permanece en el mismo ambiente manteniendo las claves visuales, los *place fields* muestran una fuerte estabilidad, es decir, codifican persistentemente el mismo lugar del espacio por días, semanas o incluso meses (Thompson y Best, 1990). Parte de esta estabilidad puede estar dada también por la demanda atencional de la tarea. Se ha visto que el aumento

de la dificultad de una tarea (y por tanto de la atención que un animal debe prestar a las claves o al entorno) se correlaciona con una mayor estabilización de los *place fields*, y que dicha estabilización se correlaciona también con un mejor desempeño en la tarea (Kentros y cols., 2004).

Por otra parte, el hipocampo es capaz de codificar dos ambientes distintos a través de la generación de dos mapas completamente diferentes, en que el espacio representado por la misma *place cell* cambia entre un ambiente y otro. Esto se conoce como *global remapping* (Leutgeb y cols., 2005; Willis y cols., 2005). Además, el hipocampo es capaz de codificar cambios sutiles en el ambiente, por ejemplo, de color, forma o luminosidad a través de un cambio en la tasa de descarga de las *place cells*. Esto se conoce como *rate remapping* (Leutgeb y cols., 2005; Colgin y cols., 2008, figura 2b). Así, el sistema puede generar dos representaciones espacialmente distintas cuando dos ambientes se codifican como diferentes (*global remapping*), y además codificar cambios más sutiles del mismo ambiente, manteniendo la representación espacial, pero modificando las tasas de descarga de las *place cells* (Colgin y cols., 2008).

Se ha reportado que ambientes que presentan lugares relevantes para el animal generan un reordenamiento de los *place fields* en CA1, de modo de representar lugares cercanos al lugar relevante del ambiente (Dupret y cols., 2010, Mamad y cols., 2017). Con todo esto, el remapeo puede estar dado tanto por un cambio del entorno físico, cambios en algunas propiedades o características de dicho entorno, también por variaciones de la relevancia de ciertos lugares dentro de un entorno, o la presencia de recompensas en cierto lugar del ambiente. Según la variación de las condiciones ambientales se pueden establecer nuevas representaciones completas del espacio, o generar cambios a nivel de tasa de descarga.

#### *Actividad rítmica poblacional como parte del sistema de navegación*

Además de la actividad individual de neuronas o ensambles neuronales, sabemos que existen oscilaciones de campo local (LFP – *local field potentials*) que son parte esencial

del funcionamiento cerebral (Buzsaki, 2006). Estas oscilaciones corresponden a deflexiones rítmicas del voltaje producto de la actividad concertada de una población neuronal, y se registran como señales continuas de baja frecuencia (0.1-250 Hz) (Varela y cols., 2001; Buzsaki, 2006). Se ha visto que el cerebro presenta estas oscilaciones continuamente y la frecuencia de dichas oscilaciones varía tanto según el estado interno del sistema (vigilia/sueño, por ejemplo) como la demanda cognitiva o la región cerebral que estemos midiendo. Se ha propuesto que estos ritmos están detrás de la coordinación y comunicación neuronal entre distintas regiones cerebrales (Varela y cols., 2001; Raichle y cols., 2001).

En el hipocampo una de las oscilaciones más estudiadas es el ritmo theta, que en roedores va de 4-12 Hz y se asocia a múltiples procesos cognitivos así como en percepción sensorial (Buzsaki, 2002). El origen de esta oscilación usualmente se asigna a una región extrahipocampal: el septum medial-banda diagonal de Broca, ya que lesiones en esta región inhiben el ritmo theta hipocampal (Green y Arduini, 1954). Interneuronas GABAérgicas del septum medial desinhiben rítmicamente a las interneuronas del GD, CA3 y CA1 promoviendo su actividad rítmica en la banda theta. Además, se ha visto que las sinapsis colinérgicas también son importantes para la generación de la oscilación theta (Colgin, 2016).

Particularmente, en navegación espacial se ha visto que el poder espectral de la onda theta se correlaciona con la velocidad de marcha del animal (Shen y cols., 1997; McNaughton y cols., 1983), mientras más rápido navega el animal, más prominente es la señal de theta hipocampal. Además, existe una relación estrecha entre esta oscilación y la actividad de las *place cells*, ya que los potenciales de acción de estas últimas sufren un retraso sistemático sobre la fase del ritmo theta, de modo que cuando el animal atraviesa el centro del *place field*, la descarga está en fase con el *peak* del ritmo theta y la neurona alcanza su máxima frecuencia de descarga (precesión de fase o *phase precesión*) (O'Keefe y Recce, 1993).

Así, las *place cells* descargan secuencialmente a lo largo del trayecto recorrido representando el espacio. Esta descarga secuencial se reproduce en la onda theta asociada, ya que mediante la precesión de fase la secuencia de descargas de las *place*

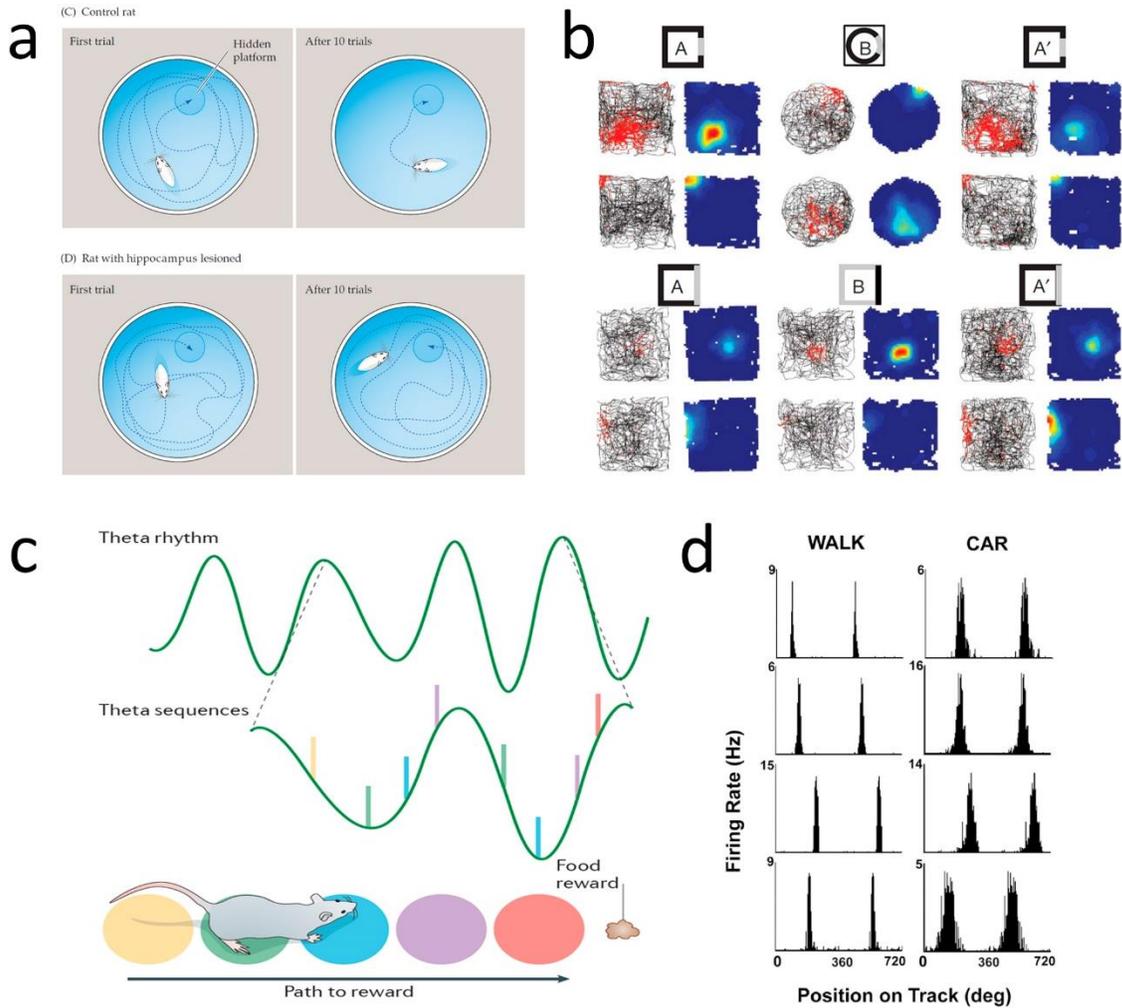
*cells* mantienen el orden en el que representan sucesivamente los lugares recorridos por el animal (Colgin, 2016; Wang y cols., 2015, figura 2c). Además, se ha visto que la estructura espaciotemporal de la onda theta también puede codificar la posición del animal, sugiriendo que la onda theta es un importante componente del sistema de navegación espacial (Agarwal y cols., 2014).

De este modo, el sistema de navegación interno del animal incorpora información del ambiente (a partir de la información sensorial) e información de la red (vía de integración, onda theta) para proveer de orientación al animal y para representar las trayectorias realizadas.

Sin embargo, cuando un animal es desplazado pasivamente (por ej, sobre un carro) a través de un laberinto anular se ha reportado que se mantiene la actividad tipo *place cells* (Terrazas y cols, 2005; Furuya y cols, 2005, figura 2d) y *head direction cells*, pero se pierde la actividad tipo *grid cells* (Winter y cols., 2015). Por otra parte, primates sometidos a un laberinto virtual en dos dimensiones muestran una disminución del contenido de información en las *place cells*, pero otras características de estas células se mantienen, como la precesión de fase (Aghajan y cols., 2014).

Además, la supresión de la oscilación theta, por lesión en el septum medial no impide la aparición de *place cells*, incluso en ambientes nuevos (Brandon y cols., 2014). Esta evidencia sugiere entonces que el hipocampo es capaz de presentar actividad tipo *place cells*, aún en ausencia de locomoción y de onda theta.

La evidencia más sugerente de la capacidad del hipocampo de representar la posición de otros viene de experimentos en ratas que observan a congéneres desplazarse sobre un laberinto lineal, de ida y vuelta (Mou y Ji, 2016). La idea es que el observador incrementa su atención sobre ciertos lugares del ambiente debido a la presencia de otro animal, lo que se conoce como *local enhancement* (Galef 1988). En estas condiciones, los autores describen que un grupo de neuronas hipocampales se activan tanto cuando el animal recorre el laberinto, como cuando observan pasivamente desde una caja adyacente a un demostrador recorriendo la misma pista. Dicha activación no



**Figura 2.** Bases neurofisiológicas de la navegación espacial. (a). Esquema del experimento de Morris (1985): un animal debe buscar una plataforma escondida en un tanque de agua. Arriba animales control, abajo animales con lesión hipocampal. Izquierda, primer ensayo, derecha décimo ensayo (extraído de Purves y cols., 2004). (b). Ejemplos de neuronas hipocampales que presentan remapeo global (panel superior) o remapeo de frecuencia (panel inferior). A y B indican habitaciones distintas. Colores de los bordes de las cajas indican colores distintos en las habitaciones. Se muestran tanto las espigas (puntos rojos) sobre la posición del animal (trazo negro) como los mapas de frecuencia en código de calor (extraído de Fyhn y cols., 2007). (c). Diagrama de *theta sequences*: un animal atraviesa un laberinto lineal codificado por los *place fields* indicados en los óvalos coloreados, organizados en un prominente ritmo theta hipocampal (sinusoide superior). Al centro, una ampliación de dos ciclos de theta indicando la relación entre las espigas de distintas *place cells* siguiendo la precesión de fase (extraído de Colgin, 2016). (d) Actividad tipo *place cells* en ausencia de actividad locomotora en ratas. Tasa de descarga de cuatro neuronas de animales que navegan activamente (*walk*) o sobre un carro (*car*) por un laberinto anular. Se muestran dos vueltas a la pista (extraído de Terrazas y cols., 2005).

distingue un demostrador entrenado o un animal naïve (es decir, se genera por la presencia de un congénere, sin importar el tipo de demostración que pueda realizar), pero no se evidencia cuando se utiliza un auto de juguete o en ausencia del demostrador (es decir, es específica para congéneres). En estas condiciones experimentales, sin embargo, los autores indican que la actividad hipocampal del observador no representa la posición del demostrador (Mou y Ji, 2016). Estos resultados sugieren que la actividad de las *place cells* durante la observación y la navegación, es dependiente de la presencia de un congénere en la pista que posteriormente recorrerá el observador. Este es el primer trabajo que presenta evidencia de la capacidad de un congénere de modificar la actividad neuronal hipocampal del observador.

Con estos antecedentes a la mano nuestra pregunta de investigación fue ¿podrían las neuronas hipocampales representar no sólo la posición del mismo animal, sino también la de un congénere? ¿Podría esta propiedad hipocampal ser la base de la capacidad de aprendizaje observacional en tareas de aprendizaje espacial en roedores?

En caso de que así fuera esperaríamos encontrar actividad tipo *place cell* en el hipocampo del observador codificando la posición de un congénere durante el aprendizaje observacional de una tarea de navegación espacial.

## HIPÓTESIS

Un sustrato neurofisiológico del aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial corresponde a la generación de un mapa cognitivo que representa la experiencia de otro individuo en el hipocampo del observador.

Dicho mapa cognitivo es generado por neuronas del tipo *place cells* que representan la posición ocupada por el congénere durante la demostración.

## **OBJETIVOS**

### *General*

Determinar el rol del hipocampo en términos conductuales y de dinámica neuronal en un animal que observa y aprende de la conducta de otro.

### *Específicos*

- 1.- Validar conductualmente un protocolo de aprendizaje observacional asociado a una tarea de navegación espacial.
- 2.- Determinar la participación del hipocampo dorsal en el aprendizaje observacional espacial mediante la inactivación farmacológica de esta estructura.
- 3.- Determinar mediante registros electrofisiológicos extracelulares de alta densidad la generación de mapas cognitivos en un animal que observa a un congénere mientras éste resuelve la tarea de navegación espacial.

## MÉTODOS

### ***Animales***

Para este estudio utilizamos ratas macho adultas, de la cepa Sprague-Dawley de entre 300-400 grs de peso, las cuales fueron adquiridas en los bioterios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile o de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, según disponibilidad. Todos los procedimientos realizados en esta tesis fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA 0813 FMUCH).

Utilizamos un total de 52 animales agrupados del siguiente modo:

- Treinta y tres para los estudios conductuales:
  - a. Animales para el grupo no pre-entrenado (7)
  - b. Animales para el grupo pre-entrenado (7)
  - c. Animales para el grupo observador de un pre-entrenado (6)
  - d. Animales para el grupo observador de un no pre-entrenado (5)
  - e. Animales para el grupo control plataforma (8)
  
- Doce para los estudios farmacológicos:
  - a. Animales para el grupo inyectado con solución salina (6)
  - b. Animales para el grupo inyectado con bupivacaína (6)
  
- Siete animales para los estudios electrofisiológicos.

Una vez adquiridos los animales se mantuvieron en ciclos luz-oscuridad 12/12 hrs (encendido de luces a las 7am), temperatura controlada (23°C), con acceso libre a comida y agua excepto cuando se indique, en la estación experimental del laboratorio del Laboratorio de aprendizaje, memoria y neuromodulación por al menos una semana. Durante este tiempo también se realizó la habituación al experimentador. Dicha habituación consistió en al menos dos sesiones de interacción libre (*handling*) con el experimentador por unos 20 minutos.

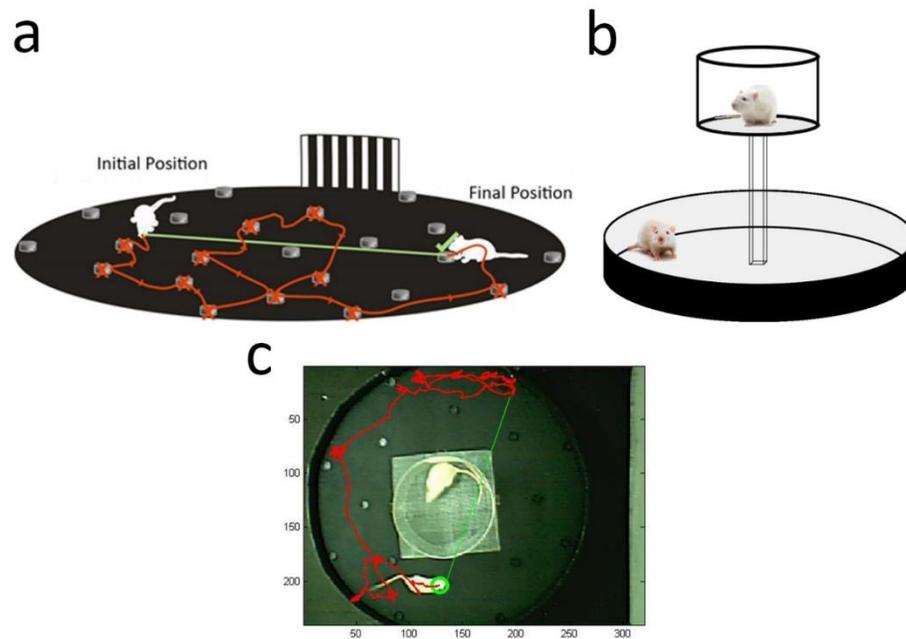
## **Tareas Conductuales**

a. *Oasis maze*: utilizamos una versión modificada del *oasis maze* (Clark y cols., 2005; Martínez y cols., 2016), que consiste en una arena circular (140 cm de diámetro) cerrada por paredes de 30 cm de alto, toda de color negro. En su interior se disponen 20 pocillos equidistantes (4 cm de diámetro, 2 cm de profundidad cada uno) en los que se esconde una gota de agua (0.2 ml). En la posición designada como norte ubicamos una clave visual proximal, sobre la pared de la arena, que se mantendrá constante para todos los grupos experimentales (figura 3a). La tarea consiste en 15 ensayos de un minuto de duración en el cual los animales deben encontrar un único pocillo recompensado. Para forzar al animal a utilizar su sistema de navegación interno, cambiamos aleatoriamente la posición de inicio entre cada ensayo.

Esperamos que una vez que los animales han identificado la ubicación del pocillo recompensado respecto al entorno, recorran trayectorias más cercanas a la trayectoria ideal (línea verde en figura 3a), y en menores tiempos.

La correcta resolución de esta tarea es dependiente de un protocolo de pre-entrenamiento previo, en el cual se habitúa a los animales tanto a la arena del *oasis maze*, a la presencia de pocillos y a la existencia de una recompensa dentro de dichos pocillos, pero no se les revela previamente la posición del pocillo recompensado ni el tiempo del que disponen para encontrar dicho pocillo. Los detalles del pre-entrenamiento se presentan en *Experimentos*.

b. *Observational maze*: Para evaluar la capacidad de aprendizaje observacional ubicamos una plataforma de acrílico transparente en el centro de la arena del *oasis maze*. En ella un animal puede observar el desempeño de un congénere en la tarea (figura 3b). La plataforma corresponde a un atril de acrílico de base cuadrada (30 cm de lado, 5 mm espesor), un eje vertical cuadrado de 50 cm de alto (5 cm lado, 3 mm espesor) y cuatro brazos en forma de 'X' centradas en el eje vertical, cada uno de 22.5 cm de largo y 5 cm de ancho (5 mm de espesor). Sobre los brazos se ubica una rejilla metálica con espacios de 5 mm y de 42 cm de lado. Sobre ésta, un cilindro



**Figura 3.** Paradigma experimental. (a). *Oasis maze*: en la tarea de orientación espacial el animal debe encontrar un pocillo recompensado de entre 20 totales, en 15 ensayos de hasta un minuto de duración. Además del porcentaje de aciertos (tasa de éxito) y el tiempo que demora en encontrar el pocillo (latencia), medimos la relación entre la trayectoria recorrida y la trayectoria óptima (razón de distancias; línea roja y verde, respectivamente) y el número de errores por ensayo (visitas a un pocillo no recompensado, cruces rojas). (b). *Observational Maze*: una plataforma de acrílico transparente fue ubicada al centro de una arena circular (140 cms diámetro). Dentro de esta plataforma se ubicó un animal que podía observar el desempeño de un congénere mientras resuelve la tarea de orientación espacial en la arena de abajo. (c). Fotografía ejemplo de una sesión de observación, indicando en rojo la trayectoria del demostrador.

de acrílico transparente de 35 cm de diámetro, abierto en el suelo y el techo (figura 3b). Esta plataforma permite disminuir el desplazamiento del animal observador.

## **Experimentos**

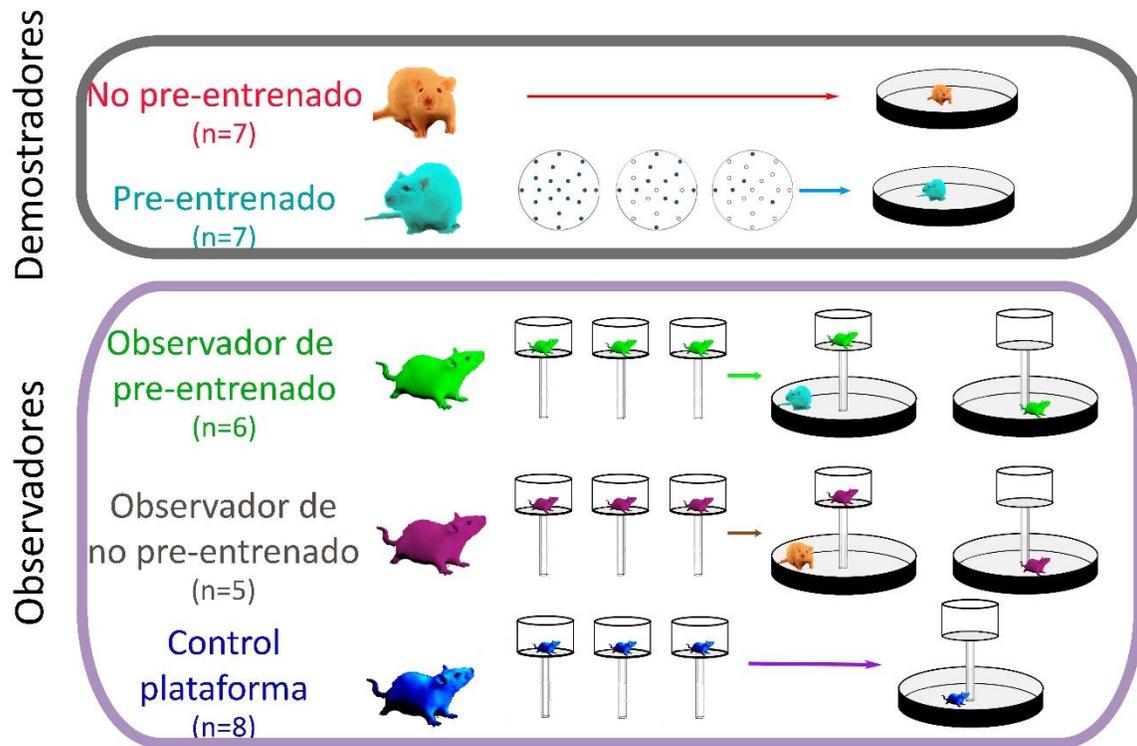
### **a. Conductuales**

El experimento conductual buscaba validar la hipótesis de que los animales naïve que observan a un congénere experto mientras este resuelve una tarea pueden luego resolver dicha tarea con mayor acierto que si no hubiesen observado o si observaron a un animal que no es experto.

Para esto, generamos dos grandes grupos de animales: demostradores y observadores (figura 4).

- i. animales demostradores: se dividió en dos subgrupos: en el primero, siete animales fueron privados de agua el día anterior a resolver 15 ensayos del *oasis maze*, sin mayor habituación (grupo no pre-entrenado, n=7). El segundo subgrupo consistió en siete animales que fueron sometidos a un régimen de pre-entrenamiento durante 3 días consecutivos previo a la resolución de la tarea (Clark y cols., 2005). Dicho régimen consistió en: el primer día todos los pocillos del *oasis maze* contenían una gota de agua; el segundo día la mitad de los pocillos tenían recompensa y el tercer día solo un cuarto de ellos tuvo agua. En los tres días se permitió al animal explorar por entre 15-20 minutos la arena forrajeando por la gota de agua. Después de cada sesión de pre entrenamiento cada animal tuvo una hora de acceso a agua (grupo pre-entrenado, n=7). Seis de siete demostradores pre-entrenados y cinco de siete demostradores no pre-entrenados resolvieron el *oasis maze* siendo observados desde la plataforma de observación. Aun cuando estos animales resolvieron 30 ensayos del *oasis maze*, sólo los primeros 15 fueron analizados posteriormente.
- ii. animales observadores: en todos los casos los animales fueron habituados durante 3 días a la plataforma de observación con un régimen de privación de agua de 23h/día. Un primer subgrupo de seis animales observó 30 ensayos de un animal pre-entrenado resolviendo el *oasis maze* (grupo observador de experto, n=6). Un segundo subgrupo de 5 animales observó a un animal no pre-entrenado (grupo observador de no pre-entrenado, n=5), mientras que un último grupo de ocho animales resolvió directamente la tarea, sin etapa de observación (grupo control plataforma, n=8).

Así, comparamos el rendimiento conductual en la resolución de 15 ensayos del *oasis maze* entre los distintos grupos experimentales, utilizando las variables descritas más adelante.



**Figura 4.** Experimento conductual. Los animales fueron separados en dos grandes grupos. Por una parte, los demostradores (panel superior) y por otra los observadores (panel inferior). Los demostradores se subdividieron en un grupo de animales que no fue pre-entrenado antes de resolver el *oasis maze* (n=7, arriba, rojo) y otro que si fue pre-entrenado (n= 7, abajo, azul). Los observadores, en tanto, se subdividieron en tres grupos. El primero observó a animales pre-entrenados (n= 6, arriba, verde), el segundo grupo observó a no pre-entrenados (n=5, centro, violeta) y el tercero no observó congéneres (n=8, abajo, azul oscuro). 6 de 7 demostradores pre-entrenados y 5 de 7 no pre-entrenados resolvieron el *oasis maze* ante la presencia de observadores en la plataforma.

*b. Farmacológicos*

El experimento farmacológico buscaba validar la hipótesis de que la actividad hipocampal es necesaria para el aprendizaje observacional. Para ello inyectamos un anestésico local que inactiva reversiblemente la actividad neuronal (bupivacaína, ver detalles en la sección *Fármacos e inyección*) 5 minutos justo antes de comenzar la etapa de observación. Todas las inyecciones se hicieron con el animal despierto. En todos los casos, los demostradores fueron animales pre-entrenados. Separamos los animales implantados con cánulas en tres grupos experimentales (figura 5):

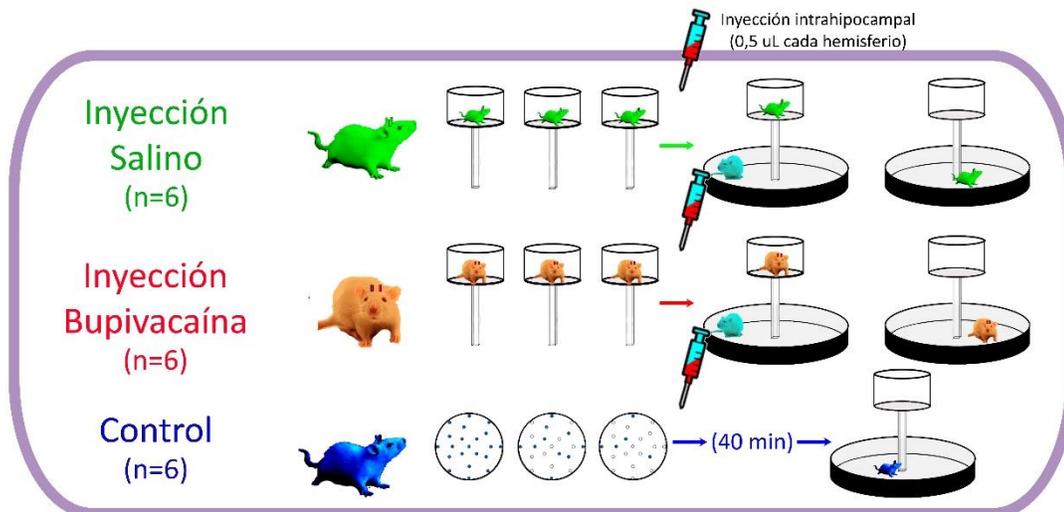
- i. Inyección salina (n=6): los animales fueron habituados por tres días a la plataforma de observación (manteniendo un régimen de privación de agua de 23 h/día) y antes de comenzar la sesión de observación se les inyectó un 0.5  $\mu$ l de solución salina (NaCl 0.9%, Abbott Laboratories, IL, EEUU) en ambos hipocampos. Inmediatamente después de la inyección, los animales observaron 30 ensayos de un congénere pre-entrenado en el *oasis maze* y luego resolvieron 15 ensayos del mismo, manteniendo la ubicación del pocillo recompensado.
- ii. Inyección bupivacaína (n=6): al igual que el grupo anterior, estos animales fueron habituados a la plataforma y cinco minutos antes de comenzar la tarea se les administró 0.5  $\mu$ L de bupivacaína 0.75% v/v bilateralmente. Inmediatamente tras la inyección, comenzaron la tarea de observación y posterior resolución del *oasis maze*.
- iii. Control (n=6): animales provenientes de cualquiera de los grupos anteriores (con el propósito de minimizar el uso de animales de experimentación sometidos a cirugías invasivas) fueron pre-entrenados para resolver el *oasis maze*, tal como el grupo pre-entrenado del experimento anterior. Cuarenta minutos antes de resolver la tarea fueron inyectados con 0.5  $\mu$ L de bupivacaína 0,75%, y luego evaluados en el *oasis maze* (sin etapa de observación). Los detalles detrás de la racional de este control se presentan en *Fármacos e inyección*.

Se utilizaron las variables conductuales descritas abajo para resolver la hipótesis.

### c. *Electrofisiológicos*

El experimento electrofisiológico buscaba dilucidar si la actividad hipocampal del animal observador tiene una relación con las posiciones del animal demostrador. Para ello animales implantados crónicamente con *hyperdirves*, cuyos tétrodo alcanzaron la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo, fueron registrados durante la observación de un congénere pre-entrenado y posteriormente durante la navegación resolviendo el *oasis maze*.

## OBSERVADORES



**Figura 5.** Experimento farmacológico. Separamos los animales previamente canulados en tres grupos: el primero (salino n=6, arriba, verde) y segundo (bupivacaína n=6, centro, rojo) fueron habituados a la plataforma de observación por tres días consecutivos, mientras que el tercer grupo (control n=6, abajo, azul oscuro) fue pre-entrenado en el *oasis maze* durante igual tiempo. Inyectamos el primer grupo con solución salina (NaCl 0.9%), y el segundo y tercero con bupivacaína 0.75% v/v. Tras la inyección, los dos primeros grupos comenzaron la fase de observación de un demostrador pre-entrenado, mientras que el tercer grupo esperó 40 minutos antes de resolver el *oasis maze*. En todos los casos la inyección fue de 0.5  $\mu$ L por hemisferio.

### ***Variables conductuales evaluadas***

Evaluamos el desempeño conductual utilizando las siguientes variables:

- Tasa de éxito:** corresponde al porcentaje de ensayos correctos sobre los ensayos totales. Nos brinda una idea general de la capacidad del animal de encontrar el pocillo recompensado en menos de un minuto.
- Razón de distancias:** es la razón entre la distancia recorrida por el animal y la distancia óptima desde el punto de salida del animal hasta el pocillo recompensado. Corresponde a un indicador de la eficiencia de la ruta seguida por el animal. Su disminución a lo largo de los 15 ensayos es un indicador de aprendizaje, ya que el animal recorrió trayectorias progresivamente más eficientes.

- c. *Latencia*: corresponde al tiempo en segundos empleado por el animal para encontrar la recompensa, en cada ensayo. Su disminución a lo largo de la tarea indica que el animal demora progresivamente menos en encontrar el pocillo recompensado y por tanto es un indicador de aprendizaje.
- d. *Número de errores*: corresponde a la cantidad de veces que un animal explora el interior de un pocillo no recompensado, en cada ensayo. Es un indicador de la conducta exploratoria de la rata y su disminución progresiva sugiere que el animal es capaz de discriminar entre el pocillo recompensado, del resto de pocillos no recompensados. Un bajo número de errores puede obtenerse también si es que los animales sistemáticamente no visitan ningún pocillo, lo que disminuye la probabilidad de encontrar la recompensa. O a la inversa, podemos encontrar un mayor número de errores si el animal recuerda la porción del espacio donde se encuentra el pocillo recompensado, pero no recuerda exactamente cuál es. Por esta razón esta variable fue analizada con mayor cautela siendo las 3 primeras variables indicadores más confiables del proceso de aprendizaje.

El aprendizaje se hizo evidente por una disminución progresiva de la razón de distancias y latencia a lo largo de la tarea.

Las variables continuas (razón de distancias, latencia y número de errores) fueron normalizadas según:

$$\langle V \rangle = \frac{Vi - \min(V)}{\max(V) - \min(V)}$$

Donde  $V_i$  = Variable continua en el ensayo *iésimo*.

De este modo, pudimos comparar simultáneamente la dinámica de las tres variables a lo largo de la tarea. La curva resultante de esta transformación se denominó curva de rendimiento.

## ***Cirugías e implantes***

Los procedimientos quirúrgicos fueron los mismos para todos los animales, tanto aquellos implantados con cánulas para inyección intrahipocampal de bupivacaína/salino o con un micromanipulador que permite el movimiento vertical de tetrodos de registro electrofisiológico (*hyperdrive*) al interior del cerebro del animal despierto.

Ratas de un peso no menor a 310 grs fueron anestesiadas con isoflurano al 2.5% en una caja de inducción, con un flujo de 1Lt de O<sub>2</sub>/minuto. Luego de la inducción el animal fue trasladado al aparato estereotáxico y se mantuvo anestesiado durante toda la cirugía con la ayuda de una naricera de gases para rata con isoflurano 1.5 %. Protegimos los ojos de los animales con ungüento oftálmico para evitar la resequedad de las corneas y potencial daño ocular por la emanación de O<sub>2</sub> desde la naricera, y mantuvimos la temperatura usando una manta térmica para evitar enfriamiento.

Practicamos una craneotomía y removimos la meninge sobre la región CA1 del hipocampo dorsal. Los implantes se fijaron al cráneo del animal mediante tornillos de anclaje de acero inoxidable. La craneotomía fue recubierta con una capa de agar y el resto del cráneo, junto a los tornillos de anclaje, fue cubierto con cemento dental. Posterior a la cirugía administramos ketoprofeno (0,2 mg/kg i.p.; Naxpet 1%, DragPharma, Santiago, Chile) y enrofloxacino (19 mg/kg i.p.; Enromic 5%, CentroVet, Santiago, Chile) como medidas analgésicas y antibióticas, y mantuvimos a los animales en una caja de recuperación con temperatura regulada. Las medidas analgésicas y antibióticas se mantuvieron durante 3 días.

a. *Cánulas para inyección intrahipocampal*: implantamos dos cánulas guías (23 Gauge, Plastic One) dirigidas a cada uno de los hipocampos dorsales. Las coordenadas estereotáxicas usadas fueron AP: -3.3 mm, ML: 2.5 mm, DV: 1.2mm, y un [ángulo de 20° (Paixinos y Watson, 1998). La cánula guía penetró sólo en la región cortical sobre el hipocampo de modo de minimizar el daño sobre las fibras comisurales que cruzan por el cuerpo calloso. Luego la punta de la cánula de inyección (33 Gauge, Plastic One) penetra 1 mm más para alcanzar la capa

piramidal de CA1. Esto permite minimizar el daño crónico sobre el hipocampo (figura 9a).

- b. *Micromanipulador para electrodos (hyperdrive)*: Implantamos crónicamente un *hyperdrive* en las coordenadas: AP: -.3mm, ML: -1.8 mm (Paixinos y Watson, 1998). Dicho manipulador nos permite manejar hasta siete tetrodos de movimiento libre en profundidad (uno de referencia y seis para registro), e incluye dos electrodos para electromiografía (EMG) (figura 6a y 6b). Cada tetrodo está compuesto por cuatro alambres de níquel-cromo de 18  $\mu\text{m}$  (AM-Systems) trenzados entre sí, en cuya punta se ha ajustado su impedancia a un valor entre 0,5 a 1  $\text{M}\Omega$ , mediante deposición electrolítica de oro. El tetrodo designado como referencia fue posicionado en el cuerpo calloso, mientras que los otros 6 electrodos sirvieron para registro de actividad neuronal. Utilizamos uno de los tornillos de fijación (el más posterior) como tierra del circuito. Una vez terminada la cirugía y antes que el animal volviese al estado de consciencia los tetrodos fueron llevados a una posición de 320  $\mu\text{m}$  de profundidad para asegurar que hayan penetrado en el tejido cerebral. Cinco días post-operación los tetrodos se comenzaron a bajar a una tasa no mayor a 320  $\mu\text{m}/\text{día}$ , hasta alcanzar la capa piramidal de CA1.

### ***Fármacos e inyección***

Administramos bupivacaína, un bloqueador reversible de canales de sodio voltaje dependientes, lo que impide la generación del potencial de acción. La bupivacaína es un anestésico local de la familia de las aminoamidas, similar a la lidocaína, pero con una vida media un poco más larga (~40 minutos) y se ha documentado su uso en inyecciones intracerebrales, mostrando una inactivación reversible por 30-50 minutos (Catterall y Mackie, 2012, Gabriele y Packard, 2006). Este tiempo coincide con nuestro periodo de observación, lo que es particularmente sensible en nuestro experimento, ya que la posterior evaluación conductual del aprendizaje observacional en el oasis maze, depende críticamente de la indemnidad de la función hipocampal (Riedel y cols., 1999). Para controlar que el efecto de la droga después de los 40 minutos de vida

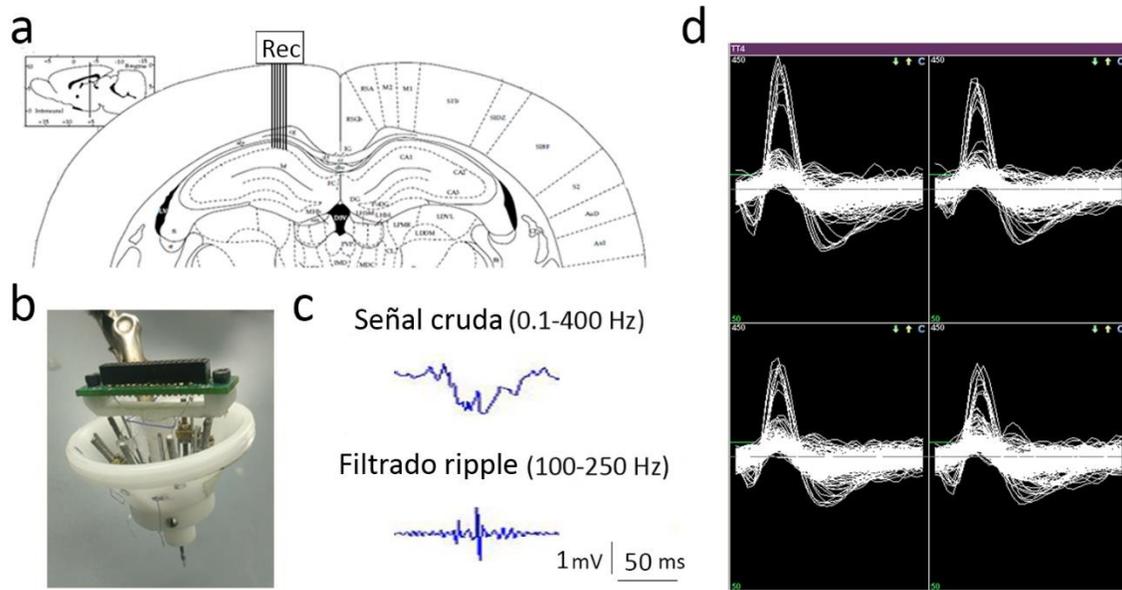
media (es decir, después del periodo de observación), no afecta el desempeño de los animales en la tarea de navegación espacial, incluimos un grupo control pre-entrenado que fue inyectado con bupivacaína y testeado 40 minutos después en la tarea.

Los animales implantados con cánulas fueron inyectados bilateralmente con 0,5  $\mu$ l de bupivacaína 0,75% v/v (Abbott Laboratories, IL, EEUU) o 0,5  $\mu$ l de solución salina (Abbott Laboratories, IL, EEUU), cinco minutos antes de comenzar la sesión de observación sin emplear anestesia, a un flujo de 0.5 $\mu$ L/30s en cada inyección. Para ello, conectamos una jeringa de precisión (Hamilton Co., NV, EEUU) con una cánula de inyección, cuya longitud fue ajustada para alcanzar la capa piramidal de CA1 (2,2 mm). Una vez inyectado el volumen, esperamos un minuto adicional para permitir la difusión de las soluciones.

### ***Adquisición y análisis de datos electrofisiológicos***

- a. *Adquisición de datos*: Utilizamos un sistema analógico Cheetah de Neuralynx® de 32 canales para los registros (Neuralynx, MT, EEUU). La señal de espigas fue adquirida a una tasa de muestreo de 32KHz y filtrada en una pasa banda de 600-6000 Hz, mientras que la señal continua de LFP fue adquirida y digitalizada a una tasa de muestreo de 2 KHz y filtrada en una pasa banda de 01-475 Hz (figura 6c y d). Establecimos un umbral mínimo de 35  $\mu$ A para todos los canales de espigas, obteniendo usualmente señales >200  $\mu$ A de amplitud (figura 6d).
- b. *Separación de unidades únicas (spike sorting)*: para obtener células individuales la actividad de espigas fue primero agrupada de manera automática en *clusters* utilizando el software Klustakwik (<http://klustakwik.sourceforge.net/>). Posteriormente revisamos manualmente estos *clusters* con el software MClust v3.4 (<http://cran.r-project.org/web/packages/mclust/index.html>, D. Redish) y Waveform (Cohen S.).

Descartamos todos aquellos *clusters* en que más del 1% de la población de espigas presentase intervalos inter-espiga menores a 2 ms (McNaughton y cols., 1983)



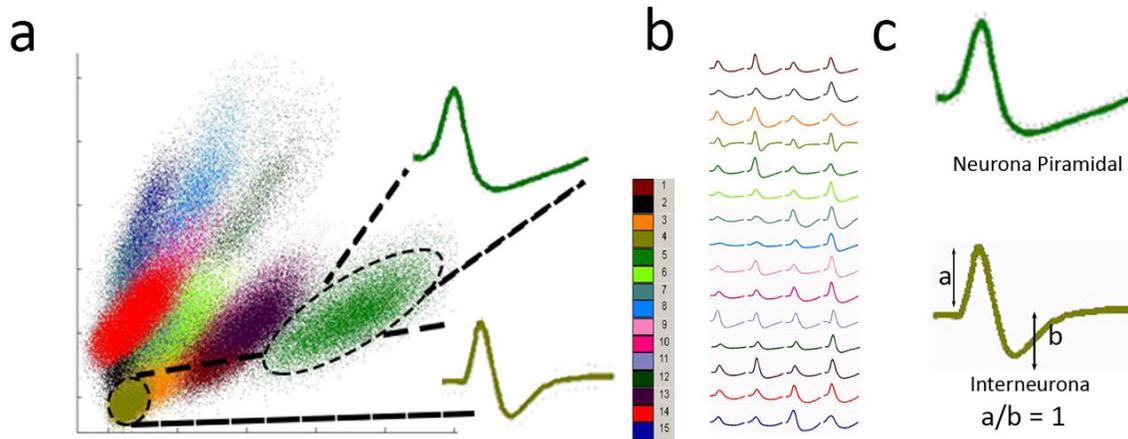
**Figura 6.** Adquisición de datos electrofisiológicos. (a). Esquema de la ubicación de los tetrodos hasta alcanzar el hipocampo. (b) Fotografía del *hypedrive* utilizado para los registros con tetrodos. (c). Trazos de señales de LFP e identificación de *ripples* características del hipocampo. (d). Ejemplos de señales de espigas registradas mientras el animal realiza la tarea. En este caso, se pueden observar señales de al menos dos putativas neuronas.

(figura7). Todos los análisis electrofisiológicos se llevaron a cabo mediante rutinas de Matlab R2010a.

- c. *Determinación del contenido de información*: agrupamos todas las trayectorias de cada ensayo del *oasis maze* y dividimos el cuadro de video en 48x48 bins (4,2x3,2 cm cada bin), lo que nos permitió calcular el tiempo de permanencia del animal en cada bin y con ello la probabilidad de ocupancia de dicho bin ( $p_i$ ). Luego calculamos la frecuencia de descarga de cada neurona registrada en cada bin ( $R_i$ ) y la frecuencia media de descarga de la neurona durante toda la tarea ( $R$ ). Finalmente calculamos el contenido de información espacial [bits/espiga] utilizando la ecuación derivada del índice de información (Robbe y cols., 2009, Skaggs y cols, 1993) (figura 8a):

$$I(R|X) \approx \sum_i p_i * \left(\frac{R_i}{R}\right) * \log_2 \left(\frac{R_i}{R}\right)$$

Donde  $p_i$  = probabilidad de ocupancia del bin  $i$ ,  
 $R_i$  = frecuencia de descarga en el bin  $i$ ,  
 $R$  = frecuencia de descarga promedio de la neurona



**Figura 7.** Separación de neuronas únicas. (a). Las señales registradas fueron analizadas mediante *clustering* semiautomático, en el que la proyección de las energías comparadas entre los distintos canales del tetrodo permite separar las espigas de distintas neuronas. (b). Las espigas de los cuatro canales del tetrodo para todas las neuronas identificadas de la proyección en (a). Nótese que la amplitud de las espigas es distinta en todos los canales, pero la forma de cada potencial de acción se mantiene. (c). Asignación de identidad celular a las espigas indicadas en (a). Mientras la espiga superior muestra una lenta hiperpolarización y una relación pico-valle distinta de 1, la espiga inferior muestra una rápida hiperpolarización y una relación pico-valle cercana a 1.

d. *Cálculo del contenido de información obtenido por azar (bootstrapping):* para determinar si el contenido de información espacial de una neurona fue mayor a lo que se puede esperar por el simple azar, aleatorizamos la posición de las espigas de cada neurona y recalculamos el índice de información, manteniendo el mapa de permanencia del animal demostrador (figura 8b).

Para obtener una media fehaciente del índice de información generado por simple azar ( $IPS_{aleatorizado}$ ) calculamos previamente la cantidad de aleatorizaciones necesarias para obtener una media bajo un error de un 1%. Calculamos el  $IPS_{aleatorizado}$  generado al iterar 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 y 5000 veces y evaluamos la dependencia del error estándar sobre el número de repeticiones (figura 8c).

Ajustamos una curva potencial del tipo  $f(x) = ax^{(b)}$  para modelar esta relación, con lo que obtuvimos la siguiente ecuación

$$Error = 0.21 * n^{-0.51}$$

Para simplificar la aproximación, consideramos el exponente de  $n^{-0.5}$ , con lo que se puede re-expresar la ecuación en su forma lineal como:

$$Error = 0.21 * \left(\frac{1}{\sqrt{n}}\right)$$

Calculamos el número de iteraciones ( $n$ ) necesarias para estimar la media del  $IPS_{aleatorizado}$  con un 1% de error, el número de repeticiones necesario es:

$$n = 463$$

Para comprobar este cálculo, en vez de usar la aproximación potencial a los datos originales, aproximamos la relación entre el error y el factor  $(1/\sqrt{n})$  utilizando directamente una regresión lineal, de modo que:

$$Error = 0.21 * \left[\frac{1}{\sqrt{n}}\right] + 4 * 10^{-4}$$

Recalculando el número de iteraciones para alcanzar el 1% de error, con este método:

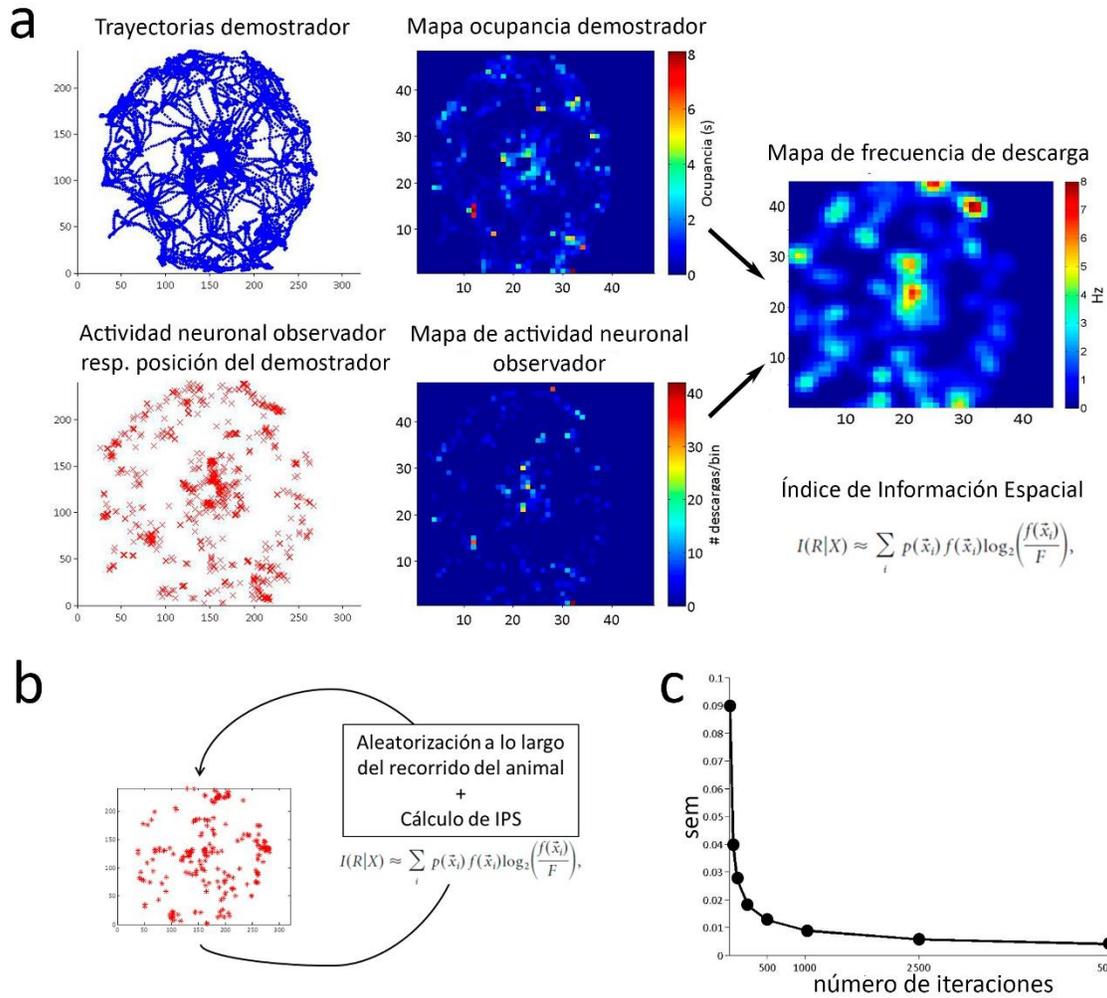
$$n = 463$$

Donde  $n$  = número de repeticiones necesarias para alcanzar el 1% de error estándar de la media. Decidimos utilizar 1000 iteraciones para el cálculo de  $IPS_{aleatorizado}$ , lo que entrega un error estándar de 0.7% a las medias obtenidas para cada neurona. Además, procuramos mantener la distribución del tren de descargas al momento de calcular las aleatorizaciones. Para ello, modelamos la distribución de cada tren de espigas ajustándola a una distribución de Poisson y obtuvimos el mejor estimador (*máximum likelihood estimator*, MLE) de la distribución ( $\lambda$ ). Utilizando herramientas de MatLab® generamos una distribución con una media =  $\lambda$  obtenido del paso anterior. Corroboramos previamente que los trenes de espiga de cada neurona podían modelarse con una distribución de Poisson, utilizando test de Chi-cuadrado.

- e. *Mapas de frecuencia*: a partir de la frecuencia por bin ( $R_i$ ) calculada antes, generamos mapas de frecuencia utilizando una ventana de Hann de 0.5 en cada bin y normalizamos la frecuencia según:

$$\langle R_i \rangle = \frac{R_i - \min(R_i)}{\max(R_i) - \min(R_i)}$$

De modo de obtener valores en el rango [0:1].



**Figura 8.** Procedimiento para calcular contenido de información espacial real y aleatorizado. (a). Ordenamos las descargas de cada neurona del observador (puntos rojos, izquierda abajo) según la posición que ocupaba el animal demostrador en el oasis maze en el momento de la descarga (trazos azules, izquierda arriba). Con la trayectoria del demostrador calculamos el mapa de permanencia u ocupancia (centro, arriba) y el mapa de número de descargas por bin (centro, abajo). Estos dos mapas se combinan finalmente para dar el mapa de frecuencia de descarga por bin (derecha). Con la información de este mapa calculamos el índice de información espacial (IPS) de cada neurona con la ecuación indicada. (b). Para calcular el IPS obtenido por azar, aleatorizamos el tiempo de los intervalos inter espiga a lo largo de todo el recorrido del animal, preservando la distribución de éstos. Así, seleccionamos las neuronas que mostraron un índice de información mayor a dos desviaciones estándar sobre la media del IPS aleatorizado. (c). Relación entre el número de iteraciones con el que se calculó el  $IPS_{\text{aleatorizado}}$  y el error estándar de la media.

f. *Definición de place field*: identificamos un *place field* como una región dentro del mapa de frecuencias en el que al menos 5 píxeles contiguos (es decir, entre 15-20 cms del arena del *oasis maze*) presentasen actividad mayor a 0 Hz, y que en el centro de dicha región se alcanza la máxima frecuencia de todos los píxeles que definen el *place field* (Fenton y cols., 2008).

g. *Cálculo del índice de correlación espacial*: para evaluar la similitud de los mapas de frecuencia en neuronas seleccionadas simultáneamente como *observational place-cells* y *place cells*, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson comparando bin a bin la frecuencia de descarga de los mapas de frecuencia vectorizados. Descartamos los bins que en ambas condiciones presentan una frecuencia de descarga = 0. Resultados cercanos a 1 indican una mayor similitud entre los mapas de frecuencia, mientras que valores cercanos a 0 indican que los mapas tienen baja similitud (Leutgeb y cols 2005).

Para estimar el valor de la correlación entre *place fields* completamente independientes, calculamos la distribución de índices de correlación entre el mapa generado durante la observación de una neurona determinada y el mapa generado durante la navegación de todas las otras neuronas analizadas. Situamos un umbral igual a dos desviaciones estándar sobre la media de esta correlación aleatorizada y lo comparamos con el valor de la correlación entre los dos mapas de la misma neurona (Fyhn y cols., 2007, Geva-Sagiv y cols., 2016).

h. *Cálculo de la dispersión del place field (sparsity)*: para evaluar la dispersión del *place field* sobre el espacio total recorrido calculamos la dispersión o *sparsity* del *place field* de las neuronas seleccionadas simultáneamente como *observational place-cells* y *place cells*, basándonos en la ecuación propuesta por Jung y cols., 1994:

$$\langle sparsity \rangle = \frac{(\sum p_i * r_i)^2}{(\sum p_i * r_i^2)}$$

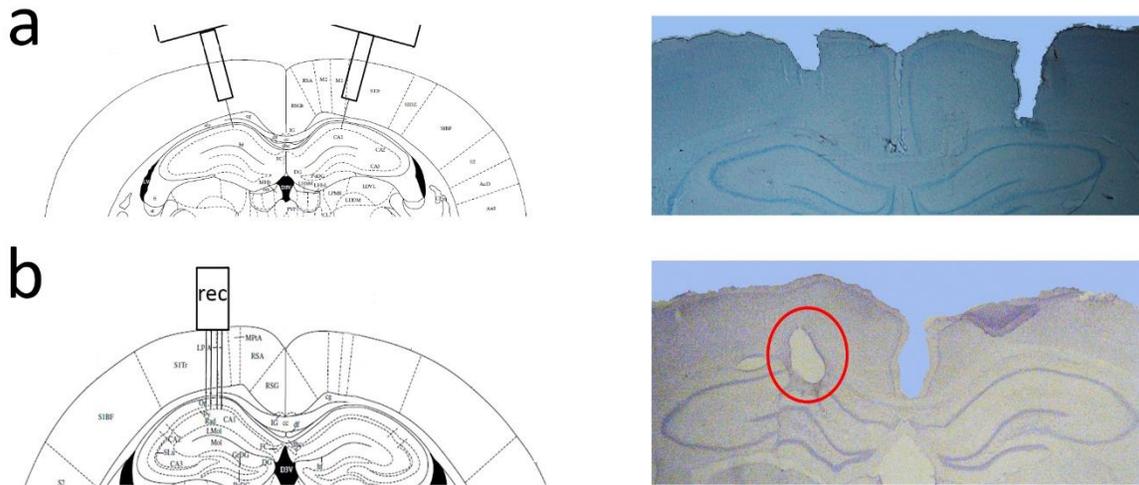
i. *Cálculo de rate remapping*: el remapeo de la tasa de descarga (*rate remapping*) corresponde a la propiedad de las *place cells* de variar la frecuencia media de los

potenciales de acción en un *place field* determinado, como respuesta a cambios sutiles del ambiente (Leutgeb y cols., 2005; Fyhn y cols., 2007). Calculamos el *rate remapping* utilizando el *overlap score* (índice de solapamiento), que en nuestro caso corresponde a la relación entre la frecuencia de descarga durante la observación vs la navegación, calculado como el cociente entre la sesión con el valor más bajo, sobre la sesión con el mayor valor (Fyhn y cols., 2007). Mediante este cálculo, frecuencias de descarga similares entre los dos episodios resultan en *overlap scores* cercanos a 1, mientras que la diferencia entre las sesiones aumenta asintóticamente hacia cero.

- j. *Determinación del poder espectral en rango theta*: para cada sesión experimental (10 sesiones) seleccionamos el canal de LFP con mayor amplitud de señal en el rango theta (4-12 Hz) en los episodios de navegación y lo usamos para los siguientes análisis. Estimamos el poder espectral en el rango 4-20 Hz mediante análisis de *multitaper* para los periodos de descanso previo a la tarea (10'), observación y navegación. Excluimos los periodos inter-ensayo del análisis. Normalizamos el valor del poder espectral obtenido del mismo modo lo hicimos para los mapas de frecuencia.

### ***Perfusión e Histología***

Todos los animales intervenidos quirúrgicamente fueron eutanizados al final del experimento mediante perfusión transcardial. Para ello anestesiamos profundamente a los animales con isoflurano 2-2,5% y perfundimos a través del ventrículo izquierdo con ~ 400 mL de solución salina (NaCl 0.9%), seguido de 500 mL de PFA 4% en 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4). Tras ello, recuperamos los cerebros y los sometimos a un proceso de postfijación en PFA 4% por 2 horas a 4°C. Criopreservamos el tejido con solución de sacarosa al 30% en buffer fosfato salino (PBS + 0,02% azida de sodio) y no antes de 2 días o que los cerebros hayan caído al fondo del vial realizamos cortes coronales de 50µm en micrótopo de congelación (Thermo Scientific, Darmstadt, Alemania).



**Figura 9.** Posición y proyección de cánulas para inyección intrahipocámpal (a) y de *hyperdrive* para registro electrofisiológico (b). A la derecha, figuras ilustrativas teñidas con el método de Nissl.

Deshidratamos los cortes a temperatura ambiente y luego realizamos tinción de Nissl. Montamos usando Entellan® (Thermo Scientific, Darmstadt, Alemania) y evaluamos la posición alcanzada tanto por las cánulas como los tetrodos, utilizando un microscopio de luz transmitida Nikon SMZ1500 (Kawasaki, Japón).

### **Análisis estadístico**

Realizamos los análisis estadísticos con el software SigmaPlot 11.0, no obstante, utilizamos el software GraphPad Prism 6.0 1 para generar los gráficos. Todos los resultados poblacionales se expresan como  $\text{media} \pm \text{error estándar de la media}$ . En todos los casos la decisión del test estadístico usado se determinó según la normalidad de los datos evaluada con test de Shapiro-Wilk. Así, utilizamos test paramétricos cada vez que los datos presentaban una distribución normal, y test no paramétricos cuando no presentaban dicha distribución. En todos los casos la significancia estadística se situó en  $p < 0.05$ .

a. *Experimentos conductuales y farmacológicos:*

Para las comparaciones entre grupos de los promedios de las distintas variables conductuales usamos ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak o test de Kruskal-Wallis seguido de test post-hoc de Dunn.

Evaluamos la correlación entre la razón de distancias y la latencia con el número de ensayo usando el índice de correlación de Pearson o el coeficiente de correlación de rangos de Spearman.

Ajustamos las pendientes de progresión a una recta usando el método de los mínimos cuadrados.

En el caso de la comparación entre grupos de distintos experimentos utilizamos ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm Sidak para comparar la tasa de éxito y prueba *t* de *Student* para comparar las distancias totales recorridas.

b. *Experimentos electrofisiológicos:*

Para estimar si la distribución de trenes de espiga se ajustó a una distribución de Poisson usamos el test de ajuste de distribución de Chi-cuadrado incorporado en el paquete de análisis estadístico de MatLab.

Comparamos la frecuencia máxima, media, índice de información y dispersión del *place field* mediante test de rangos de Mann-Whitney.

Para la correlación de mapas espaciales utilizamos el índice de correlación de Pearson.

Para la comparación de frecuencias máximas entre los episodios de observación y navegación usamos test de rangos de Wilcoxon.

Comparamos el poder espectral en el rango theta durante descanso, observación y navegación mediante ANOVA de dos vías seguido de test post-hoc de Sidak.

## RESULTADOS

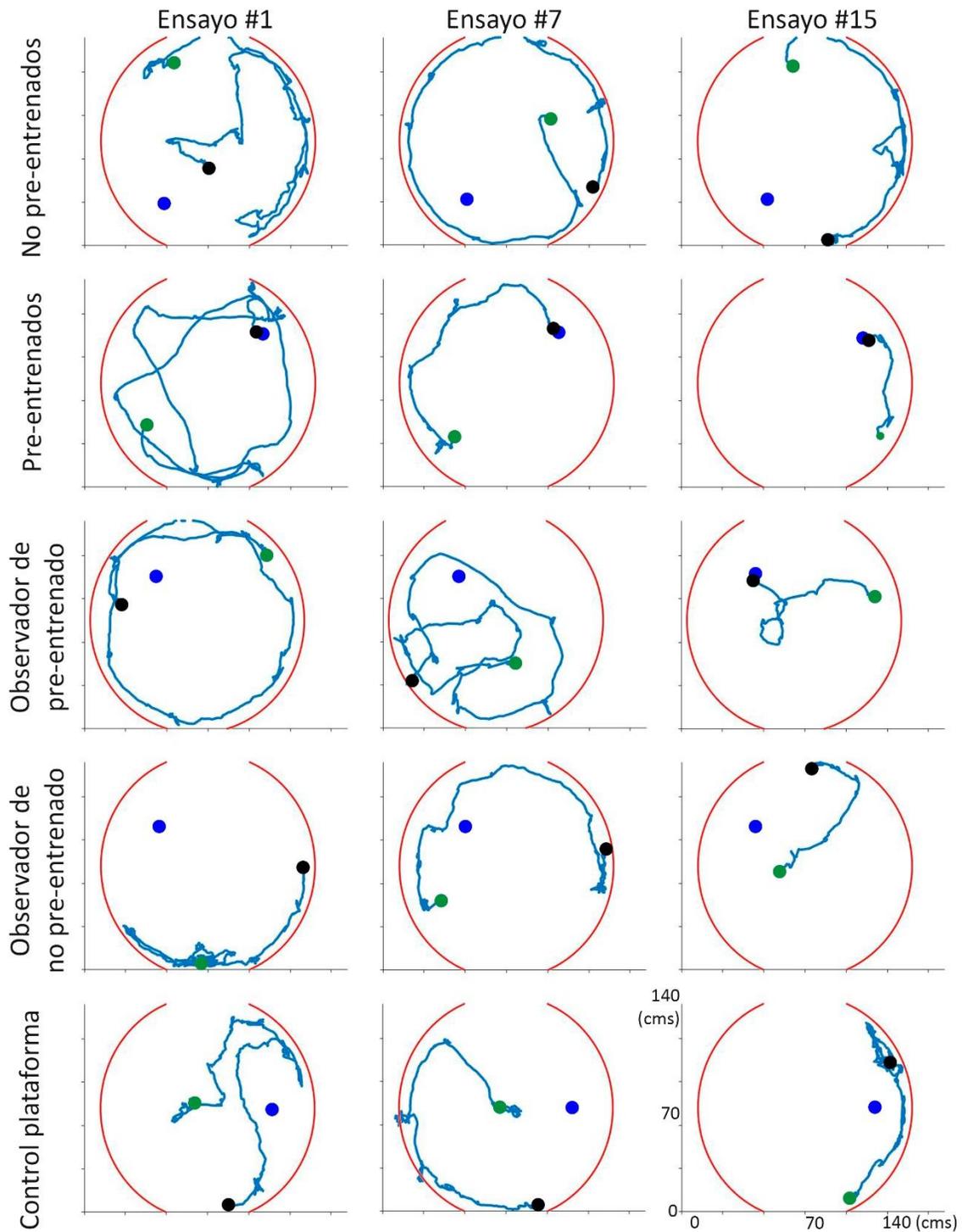
### Verificación conductual del aprendizaje observacional en ratas

Para evaluar la capacidad de aprender por observación de congéneres en ratas, comparamos el desempeño de los distintos grupos experimentales en la tarea del *oasis maze* (figura 4), usando los indicadores detallados en *Métodos*. Cualitativamente es interesante observar que, si bien todos los grupos experimentales realizan progresivamente trayectorias más cortas a lo largo de la tarea, los grupos no pre-entrenados, observador de no pre-entrenado y control plataforma, se mantienen preferentemente en la periferia del arena, mientras que los animales pre-entrenados y observador de pre-entrenado realizan cruces por el centro de la misma (ver figura 10).

#### *Tasa de éxito*

La tasa de éxito, entendida como un indicador global del desempeño de cada animal durante toda la tarea, mostró que los animales no pre-entrenados ( $n=7$ ) resuelven un  $12.4 \pm 7.2$  % de los ensayos de la tarea (media  $\pm$  SEM), mientras que aquellos que si fueron pre-entrenados ( $n=7$ ) consiguen un  $88.6 \pm 3.8$  % de rendimiento. Los animales observadores de un pre-entrenado ( $n=6$ ), en tanto, logran un  $53.3 \pm 9.3$  % de rendimiento, mientras que los observadores de un no pre-entrenado ( $n=5$ ) y el grupo control plataforma (animales que no observan un demostrador,  $n=8$ ), resuelven un  $8 \pm 8$  y un  $23.3 \pm 9$  % de los ensayos (figura 11a).

La comparación estadística muestra diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.001$ ,  $F(4,28)=0.96$ , ANOVA de una vía), particularmente entre los animales pre-entrenados y los observadores de un pre-entrenado, que se diferenciaron de todo el resto de grupos ( $p < 0.05$  test post-hoc de Holm-Sidak, detalles de la comparación entre grupos la tabla A1). No encontramos diferencias entre los grupos no pre-entrenados, observador de no pre-entrenado ni control plataforma.



**Figura 10.** Trayectorias representativas de los distintos grupos durante los ensayos 1, 7 y 15. Los círculos verdes indican el lugar de salida en dicho ensayo, los círculos negros indican el lugar de llegada al final del ensayo, y el círculo azul representa el lugar del pocillo recompensado (invariable en los tres ensayos).

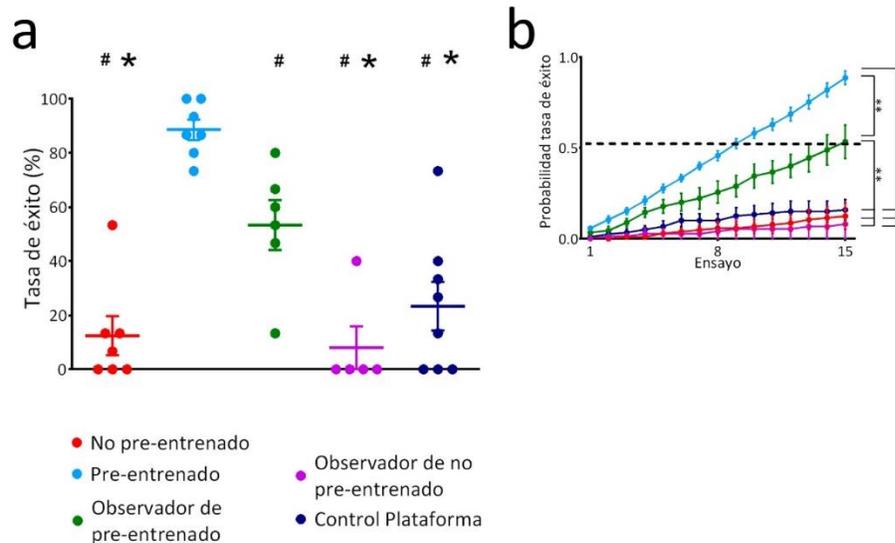
Además, evaluamos la progresión de la tasa de éxito a lo largo de la tarea calculando la probabilidad de éxito acumulada para cada ensayo. En términos prácticos, asignamos un valor = 1 a cada ensayo en que el animal encontró el pocillo recompensado y un valor = 0 cuando el animal no encontró el pocillo. Calculamos la probabilidad de éxito para los 15 ensayos totales, construimos curvas de probabilidad de éxito acumulada y comparamos las pendientes obtenidas con los datos de cada grupo experimental (figura 11b).

Los animales del grupo pre-entrenado alcanzaron el 50% de probabilidad de encontrar el pocillo recompensado antes del 9° ensayo, mientras que quienes los observaron (observadores de un pre-entrenado) alcanzaron la misma probabilidad hacia el final de la tarea. Los animales de los grupos no pre-entrenado, observador de un no pre-entrenado y control plataforma requerirían de 20, 99 y 46 ensayos respectivamente.

Al comparar las curvas de probabilidad acumulada, encontramos que los animales pre-entrenados y los observadores de pre-entrenados se diferenciaban de todos los demás grupos (incluso entre ellos), mientras que los animales no pre-entrenados, observadores de no pre-entrenado y control plataforma no se diferenciaron entre sí (Figura 11b, tabla A2 con el detalle estadístico). Esto indica que sólo los animales pre-entrenados en el *oasis maze*, y los observadores de un pre-entrenado muestran una mejora progresiva de la probabilidad de encontrar el pocillo recompensado.

### *Razón de distancias*

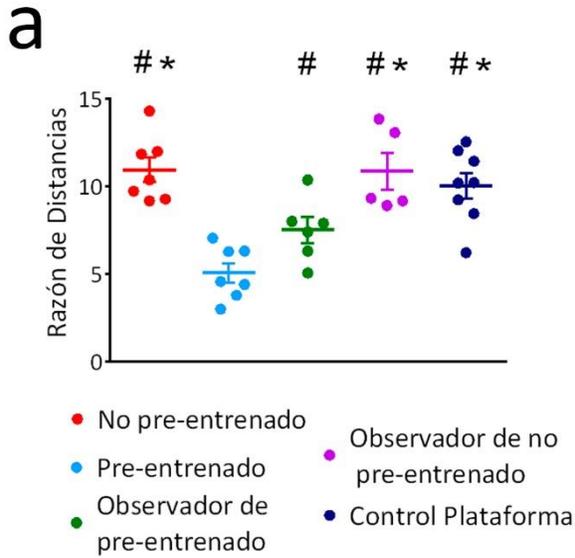
El resultado de la razón de distancias promedio (figura 12a) muestra que el grupo de animales no pre-entrenados, los observadores de no pre-entrenado y el grupo control plataforma recorren en promedio diez o más veces el recorrido ideal durante la tarea ( $10.9 \pm 0.4$ ,  $10.8 \pm 0.5$ ,  $10 \pm 0.5$ ,  $\text{media} \pm \text{sem}$  respectivamente). Los animales pre-entrenados, en cambio, bajan esa tasa a la mitad ( $5.1 \pm 0.4$ ), y los animales que observaron a un pre-entrenado también muestran una disminución ( $7.3 \pm 0.5$ ). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos ( $p > 0.001$ ,  $F(4,28) = 0.16$ , ANOVA de una vía). Los animales pre-entrenados y los observadores



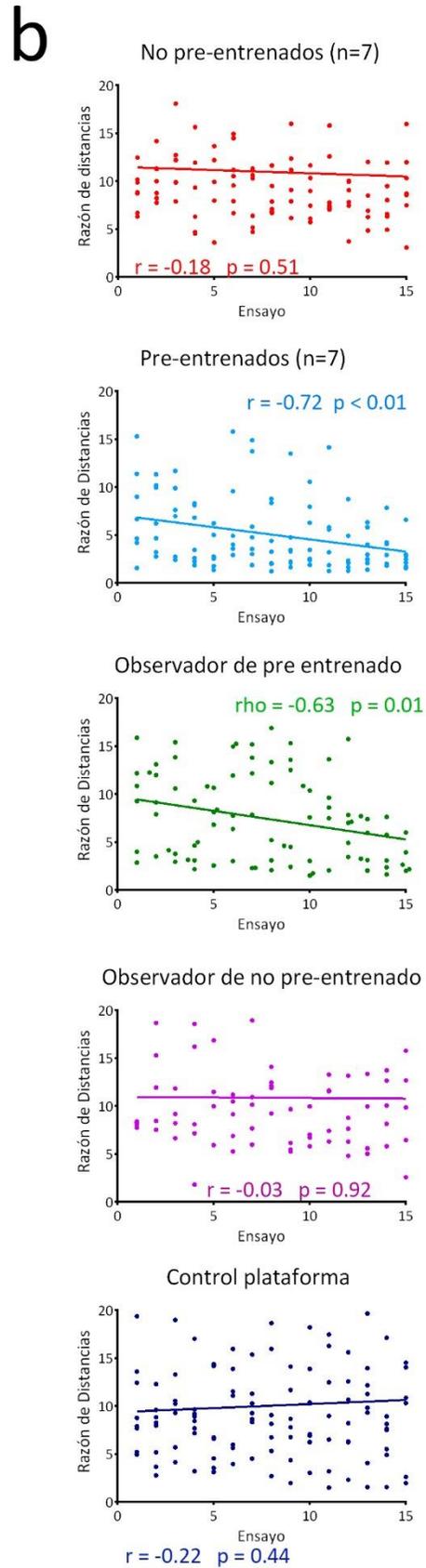
**Figura 11.** Tasa de éxito. (a) Media  $\pm$  sem de los distintos grupos experimentales. #  $p < 0.05$  vs pre-entrenado, \*  $p < 0.05$  vs observado de pre-entrenado. Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. (b) Curvas acumuladas de la probabilidad de tasa de éxito. Asignamos un valor = 1 a cada ensayo finalizado con éxito, y = 0 a aquellos en que el animal no encontró la recompensa, y obtuvimos la media acumulada por grupo. \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. La línea punteada demarca el 50% de probabilidad de éxito.

de un pre-entrenado, al igual que en la tasa de éxito, se diferenciaron de todos los demás grupos ( $p < 0.05$  test post-hoc de Holm-Sidak, detalles de la comparación entre grupos en la tabla A3). Así también, los animales no pre-entrenados, observadores de un no pre-entrenado y control plataforma no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos (figura 12a).

También analizamos el desempeño de los distintos grupos a lo largo de la tarea. Esperamos que aquellos animales que aprenden la ubicación del pocillo recompensado realicen trayectorias cada vez más cercanas a la trayectoria ideal (independientemente de su posición inicial), lo que conlleve a una disminución de la razón de distancias a lo largo de los ensayos. Para evaluar esta progresión, calculamos la razón de distancia en cada ensayo y evaluamos la correlación con el número de ensayo. De los cinco grupos experimentales sólo los animales pre-entrenados y observadores de un pre-entrenado mostraron una correlación



**Figura 12.** Razón de distancias. (a) Media  $\pm$  sem del promedio de la razón de distancia en el *oasis maze*. # $p < 0.05$  vs grupo pre-entrenados; \* $p < 0.01$  vs observadores de pre-entrenado. Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b) Razón de distancias en cada ensayo para cada animal de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson o rho de Spearman para la línea recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.



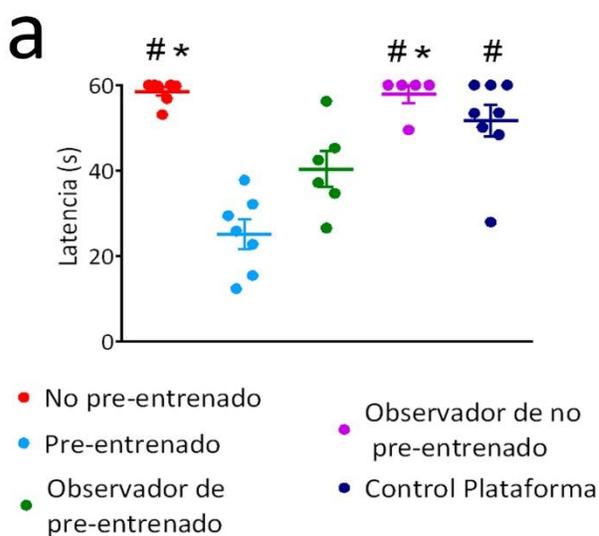
estadísticamente significativa ( $r=-0.72$ ,  $p=0.002$  grupo pre-entrenado, índice de correlación de Pearson y  $p$  valor asociado,  $r=-0.67$ ,  $p=0.008$  grupo observador de un pre-entrenado, coeficiente de correlación de Spearman y  $p$  valor asociado, tabla A4).

El ajuste lineal de los grupos que mostraron correlación entre la razón de distancias y el número de ensayo nos permitió comparar las pendientes de la progresión a lo largo de la tarea entre los animales pre-entrenados y los observadores de un pre-entrenado. Dicha comparación no mostró diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que progresión de los observadores de un pre-entrenado es indistinguible de aquellos que han sido pre-entrenados en el *oasis maze* ( $-0.25\pm 0.08$ ,  $-0.30\pm 0.11$ , pendiente grupo pre-entrenado y observador de un pre-entrenado respectivamente,  $p=0.73$ , prueba  $t$  de *Student*). Esto indica que a medida que avanza la tarea ambos grupos disminuyen su razón de distancias, es decir, sus trayectorias se acercan cada vez más a la trayectoria ideal a la misma tasa de cambio (figura 12b, tabla A4).

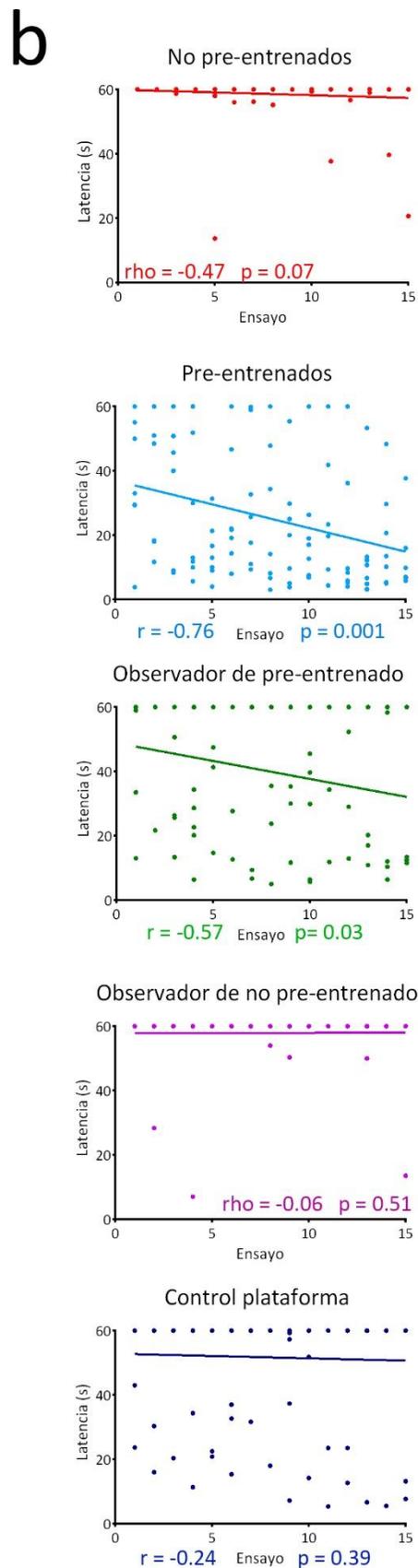
### *Latencia*

Comparamos también las latencias promedio de los distintos grupos. Los animales no pre-entrenados, observadores de un pre-entrenado y control plataforma mostraron latencias cercanas a los 60 segundos ( $58.2\pm 0.6$  (s) grupo no pre-entrenado,  $57.9\pm 0.9$  (s) grupo observador de un no pre-entrenado,  $51.7\pm 0.7$  (s) grupo control plataforma,  $\text{media}\pm\text{sem}$ ), mientras que los grupos pre-entrenado y observador de un pre-entrenado presentaron menores promedios de latencia ( $25.2\pm 2.2$  (s) grupo pre-entrenado,  $39.7\pm 2.4$  (s) grupo observador de un pre-entrenado) (figura 13a).

Encontramos diferencias estadísticas entre los grupos experimentales ( $p<0.001$  calculado con test de rangos de Kruskal-Wallis): el grupo pre-entrenado se diferencia de todos los grupos excepto los observadores de un pre-entrenado ( $p=0.2$  pre-entrenados vs observadores de pre-entrenado,  $p<0.01$  pre-entrenados vs todos los demás grupos, calculado con test post-hoc de Dunn); los animales observadores de un pre-entrenado, en tanto, se diferencian con los animales no pre-entrenados y observadores de un no pre-entrenado, pero no con el grupo control plataforma.



**Figura 13.** Latencia. (a) Media  $\pm$  sem del promedio de la latencia en la tarea. # $p < 0.01$  vs pre-entrenados; \* $p < 0.05$  vs observadores de pre-entrenado. Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b) Latencia en cada ensayo para cada animal de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson o rho de Spearman para la línea recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.

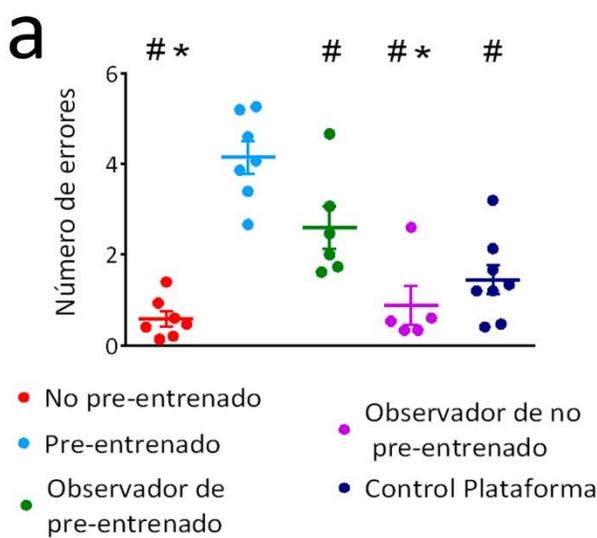


Finalmente, no encontramos diferencias entre los grupos no pre-entrenado, observadores de un no pre-entrenado y control plataforma. Todas las comparaciones se realizaron utilizando test post-hoc de Dunn, con el promedio de la latencia para los 15 ensayos, entre todos los grupos (figura 13a). Los detalles de los resultados estadísticos se presentan en la tabla A5.

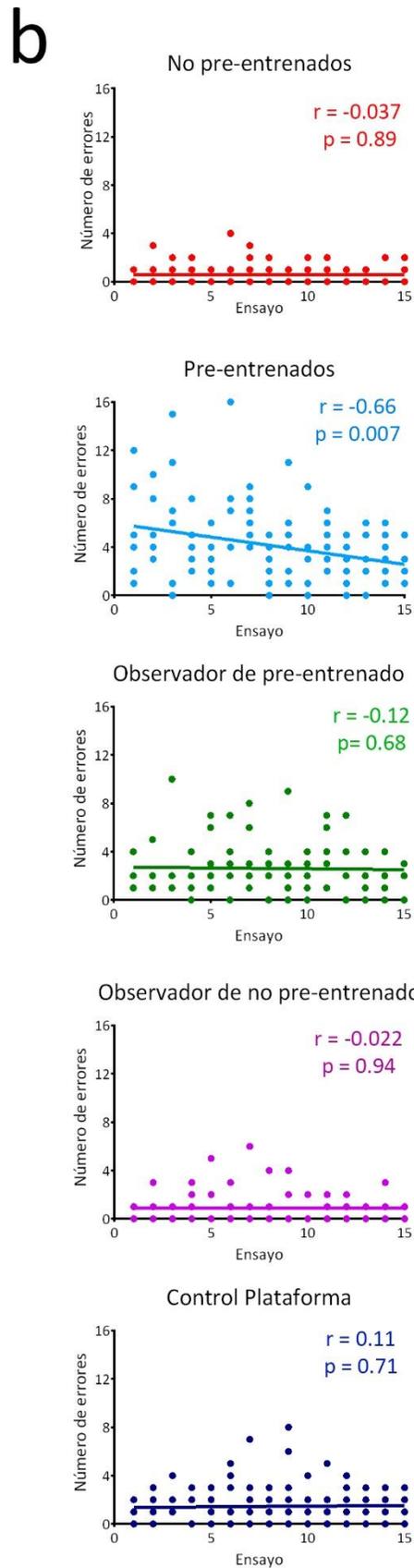
El análisis de la progresión de la latencia a lo largo de la tarea reveló que los animales pre-entrenados y los observadores de un pre-entrenado fueron los únicos que disminuyeron progresivamente este parámetro ( $r = -0.76$ ,  $p = 0.001$  grupo pre-entrenado,  $r = -0.57$ ,  $p = 0.025$  grupo observador de pre-entrenado, coeficiente de correlación de Pearson y  $p$  valor asociado) (figura 13b, tabla A6). Al igual que lo encontrado al medir la razón de distancias, los ajustes lineales a ambas correlaciones muestran una recta de pendiente negativa ( $-1.47 \pm 0.42$ ,  $-1.12 \pm 0.52$  pendientes grupo pre-entrenado y observador de pre-entrenado respectivamente) que indica mejora progresiva de la latencia a lo largo de la tarea. La comparación estadística de las pendientes de dichos ajustes no mostró diferencias significativas ( $p = 0.59$ , prueba *t* de *Student*), lo que indica que la progresión de la latencia es la misma para ambos grupos.

### *Número de errores*

Calculamos el número de errores por ensayo para cada animal de cada grupo. Los animales del grupo pre-entrenado tuvieron en promedio  $4.15 \pm 0.39$  errores en toda la tarea, mientras que los observadores de un pre-entrenado tuvieron  $2.6 \pm 0.22$  errores. Los grupos no pre-entrenado, observadores de un pre-entrenado y control plataforma, en tanto, tuvieron promedios de  $0.59 \pm 0.05$ ,  $0.88 \pm 0.11$  y  $1.4 \pm 0.14$  errores, respectivamente. La comparación estadística de los grupos mostró diferencias significativas entre los pre-entrenados y todos los demás grupos ( $p < 0.0001$  en todos los casos), y entre los observadores de un pre-entrenado y todos los demás grupos ( $p < 0.01$  en todos los casos). No encontramos diferencias entre los grupos no pre-entrenado, observador de un no pre-entrenado y control plataforma. Todas las comparaciones se realizaron mediante ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de



**Figura 14.** Número de errores (a) Media  $\pm$  sem del promedio del número de errores por grupo en la tarea. # $p < 0.05$  vs pre-entrenados; \* $p < 0.05$  vs observadores de pre-entrenado. Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b) Número de errores en cada ensayo para cada animal de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson para la línea recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.



Tukey con el promedio del número de errores para los 15 ensayos, entre todos los grupos (figura 14a). Los detalles de cada test estadístico se presentan en la tabla A7.

Al igual que para las variables anteriores, calculamos la progresión del número de errores a lo largo de los ensayos del *oasis maze*. Sólo el grupo de animales pre-entrenado mostró una correlación estadísticamente significativa, de pendiente negativa ( $p < 0.01$ ,  $r = -0.66$ , pendiente =  $-0.23$ ; coeficiente de correlación de Pearson). Todos los demás grupos no mostraron correlación o mejora del número de errores (figura 14b). Los detalles estadísticos de este test se presentan en la tabla A8. Esto indica que los observadores de un pre-entrenado, a diferencia de los pre-entrenados, no disminuyen progresivamente el número de pocillos no recompensados visitados a lo largo de los ensayos de la tarea, lo que si se corrobora para los animales pre-entrenados.

### **Análisis de la eficiencia del aprendizaje**

Para profundizar nuestro estudio, pusimos a prueba la hipótesis de que el animal que aprendía a partir de la demostración de otro, lo hacía con idéntica eficiencia a la desempeñada por el demostrador. Para ello, normalizamos los valores promedio de la razón de distancias, la latencia y el número de errores a lo largo de la tarea y construimos curvas de rendimiento de los animales pre-entrenados y observadores de un pre-entrenado a lo largo de los 15 ensayos. Estas curvas de rendimiento no son más que la progresión de cada indicador a lo largo del tiempo, pero transformadas de modo de poder compararlas simultáneamente entre grupos (detalles en *Métodos*).

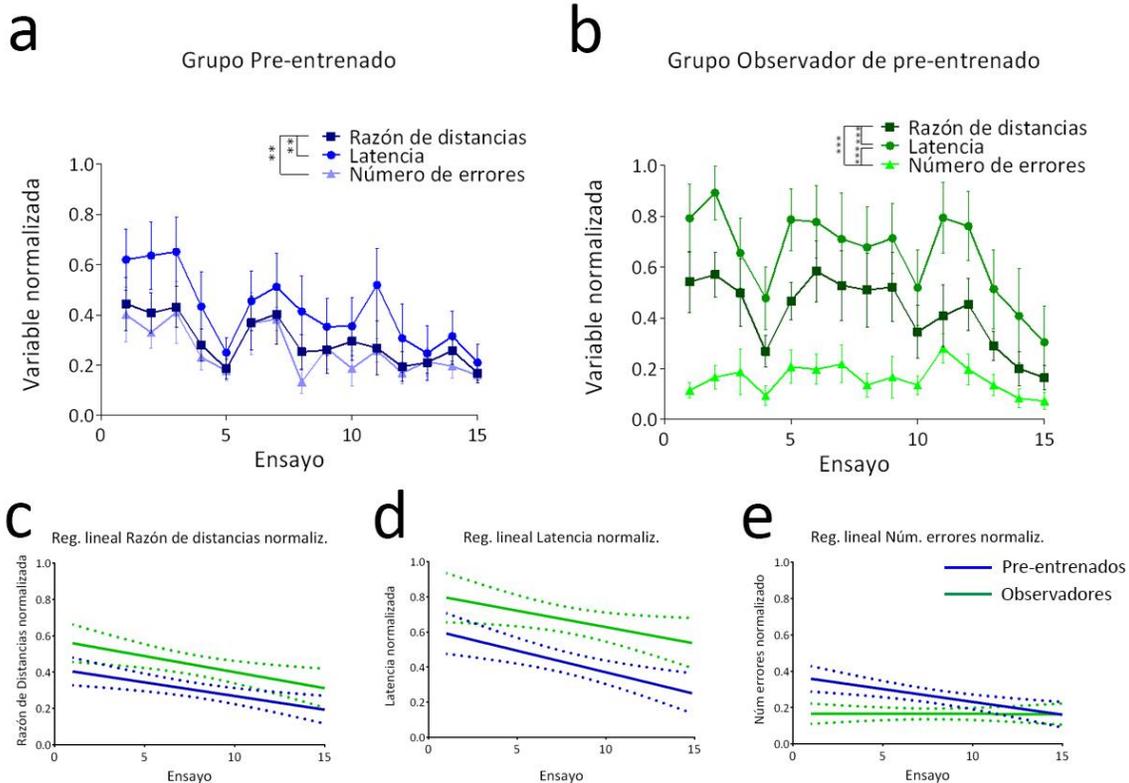
Para el grupo pre-entrenado, las curvas de rendimiento mostraron una dinámica homogénea: comienzan en un nivel medio, sufren un brusco descenso hacia el quinto ensayo, luego vuelven cerca del nivel inicial y bajan hasta casi un quinto del máximo común a todas las variables (figura 15a). La comparación estadística nos mostró que las curvas eran distintas entre sí ( $p = 0.001$ ,  $F(2,42) = 2.24$ , ANOVA de una vía), particularmente la latencia con la razón de distancias y con el número de errores ( $p = 0.0097$  y  $p = 0.0012$ , respectivamente, test post-hoc de Holm-Sidak).

Para el grupo observador de un pre-entrenador, las curvas de rendimiento en cambio mostraron una dinámica similar, pero en umbrales muy distintos entre sí. Las variables se mantienen estables hasta sufrir un aparente descenso en el cuarto ensayo (estadísticamente no significativo, calculado con test post-hoc de Tukey posterior a ANOVA de dos vías) del que se recuperan y descienden, tal como las curvas de los pre-entrenados, hasta el último ensayo que es significativamente distinto de los ensayos 2, 5, 6, 7 y 11 ( $p < 0.05$  en todas las comparaciones, figura 15b). La comparación estadística nos mostró que, a diferencia del grupo de animales pre-entrenados, las variables de los observadores de un pre-entrenador son todas distintas entre sí ( $p < 0.001$ , ANOVA de una vía y  $p < 0.0001$  en las comparaciones entre las tres variables usando test post-hoc de Holm-Sidak).

Finalmente, para evaluar la razón de cambio y el umbral de partida de cada variable, ajustamos una curva lineal y comparamos las pendientes e interceptos entre los dos grupos experimentales (figura 15c-e).

En el caso de la razón de distancias y la latencia, los ajustes lineales mostraron que las pendientes no son distintas en las dos condiciones, pero el intercepto de los observadores de un pre-entrenador (es decir, el nivel en el que comenzaron la tarea, para cada variable) en ambos casos fue significativamente mayor que el de los pre-entrenados (valores de pendiente, intercepto y comparación estadística se detallan en la tabla A9). Esto indica que los observadores de un pre-entrenador desarrollaron la tarea tal como los pre-entrenados, pero comenzaron la tarea con trayectorias alejadas de la trayectoria ideal, y con latencias también más altas, comparado con los pre-entrenados.

En el caso del número de errores, las pendientes entre los dos grupos resultaron estadísticamente diferentes al igual que el intercepto, lo que indica que la conducta de los observadores de un pre-entrenador, medida por este parámetro, resulta completamente distinta de la conducta de los pre-entrenados, tanto en su nivel inicial como en la progresión a lo largo de la tarea (los detalles de pendiente, intercepto y estadística se presentan en la tabla A9).



**Figura 15.** Análisis del aprendizaje de los grupos pre-entrenado y observador de pre-entrenado. Las tres variables continuas medidas en la tarea del *oasis maze* (razón de distancias, latencia y número de errores) fueron normalizadas y comparadas simultáneamente para el grupo pre-entrenado (a) y observador de pre-entrenado (b). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Ajuste lineal  $\pm$  sem de la razón de distancia (c), latencia (d) y número de errores (e) normalizados para ambos grupos analizados. El valor de la pendiente e intercepto de cada recta, así como las comparaciones estadísticas entre ellas se presentan en la tabla A9.

En términos globales, estos resultados indican que los animales de los grupos pre-entrenado y observador de un pre-entrenado son los únicos que muestran un aprendizaje efectivo en la resolución del *oasis maze*, sustentados en una alta tasa de éxito, mejora progresiva en las estrategias de navegación (medido por la razón de distancias) y progresión a menores tiempos para encontrar el pocillo recompensado (medido por latencia). Las únicas diferencias que observamos entre los grupos pre-entrenado y observador de pre-entrenado fueron en la tasa de éxito promedio, la

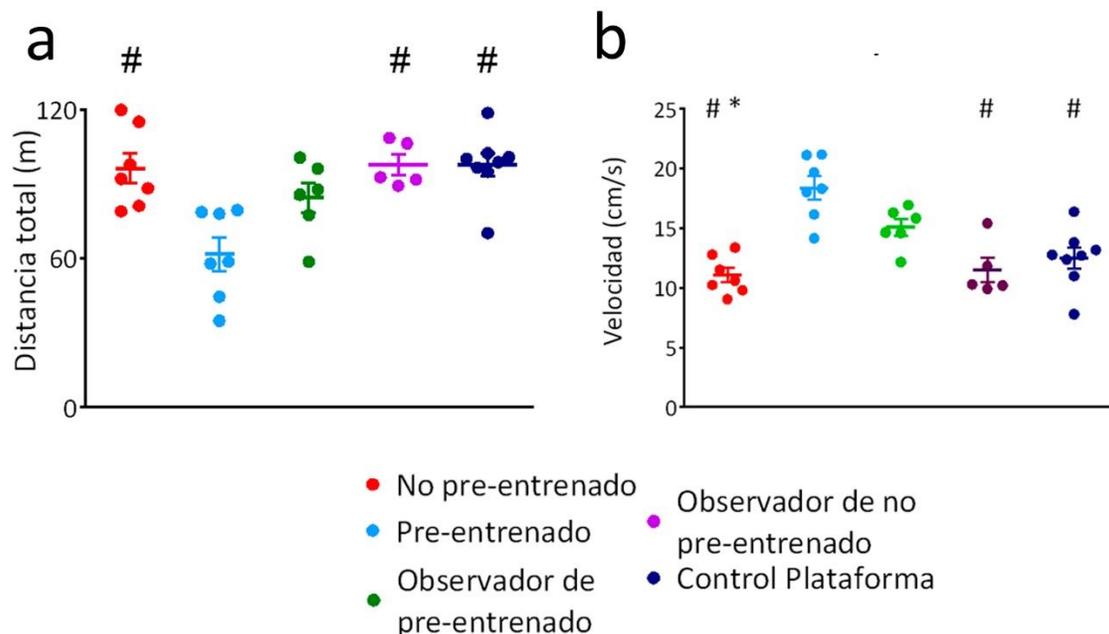
pendiente de la probabilidad de la tasa de éxito acumulada y razón de distancias promedio. Por otra parte, los animales de los grupos no pre-entrenados, observador de no pre-entrenado y control plataforma no demostraron ninguna mejora conductual o aprendizaje en ningún parámetro evaluado.

Para descartar que estos resultados se debiesen a ausencia de locomoción y una conducta pasiva de los animales que no aprendieron, comparamos la distancia total recorrida por cada animal sumando las trayectorias de cada ensayo. Los grupos que no demostraron aprendizaje mostraron los recorridos más largos, seguidos de los animales observadores y pre-entrenados ( $96.3 \pm 6.0$  (m) no pre-entrenados,  $61.8 \pm 6.7$  (m) pre-entrenados,  $84.5 \pm 6.1$  (m) observadores de pre-entrenado,  $97.8 \pm 4.0$  (m) observadores de no pre-entrenado,  $97.9 \pm 4.7$  (m) control plataforma,  $\text{media} \pm \text{sem}$ ).

La comparación estadística de este parámetro indica que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ,  $F(4,28) = 0.62$  ANOVA de una vía), particularmente entre los grupos que no aprendieron y los pre-entrenados ( $p < 0.01$  pre-entrenados vs control plataforma, no pre-entrenados y observador de no pre-entrenado,  $p = 0.069$  pre-entrenado vs observador de pre-entrenado, test post-hoc de Holm-Sidak, detalles en tabla A10) (figura 16a).

Comparamos también las velocidades medias durante la tarea para cada grupo, y encontramos que los animales pre-entrenados fueron los más rápidos ( $18.39 \pm 0.98$  (cm/s)) y se diferenciaron de todos los demás grupos excepto los observadores de pre-entrenado ( $p < 0,0001$  vs observador de no pre-entrenado y control plataforma,  $p = 0.064$  vs observador de pre-entrenado, test post-hoc de Holm-Sidak posterior a ANOVA de una vía, detalles en tabla A11) (figura 16b). Los animales observadores de pre-entrenado fueron sólo más rápidos que los no pre-entrenados ( $15.09 \pm 0.69$  (cm/s) y  $11.06 \pm 0.6$  (cm/s) respectivamente,  $p = 0.012$ ). No encontramos diferencias entre los animales no pre-entrenados, observador de un no pre-entrenado y control plataforma (detalles estadísticos en la tabla A11).

Con todo, estos resultados indican claramente que los animales naïve que tuvieron la oportunidad de observar a un congénere experto en resolver la tarea presentaron una



**Figura 16.** Distancia total recorrida y velocidad media durante el *oasis maze*. (a) Media  $\pm$  sem de la distancia total recorrida por cada grupo experimental. #  $p < 0.05$  vs pre-entrenado. (b) Media  $\pm$  sem de la velocidad de cada grupo experimental. #  $p < 0.01$  vs pre-entrenado, \*  $p < 0.05$  vs observador de pre-entrenado. Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak.

mejora en todas las variables medidas. Este aprendizaje fue altamente dependiente tanto de la presencia del congénere como de que éste sea un efectivo modelo de aprendizaje, lo que da sustento a la idea de que las ratas son capaces de aprender por observación. En cambio, tanto los animales no pre-entrenados como aquellos que observaron a un no pre-entrenado, y aquellos que no observaron congéneres, no mostraron mejorías en ningún parámetro. Esta ausencia de aprendizaje no se puede atribuir a la falta de conducta exploratoria en ningún grupo, dado que los animales que no aprenden fueron los que más se desplazaron, mientras que los que aprenden al ser sus trayectorias cada vez más eficientes reducen un poco la distancia recorrida total.

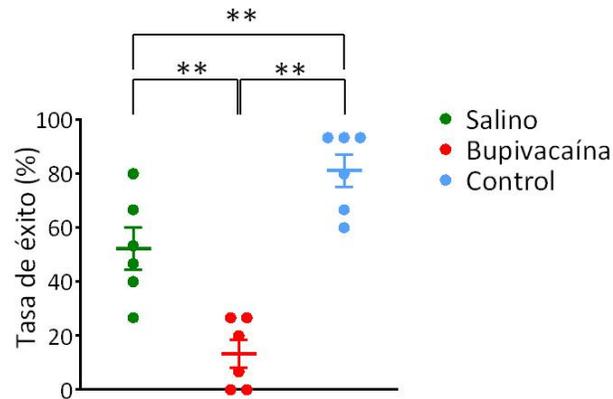
## **Papel del hipocampo en el aprendizaje observacional**

Para determinar la participación del hipocampo durante el aprendizaje observacional en tareas de memoria espacial, comparamos el desempeño en el *oasis maze* de animales que previo a la observación fueron inyectados con un pequeño volumen de bupivacaína, un bloqueador reversible de los canales de sodio voltaje dependientes, inhibiendo la actividad hipocampal localmente y sólo durante la observación. La caracterización de los distintos grupos, los detalles de la cirugía de implante y del procedimiento de inyección se detallaron previamente en *Métodos*.

En breve, animales previamente implantados crónicamente con cánulas dirigidas a la región CA1 del hipocampo fueron inyectados con un pequeño volumen de 0.5µl de solución salina o bupivacaína justo antes de comenzar la etapa de observación. En todos los casos utilizamos como demostradores animales pre-entrenados en el *oasis maze*. Dado que la etapa de observación se extiende por alrededor de 40 minutos y la vida media de la bupivacaína es también de ~40 minutos, esperamos bloquear la actividad hipocampal sólo durante la observación, y no durante la posterior navegación del animal. Para corroborar esto incluimos un tercer grupo de animales que fueron pre-entrenados en el *oasis maze* e inyectados con bupivacaína 40 minutos antes de comenzar la tarea (grupo control). Con este grupo esperamos verificar que las capacidades de orientación espacial dependientes de la funcionalidad hipocampal se recuperan 40 minutos después de la inyección de bupivacaína.

### *Tasa de éxito*

Los animales inyectados con solución salina (n=6) alcanzaron un 52.2±7.8 % de tasa de éxito, mientras que los inyectados con bupivacaína (n=6) alcanzaron sólo un 13.3±5.2 %. Los animales controles (n=6), en tanto, alcanzaron un 81.1±6.1% (figura 17).



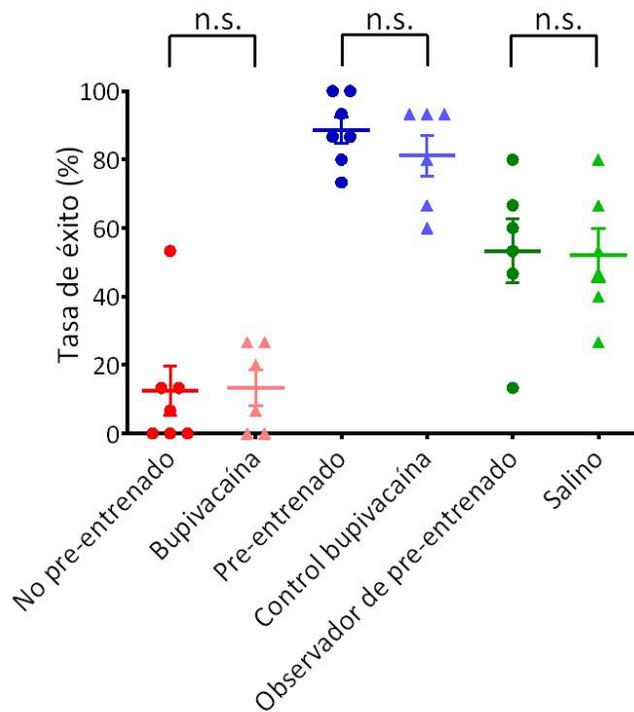
**Figura 17.** Tasa de éxito tras la inyección farmacológica. Media  $\pm$  sem de los distintos grupos experimentales. \*\*  $p < 0.01$  calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Salino = animales inyectados bilateralmente con solución salina (NaCl 0.9%); bupivacaína = animales inyectados bilateralmente con bupivacaína (0.75% v/v); control = animales pre-entrenados, inyectados con bupivacaína (0.75% v/v) 40 minutos antes de comenzar el *oasis maze* (para detalle de los grupos, ver Figura 5).

La comparación estadística muestra que las medias de todos los grupos son distintas entre sí ( $p = 0.0013$  salino vs bupivacaína,  $p = 0.0062$  salino vs control,  $p < 0.001$  bupivacaína vs control, ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak).

Al comparar estos resultados con los datos de la tasa de éxito del experimento anterior, encontramos que la media de los animales inyectados con bupivacaína es indistinguible de los animales no pre-entrenados, a la vez que los animales controles se comportan como los animales pre-entrenados y los animales inyectados con solución salina no se diferencian de la media de los observadores de un pre-entrenado ( $p = 0.99$  bupivacaína vs no pre-entrenado,  $p = 0.82$  control vs pre-entrenado,  $p = 0.99$  salino vs observador de un pre-entrenado, ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak) (tabla A12 y figura 18).

### *Razón de distancias*

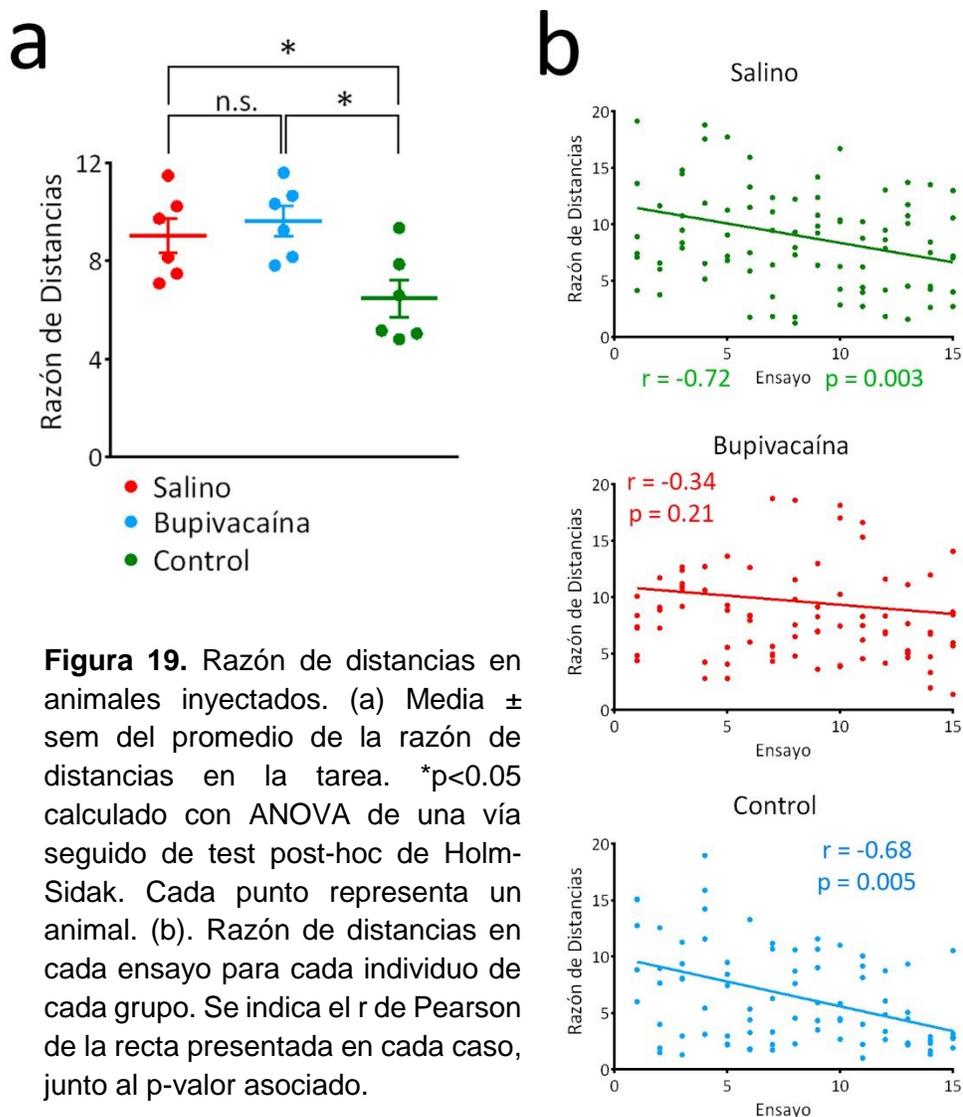
Al calcular la razón de distancia promedio de cada grupo encontramos que los animales inyectados con solución salina y bupivacaína presentan mayores valores que los animales controles ( $9.1 \pm 0.7$ , grupo salino;  $9.6 \pm 0.6$ , grupo bupivacaína;  $6.5 \pm 0.8$ ,



**Figura 18.** Tasa de éxito combinada entre los experimentos conductual y farmacológico. Media  $\pm$  sem de los grupos no pre-entrenado, pre-entrenado y observador de pre-entrenado del experimento conductual (círculos) y los tres grupos del experimento farmacológico (triángulos), ordenados en función de la similitud del resultado. n.s. = no significativo, calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak.

grupo control, figura 19a). Estadísticamente estos dos grupos son indistinguibles, y ambos son diferentes del grupo control ( $p=0.5$  salino vs bupivacaína,  $p=0.04$  salino vs control,  $p=0.02$  bupivacaína vs control, calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak).

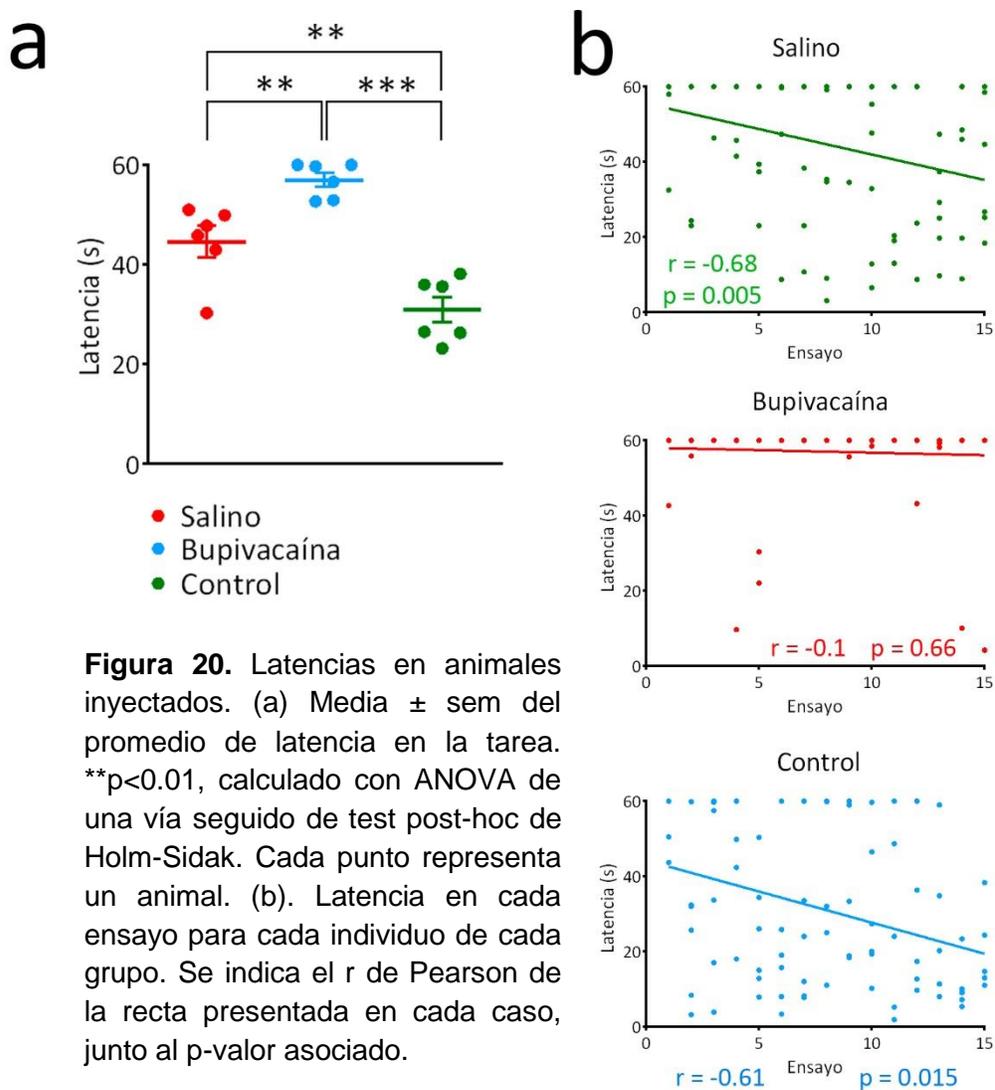
Al evaluar la correlación entre la razón de distancias y el número de ensayo encontramos que los animales inyectados con solución salina y los controles mostraron una disminución progresiva a lo largo de la tarea. Los animales inyectados con bupivacaína en cambio, no mostraron dicha progresión ( $r=-0.72$ ,  $p=0.003$  salino,  $r=-0.34$ ,  $p=0.21$  bupivacaína,  $r=-0.68$ ,  $p=0.005$  control, coeficiente de correlación de Pearson y p valor asociado, figura 19b).



**Figura 19.** Razón de distancias en animales inyectados. (a) Media  $\pm$  sem del promedio de la razón de distancias en la tarea. \* $p < 0.05$  calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b). Razón de distancias en cada ensayo para cada individuo de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson de la recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.

### Latencia

Los animales del grupo control mostraron las menores latencias promedio, seguidos del grupo salino y el bupivacaína ( $31 \pm 3.1$  (s) grupo control,  $44.7 \pm 2.3$  (s) grupo salino,  $57 \pm 1$  (s) grupo bupivacaína, figura 20a). La comparación estadística indica que todos los grupos son diferentes de todos los grupos ( $p = 0.003$  salino vs bupivacaína,  $p = 0.003$  salino vs control,  $p < 0.001$  bupivacaína vs control, ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak).



**Figura 20.** Latencias en animales inyectados. (a) Media  $\pm$  sem del promedio de latencia en la tarea. \*\* $p < 0.01$ , calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b). Latencia en cada ensayo para cada individuo de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson de la recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.

Sólo encontramos correlación entre la progresión de la tarea y la latencia en los animales inyectados con solución salina y los del grupo control, pero no en los animales inyectados con bupivacaína ( $r = -0.68$ ,  $p = 0.005$  grupo salino,  $r = -0.61$ ,  $p = 0.015$  grupo control, coeficiente de correlación de Pearson y  $p$  valor asociado;  $r = -0.1$ ,  $p = 0.66$  grupo bupivacaína coeficiente de correlación de Spearman y  $p$  valor asociado, figura 20b).

### *Número de errores*

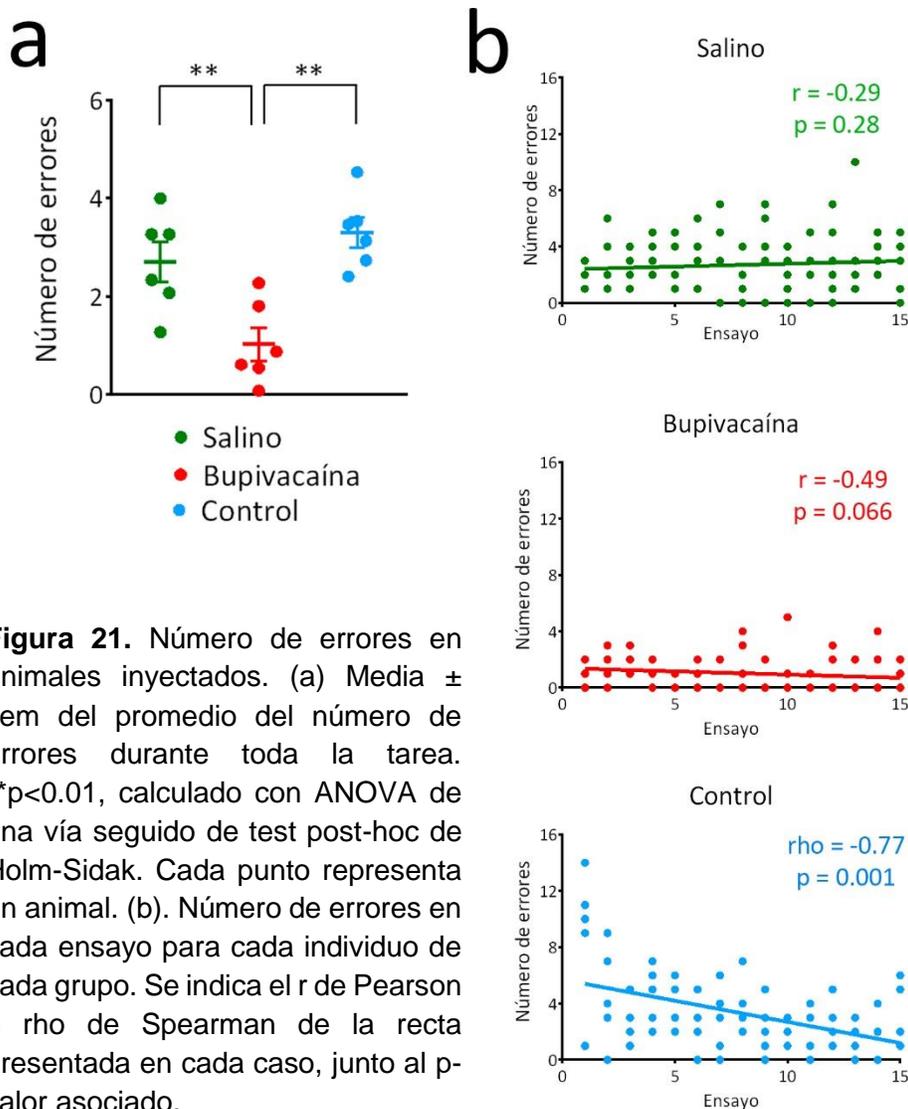
Los animales inyectados con bupivacaína mostraron una disminución significativa del número de errores promedio durante el *oasis maze*, comparado con los grupos salino y control ( $p < 0.01$  en ambos casos, calculado con test post-hoc de Holm-Sidak, posterior a ANOVA de una vía, figura 21a). Los animales del grupo control, a diferencia de los pre-entrenados del experimento conductual anterior, no se diferenciaron del grupo tratado con solución salina.

Aun así, sólo los animales del grupo control mostraron una disminución progresiva del número de errores a lo largo de la tarea, lo que no fue corroborado para ninguno de los otros dos grupos ( $r = -0.29$ ,  $p = 0.28$  grupo salino,  $r = -0.49$ ,  $p = 0.066$  grupo bupivacaína, coeficiente de correlación de Pearson y  $p$  valor asociado;  $\rho = -0.77$ ,  $p = 0.001$  grupo control, coeficiente de correlación de Spearman y  $p$  valor asociado, figura 21b).

### *Distancia total recorrida y velocidad promedio*

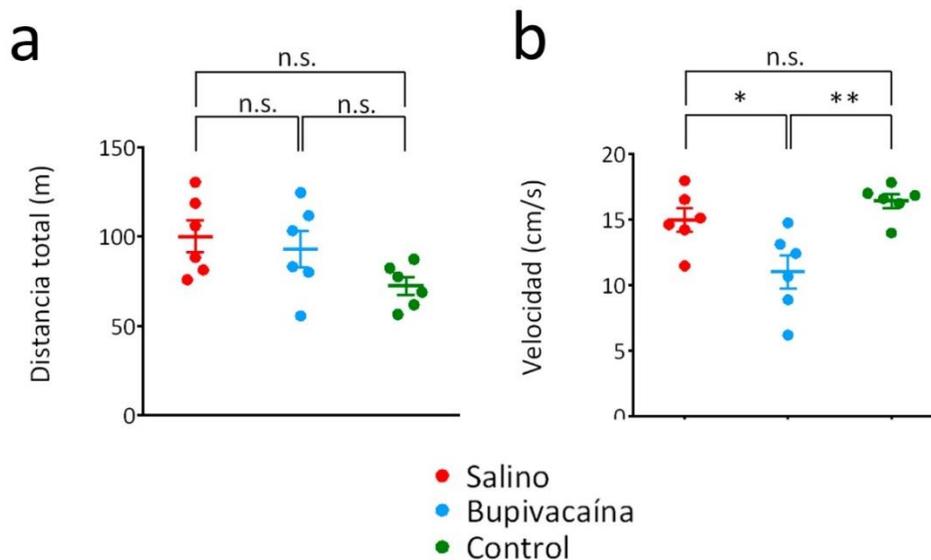
Al igual que en el experimento anterior, para descartar que los resultados encontrados se debiesen a inmovilidad de los animales comparamos la distancia total recorrida por cada animal y la velocidad promedio durante la tarea. La comparación de las medias de la distancia recorrida muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.56$  salino vs bupivacaína,  $p = 0.09$  salino vs control,  $p = 0.19$  bupivacaína vs control, calculado usando ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak). Es decir, recorrieron la misma distancia al resolver la tarea, descartando cualquier efecto de la droga o la solución salina, sobre la marcha (figura 22a).

En cuanto a los promedios de velocidad, los animales del grupo bupivacaína fueron en promedio más lentos que los otros dos grupos, que no se diferenciaron entre sí ( $14,98 \pm 0.89$  (cm/s) grupo salino;  $11,01 \pm 1.27$  (cm/s) grupo bupivacaína;  $16.4 \pm 0.53$  (cm/s) grupo control,  $\text{media} \pm \text{sem}$ ;  $p = 0.019$  salino vs bupivacaína,  $p = 0.0033$  control vs bupivacaína, calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak, figura 22b).



**Figura 21.** Número de errores en animales inyectados. (a) Media  $\pm$  sem del promedio del número de errores durante toda la tarea.  $**p < 0.01$ , calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak. Cada punto representa un animal. (b). Número de errores en cada ensayo para cada individuo de cada grupo. Se indica el  $r$  de Pearson o  $\rho$  de Spearman de la recta presentada en cada caso, junto al  $p$ -valor asociado.

Para evaluar si la inyección misma podía promover una menor actividad locomotora sobre los distintos animales comparamos la distancia recorrida y la velocidad entre estos tres grupos y sus homólogos del experimento conductual (ver figura 18). No encontramos diferencias en las comparaciones de la distancia total recorrida ( $p=0.17$  salino vs observador de pre-entrenado,  $p=0.79$  bupivacaína vs no pre-entrenado,  $p=0.24$  control vs pre-entrenado), ni en la velocidad promedio ( $p=0.93$  salino vs observador de pre-entrenado,  $p=0.97$  bupivacaína vs no pre-entrenado,  $p=0.12$  control vs pre-entrenado, calculado usando prueba  $t$  de *Student* para cada pareja en ambas condiciones)



**Figura 22.** Distancia total y velocidad media de los animales inyectados. (a) Media  $\pm$  sem de la distancia total recorrida por cada grupo experimental. n.s.= no significativo. (b) Media  $\pm$  sem de la velocidad promedio de cada grupo experimental. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Calculado con ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Holm-Sidak.

El conjunto de resultados indica que la inactivación farmacológica del hipocampo durante los periodos de observación impide la adquisición del aprendizaje observacional y dichos animales no muestran las mejoras conductuales que si muestran los animales inyectados con solución salina y los del grupo control. Descartamos que los resultados encontrados se deban a un remanente de bupivacaína, ya que los animales controles resolvieron el *oasis maze* sin problemas 40 minutos después de haber sido inyectados con la droga. También descartamos cualquier efecto inmovilizador de la inyección misma ya que tanto las distancias recorridas como la velocidad promedio fueron indistinguibles de los animales del experimento conductual (sin intervención farmacológica). Dicho de otro modo, estos experimentos indican que el hipocampo es necesario para el aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial.

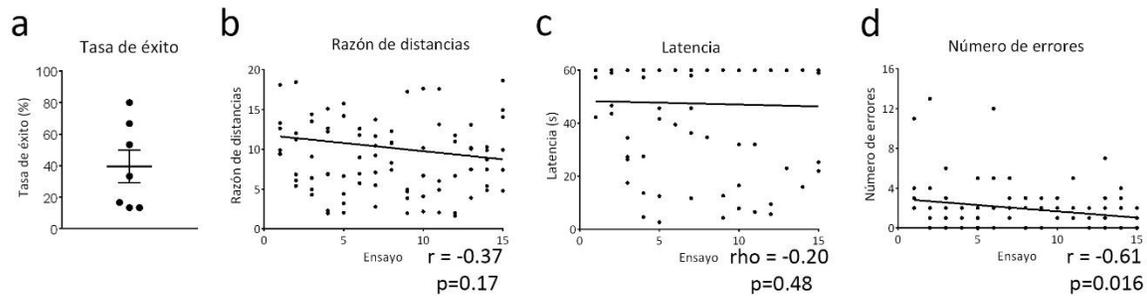
## Dinámica neuronal durante la observación

Para tener acceso a la actividad hipocampal durante el aprendizaje observacional, registramos señales de espigas mediante tetrodos localizados en la región CA1 durante los periodos de observación y navegación (Gray y cols., 1995, Villalobos y cols., 2017). Luego de separar las neuronas, estimamos la información que cada una de ellas posee al correlacionar dicha actividad con la posición del animal demostrador (sesión de observación) o con su propia posición (sesión de navegación). Esto nos permitió evaluar la generación de un mapa cognitivo en el hipocampo del observador respecto a las posiciones del congénere demostrador. Los detalles de la cirugía, el manejo, el registro y el análisis detallado de las señales, se encuentran en la sección *Métodos*.

Evaluamos también los parámetros de aprendizaje en los animales registrados. Dado que algunos animales realizaron más de una sesión experimental, incluimos en este análisis los resultados conductuales sólo de la primera sesión de observación, de modo que fuesen comparables con los resultados descritos previamente en esta tesis en los experimentos conductual y farmacológico (figura 23).

La tasa de éxito media de los animales registrados fue de  $36.52 \pm 10.35$  % (media  $\pm$  sem, figura 23a), lo que no fue estadísticamente diferente de las medias encontradas en los grupos no pre-entrenados y pre-entrenados del experimento conductual ( $p > 0.17$ , registrados vs no pre-entrenados,  $p > 0.99$  registrados vs pre-entrenados, test de comparaciones múltiples de Dunn posterior a test de rangos de Kruskal-Wallis). Además, estos animales no presentaron una disminución progresiva de la razón de distancias ( $r = -0.37$ ,  $p = 0.17$ , coeficiente de correlación de Pearson, figura 23b) ni de la latencia ( $\rho = -0.20$ ,  $p = 0.48$ , coeficiente de correlación de rangos de Spearman, figura 23c), aunque sí del número de errores ( $r = -0.61$ ,  $p = 0.016$ , coeficiente de correlación de Pearson, figura 23d), lo que contrasta con los resultados encontrados en los experimentos anteriores. Detalles estadísticos en la tabla A13.

Estos resultados indican que los animales registrados no despliegan una conducta de aprendizaje similar a las vistas en los experimentos anteriores.



**Figura 23.** Parámetros conductuales evaluados en los animales registrados electrofisiológicamente. Valores de (a) Tasa de éxito, (b) razón de distancias, (c) latencia y (d) número de errores, a lo largo de 15 ensayos del *oasis maze*. En (b), (c) y (d) se indica además el índice de correlación de Pearson ( $r$ ) o de Spearman ( $\rho$ ) según corresponda, acompañado del  $p$ -valor asociado.

### *Estimación de Observational-place cells*

Identificamos 380 neuronas totales en 10 sesiones experimentales utilizando 7 animales implantados crónicamente. De dichas neuronas, 322 (85%) fueron clasificadas como probables neuronas piramidales, basados en la forma de la espiga y la tasa de descarga en reposo. Las restantes 58 neuronas fueron clasificadas como interneuronas y se descartaron del análisis (tabla 1).

Para evaluar la hipótesis de que las neuronas hipocampales codifican la posición de un congénere, alineamos los potenciales de acción de cada una de las neuronas con la posición ocupada por el animal demostrador. Luego dividimos el espacio del *oasis maze* en  $48 \times 48$  bins de  $\sim 4 \times 3$  cm cada uno, y calculamos la frecuencia de descarga de cada neurona en cada bin, generando así mapas de tasa de descarga para cada célula (figura 8a). Normalizamos la descarga de cada neurona por la permanencia del animal demostrador en cada bin y calculamos el índice de información espacial (en bits/espiga) de cada neurona para cada experiencia de observación ( $IPS_{real}$ ), utilizando la ecuación derivada de Skaggs que se detalla en *Métodos* (Robbe y cols, 2009; Skaggs y cols., 1993).

**Tabla 1.** Detalle de neuronas seleccionadas en cada etapa del análisis.

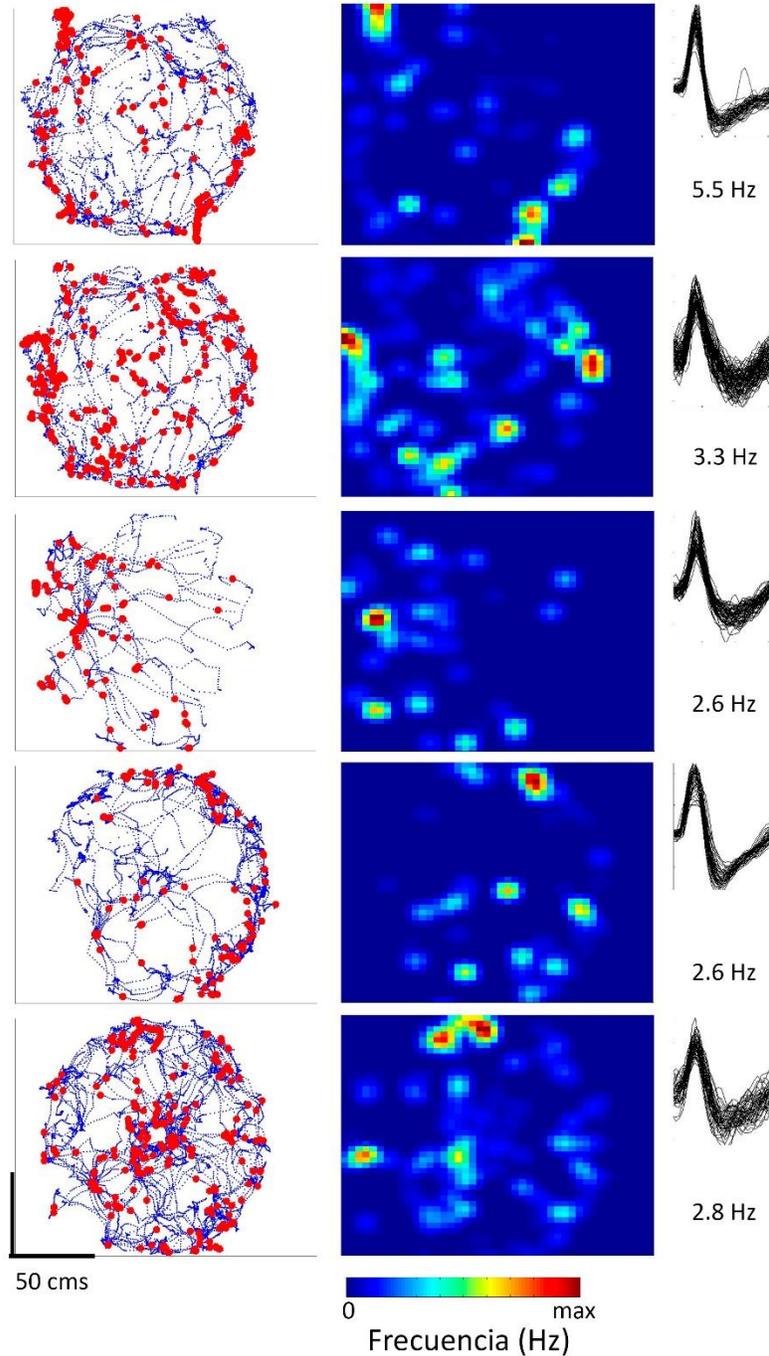
	Total	%
<b>Total animales</b>	7	
<b>Neuronas registradas aisladas</b>	380	
<b>Neuronas piramidales aisladas</b>	322	85% del total
<b>Observational-place cells (OPC)</b>	62	19,3% de piramidales
<b>Place cells (PC)</b>	84	26% de piramidales
<b>OPC y PC simultáneamente</b>	29	46,7% de OPCs

Comparamos el IPS obtenido para cada neurona con el IPS obtenido al aleatorizar el patrón de descargas del observador, manteniendo la posición del animal demostrador. Repetimos esta aleatorización 1000 veces y calculamos la media y desviación estándar de la distribución de resultados aleatorizados ( $IPS_{aleatorizado}$ , más detalles del procedimiento en *Métodos*). Así, cualquier propiedad presente en la dinámica de descarga de las neuronas es eliminada y el índice de información se ve fuertemente influenciado por la permanencia del animal demostrador. Esto nos permite entonces encontrar valores de IPS que además son comparables entre distintos animales y sesiones, independiente de la duración y el desplazamiento del animal demostrador (figura 8b).

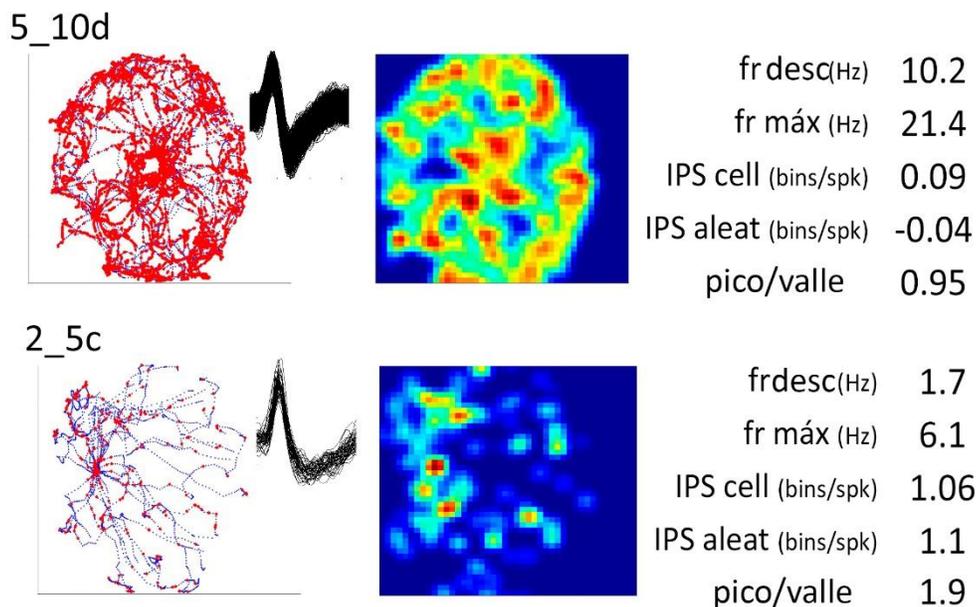
Para seleccionar neuronas con propiedades de *place cells* durante la observación utilizamos entonces los siguientes criterios:

- frecuencia de descarga durante la observación > 0.25 Hz
- frecuencia de descarga durante observación > frecuencia de descarga en reposo
- $IPS_{real} > (2\sigma_{IPS_{aleatorizado}} + \bar{X}_{IPS_{aleatorizado}})$

De esta manera, 62 unidades (19,2% del total de neuronas piramidales) fueron seleccionadas como neuronas que codifican la posición del animal demostrador en el hipocampo del animal observador (algunos ejemplos se detallan en la figura 24). En adelante, llamaremos a estas neuronas *observational-place cells (OPC)*. En la figura 25 mostramos ejemplos de unidades no seleccionadas como OPC, tanto por haber sido clasificadas como interneuronas o porque el índice de información alcanzado por el tren de descargas de una neurona piramidal fue menor que el alcanzado por azar.



**Figura 24.** Ejemplos de *observational-place cells*. A la izquierda se muestra la posición ocupada por el animal demostrador (trazos azules) cuando cada neurona hipocámpal del observador descargó un potencial de acción (puntos rojos). Al centro se muestra el mapa de frecuencias (*rate map*) generado a partir del gráfico de la izquierda. A la derecha arriba, trazos de la espiga correspondiente a dicha neurona. A la derecha abajo se indica la frecuencia máxima de disparo por bin.



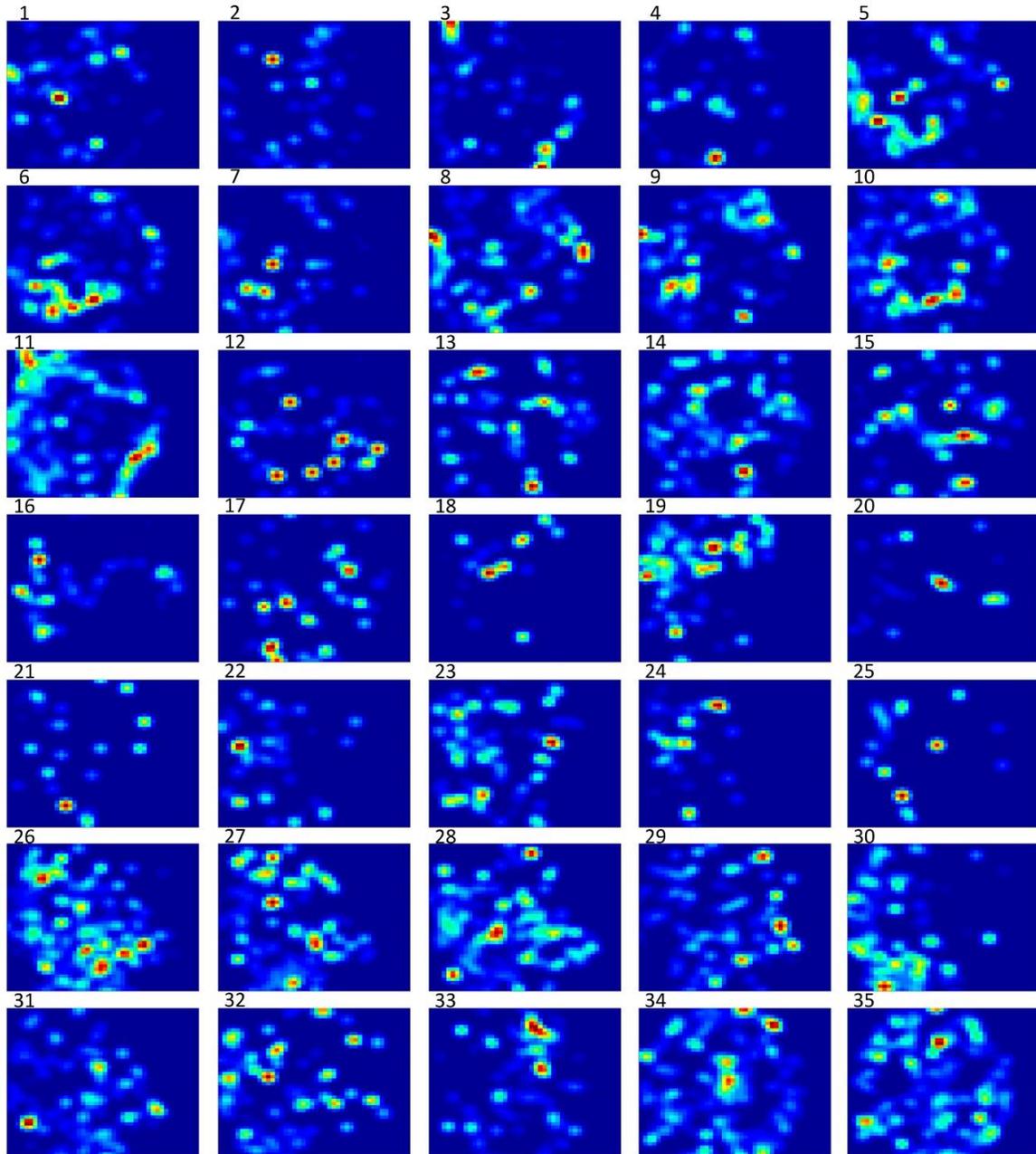
**Figura 25.** Ejemplos de neuronas no clasificadas como *observational-place cells*. A la izquierda se muestra la ubicación del animal demostrador (trazos azules) cuando descargó un potencial de acción cada neurona (puntos rojos). Al centro, el mapa de frecuencia de descargas generados de la actividad neuronal (colores más fríos indican actividad = 0, colores cálidos indican actividad cercana al máximo de la neurona). Entre ambos gráficos se indica la forma del potencial de acción. Nótese que la neurona 5\_10d muestra una forma de la espiga distinta a la neurona 2\_5c. En base a la forma del potencial de acción la primera fue definida como probable interneurona y la segunda como probable neurona piramidal. A la derecha: fr desc = frecuencia de descarga en reposo; fr max = frecuencia de descarga máxima durante la observación; IPS cell= índice de información de la neurona; IPS aleat = índice de información aleatorizado; pico/valle = relación pico valle de la forma del potencial de acción.

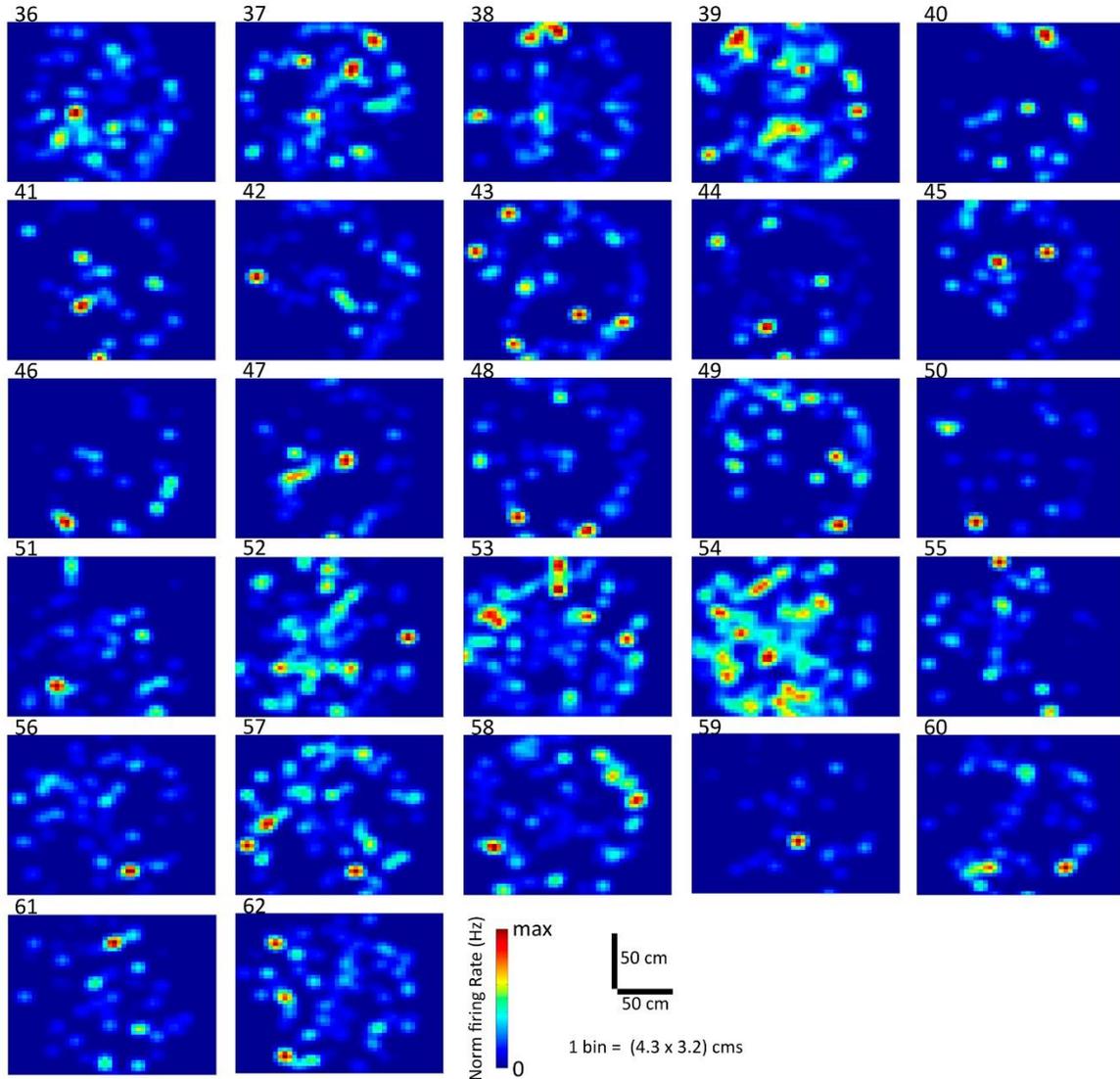
Los *place fields* formados por cada OPC encontrada en este estudio se muestran en la figura 26.

Estos resultados indican que una población de las neuronas hipocampales del observador presenta un contenido de información sobre el esperado por azar respecto a las trayectorias del demostrador, las *Observational-place cells* (OPC).

### *Estimación de place cells*

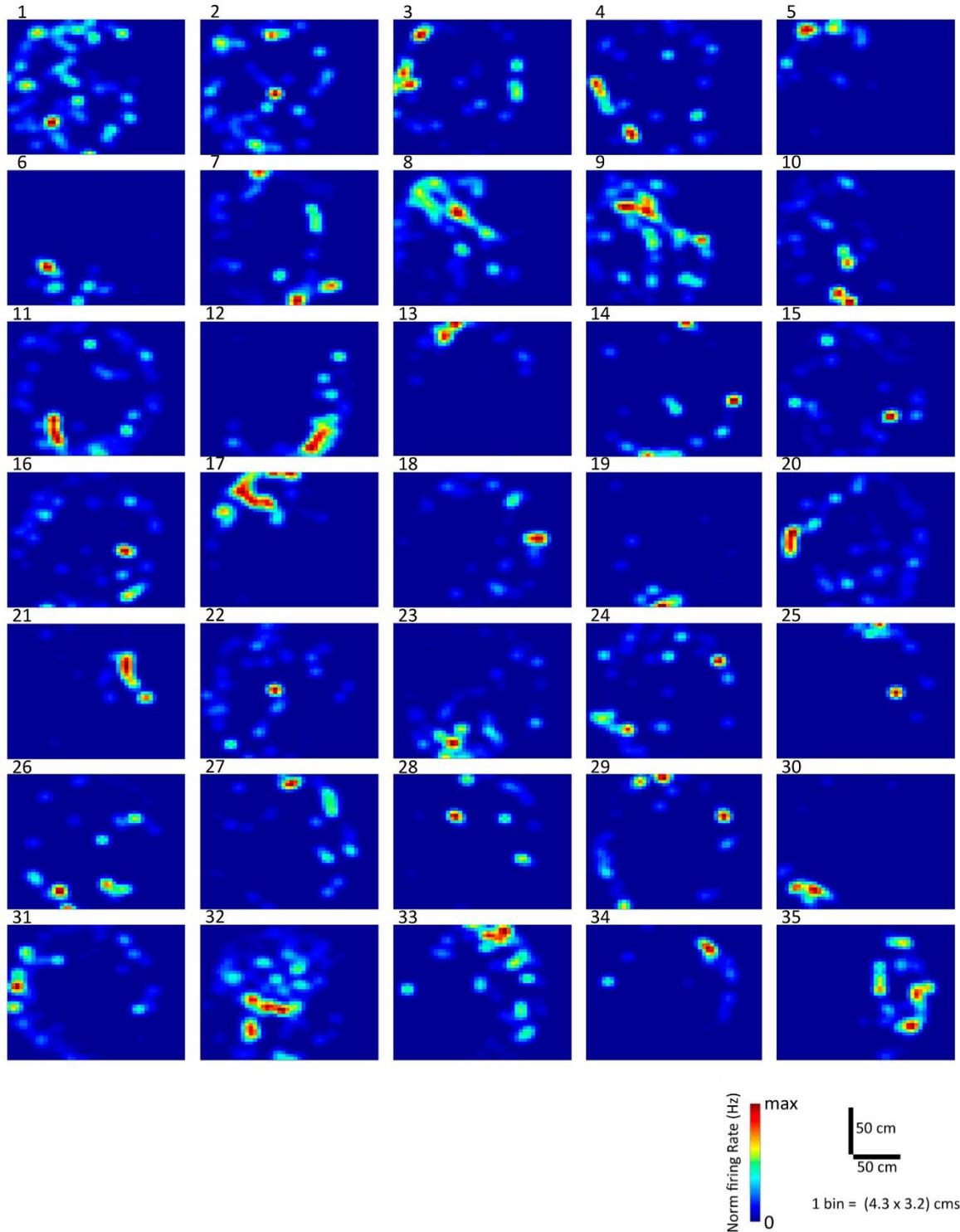
Tras la sesión de observación los animales registrados pasaron a resolver el *oasis maze*. En dichos periodos de navegación activa registramos también la actividad



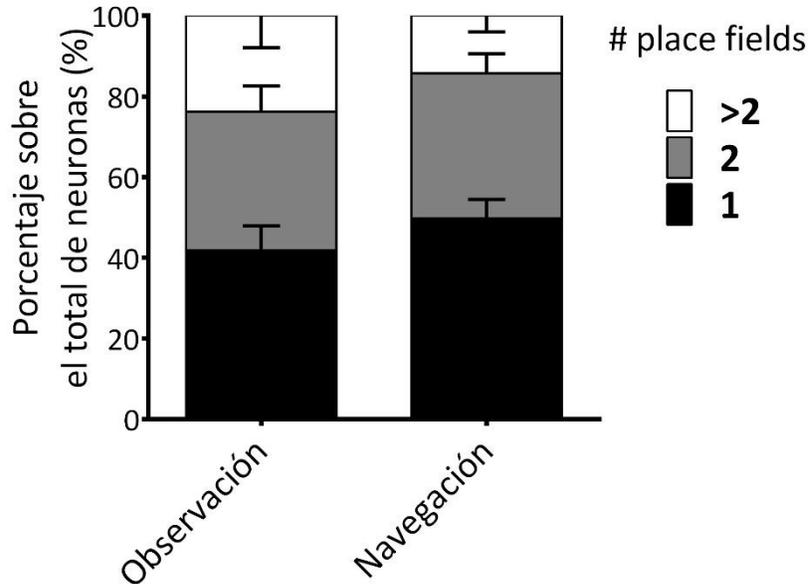


**Figura 26.** Mapas de frecuencia de las 62 neuronas clasificadas como *observational-place cells*. En todos los casos la frecuencia se normalizó como se indica en Métodos. El tamaño de cada cuadro es de 187x140 cms.

hipocampal y posteriormente alineamos la posición ocupada por el animal mientras resolvía el laberinto con el tren de espigas de cada neurona piramidal identificada. Utilizando los mismos criterios definidos anteriormente, obtuvimos las *place cells* del animal que previamente había observado, mientras resolvía el *oasis maze* (sesiones de navegación).



**Figura 27.** Mapas de frecuencia de 35 neuronas clasificadas como *place cells*. En todos los casos la frecuencia se normalizó como se indica en Métodos. El tamaño de cada cuadro es de 187x140 cms.

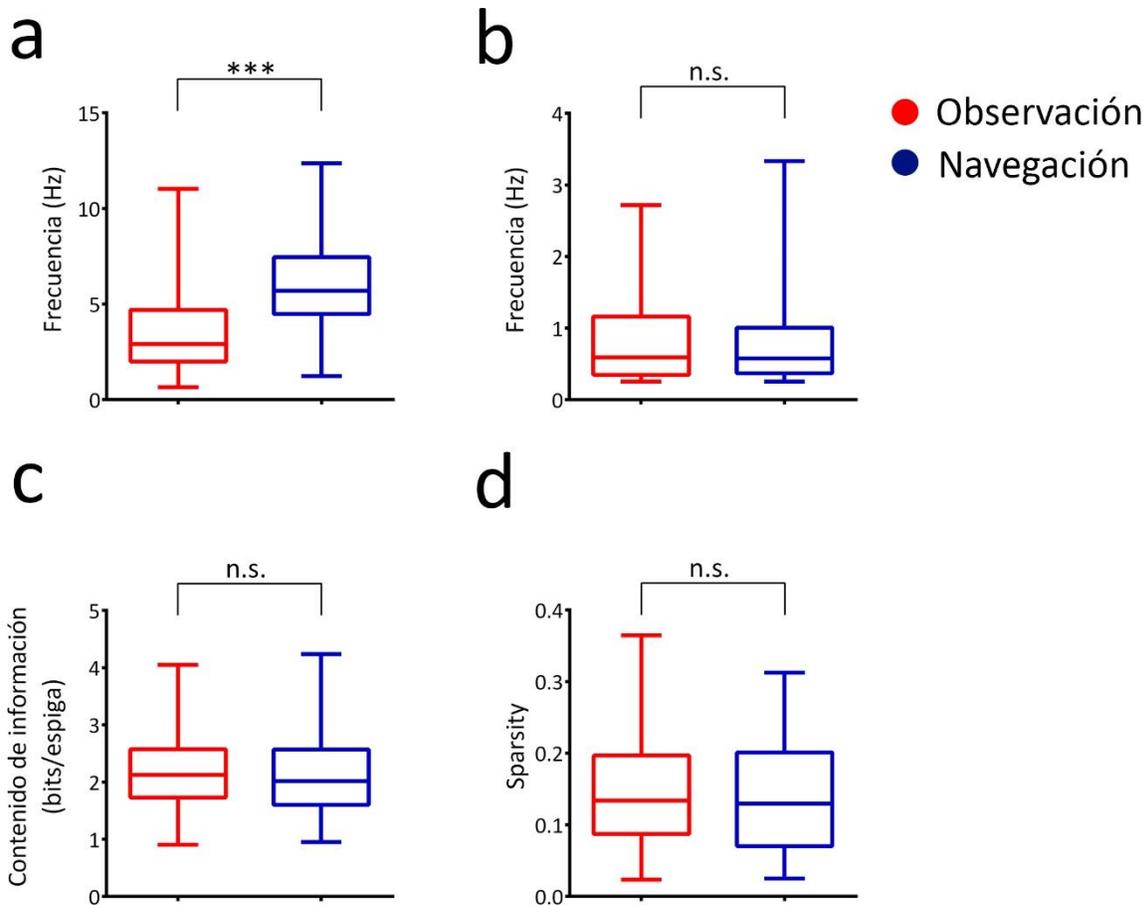


**Figura 28.** Comparación de la proporción de neuronas que generan representaciones espaciales con uno o más *place fields*, sobre el total de OPCs (izquierda) o *place cells* (derecha) por sesión experimental (n=9 sesiones en ambos casos). En negro, porcentaje de neuronas con 1 (negro), 2 (gris) o más de dos *place fields* (blanco). No encontramos diferencias significativas en la comparación entre las sesiones de observación vs navegación en ninguna de las tres categorías entre OPC y *place cells*, calculado con test t de *Student* para cada categoría.

Encontramos 84 unidades con características de *place cells* (26% del total de piramidales). Algunos ejemplos de estas *place cells* se muestran en la figura 27.

Para evaluar si las OPC (n=62) compartían características de *place cells* (n=84) comparamos la proporción de neuronas que presentaron uno, dos o más de dos *place fields* en su representación espacial (figura 28). Más de un 40% de OPC y de *place cells* mostraron mapas de frecuencia con un único *place field*, ~35% con dos *place fields*, y casi un 24% de las OPC y un 15% de las *place cells* mostraron más de dos *place fields* por mapa. No encontramos diferencias en la proporción de *place fields* por mapa espacial (1, 2 o >2) entre OPCs y *place cells* (p=0.33 OPC vs PC, 1 *place field*; p=0.84 OPC vs PC, 2 *place fields*; p=0.32 OPC vs PC, >2 *place fields*, test t de *Student* en cada caso).

También utilizamos parámetros de frecuencia de descarga, contenido de información y dispersión del *place field* (*sparsity*) para evaluar la similitud entre la actividad de las



**Figura 29.** Características de OPC y PC. Comparación de la frecuencia máxima (a), frecuencia promedio. (b). Índice de información espacial y dispersión (*sparsity*), durante la observación (actividad OPC) y navegación (actividad PC). \*\*\* $p < 0.001$ , n.s. = no significativo, calculado usando test de rangos de Mann-Whitney.

OPC y la actividad de las *place cells*. La frecuencia máxima alcanzada durante la observación fue significativamente menor que durante la navegación ( $3.6 \pm 0.29$  Hz OPC,  $6.1 \pm 0.26$  Hz PC, media  $\pm$  sem;  $p < 0.001$ ). No encontramos diferencias en las frecuencias medias de descarga ( $0.79 \pm 0.07$  Hz OPC,  $0.76 \pm 0.06$  Hz PC,  $p = 0.95$ ), ni en los índices de contenido de información ( $2.24 \pm 0.08$  (bits/espiga) OPC,  $2.16 \pm 0.08$  (bits/espiga) PC,  $p = 0.38$ ), ni en la dispersión del *place field* ( $0.14 \pm 0.009$  OPC,  $0.14 \pm 0.007$  PC,  $p = 0.57$ ). Todas las comparaciones fueron realizadas usando el test de rangos de Mann-Whitney (figura 29).

Estos resultados indican que la actividad neuronal al observar es comparable a la actividad neuronal al navegar, ya que tanto la frecuencia media, el contenido de información y el *sparsity* son indistinguibles al observar y al resolver la tarea. Sólo la frecuencia máxima de descarga en el centro del *place field* es menor en el animal observador. Es decir, el animal observador es capaz de generar una representación propia de la posición del animal demostrador, a través de actividad tipo *place cells* en la región CA1 del hipocampo.

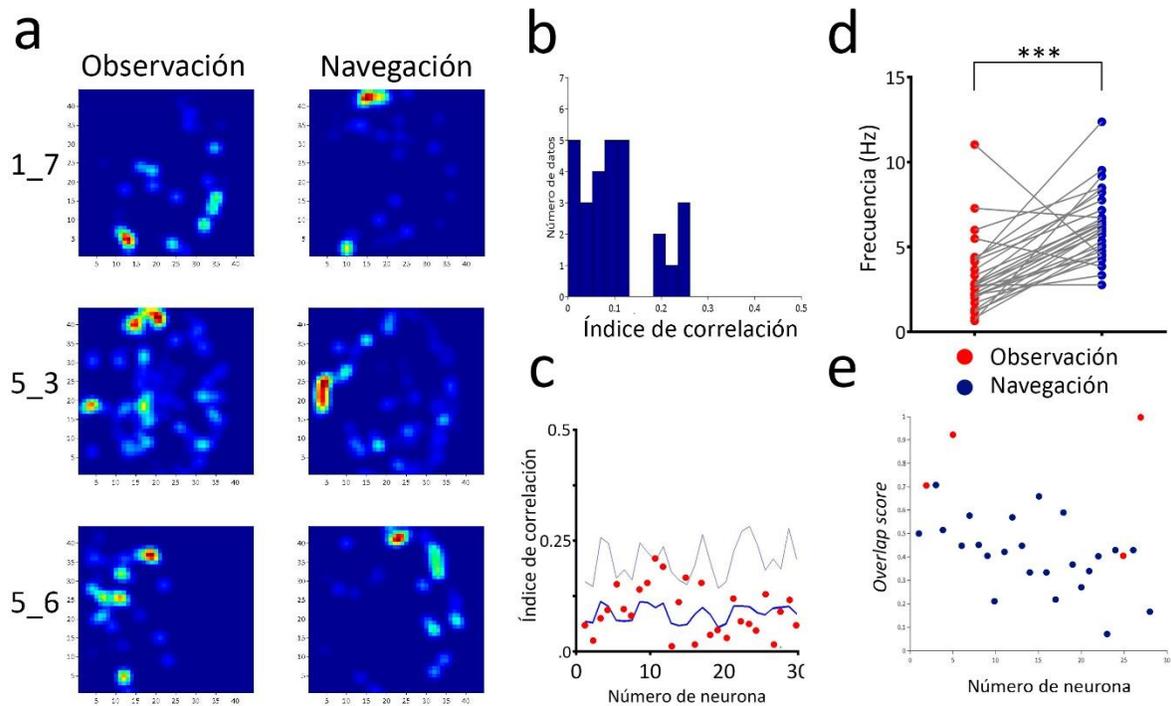
#### *Caracterización y relación entre los place fields durante observación y navegación*

Para determinar la posible relación entre los mapas espaciales generados durante la observación y la navegación, evaluamos la presencia de neuronas que se comportasen OPC y *place cells* en una misma sesión experimental. Identificamos 29 unidades con estas características (46,7% de total de OPCs). Esto indica que casi la mitad de las neuronas que codifican la posición de un congénere participan también de la codificación del espacio recorrido por el propio animal. En adelante las llamaremos *common cells*, es decir son comunes a ambas condiciones.

Comparamos los mapas de frecuencia generados durante la observación y durante la navegación. Para ello estimamos la correlación espacial entre dichos mapas usando el índice de Pearson, para cada *common cell* (figura 30a). El detalle de este análisis se indicó en la sección *Métodos*.

Encontramos bajos valores de correlación entre los mapas de observación y navegación, con una media de  $0.1 \pm 0.01$  (r de Pearson) y una distribución sesgada hacia valores bajos de correlación, como se muestra en la figura 30b. Esto sugiere que la ubicación de los *place fields* cambia entre las dos etapas de la tarea y que por tanto la representación al observar es diferente de la representación en la arena del *oasis maze* (figura 30b).

Para corroborar esto, calculamos la correlación entre los mapas obtenidos durante la observación y navegación de neuronas distintas. Este procedimiento nos permitió obtener los valores de correlación de mapas completamente independientes entre sí



**Figura 30.** Estimación de remapeo espacial y de frecuencia de descarga. (a). Mapas de frecuencia de tres *common cells* durante observación y navegación (izquierda y derecha, respectivamente). Las frecuencias están normalizadas en el rango [0:1], de modo que los colores más cálidos representen mayores frecuencias. (b). Histograma del índice de correlación de Pearson entre los mapas espaciales. La mayor parte de los datos se agrupa en torno a 0. (c). El índice de correlación de cada *common cell* (puntos rojos) fue comparado con el índice de correlación aleatorizado entre dicha neurona y todas las otras *common cells*. El índice de correlación aleatorizado se muestra como media + 2 desviaciones estándar, donde establecimos el umbral de estabilidad (trazo azul grueso = media, trazo azul delgado = umbral). (d). Comparación de las frecuencias máximas de descarga de las *common cells*. \*\*\* $p < 0.001$  test de rangos de Wilcoxon. (e). *Overlap score* de la frecuencia máxima de descarga de cada *common cell*. Valores cercanos a 1 indican que no existió *rate remapping*, mientras que valores cercanos a 0, lo contrario. El color de los círculos representa la sesión en que la frecuencia máxima fue mayor: rojo durante observación, azul durante navegación.

(ya que fueron generados por neuronas distintas, provenientes además de sesiones experimentales y animales distintos), y por lo tanto lo consideramos como el umbral que define el remapeo global (Fyhn y cols., 2007, Geva-Sagiv y cols., 2016). Tan sólo una sobre las 29 *common cell* totales mostró un índice de correlación espacial mayor que el umbral de remapeo global, lo que refuerza la idea de que no existe relación

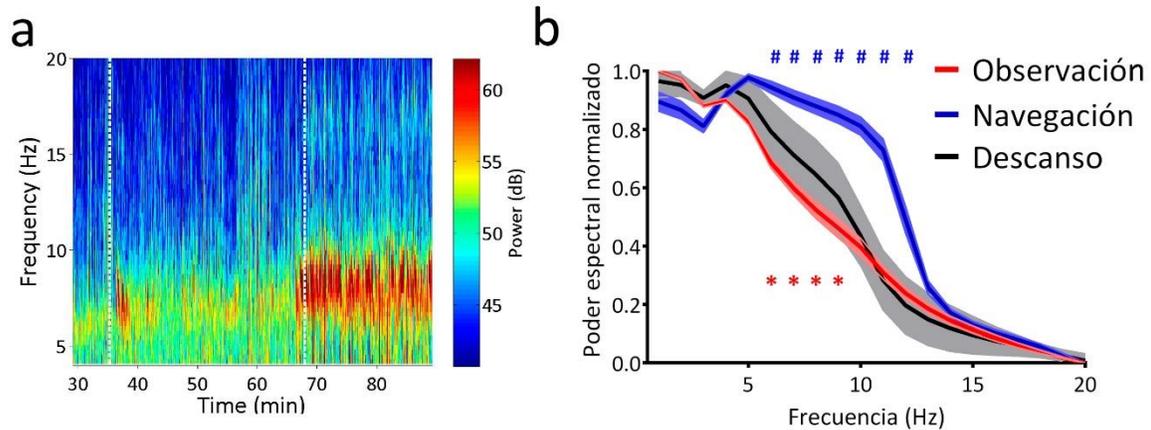
entre los mapas espaciales durante la observación y la navegación o, dicho de otro modo, las representaciones en cada condición son completamente independientes.

Finalmente, comprobamos que la diferencia de las frecuencias máximas al centro del *place field* entre OPC y *place cells* se mantienen en las *common cells*, ya que durante las sesiones de navegación la frecuencia máxima es mayor que durante la observación ( $p < 0.001$  test pareado de rangos de Wilcoxon, figura 30d). Calculamos también el índice de remapeo de la frecuencia máxima de descarga (*rate remapping*) utilizando el *overlap score* (figura 30e, detalles del *overlap score* en Métodos), lo que nos muestra una distribución centrada en  $0.39 \pm 0.03$  y con solo dos valores cercanos a uno. Estos resultados indican que la frecuencia máxima de descarga también cambia entre la observación y la navegación, incrementándose cuando el animal pasa de representar la posición de un congénere a representar la posición propia en el *maze*.

### **Poder espectral en banda theta.**

Dada la estrecha relación entre las *place cells* y la oscilación de campo en el rango theta (4-12 Hz en ratas; Colgin, 2016), evaluamos el poder espectral del LFP en este rango en tres periodos: descanso previo a comenzar la observación, observación y navegación. En la figura 31a mostramos la carta tiempo-frecuencia en el rango 0-20 Hz para toda la tarea (esto es, considerando los tres periodos).

Calculamos el poder espectral en dicho rango y evaluamos, mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de comparaciones múltiples de Sidak, cambios estadísticos dentro del rango theta (4-12Hz) entre las tres etapas de la tarea (descanso, observación, navegación). Encontramos un importante incremento en el poder espectral en el rango 6-12 Hz durante los periodos de navegación que no se presenta durante la observación ni en los periodos de descanso y que corresponde al prominente ritmo theta asociado a la ambulación. Además, encontramos un pequeño descenso del poder espectral entre los 6-9 Hz durante las sesiones de observación, comparado con el descanso previo (figura 31b).



**Figura 31.** Poder espectral en la banda theta. (a) Ejemplo de un espectrograma durante la tarea de observación. Las líneas punteadas blancas verticales indican la transición desde descanso pre tarea → observación → navegación. En el último tercio se observa un aumento del poder entre 5-10 Hz (ritmo theta), que coincide con los periodos de navegación del animal. (b). Poder espectral sobre el rango de frecuencias 0-20 Hz para los tres episodios de la tarea. #  $p < 0.001$  Navegación vs Descanso; \*  $p < 0.05$  Observación vs Descanso, ANOVA de dos vías y test posthoc de comparaciones múltiples de Sidak.

Este resultado indica que las sesiones de observación no están asociadas a un aumento de poder espectral en ritmo theta, que aparece cuando el animal resuelve activamente el *oasis maze*. Esto sugiere entonces que la dinámica neuronal que subyace la codificación de congéneres no está coordinada por esta oscilación, lo que no descarta que otros mecanismos o ritmos endógenos puedan participar de este proceso.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El aprendizaje observacional representa una de las estrategias de transferencia de información social más importantes y está ampliamente expresada en el mundo animal. Sin embargo, hoy en día disponemos de escasa evidencia de las bases neurofisiológicas que sustentan este fenómeno. En el presente trabajo evaluamos el papel del hipocampo en el aprendizaje observacional de tareas de navegación espacial, con particular interés en determinar si la actividad tipo *place cells*, que juega un papel esencial en el aprendizaje individual de tareas de navegación espacial al codificar la posición ocupada por el animal en un determinado ambiente, permite también codificar la posición de un congénere, y con ello, viabiliza el establecimiento del aprendizaje observacional.

A través de los distintos experimentos presentados hemos recopilado evidencia que apoya la hipótesis de la investigación, esto es: que un mapa espacial generado en representación de la posición de un congénere, a través de actividad tipo *place cells*, subyace al aprendizaje observacional en tareas de navegación espacial.

Por una parte, generamos una tarea original para evaluar este tipo de aprendizaje en ratas, la cual nos permitió determinar las condiciones precisas bajo las cuales se confirma dicho aprendizaje, es decir, solamente cuando los animales demostradores están altamente pre-entrenados en la tarea.

Posterior a ello, determinamos que el aprendizaje es altamente dependiente de la funcionalidad hipocampal, ya que la inactivación reversible mediante un bloqueador de canales de sodio voltaje dependientes aplicado directamente en la región CA1, impidió el establecimiento del aprendizaje demostrado antes.

Finalmente, mediante el registro de la actividad neuronal *in vivo* mostramos que algunas neuronas principales del hipocampo codifican la posición del animal demostrador durante los episodios de observación, las que llamamos *Observational place-cells*. Algunas de ellas presentan además actividad tipo *place cells* cuando el animal observador pasa a resolver la tarea. Interesantemente, la codificación de la posición del congénere es diferente de la codificación de la ubicación propia, ya que

que tanto el espacio representado por los *place fields* como las frecuencias de descarga son distintos entre las dos etapas de la tarea.

Postulamos que dichos mapas cognitivos generados en el hipocampo del observador serían parte del circuito que subyace la capacidad de estos animales de desempeñarse mejor en el *oasis maze*, incluso siendo la primera vez que se exponen a dicho ambiente y a dicha tarea.

A nivel conductual, los animales que observan congéneres pre-entrenados en el *oasis maze* son capaces de resolver más de la mitad de los ensayos de la tarea y mejoran en todas las variables conductuales medidas. Esto no ocurre cuando los animales observan congéneres no entrenados, que no son capaces de resolver la tarea en forma eficiente.

Cuando miramos detenidamente la progresión de la conducta en la tarea, medida con las variables razón de distancia, latencia y número de errores, observamos que entre los demostradores el aprendizaje sólo se confirma en los animales pre-entrenados, y no en los no pre-entrenados, lo que confirma la necesidad del pre-entrenamiento para desarrollar la tarea y descarta la posibilidad de que los animales la resuelvan por instinto.

El pre-entrenamiento es un periodo de habituación a la arena del *oasis maze* así como a la clave visual proximal que este contiene. Pero más importante, es el momento en que los animales pueden asociar la presencia de pocillos con la probabilidad de encontrar una recompensa. Sin embargo, los animales son ciegos respecto a la ubicación que tendrá el pocillo recompensado el día del test y a la duración de cada ensayo. Ambas características de la tarea son reveladas a todos los animales durante la progresión de la misma. Por lo tanto, la mejora conductual del grupo pre-entrenado responde directamente a la asociación pocillo-recompensa, y no puede ser adquirida en forma innata durante el desarrollo de la tarea, sino que debe ser adquirida previamente.

El resultado de la tasa de éxito sugiere que la información obtenida por la observación de demostradores expertos no es equivalente al periodo de pre-entrenamiento, ya que

los observadores muestran una tasa de éxito intermedia entre quienes no aprendieron y los expertos (figura 11). Es más, la probabilidad de encontrar el pocillo recompensado del grupo de animales observadores de un pre-entrenado muestra claramente que este grupo tuvo un mejor rendimiento que los grupos no pre-entrenado, observador de no pre-entrenado y control plataforma, pero no igualó el rendimiento de los animales pre-entrenados (figura 11b). Esto es esperable ya que la observación no es comparable con el periodo de pre-entrenamiento: en la segunda la asociación pocillo-recompensa es explícita, mientras que en la primera no. Por lo mismo creemos que esta mejora en la cantidad de pocillos recompensado visitados por el observador reviste una evidencia fundamental para aseverar que estos animales aprenden a partir de la experiencia del congénere entrenado.

Al mirar ahora la progresión de la conducta cuando los animales observadores resolvieron el *oasis maze* (después de mirar distintos demostradores), vemos que sólo aquellos que observaron a un demostrador experto mejoraron en los parámetros de razón de distancias y latencia (figuras 12 y 13). No encontramos diferencias entre los animales que observaron a congénere no pre-entrenados o que simplemente no observaron ningún demostrador. Este hallazgo es de particular interés, pues indica una transferencia efectiva de información entre dos animales que interactúan indirectamente. El animal pre-entrenado posee información que el animal no pre-entrenado no posee, y es esta información la que permite a los observadores naïve mejorar posteriormente su desempeño. Además, este resultado va en concordancia con diversos trabajos de aprendizaje observacional, en los cuales se ha demostrado que los animales no mejoran su desempeño en ausencia de un demostrador, o con demostradores sedados (inactivos) o robotizados (Zantall y Levine, 1972, Twining y cols., 2017, Terrazas y cols., 2005, Mou y Ji, 2016).

Los animales observadores de un pre-entrenado mostraron un nivel intermedio de número de errores, entre los pre-entrenados y los no pre-entrenados (figura 14a), no observamos una mejora progresiva de este parámetro a lo largo de la tarea (figura 14b), lo que reafirma que la conducta de los observadores no es equivalente a la de los pre-entrenados en cuanto a que no forrajeen en varios pocillos hasta encontrar el

recompensado, sino que más bien visitan sistemáticamente pocos pocillos, y aún así pueden encontrar el recompensado en más de la mitad de los ensayos.

Si bien puede resultar contra-intuitivo que los animales con mejor desempeño en la tarea (pre-entrenados y observadores de pre-entrenado) muestren la mayor cantidad de errores promedio, esto se explica por el hecho de que los animales que no aprenden básicamente no exploran el interior de casi ningún pocillo durante toda la tarea, mientras que los animales de mejor desempeño se equivocan más y por lo mismo aumentan su rendimiento en la tarea (para tener éxito también hay que equivocarse).

El análisis de las curvas de rendimiento y la progresión de la conducta muestra también diferencias entre los demostradores pre-entrenados y los observadores. Mientras los tres parámetros evaluados (razón de distancias, latencia y número de errores) muestran dinámicas similares en los animales pre-entrenados, en los animales observadores se muestran más bien distanciadas entre sí. La progresión de la razón de distancias y la latencia no mostraron diferencias significativas en cuanto a la pendiente de la regresión lineal, pero el intercepto de la recta fue consistentemente mayor para los observadores, lo que indica una conducta menos eficiente al iniciar la tarea comparado con los demostradores (figura 15 y tabla A9). Nuevamente, este análisis da sustento a la idea de que la observación representa una ventaja considerable para el aprendizaje, pero no reemplaza al entrenamiento previo de los animales. Dado que no observamos una progresión del número de errores de los observadores de un pre-entrenado, es esperable que las regresiones lineales de este parámetro fuesen distintas tanto en la pendiente como el intercepto.

A nivel conceptual, los resultados conductuales refuerzan la idea de que nuestro paradigma es apropiado para medir aprendizaje propiamente tal y no una conducta que refleja un aumento del estado de alerta por la cercanía de un congénere. Particularmente, nos permite descartar que las mejoras conductuales se deban simplemente a la presencia de un congénere debajo de la plataforma donde se encuentra el observador. La presencia de este congénere podría llevar a que el observador incremente su atención sobre ciertos lugares del ambiente (como las cercanías del pocillo recompensado), pero sin necesitar involucrarse en la tarea

desarrollada por el demostrador, es decir, a través de *local enhancement* (Galef, 1988; Mou y Ji, 2016).

Así, podemos concluir que desarrollamos una tarea original para evaluar capacidad de navegación espacial y aprendizaje observacional, la que develó que los roedores pueden aprender por observación de demostradores expertos en la resolución de tareas de navegación espacial (figuras 10-12).

La inyección intrahipocampal de un bloqueador reversible de la actividad neuronal justo antes de comenzar la tarea reveló que el aprendizaje observacional es altamente dependiente de la función hipocampal, ya que los animales que recibieron una pequeña dosis de bupivacaína mostraron una caída de la tasa de éxito a niveles indistinguibles de los animales no pre-entrenados (tabla A12), mientras que aquellos que recibieron solución salina replicaron los resultados de los observadores de un pre-entrenado, es decir, demostraron un efectivo aprendizaje observacional (figura 18). La progresión de la razón de distancias y latencia confirma la idea de que la inactivación hipocampal es suficiente para interrumpir el aprendizaje observacional. Nuevamente, el grupo de animales inyectados con solución salina muestran una curva de pendiente negativa que denota el aprendizaje, mientras que aquellos que fueron inyectados con la droga, no muestran ninguna correlación entre las variables y la progresión de la tarea. Los animales del grupo control, en tanto, mostraron una alta tasa de éxito y una disminución progresiva de la razón de distancia y la latencia, tal como los animales pre-entrenados del experimento anterior.

En cuanto al número de errores también replicamos los resultados vistos en el experimento conductual: tanto los animales inyectados con solución salina como con bupivacaína no mostraron una progresión de este parámetro, al igual que los animales observadores de pre-entrenado y no pre-entrenados del primer experimento. Los animales del grupo control, en tanto, si mostraron dicha disminución, lo que indica que las estrategias de navegación que dan cuenta del aprendizaje son robustas y reproducibles (figura 21).

El resultado de los animales inyectados con solución salina muestra que a pesar de que el procedimiento quirúrgico de implante de cánulas generó daño en el tejido

cerebral, los animales siguen desplegando la conducta de aprendizaje mostrada en el primer experimento. Esto da fuerza a la idea de que es específicamente la inhibición de la actividad neuronal hipocampal la que da cuenta del cambio conductual observado, y no un daño tisular o alteraciones de la red hipocampal asociadas a los implantes más que al fármaco inyectado.

Adicionalmente, el resultado de los animales del grupo control muestra que 40 minutos post inyección de bupivacaína los animales son capaces de resolver el *oasis maze*, sin mostrar efectos sobre las capacidades de orientación espacial o locomoción. Dado que el periodo de observación es de ~40 minutos, este resultado indica que la caída conductual asociada a la inyección del anestésico no se debe a una disfunción hipocampal remanente de la droga que impacte en la conducta, sino que se trata de la conducta de un animal que no aprendió tras la observación.

Así, con ambos controles, presentamos evidencia de que la inactivación hipocampal durante el periodo de observación es suficiente para impedir el aprendizaje observacional. Dicho de otro modo, esta evidencia muestra que el hipocampo es una pieza clave del circuito cerebral que subyace a la capacidad de adquirir información a partir de la conducta de congéneres. Su inactivación durante la etapa de observación provoca que los animales se comporten como si nunca hubiesen observado a un congénere experto (figuras 14-17).

Evaluamos la idea de que el hipocampo del observador podía codificar la posición del congénere durante el *oasis maze*. Esto podría entregar información al observador respecto de un lugar que aún no ha visitado, particularmente en nuestro caso, las trayectorias seguidas por el demostrador para resolver la tarea. Para ello, alineamos los trenes de descarga de cada neurona con la posición que ocupaba el demostrador en el arena, e identificamos las neuronas que presentaban un contenido de información mayor al esperado por azar, y que aumentaban su frecuencia de descargas durante la observación (~20% del total de neuronas piramidales).

La existencia de este tipo de actividad neuronal sugiere que el hipocampo del observador es capaz de codificar la posición del congénere a través de actividad tipo *place cells*. La proporción de OPC encontradas sobre el total de neuronas piramidales

registradas es un poco más baja que la proporción de *place cells* descritas clásicamente en la literatura (por ejemplo, Jung y cols., 1994 reportan un 45% de *place cells* sobre el total de neuronas piramidales). Creemos que este bajo porcentaje puede explicarse por la escasa información sensorial que dispone el animal observador, y la ausencia de locomoción, lo que limita la cantidad de *inputs* sensoriales que llegan desde la EC y que pueden colaborar en la codificación espacial. Así, aunque la cantidad de información sensorial sea limitada, probablemente la atención que genera la presencia del congénere en la arena bajo la plataforma colabora también en la codificación hipocampal.

A nivel conductual, los observadores conectados al sistema de registro no demostraron un aprendizaje similar al encontrado en los experimentos conductual y farmacológico, a juzgar tanto por la ambigüedad de la tasa de éxito, y la correlación de la razón de distancias y de la latencia, con el progreso de la tarea (figura 23a-c). Estos resultados, sin embargo, puede estar plenamente respaldado por el hecho de que esta tarea fue la primera experiencia de dicho animal con el peso y la inestabilidad que genera el sistema de registro *in vivo*. La única experiencia previa del animal conectado a este sistema ocurrió justo antes de explorar el *oasis maze*, durante el periodo de observación, en el cual el animal no requiere desplazarse activamente. Aún más, la disminución progresiva del número de errores (no encontrada ni en los observadores de un pre-entrenado ni en los animales inyectados con solución salina), sugiere que efectivamente los animales disminuían la visita a cualquier pocillo dentro del *oasis maze*, ya que no es concordante con el resto de los parámetros de aprendizaje (a diferencia de los experimentos conductual y farmacológico, donde los grupos pre-entrenados y control mostraban esta misma disminución). Esta disminución progresiva se puede interpretar como una menor conducta exploratoria asociada a las condiciones experimentales, pero no permite descartar la capacidad de los animales para aprender a partir de la observación. Más bien, resulta ilustrativa de la precaución con la que debe interpretarse este parámetro conductual, como se menciona en la sección *Métodos*.

A diferencia de lo reportado por Mou y Ji (2016), nuestros análisis muestran que el observador si genera representaciones de las trayectorias del congénere. Creemos que detrás de esta diferencia está la naturaleza distinta de la tarea usada en cada estudio. Mientras Mou y Ji evalúan la actividad hipocampal en el animal que observa a otro moverse por una pista lineal, nosotros lo hacemos en una arena bidimensional, lo que agrega complejidad a la conducta. Demostramos, además, que el animal experto es fundamental para que se confirme el aprendizaje, lo que marca otra diferencia con el protocolo de Mou y Ji, a quienes les basta con un demostrador (entrenado o naïve) para que la actividad cruzada (*cross activation*, es decir actividad en la caja de observación y en la pista) se confirme. En cambio, nuestro protocolo requiere específicamente de un demostrador experto en la resolución de la tarea, de modo que el observador debe entender el sentido de la navegación orientada a metas del demostrador. Es este proceso fundamental el que estaría siendo codificado por las OPC: la navegación orientada a metas del demostrador. Dicho proceso no es observable en el paradigma de Mou y Ji (porque la tarea es muy sencilla, el demostrador sólo debe ir adelante y atrás por una recompensa) y podría estar detrás de la ausencia de codificación de la posición del demostrador en el hipocampo del observador.

No encontramos diferencias en el porcentaje de neuronas que presentaban uno o múltiples *place fields* en sus mapas de frecuencia entre las OPC y las *place cells*, lo que indica que la calidad de la representación de parte de las OPC es idéntica a la de las *place cells* reales (figura 28). Interesantemente, la proporción de *place cells* durante la navegación que muestran un único *place field* fue mayor que lo reportado para arenas del tamaño del oasis maze (~50% vs 11% reportado en Fenton y cols., 2008). Este aumento podría estar dado por la experiencia de la observación y/o por la activación de las OPCs previo a la experiencia de resolver el *oasis maze*.

En cuanto a la comparación de las frecuencias máxima y media entre OPC y *place cells*, mientras la media de descargas se mantuvo igual en los dos periodos, la frecuencia máxima (al centro del *place field*) fue significativamente menor durante la observación comparado con la navegación. Esto indica que, en promedio, descargaron

el mismo número de potenciales de acción, pero durante la navegación dichos potenciales de acción se agruparon en torno al *place field* (incrementando la frecuencia máxima del centro de éste), mientras que durante la observación éstos se distribuyeron sobre el resto de trayectorias, haciendo que el máximo al centro del *place field* haya sido menor.

A pesar de que esto podría impactar en la calidad de los *place fields* (y por tanto, de la codificación espacial) el contenido de información y el parámetro de *sparsity* fueron idénticos en las dos condiciones, lo que sugiere que las OPC pueden predecir la posición ocupada por el demostrador tal como lo predicen las *place cells* y que sus *place fields* son igual de difusos en la dimensión espacial cuando el animal observa y cuando navega.

Con todo, a partir de estos resultados concluimos que los observadores son capaces de codificar la posición de un congénere mediante mecanismos de *place cells* preservando la calidad de los *place fields* en cada mapa de frecuencias, manteniendo el contenido de información y la dispersión del *place field*, pero con una menor frecuencia máxima en el centro de este.

De las 62 OPC registradas, 29 unidades mostraron además actividad *place cells* durante las sesiones de navegación. La existencia de neuronas que codifican tanto el espacio de otros como el espacio propio sugiere que los mapas cognitivos generados en las dos condiciones podrían interactuar o modularse. La existencia de *common cells* sugiere que la dinámica hipocampal durante la observación podría estar influyendo en la dinámica generada durante la navegación, de modo tal que resulta clave para facilitar o permitir el aprendizaje observacional.

Esto podría estar dado por dos mecanismos: por una parte, la estabilidad del mapa espacial generado en representación del congénere podría facilitar la orientación del observador en los episodios de navegación. La mejora en los parámetros conductuales de aprendizaje indica que el observador es capaz de orientarse igual que el pre-entrenado, pero no ha tenido la posibilidad de asociar la presencia de pocillos en la arena, con la recompensa. La falta de esta asociación se evidencia en la menor tasa de éxito comparado con los animales pre-entrenados. Así, el observador es capaz de

generar un mapa cognitivo de un lugar en el que no ha estado, y luego replicar dicho mapa cognitivo cuando efectivamente visita ese lugar, explicando la conducta descrita antes. De este modo, es capaz de orientarse, pero demora un par de ensayos en encontrar la relación 'posición-pocillo-recompensa'. Este mecanismo implicaría que el mapa cognitivo se mantiene estable entre la sesión de observación y la de navegación.

Por otra parte, sabemos que 'mirar' no es lo mismo que 'hacer', y que las perspectivas internas son muy diferentes cuando se 'está' en un lugar a cuando se 'observa' dicho lugar (Terrazas y cols., 2005; Aghajan y cols., 2014), por lo que el cambio de observación a navegación podría conllevar también al fenómeno de remapeo, es decir, a la representación de dos mapas espaciales distintos que representan ambientes con características distintas, entre el mapa cognitivo generado en representación del congénere y aquél generado para sí mismo. De este modo, la relación con el aprendizaje no parece tan obvia, ya que el animal observador simplemente cambia de mapa espacial. Pero que los mapas cognitivos sean distintos no implica necesariamente que los lugares sean completamente desconocidos. El bloqueo farmacológico de la actividad hipocampal indica que esta representación previa es clave en la adquisición del aprendizaje, por lo que, aunque los mapas cognitivos representen lugares distintos, esta representación de un lugar no visitado pero ya representado en el hipocampo, facilita la orientación del observador en su primera experiencia a dicho lugar, aun cuando genere una representación distinta. De ser así, el hipocampo sería capaz entonces de representar lugares no visitados, pero a los que el animal tiene acceso a través de los sentidos, sin necesariamente disponerse a pasar por dichos lugares. Esto porque el observador nunca ha bajado de la plataforma de observación a la arena del *oasis maze*, por lo que no puede anticipar que ocupará el espacio del demostrador. Aún así, es capaz de codificar la posición de éste y generar un mapa cognitivo correspondiente al espacio de otros.

Comprobamos que tanto la posición de los *place fields* como las frecuencias máximas cambian en las mismas neuronas, entre la observación y la navegación, indicando que ocurre un remapeo global (Leutgeb y cols., 2005, Fyhn y cols., 2007) entre la codificación espacial de las posiciones ocupadas por el congénere y las que ocupa el

animal mismo (figura 30). Los mapas de descarga no mostraron relación espacial, medidos por índice de correlación y comparándolos con el remapeo entre neuronas independientes (figura 30b y c). La tasa de descarga máxima durante la observación fue consistentemente menor que durante la navegación (sólo 4/29 neuronas presentan frecuencias mayores durante la observación) y la distribución de *overlapping scores* mostró una media  $\sim 0.5$ , con sólo dos neuronas que mantuvieron su tasa de descarga cerca de 1 (figura 30 d y e). Estos resultados dan soporte a la idea de que el hipocampo genera representaciones independientes al observar y al navegar.

En cuanto a las oscilaciones de campo local (LFP), el análisis del poder espectral en el rango theta no mostró aumentos sobre el poder durante el descanso previo o posterior a la observación (figura 31). Esto sugiere que la actividad de las OPC no se coordina con dicha oscilación. Si bien se ha documentado la existencia de actividad tipo *place cells* al bloquear la generación de la oscilación theta (Brandon y cols., 2014), y que el movimiento pasivo genera un desacoplamiento de la relación espiga-fase de la onda theta (Terrazas y cols., 2005), trabajos en primates muestran que cuando éstos resuelven un laberinto virtual, la precesión de fase se mantiene intacta (Aghajian y cols., 2014). Esto indica que la oscilación theta no es necesaria para la actividad *place cells*, pero probablemente facilita la actividad secuencial de *place cells* a través de las *theta sequences* (Colgin 2016), y con ello la codificación espacial y la consolidación de dichos trazos de memoria en el sueño posterior a la tarea (Wang y cols., 2015).

¿Qué mecanismo podría estar detrás de esta actividad neuronal?

La actividad de las neuronas principales de CA1 es modulada por las aferencias tanto de CA3 a través de las colaterales de Schaffer (es decir, de la vía clásica, que comienza en la corteza entorrinal), por las neuronas ubicadas en la capa III de la corteza entorrinal lateral que envían sus axones directamente a CA1, y por las neuronas ubicadas en CA2 que también hacen sinapsis directas con CA1 (Van-Strien y cols., 2009; Valdés y Torrealba, 2008; Dudek y cols., 2016). La información espacial es principalmente incorporada al circuito hipocampal a través de la vía clásica, particularmente la información codificada por las *grid cells* (McNaughton y cols., 2006), mientras que la información codificada por las neuronas de la LEC es de tipo no

espacial, sino más bien contextual y de contenido emocional (Valdés y Torrealba, 2008). Por su parte, recientemente se ha descrito que las neuronas piramidales de CA2 participan de la codificación de congéneres y de la memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014; Dudek y cols., 2016).

En el contexto de nuestra tarea, y considerando que no encontramos un aumento del ritmo theta hipocampal durante la observación, es presumible que las neuronas de CA1 no estén recibiendo el input de información espacial proveniente de la actividad de las *grid cells* desde la EC (Brandon y cols., 2014), o al menos no en la forma en que este circuito transfiere información entre la corteza y el hipocampo durante la navegación activa del animal. Así, es posible que sea la información no-espacial de la LEC y la información social codificada en CA2 la que mayormente regule la actividad de las neuronas registradas en CA1 durante la tarea de observación. Dicho de otro modo, sería la información contextual, su contenido emocional y la interacción social la que promovería la representación del congénere en el *oasis maze* por la actividad OPC. Una menor cantidad de sinapsis excitatorias, ya sea directas por la conectividad LEC-CA1 y CA2-CA1, o a través de la vía clásica, podrían también explicar la disminución de la frecuencia máxima en el centro del *place field* (figura 29a).

Por los resultados conductuales encontrados en el presente estudio sabemos que no basta con la mera presencia de un congénere para promover el aprendizaje observacional (figuras 11-14), por lo que es probable que la propia conducta dirigida a metas desplegada por el demostrador regule importantemente la actividad de las OPC en conjunto con los circuitos recién mencionados. La identificación de un circuito que codifique esta conducta dirigida a metas permitiría identificar las diferencias en la actividad hipocampal entre estos resultados y la activación cruzada de los patrones temporales de activación en CA1 (Mou y Ji, 2016), y podría explicar la emergencia de la codificación de congéneres en el hipocampo.

Finalmente, no analizamos la relación entre la codificación del congénere y la posición del pocillo recompensado. Dado que algunos trabajos relacionan la actividad de las *place cells* con la codificación del lugar donde se esconde una recompensa, una posibilidad es que los mapas generados durante la observación se alineen en las

proximidades del pocillo recompensado y dicha información luego sea utilizada por el observador para resolver la tarea.

Otra pregunta que se puede abordar con este trabajo es si el hipocampo genera la representación de congéneres a través de actividad tipo espejo. Los resultados del remapeo sugieren que no hay relación entre los mapas al observar y al navegar, por lo que no podemos aseverar que las OPC presenten actividad tipo espejo, ya que, si bien representan la codificación del congénere en el cerebro del observador, el mapa cognitivo asignado al congénere es completamente distinto al que emerge en representación del animal mismo. Por ello, más que actividad tipo espejo, nuestros hallazgos sugieren que son los mecanismos y la dinámica neuronal la que se preserva, pero en el que las *place cells* codifican lugares del espacio distinto entre una experiencia y la siguiente (el mirar vs el hacer).

Recientemente dos investigaciones refuerzan la evidencia sobre la capacidad del hipocampo de representar, mediante actividad tipo *place cells* la posición de un congénere en un ambiente conocido por el animal lo cual puede impactar en la conducta del observador (Danjo y cols., 2018, Omer y cols., 2018). En una tarea de alternancia de caminos, un animal observador debe decidir qué dirección seguir según el camino tomado previamente por un demostrador. Los autores muestran que la actividad tipo *place cells* no sólo correlaciona con la trayectoria del demostrador antes de que el observador comience la tarea, sino que muchos *place fields* resultan ser comunes a la trayectoria del demostrador y del observador (Danjo y cols., 2018).

Omer y cols. (2018) muestran algo similar pero en murciélagos, los cuales deben escoger entre dos rutas posibles para obtener una recompensa, guiados por la conducta de un demostrador. Interesantemente, este trabajo no sólo muestra que la actividad *place cells* emerge en representación de la trayectoria del demostrador, sino que es prácticamente ausente cuando el demostrador es un objeto inanimado en movimiento.

A diferencia de los trabajos mencionados, esta tesis muestra por primera vez que el animal observador no requiere conocer previamente el ambiente recorrido por el demostrador para la emergencia de la actividad tipo *place cells*. Esta sutil diferencia

puede explicar el intenso remapeo de las OPC, y la ausencia de *place fields* comunes a la representación de la posición del animal mismo y del congénere.

Con todo, concluimos que los roedores pueden aprender por observación de un demostrador experto en la resolución de una tarea de navegación espacial a través de la generación de un mapa cognitivo que representa la posición del congénere en un espacio no visitado aún por el observador. Este mapa cognitivo generado durante la observación es distinto del que se forma en representación del animal mismo. Varias hipótesis pueden desprenderse de esta conclusión y dar pie a nuevas investigaciones, por ejemplo: ¿participa también el resto de la vía de integración en la generación de este mapa cognitivo en representación de congéneres (*grid cells*, *head direction cells*, etc) ?, ¿los *place fields* generados durante la observación se almacenan como memorias de largo plazo?, ¿existe reactivación de los patrones de actividad neuronal, generada en la observación, durante el sueño?, etc.

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS**

En el marco de la presente tesis participé de las siguientes reuniones científicas mostrando parte de este trabajo:

- 1ª feria de grados académicos del Instituto de Ciencias Biomédicas. Marzo 2016. Facultad de Medicina Universidad de Chile. Santiago, Chile. En esta ocasión el trabajo fue galardonado con el 1er Premio a la mejor tesis del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

- 2º Congreso Latinoamericano de Neurociencias, FALAN. Octubre 2016. Buenos Aires, Argentina. Formato Póster

- 46ª meeting of the Society for Neurosciences. Noviembre 2016. San Diego, EE. UU.. Formato Póster.

- 13a Reunión anual de la Sociedad Chilena de Neurociencias. Octubre 2017. Castro, Chile. Formato Póster.

Además, participé del curso de verano Neural Sciences & Behavior, organizado por el Marine Biology Laboratory en Woods Hole, MA, EE. UU., entre junio y julio de 2016.

**ANEXO I: Tablas con resultados de análisis estadísticos.**

**Tabla A1.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la tasa de éxito.

<b>Variable: Tasa de éxito</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Holm-Sidak</b>				
	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Observador de pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,0001	0,006	0,71	0,51
<b>Pre-entrenado</b>		0,019	<0,0001	<0,0001
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0,006	0,039
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0,47

**Tabla A2.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la probabilidad de tasa de éxito acumulada.

<b>Variable: Probabilidad acumulada de éxito</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Holm-Sidak</b>				
	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Observador de Pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control Plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,0001	0,0006	0,78	0,63
<b>Pre-entrenado</b>		0,0025	<0,0001	<0,0001
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0,0003	0,0068
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0,58

**Tabla A3.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la razón de distancias.

<b>Variable: Razón de distancias</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Holm-Sidak</b>				
	<b>Pre- entrenado</b>	<b>Observador de pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,0001	0,003	0,93	0,37
<b>Pre-entrenado</b>		0,03	<0,0001	<0,0001
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0,007	0,021
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0,46

**Tabla A4.** Detalle del resultado de correlación y regresión lineal de cada grupo para la razón de distancias.

<b>Variable: Razón de distancias</b>				
	<b>Test: Correlación (Pearson o Spearman)</b>		<b>Regresión lineal</b>	
	<b>r / rho(*)</b>	<b>P valor</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>
<b>No pre-entrenado</b>	-0.18	0.51	-0.067	11.48
<b>Pre-entrenado</b>	-0.72	0.0024	-0.25	7.07
<b>Observador de pre- entrenado</b>	-0.67(*)	0.008	-0.29	9.74
<b>Observador de no pre- entrenado</b>	-0.03	0.92	-0.011	10.95
<b>Control plataforma</b>	0.22	0.44	0.085	9.36

**Tabla A5.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la latencia.

<b>Variable: Latencia</b>				
<b>Test: Test de rangos de Kruskal-Wallis seguido de test post hoc de Dunn</b>				
	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Observador de pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control Plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,001	0,018	0,76	0,39
<b>Pre-entrenado</b>		0,23	<0,001	0,003
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0,013	0,1
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0,27

**Tabla A6.** Detalle del resultado de correlación y regresión lineal de cada grupo para la latencia.

<b>Variable: Latencia</b>				
<b>Test: Correlación (Pearson o Spearman)</b>			<b>Regresión lineal</b>	
	<b>r / rho(*)</b>	<b>P valor</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>
<b>No pre-entrenado</b>	-0.48(*)	0.07	-0.17	59.91
<b>Pre-entrenado</b>	-0.76	0.0011	-1.47	36.94
<b>Observador de pre-entrenado</b>	-0.57	0.025	-1.12	48.85
<b>Observador de No pre-entrenado</b>	0.015	0.96	0.012	57.81
<b>Control plataforma</b>	0.24	0.39	-0.15	52.84

**Tabla A7.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para el número de errores.

<b>Variable: Número de errores</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test posthoc de Holm-Sidak</b>				
	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Observador de pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control Plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,0001	0.003	0.59	0.21
<b>Pre-entrenado</b>		0.024	<0,0001	<0,0001
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0.024	0.1
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0.48

**Tabla A8.** Detalle del resultado de correlación y regresión lineal de cada grupo para el número de errores.

<b>Variable: Número de errores</b>				
	<b>Test: Correlación (Pearson o Spearman)</b>		<b>Regresión lineal</b>	
	<b>r / rho(*)</b>	<b>P valor</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Intercepto</b>
<b>No pre-entrenado</b>	-0.037	0.89	$1.5 \cdot 10^{-3}$	0.6
<b>Pre-entrenado</b>	0.66	0.0071	-0.23	5.9
<b>Observador de pre-entrenado</b>	-0.11	0.68	-0.015	2.7
<b>Observador de no pre-entrenado</b>	-0.022	0.94	$-2.1 \cdot 10^{-3}$	0.89
<b>Control plataforma</b>	0.11	0.70	0.012	1.35

**Tabla A9.** Detalles del análisis estadístico de las regresiones lineales de cada variable normalizada.

	Test: Regresión lineal		Prueba t Student	
	Pendiente	Intercepto	P valor pendiente	P valor intercepto
<b>Variable: Razón de distancias</b>				
Pre-entrenado	$-0.015 \pm 4.6 \cdot 10^{-3}$	$0.42 \pm 0.042$	0.73	0.025
Observador de pre-entrenado	$-0.018 \pm 0.06$	$0.58 \pm 0.058$		
<b>Variable: Latencia</b>				
Pre-entrenado	$-0.025 \pm 7 \cdot 10^{-3}$	$0.62 \pm 0.064$	0.60	0.049
Observador de pre-entrenado	$-0.019 \pm 8.7 \cdot 10^{-3}$	$0.81 \pm 0.078$		
<b>Variable: Número de errores</b>				
Pre-entrenado	$-0.014 \pm 4.2 \cdot 10^{-3}$	$0.37 \pm 0.039$	$p < 0.05$	$p < 0.0001$
Observador de pre-entrenado	$-1.7 \cdot 10^{-4} \pm 0.004$	$0.17 \pm 0.031$		

**Tabla A10.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la distancia total recorrida.

<b>Variable: Distancia total recorrida</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Holm-Sidak</b>				
	Pre-entrenado	Observador de pre-entrenado	Observador de no pre-entrenado	Control plataforma
No pre-entrenado	0,0014	0,55	0,99	0,99
Pre-entrenado		0,069	0,0022	<0,0001
Observador de pre-entrenado			0,55	0,48
Observador de no pre-entrenado				0,99

**Tabla A11.** Resumen de p-valores resultantes de la comparación de estadística de los distintos grupos para la velocidad promedio.

<b>Variable: Velocidad promedio</b>				
<b>Test: ANOVA de una vía seguido de test post hoc de Holm-Sidak</b>				
	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Observador de pre-entrenado</b>	<b>Observador de no pre-entrenado</b>	<b>Control plataforma</b>
<b>No pre-entrenado</b>	<0,0001	0.012	0.71	0.51
<b>Pre-entrenado</b>		0.064	<0,0001	0.0001
<b>Observador de pre-entrenado</b>			0.064	0.14
<b>Observador de no pre-entrenado</b>				0.69

**Tabla A12.** P-valor asociado a la comparación estadística de la tasa de éxito de animales del experimento conductual y farmacológico. Se calcularon mediante ANOVA de una vía seguido de test posthoc de Holm-Sidak.

	<b>Bupivacaína</b>	<b>Observador pre-entrenado</b>	<b>Salino</b>	<b>Pre-entrenado</b>	<b>Control</b>
<b>No pre-entrenado</b>	0.99	0.0013	0.0017	<0.0001	<0.0001
<b>Bupivacaína</b>		0.0023	0.0028	<0.0001	<0.0001
<b>Observador pre-entrenado</b>			0.99	0.0041	0.029
<b>Salino</b>				0.0034	0.027
<b>Pre-entrenado</b>					0.82

**Tabla A13.** Resultado del análisis estadístico de las variables conductuales, en los animales registrados electrofisiológicamente durante la tarea de observación.

	<b>Tasa de éxito</b>	<b>Razón de distancias</b>	<b>Latencia (s)</b>	<b>Número de errores</b>
<b>Promedio</b>	39.52	10.15	47.56	1.9
<b>Error estándar (sem)</b>	10.35	0.64	1.75	0.24
<b>r/rho correlación</b>		-0.37	-0.20	-0.61
<b>p-valor correlación</b>		0.17	0.48	0.016

## ANEXO II: Certificado de autorización bioética de la investigación



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
COMITE DE BIOETICA SOBRE INVESTIGACION EN ANIMALES

### CERTIFICACIÓN

El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en la tesis de Investigación titulada **“Dinámica neuronal hipocampal durante el aprendizaje observacional en ratas”**, del Sr. Yerko Fuentealba, Tesista y su Patrocinante-Responsable es el **Dr. José Luis Valdés G.** del Laboratorio de aprendizaje Memoria y Neuromodulación, Programa Disciplinario de Fisiología y Biofísica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (CBA 0813 FMUCH).

Ambos investigadores se han comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **36** meses, tiempo estimado de ejecución correspondiente al Proyecto de Tesis Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Escuela de Postgrado.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 13 miembros con experiencia en bioética asociada a experimentación animal: 3 veterinarios, 8 académicos de diversas disciplinas y 2 personas ajenas a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*



**Dr. Emilio Herrera Videla**  
Presidente

*Comité de Bioética sobre Investigación en Animales*

Santiago, 19 de octubre de 2015.

---

Comité de Bioética sobre Investigación en Animales  
Facultad de Medicina – Universidad de Chile  
Avda. Independencia 1027, Independencia 8380453, Santiago, Chile  
Fono: 2 978 6923, Email: [cba@med.uchile.cl](mailto:cba@med.uchile.cl)

## REFERENCIAS

1. Abbot A., Callaway E. (2014). Nobel prize for decoding brain's sense of place. *Nature* 512: 153.
2. Agarwal G., Stevenson I.H., Berényi A., Mizuseki K., Buzsaki G., Sommer F.T. (2014). Spatially distributed local fields in the hippocampus encode rat position. *Science*. 344(6184): 626-630.
3. Aghajan Z.M., Acharya L., Moore J.J., Cushman J.D., Vuong C., Mehta M.R. (2014). Impaired spatial selectivity and intact phase precession in two-dimensional virtual reality. *Nat neurosci*
4. Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T., O'Keefe J. (2007). *The hippocampus book*. 1a edición, Oxford university press. London. UK
5. Bandura A. (1969). *Social learning theory*. General learning press, 1a Ed. NY. EEUU.
6. Brandon M.P., Koenig J., Leutgeb J.K., Leutgeb S. (2014). New and distinct hippocampal place codes are generated in a new environment during septal inactivation. *Neuron* 82:789-796
7. Burgess, N. (2006). Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends cogn sci*. 10(12): 551-557.
8. Buzsaki G. (2002). Theta oscillation in the hippocampus. *Neuron* 33(3): 325-340.
9. Buzsaki G. (2006). *Rhythms of the brain*. Oxford University Press 1st Ed.
10. Catterall W.A., Mackie K. (2012). Local anesthetics. En Goodman & Gilman, *the pharmacological basis of experimental therapeutics*. Editado por Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C. 12 edición. Mc Graw-Hill Companies Inc., New York, EEUU.
11. Colgin L.L., Moser E.I., Moser M.B. (2008). Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends neurosci*. 31(9):469-477.
12. Colgin L.L. (2016). Rhythms of the hippocampal network. *Nat rev neurosci*. 17:239-249.
13. Danjo T., Toyozumi T., Fujisawa S. (2018). Spatial representations of self and other in the hippocampus. *Science* 359:213-218.
14. Darwin C. (1871). *The descent of a man, and selection in relation to sex*. London: John Murray. 1ª edición.
15. Di Pellegrino G., Fadiga L., Fogassi L., Gallese V., Rizzolatti G. (1992). Understanding motor events: a neurophysiological study. *Exp brain res*. 91:176-180.
16. Dudek S.M., Alexandra G.M., Farris S. (2016). Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Nat rev neurosci*. 17: 89-102.

17. Dupret D., O'Neill J., Pleydell-Bouverie B., Csicsvari J. (2010). The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat neurosci.* 13(8):995-1002.
18. Etienne A.S., Jeffery K.J. (2004). Path integration in mammals. *Hippocampus* 14:180-192.
19. Fenton A.A., Kao H-Y., Neymotin S.A., Olypher A., Vayntrub Y., Lytton W.W., Ludvig N. (2008). Unmasking the CA1 ensemble place code by exposures to small and large environments: more place cells and multiple, irregularly arranged and expanded place fields in the larger space. *J neurosci.* 28(44): 11250-11262.
20. Fanselow M.S. Dong H-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron.* 65(1): 7-19.
21. Furuya Y., Matsumoto J., Hori E., Boas C.V., Tran A.H., Shimada Y., Ono T., Nishijo H. (2014). Place-related neuronal activity in the monkey parahippocampal gyrus and hippocampal formation during virtual navigation. *Hippocampus* 24:113-130.
22. Fyhn M., Hafting T., Treves A., Mosser M-B., Mosser E.I. (2007). Hippocampal remapping and grid realignment in entorhinal cortex. *Nature* 446:190-194.
23. Gabriele A., Packard M.G. (2006). Evidence of a role for multiple memory systems in behavioral extinction. *Neurobiol learn mem.* 85(3): 289-299.
24. Galef Jr., B.G. (1988). Imitation in animals: History, definitions, and interpretation of data from the psychological laboratory. En *Social learning: Psychological and biological perspectives*, editado por T. Zentall y B. G. Galef. Lawrence Erlbaum Associates, Inc. New Jersey, NJ, EE.UU.
25. Geva-Sagiv M., Romani S., Las L., Ulanovsky N. (2016). Hippocampal global remapping for different sensory modalities in flying bats. *Nat Neurosci.* 19(7): 952-958.
26. Gray C.M. Maldonado P.E., Wilson M., McNaughton B.L. (1995). Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-units recordings in cat striate cortex. *J neurosci meth.* 63:43-54.
27. Green, J. D. & Arduini, A. A. (1954). Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.* **17**, 533–557 (1954).
28. Hafting T., Fyhn M., Molden S., Moser M-B., Moser E.I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801-806.
29. Henke P.G. (1990). Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain res bull.* 25(5):691-695.
30. Heyes C.M., Dawson G.R. (1990). A demonstration of observational learning in rats using bidirectional control. *Q J exp physhol B.* 42(1): 59-71.
31. Heyes C.M. (1994). Social learning in animals: categories and mechanisms. *Biol rev Camb philos soc.* 69:207-231.

32. Heyes C.M. (1996). En '*The roots of culture*', editado por Heyes C.M., Galef B.G., 1a Ed. Academic Press, EEUU.
33. Hitti F.L., Siegelbaum S.A. (2014). The hippocampal region CA2 is essential for social memory. *Nature* 508(7494): 88-92.
34. Jeon D., Kim S., Chetana M., Jo D., Ruley H.E., Lin S.-Y., Rabah D., Kinet J.P., Shin H.S. (2010). Observational fear learning involves affective pain system and Ca<sub>v</sub> 1.2 Ca<sup>+2</sup> channels in ACC. *Nat neurosci* 13(4): 482-484
35. Jung M.W., Wiener S., McNaughton B.L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J neurosci.* 14(12): 7347-7356
36. Jurado-Parras M.T., Gruart A., Delgado-García J.M. (2012). Observational learning in mice can be prevented by medial prefrontal cortex stimulation and enhanced by nucleus accumbens stimulation. *Learn mem* 19:99-106.
37. Keller G.B., Hahnloser R.H. (2009). Neural processing of auditory feedback during vocal practice in a songbird. *Nature* 457: 187-190.
38. Kentros C.G., Agnihotri N.T., Streater S., Hawkins R.D., Kander E.R. (2004). Increased Attention to Spatial Context Increases both Place Field Stability and Spatial Memory. *Neuron* 42:283-295.
39. Kjelstrup K., Solstad T., Brun V., Hafting T., Leutgeb S., Witter M., Mosser E., Mosser M. (2008). Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* 321: 140-143.
40. Kropf E., Carmichael J.E., Moser M-B., Moser E.I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature* 523: 419-424
41. Leggio M.G., Molinari M., Neri P., Graziano A., Mandolesi L., Petrosini L. (2000). Representation of actions in rats: the role of cerebellum in learning spatial performances by observation. *Proc natl acad sci USA.* 97(5): 2320-2325.
42. Leggio M.G., Graziano A., Mandolesi L., Molinari M., Neri P., Petrosini L. (2003). A new paradigm to analyze observational learning in rats. *Brain res protoc.* 12:83-90.
43. Leutgeb S., Leutgeb J.K., Barnes C.A., Moser E.I., McNaughton B.L., Moser M-B. (2005). Independent Codes for Spatial and Episodic Memory in Hippocampal. *Science* 309: 619-623.
44. Mamad O., Stumpp L., McNamara H.M., Ramakrishnan Ch., Deisseroth K., Reilly R.B., Tsanov M. (2017). Place field assembly distributions encodes preferred locations. *PLoS Biol* 15(9): e2002365.
45. Maren S. (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning, *Annu rev neurosci.* 24:897-931.
46. McNaughton B., Barnes C., O'Keefe J. (1983). The contributions of position, direction and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp Brain Res.* 52(1): 113-119.

47. McNaughton B.L., Battaglia F.P., Jensen O., Moser E.I., Moser M.B. (2006). Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat rev neurosci.* 7:663-678
48. Mittelstaedt, M. L. y Mittelstaedt, H. (1980). Homing by path integration in a mammal. *Naturwissenschaften* 67:566–567.
49. Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.N.P., O'Keefe J.O. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
50. Moser M-B, Moser E.I., Forrest E., Andersen P., Morris R.G.M. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99: 9697-9701.
51. Moser M-B., Moser E.I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus.* 8(6):608-619.
52. Moser E.I., Kropf E., Moser M-B. (2008). Place cells, grid cells and the brain's spatial representation system. *Ann rev neurosci*31:69-89.
53. Mou X., Ji D. (2016). Social observation enhances cross-environment activation of hippocampal place cell patterns. *eLife.* 5: e18022.
54. Mukamel R., Ekstrom A.D., Kaplan J., Iacoboni M., Fried I. (2010). Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. *Curr biol.* 20:750-756.
55. O'Keefe J., Dostrovski J. (1971). The hippocampus as a spatial map. *Brain Res.* 34:171-175.
56. O'Keefe J., Nadel L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map.* Oxford University Press, UK.
57. O'Keefe J., Recce M.L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG in theta rhythm. *Hippocampus.* 3(3): 317-330.
58. Omer D., Maimon S.R., Las L., Ulanovsky N. (2018). Social place-cells in the bat hippocampus. *Science* 359: 218-224.
59. Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.* Oxford, England: Oxford Univ. Press.
60. Petrosini L., Graziano A., Mandolesi L., Neri P., Molinari M., Leggio M.G. (2003). Watch how to do it! New advances in learning by observation. *Brain res rev.* 42:252-264.
61. Petrosini L. (2007). "Do what I do" or "Do how I do": different components of imitative learning are mediated by different neural structures. *Neuroscientist.* 13:335-348.
62. Prather J.F., Peters S., Nowicki S., Mooney R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature* 451:305-310.
63. Purves D., Augustine G.J. Fitzpatrick D., Hall W.C., Lamantia A-S., McNamara J.O., Williams S.M. (2004). *Neuroscience.* 3ra Edicion. Sinauer Associates Inc. MA. EEUU.

64. Quirk, G.J., Muller, R.U. & Kubie, J.L. (1990). The firing of hippocampal place cells in the dark depends on the rat's recent experience. *J. Neurosci.* 10(6): 2008–2017
65. Raichle M.E., MacLeod A.M., Snyder A.Z., Powers W.J., Gusnard D.A., Shulman G.L. (2001). A default mode of brain function. *PNAS* 98(2): 676-682.
66. Riedel G., Micheau J., Lam A.G.M., Roloff E.v.L., Martin S.J., Bridge H., de Hoz L., Poeschel B., McCulloch J., Morris R.G.M, (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat neurosci.* 2:898-905.
67. Rizzolatti G., Craighero L. (2004). The mirror-neuron system. *Annu rev neurosci.* 27:169-19.
68. Rizzolatti G., Sinigaglia C. (2010). The functional role of the parieto-frontal mirror circuit: interpretations and misinterpretations. *Nat rev neurosci.* 11:264-274.
69. Rizzolatti G., Sinigaglia C. (2016). The mirror mechanism: a basic principle of brain function. *Nat rev neurosci.* 17:757-765
70. Romanes G.J. (1883). *Mental evolution in animals.* London K. Paul Trench & Co. UK.
71. Schacter D.L., Wagner A.D. (2012). Learning and memory. En *Principles of neural sciences*, editado por Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J. 5ta edición, McGraw-Hill Medical, Inc.
72. Shen J., Barnes C.A., McNaughton B.L., Skaggs W.E., Weaver K.L. (1997). The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *J neurosci* 17(17): 6769-6782.
73. Skaggs W.E., McNaughton B.L., Gothard K.M., Markus E.J. (1993) An information-theoretic approach to deciphering the hippocampal code, en *Advances in Neural Information Processing Systems 5*, editado por Hanson S., Cowan J., y Giles L. Morgan Kaufmann Publishers, San Mateo CA, USA, p 1030-1037.
74. Skinner B.F. (1937). Two types of conditioned reflex: a reply to Konorski and Miller. *J. gen physiol.* 16(1): 272-279.
75. Skinner BF. (1938). *The behavior of organisms.* Appleton-Century-Crofts Inc, NY, EEUU.
76. Staddon J.E.R., Cerutti D.T. (2003). *Ann rev psychol.* 54:115-144.
77. Stackman R.W., Taube J.S. (1997). Firing properties of head direction cells in the rat anterior thalamic nucleus: dependence on vestibular input. *J neurosci.* 17(11):4349-58.
78. Steinhirst A., Funke J. (2014). Mirror neuron activity is no proof for action understanding. *Front hum neurosci.* 8:333.
79. Terrazas A., Krause M., Lipa P., Gothard K.M., Barnes C.A., McNaughton B.L. (2005). Self-motion and the hippocampal spatial metric. *J neurosci* 25:8085-8096.

80. Thompson L.T., Best P.J. (1990). Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. *Brain Res* 509:299–308.
81. Thorndike, E. L. (1898). *Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals*. Psychological Monographs: General and Applied, 2(4), i-109.
82. Thorpe W.H. (1963). *Learning and instinct in animals*. 2da Edición. London Methuen. UK.
83. Tolman E.C. (1948). Cognitive maps in rats and animals. *Psychol Rev.* 55:189-208. Gallistel CR. (1990). *The organization of learning*. Cambridge, MA: Bradford Books/MIT Press.
84. Torrealba F., Valdés J.L. (2008). The parietal association cortex of the rat. *Biol Res* 41:369-377.
85. Twining R.C., Vantrease J.E., Love S., Padival M., Rosenkranz J A. (2017). An intra-amygdala circuit specifically regulates social fear learning. *Nat neurosci* 20(3): 459-469.
86. Van Gog T., Paas F., Marcus N., Ayres P., Sweller P. (2009). The mirror neuron system and observational learning: implications for the effectiveness of dynamic visualizations. *Educ psychol rev* 21:21-30.
87. Van Strien N.M., Cappaert N.L.M., Witter M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat rev Neurosci.* 10(4): 272–82.
88. Varela F., Lachaux J.P., Rodriguez E., Martinerie J. (2001). The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nat rev neurosci.* 2(4): 229-239.
89. Villalobos C., Maldonado P.E., Valdés J.L. (2017). Asynchronous ripple oscillations between left and right hippocampi during slow-wave sleep. *PLoS ONE* 12(2): e0171304.
90. Vlicek., Laczó J, (2014). Neural correlates of spatial navigation changes in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Front behave neurosci.* 8:89.
91. Wallace A.R. (1858). On the tendency of species to form varieties. *J of the Proceed of the Linnean Soc: Zoology.* 3(20 agosto): 46-50
92. Wang Y., Romani S., Lustig B., Leonardo A., Pastalkova E. (2015). Theta sequences are essential for internally generated hippocampal firing fields. *Nat neurosci.* 18(2): 282-288
93. Watson J.B. (1913). Psychology as the behaviorist views it. *Psychol Rev* 20:158-177
94. Wills T.J., Lever C., Cacucci F., Burgess N., O'Keefe J. (2005). Attractor dynamics in the hippocampal representation of the local environment. *Science* 308:873-876.
95. Winter S.S., Mehlman M.L., Clarck B.J., Taube J.S. (2015). Passive transport disrupts grid signals in the parahippocampal cortex. *Curr biol.* 25:2493-2502.
96. Witter M.P., Amaral D.G. (2004) Hippocampal formation, en *The Rat Nervious System*, editado por George Paxinos, 3ª Edición, Elsevier Academic Press, p 635-704.

97. Zentall y Levine (1972). Observational learning and social facilitation in the rat. *Science* 178: 1220-1221.
98. Zentall T.R. (1996). En '*The roots of culture*', editado por Heyes C.M., Galef B.G., 1a Ed. Academic Press, EEUU.