



DISTRIBUCIÓN DE RLN3 EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA

Trabajo Final de Grado

Grado en Medicina

Autora: Carmen Botía Martínez

Tutor: Francisco Eliseo Olucha Bordonau

Departamento: Unidad Predepartamental de Medicina

Curso 2016/17

Castellón de la Plana, Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
EXTENDED SUMMARY	3
Abreviaturas	4
INTRODUCCIÓN	5
El hipotálamo como centro organizador del metabolismo.....	5
Hipotálamo controlado por diferentes sistemas	6
Núcleo incertus y relaxin-3 como agente orexigénico.....	8
Relaxin3 y estrés.....	10
Relaxin3 y conducta alimentaria	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Fijación y sección del cerebro	12
Inmunohistoquímica para relaxina-3	12
Estudio.....	13
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIÓN	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

RESUMEN

Relaxin-3(RLN3) es un miembro de la superfamilia de la insulina. Su principal lugar de expresión es el nucleus incertus del tronco encefálico, desde donde las neuronas envían proyecciones ascendentes el mesencéfalo, hipotálamo y telencéfalo. Este neuropéptido presenta una alta afinidad por el receptor acoplado a proteína G RXFP3. Dicho receptor expresa ampliamente en diversas zonas del SNC entre las que se encuentran las zonas de proyección del nucleus incertus. Estudios previos han sugerido un importante papel de RLN3 como modulador de respuestas de estrés y control de apetito, entre otras. El objetivo de este estudio era determinar qué núcleos hipotalámicos presentan abundancia de fibras de RLN3, y poder relacionar dichos hallazgos con el posible papel de RLN3 en la modulación de las conductas alimentarias y otras funciones metabólicas. Se usaron ratas macho Wistar y un protocolo de inmunohistoquímica de marcaje inmunocitoquímico para el estudio de la distribución de RLN3 en cuatro niveles hipotalámicos. Detectamos abundancia de fibras en hipotálamo anterior (AH), lateral (LH) y posterior (PH), tres de los núcleos que se conocen implicados en el control del apetito y la saciedad, así como en núcleo dorsomedial hipotalámico, núcleo preóptico lateral LPO, núcleo paraventricular anterior y núcleo supramamilar. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la implicación de RLN3 en el control de la ingesta.

Palabras clave: relaxina-3, nucleus incertus, estrés, ingesta, hipotálamo.

ABSTRACT

Relaxin-3 (RLN3) is a neuropeptide of the insulin superfamily. It is mainly expressed in the nucleus incertus of the brainstem, from where the neurons send ascending projections towards the midbrain, hypothalamus and telencephalon. This neuropeptide displays high affinity to a G-protein coupled receptor RXFP3. This receptor is widely distributed in areas projected by the nucleus incertus. Previous studies have suggested an important role of RLN3 as a modulator of stress responses and food intake control, among others. The aim of this study was to determine which hypothalamic nuclei are targeted by RLN3 fibers, and to relate these findings to the possible role of RLN3 in the modulation of feeding behaviors. An immunohistochemistry protocol was used in male Wistar rats to study the distribution of RLN3 at four hypothalamic levels. We detected abundance of fibers in the anterior hypothalamus (AH), lateral (LH) and posterior (PH), three of the nuclei known to be involved in appetite

control and satiety, as well as dorsomedial hypothalamic nucleus, lateral preoptic nucleus (LPO), anterior paraventricular nucleus and supramammillary nucleus. These results support the idea of the involvement of ζ RLN3 in feeding control.

Key words: relaxin-3, nucleus incertus, stress, feeding, hypothalamus.

EXTENDED SUMMARY

The aim of this project was to determine which hypothalamic nuclei present abundance of RLN3 fibers, and to establish a relation between these findings and the possible role of RLN3 in the modulation of dietary behaviors.

Since its discovery, RLN3, a peptide belonging to the insulin superfamily, has been linked with stress modulation, activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HHS) and also with appetite regulation among others.

On the other hand, it is well known that the hypothalamus is one of the core centers in the control of hunger and satiety, being known as its main nuclei involved in such modulation the anterior hypothalamic area (AH), the lateral hypothalamic area (LH) and the posterior hypothalamic area (PH). Because of its huge functions, the hypothalamus is an area that displays connections with many other regions of the brain, including the amygdala and nucleus incertus. The nucleus incertus (NI), a bilateral group of large multipolar neurons in the central gray matter of the pontine tegmentum. Besides being the main source of RLN3 and the epicenter of the cerebral relaxinergic system, it is GABAergic in nature and expresses a variety of other neurotransmitters and peptides. It has also been shown the occurrence of NI projections to specific nuclei of the amygdala, consistent with a probable role for this system of putative integrative excitation in the regulation of social and emotional behaviors dependent on the amygdala.

For all previous information we decided to focus this study on the observation of the distribution and relative abundance of RLN3 fibers along the hypothalamus and its main nuclei.

Previous immunocytochemical studies observed that RLN3 expression in NI neurons increased following stress and that the central infusion of an agonist of RXFP3, the major RLN3 receptor, resulted in anxiolytic effects in adult rats. In addition, central administration of RLN3 has been shown to strongly stimulate feed in satiated rats. This effect was different in female and male rats. For example, compulsive ingestion is often stimulated by stress, and has been shown in

several studies in rats where stressing rats (BEP) showed elevated RLN3 mRNA expression when stressed. The NI and RXFP3 mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON).

In our study, male Sprague-Dawley rats and a double-label immunohistochemistry protocol were used to study the distribution of RLN3 in four hypothalamic levels (preoptic, anterior, premamillar and tuberal). We have studied, in depth, the distribution of the fibers along the main hypothalamic nuclei with the aid of a camera lucida attached to an optical microscope.

The present study demonstrates abundance of RLN3 fibers in the lateral hypothalamus, anterior and posterior hypothalamus, three of the main hypothalamic nuclei known for their role in the regulation of hunger and satiety. In addition, we have found a dense distribution of relaxin3 fibers in the hypothalamic dorsomedial nucleus (DMH), lateral preoptic nucleus (LPO), anterior paraventricular nucleus (PVA), and supramammillary nucleus. In this way, the established relationship between the RLN3/ NI system and the appetite control is reinforced.

ABREVIATURAS

5-HT, serotonina; 5HT1A, receptores de serotonina tipo 1; AgRP, péptido relacionado con agouti; AH, hipotálamo anterior; Arc, núcleo arcuato; CRF, factor libertador de corticotropina; CRFR1, receptor 1 de factor liberador de corticotropina ; DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico; HHS, hipotálamo-hipófisis-suprarrenal; ic, cápsula interna; KO, knockout; LH, lateral; LPO, núcleo preóptico lateral; MCH, hormona concentradora de melanina; MCH1, hormona concentradora de melanina tipo 1; MGP, globo pálido medial; NI, nucleus incertus; Nlc, pars compacta del NI; Nld, pars dissipata del NI; NPY, neuropéptido Y; NTS, tracto solitario; opt, tracto óptico; PeF, área perifornical; PH, posterior; PMD, núcleo premamilar; POMC, proopiomelanocortina ; PT, núcleo talámico paratenial; PVN, núcleo paraventricular; RCh, área retroquiasmática; Re, núcleo reuniens; RLN3, relaxina-3; SON, núcleo supraóptico ; sox, decusación supraóptica; STMPI, zona posterior intermedia del núcleo medial de la estría terminal; Subl, subincerta; SuCh, núcleo supraquiasmático; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial; Xi, núcleo xifoides; ZI; zona incerta.

INTRODUCCIÓN

El hipotálamo como centro organizador del metabolismo.

El cerebro es el regulador de varios aspectos de la homeostasis energética, ajustando el deseo de comer y el gasto energético en respuesta a un amplio rango de señales nutricionales y de otros tipos. Este proceso es altamente complejo y en él participan numerosas áreas cerebrales desde la corteza hasta el tronco encefálico, pero la mayor parte de la atención se centra en estos momentos en el hipotálamo (Williams et al., 2001).

El hipotálamo es una región anatómica del diencefalo localizada entre el tercer ventrículo y la lámina terminal (límite interno), tálamo (límite superior) y globo pálido, cápsula interna, región subtalámica y pedúnculos cerebrales (límite posterior y lateral). Hacia abajo el hipotálamo se conecta con la glándula hipófisis a través del tallo hipofisario. En esta zona se localizan los diferentes núcleos hipotalámicos, que están implicados en la regulación de funciones relacionadas fundamentalmente con la homeostasis del organismo. En este trabajo nos centraremos sobre todo en su función en relación a la conducta alimentaria.

El núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) ha sido clásicamente conocido como centro de la saciedad, en tanto que el hipotálamo lateral es considerado el centro del hambre. Esto es así debido a que se observó que la estimulación eléctrica del núcleo ventromedial hipotalámico desencadenaba una disminución de la ingesta, mientras que la lesión del núcleo de forma bilateral inducían hiperfagia y el desarrollo de obesidad en estos sujetos. Mientras que las mismas acciones realizadas sobre el área lateral hipotalámica desencadenaban las respuestas contrarias. Sin embargo, esta premisa es considerada actualmente como una sobresimplificación. Las neuronas del núcleo hipotalámico ventromedial principalmente reciben entradas neuronales del núcleo arcuato (Arc) y luego proyectan sus axones al arcuato, al núcleo paraventricular (PVN), hipotálamo lateral (LH), núcleo dorsomedial (DMN), y el tracto solitario (NTS) (Roh & Kim, 2016)

El área hipotalámica lateral (LH) se encuentra en la región hipotalámica donde se integra información metabólica y relacionada con la recompensa. Esta información se transfiere a diversas áreas cerebrales como el tronco encefálico, la corteza, el sistema límbico, el tálamo y la médula espinal, lo que permite una modulación compleja del flujo de salida tanto conductual como autonómico. El LH contiene dos poblaciones neuronales distintas que producen hormona concentradora de melanina (MCH) y orexina, respectivamente. (Roh & Kim, 2016).

El núcleo arcuato hipotalámico (ARC) se localiza alrededor del extremo ventral del tercer ventrículo y de la eminencia mediana, que es un área con una barrera hemato-encefálica relativamente porosa. Esto proporciona al ARC el acceso a nutrientes y hormonas circulantes, lo que lo convierte en el principal centro de detección de nutrientes del hipotálamo (Roh & Kim, 2016). Hay dos poblaciones neuronales distintas en el ARC, neuronas orexigénicas que expresan tanto el neuropéptido Y (NPY) como el péptido relacionado con agouti (AgRP) y neuronas anorexigénicas que expresan proopiomelanocortina (POMC) (Roh & Kim, 2016). La orexina muestra acciones que aumentan el apetito mediante la activación directa de las neuronas NPY / AgRP e inhibición indirecta de las neuronas POMC en el ARC (X. Ma, Zubcevic, Brüning, Ashcroft, & Burdakov, 2007; van den Top, Lee, Whyment, Blanks, & Spanswick, 2004). MCH también ejerce efectos orexigénicos modulando el sistema de melanocortina del ARC (Segal-Lieberman et al., 2003). Se ha observado que la sobreexpresión de MCH en ratones transgénicoconduce a hiperfagia y obesidad (Ludwig et al., 2001).

La incapacidad del cerebro para controlar la homeostasis energética subyace a la patología de la hiperfagia y la obesidad. El cerebro detecta el exceso de energía corporal y su déficit detectando los niveles de hormonas y nutrientes circulantes y recibiendo información metabólica desde la periferia a través del sistema nervioso autónomo (Roh & Kim, 2016)

Hipotálamo controlado por diferentes sistemas

Debido a su variedad de funciones, el hipotálamo es un área que presenta conexiones con otras muchas regiones del cerebro, y es mediante estas que regula su función y se adapta a las condiciones metabólicas que el organismo presenta en cada momento. Una de las áreas con las que tiene estrecha relación es la amígdala cerebral.

La amígdala cerebral es una estructura subcortical situada en la profundidad del lóbulo temporal. Se considera un nodo central del procesamiento del comportamiento social y emocional adaptativo (Adolphs, 2008; Aggleton, 1993; Phelps, 2006), y como tal se la ha considerado formando parte del sistema límbico. La amígdala está modulada por proyecciones que surgen de una variedad de poblaciones de neuronas entre las que se encuentran las neuronas monoaminérgicas del tronco encefálico. Por ejemplo, aferencias serotoninérgicas se distribuyen en múltiples regiones de la amígdala (Bonn, Schmitt, Lesch, Van Bockstaele, & Asan, 2013; H. R. Smith & Porrino, 2008; Steinbusch, 1981). La excitación y el estrés inducen un aumento de las concentraciones de serotonina en la amígdala durante el miedo condicionado (Christianson et al., 2010; Kawahara, Yoshida, Yokoo, Nishi, & Tanaka, 1993; Mo, Feng, Renner,

& Forster, 2008; Yokoyama et al., 2005). Además, se ha observado que una importante población de fibras de RLN3 dirigidas a la amígdala surgen de la NI (Santos et al., 2016)

Otra región importante en la modulación del hipotálamo es el nucleus incertus (NI)(Goto, Swanson, & Canteras, 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). El NI está formado por un grupo bilateral de grandes neuronas multipolares en la sustancia gris central del tegmentum pontino, que se encuentran inmediatamente posteriores al núcleo del rafe dorsal y están bordeadas lateralmente por el núcleo tegmental dorsal y ventralmente por los tractos del fascículo longitudinal medial. En la rata, hay dos subregiones distintas del NI según su citoarquitectura – columnas en la línea media de neuronas compactas denominadas pars compacta del NI (Nlc) y alas laterales de neuronas dispersas que conforman la denominada pars dissipata del NI (Nld), aunque las entradas neurales y los destinos de las proyecciones de estas dos subregiones son bastante similares. En el ratón y el macaco, la definición neuroanatómica de Nlc y Nld son menos claras (S. Ma & Gundlach, 2015).

El NI, además de ser la fuente principal de RLN3y el epicentro del sistema relaxinérgico cerebral, es de naturaleza GABAérgica (Olucha-Bordonau et al., 2003). Sus células expresan, además, diversos neurotransmisores y péptidos (Rajkumar, Wu, Farooq, Tan, & Dawe, 2016). Estudios anatómicos detallados confirman que estas neuronas GABAérgicas del nucleus incertus tienen proyecciones dispersas sobre mesencéfalo, diencefalo y telencefalo (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). Las neuronas del NI no parecen producir niveles significativos de marcadores para la transmisión de aminoácidos excitatorios, lo que sugiere que el papel principal de las neuronas de este núcleo en la neurotransmisión es inhibitorio (P. J. Ryan et al., 2013).

Se ha descrito ya el nucleus incertus como una región que muestra abundante expresión del receptor 1 de factor liberador de corticotropina (CRFR1), y en él se puede observar una fuerte inducción de c-Fos (el marcador más frecuentemente utilizado para mostrar la activación neuronal) en respuesta a la inyección intrecerebroventricular de factor liberador de corticotropina (CRF) (Bittencourt & Sawchenko, 2000; Potter et al., 1994). CRF se expresa en neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular y, durante la respuesta al estrés, CRF activa el eje hipotálamo-hipofisis-suprarrenal (HHS) actuando en CRFR1 de la hipófisis anterior para estimular la liberación de hormona adrenocorticotropa. También hay neuronas extrahipotalámicas que expresan CRF distribuidas en varias zonas cerebrales, como la amígdala central y el hipocampo (Merchenthaler, Vigh, Petrusz, & Schally, 1982; Swanson, Sawchenko, Rivier, & Vale, 1983). La regulación de la expresión de CRF puede estar involucrada en el

control del tono de la respuesta comportamental al estrés, incluyendo la ansiedad, así como la memoria de aprendizaje (Bale & Vale, 2004; Korosi & Baram, 2008). Las neuronas que expresan relaxin3 en el NI aumentan su frecuencia de disparos cuando son expuestas a CRF en un sistema in vitro. Mientras que en una parte de las neuronas que no expresan relaxin3 se produce una disminución de la frecuencia de disparos con CRF (S. Ma & Gundlach, 2015)

Estudios de trazado neuronal con marcadores anterógrados y retrógrados han demostrado que el nucleus incertus, junto con el rafe mediano y los núcleos interpedunculares, pueden conformar una red de la línea media de control del comportamiento, y muchas dianas del NI, como el septum medial, hipocampo, hipotálamo, complejo mamilar y amígdala, están involucradas en mecanismos de excitación, incluyendo la sincronización y desincronización del ritmo theta (Nuñez, Cervera-Ferri, Olucha-Bordonau, Ruiz-Torner, & Teruel, 2006).

Se ha demostrado, además, la existencia de proyecciones del NI a núcleos específicos de la amígdala, en consonancia con un papel probable para este sistema de excitación integrador putativo en la regulación de los comportamientos sociales y emocionales dependientes de la amígdala (Santos et al., 2016).

Núcleo incertus y relaxin-3 como agente orexigénico.

RLN3 es un neuropéptido con un peso molecular de 6 kDa que se expresa fundamentalmente en el NI (Bathgate et al., 2002). Pertenece a la súper-familia de péptidos relaxina/insulina y, como los otros miembros de esta familia, RLN3 consta de dos enlaces disulfuro que unen sus cadenas A y B y una conexión adicional de la cadena intra-A.

Exámenes ultraestructurales del cerebro de rata han revelado inmunorreactividad a RLN3 presente en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi del NI y terminales sinápticos asociados a vesículas de núcleo denso en terminales con vesículas ovaladas y contactos simétricos propios de sinapsis inhibitoras en septum e hipotálamo (Olucha-Bordonau et al., 2012; Tanaka et al., 2005). Estas características sugieren que RLN3 se libera en la hendidura sináptica para actuar como un neurotransmisor (Olucha-Bordonau et al., 2012).

Los receptores de los péptidos de la familia de la relaxina son receptores acoplados a proteína G (Bathgate, Samuel, Burazin, Gundlach, & Tregear, 2003). Hasta el momento, el receptor conocido para la RLN3 es RXFP3. Aunque se conoce que la RLN3 puede unirse y activar los receptores de péptidos de la familia de la relaxina (RXFP) 1, 3 y 4, su receptor afín es RXFP3, un receptor acoplado a proteína G (GPCR) conocido formalmente como GPCR135 o SALPR. El

patrón de expresión de RXFP3 en el cerebro se superpone en gran medida a la distribución de la inmunorreactividad de RLN3 en axones y terminales nerviosas con abundante mRNA de RXFP3 y sitios de unión al receptor en el bulbo olfatorio, septum, amígdala, hipocampo ventral, corteza cerebral y varios núcleos talámicos, hipotalámicos y de línea media (Callander et al., 2012). En general, esto sugiere que RXFP3 está involucrado en el procesamiento central de las señales sensoriales y apoya el posible papel modulador del sistema relaxin-3/RXFP3 en el estrés y la ansiedad, la alimentación y el metabolismo y el nivel "arousal" o de activación del comportamiento (Callander et al., 2012).

El receptor RXFP3 se expresa en varias regiones cerebrales relacionadas con el estrés, incluyendo el núcleo paraventricular (PVN), donde podría regular el factor liberador de corticotropina (CRF) y la vasopresina/oxitocina, reguladores críticos del eje del estrés en diferentes condiciones fisiológicas (Kania et al., 2017). En el hipotálamo, las fibras de RLN3 inervan densamente el área hipotalámica lateral, aunque RXFP3 se expresa fuertemente en el PVN y el SON (S. Ma et al., 2007; C. M. Smith et al., 2010).

Hasta el momento tan sólo hay identificadas cuatro áreas donde existen neuronas inmunorreactivas a relaxina-3: el NI, el núcleo del rafe pontino, la sustancia gris periacueductal y el área dorsal a la sustancia negra. Entre ellos, el NI tiene la mayoría de las neuronas de relaxina-3, aproximadamente dos mil por rata (Miyamoto, Watanabe, & Tanaka, 2008a), y desde él estas neuronas lanzan proyecciones hacia el hipotálamo, septum y regiones límbicas cerebrales (Tanaka et al., 2005). Por su lado, el ARNm de RXFP3 es abundante en el bulbo olfatorio, el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON) en el área hipotalámica amigdaloido-hipocampal, así como el núcleo del lecho estria terminal, el tálamo paraventricular, el colículo superior y el núcleo interpeduncular en el tronco encefálico (S. Ma et al., 2007; C. M. Smith et al., 2010). La presencia de RLN3 en una población relevante de estas neuronas del nucleus incertus y estudios farmacológicos con péptidos selectivos para RXFP3 sugieren que la señalización de relaxina-3/RXFP3 puede contribuir a importantes modalidades fisiológicas y de comportamiento (Santos et al., 2016).

Relaxin3 y estrés

Mediante el uso de estudios de inmunocitoquímica, se ha demostrado que las neuronas positivas para RLN3 en el nucleus incertus son GABAérgicas (principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central) y co-expresan, como ya hemos mencionado anteriormente, receptores de factor de liberación de corticotropina (CRF) tipo 1 (CRFR1) (S. Ma et al., 2007).

Se ha visto que la expresión de RLN3 se incrementa en las neuronas del NI por estrés neurogénico, como se ha observado en ratas al someterlas al test de natación forzada, estrés social, ejercicio en cinta ergométrica y estrés por inmovilización, situaciones que estimulan fisiológicamente la excitación y el estado de alerta (Banerjee, Shen, Ma, Bathgate, & Gundlach, 2010). Además, se ha observado que la inyección central de RLN3 inhibe la actividad de neuronas CRF en el núcleo paraventricular, lo cual sugería un posible efecto de feedback (Blasiak, Gundlach, Hess, & Lewandowski, 2017) entre CRF y RLN-3, quedando finalmente demostrado el papel regulador central que juegan las neuronas con expresión de RLN-3 en el nucleus incertus sobre el estrés mediante esta mutua interacción con las neuronas con expresión de CRF (Tanaka, 2010).

Se ha encontrado, además, que la infusión central de un agonista de RXFP3 tiene efectos ansiolíticos en ratas adultas (Philip J. Ryan et al., 2013). De hecho, las neuronas RLN3-positivas del NI de la rata también expresan receptores de serotonina tipo 1A (5HT1A) (Miyamoto, Watanabe, & Tanaka, 2008b), receptores metabotrópicos de glutamato tipo 3 (mGluR3), receptores de orexina/hipocretina tipo 1 y 2 (OR1 y OR2) (Greco & Shiromani, 2001) y receptores de la hormona concentradora de melanina tipo 1 (MCH1). (Philip J. Ryan, Ma, Olucha-Bordonau, & Gundlach, 2011). Los receptores de oxitocina y de MCH tienen una potente acción orexígena. Se sabe que la serotonina (5-HT) regula negativamente la expresión del gen de la relaxina 3 en el NI (Miyamoto et al., 2008b), y es bien conocido que la función del receptor 5HT1A está fuertemente implicado en comportamientos de tipo depresivo.

En un estudio con ratones knockout (KO) para RLN3 se observó que los ratones KO masculinos mostraban una "hipersensibilidad" al estrés y perdieron un porcentaje significativamente mayor de su peso corporal en respuesta a un régimen de estrés crónico de 8 semanas (C. M. Smith, Lawrence, Sutton, & Gundlach, 2009), lo cual refuerza aún más la idea de la implicación de RLN3 en la modulación del estrés.

Relaxin3 y conducta alimentaria

Desde su descubrimiento, RLN3 ha demostrado tener un papel importante en la regulación de la ingesta de alimentos en los estudios de comportamiento (Ganella, Ryan, Bathgate, & Gundlach, 2012). Se ha observado que la administración central de RLN3 estimula fuertemente la alimentación en ratas saciadas. Asimismo, la inyección intracerebroventricular de RLN3 aumentó la ingesta de alimentos en ratas macho durante 1 h tras su administración tanto en las fases lumínicas como de oscuridad (Christophe Lenglos, Calvez, & Timofeeva, 2015; McGowan et al., 2005).

Se ha observado que la expresión de RLN3 en el NI se ve estimulada por la restricción nutricional y es particularmente alta en un modelo de ratas hembras hiperfágicas y con sobrepeso sujetas a ciclos semanales repetitivos de estrés y restricción de la comida (C. Lenglos, Mitra, Guèvremont, & Timofeeva, 2013). Además, se ha visto que la administración central de RLN3 induce diferencias sexo-específicas en la activación del eje HHS, incluyendo mayor activación de neuronas CRF (factor liberador de corticotropina) en el núcleo paraventricular hipotalámico en machos más que en hembras. Las ratas hembras también muestran una mayor ganancia ponderal y de tejido adiposo tras dos semanas de administración intracerebroventricular continua de RLN3 (Calvez, de Ávila, & Timofeeva, 2016), así como un aumento de los niveles plasmáticos de leptina e insulina (HIDA et al., 2006). Por otro lado, en modelos de ratas con obesidad inducida mediante la dieta, se observó que la expresión de RLN3 era más alta en estas en comparación con aquellas que no desarrollaban obesidad a pesar de la dieta alta en grasa, y esta mayor cantidad de RLN-3 se ha relacionado con un aumento de la capacidad de mantener el peso corporal elevado ante la restricción nutricional, sólo pudiendo bajar de peso con una restricción forzada de la ingesta. De hecho, tras esta restricción, al volver a permitir a las ratas acceder a demanda a la comida, recuperan su peso corporal de forma mucho más rápida y no tardan en equipararlo a aquellas ratas que no han sufrido una restricción del acceso a la comida (Christophe Lenglos, Mitra, Guèvremont, & Timofeeva, 2014)

Se ha demostrado también que la administración central de RLN3 resulta en un aumento significativo de la ingesta hídrica (Bathgate et al., 2006).

HIPÓTESIS

El sistema NI/RLN3 desarrolla un control orexigénico a través de proyecciones específicas sobre núcleos hipotalámicos concretos.

OBJETIVO:

El objetivo de este estudio es determinar qué núcleos hipotalámicos son inervados por fibras RLN3 positivas procedentes del NI.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se usaron ratas macho Wistar (300-400 g, n=3). Todos los protocolos han sido aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universitat Jaume I (Castellón, España). Todos los procedimientos estaban en consonancia con la Directiva 86/609 / CEE de la Comunidad Europea relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Fijación y sección del cerebro

Para la extracción del cerebro, los animales se anestesiaron profundamente con Nembutal (150 mg / kg ip, Euthalender, Barcelona, España) y se perfundió transcardialmente con solución salina (250 ml) seguido de fijador (paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M, pH 7,4) 30 minutos (alrededor de 500 ml). Los cerebros se diseccionaron y se sumergieron en el mismo fijador durante 4 horas a 4°C. Luego se pasaron a sacarosa al 30% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4, durante 48 horas a 4°C. Los cerebros se cortaron coronalmente a nivel de los flóculos cerebelosos utilizando una matriz de metacrilato de cerebro de rata (World Precision Instruments, Sarasota, FL) para obtener secciones de orientación equivalente de cada rata. Tras 2-3 días de crioprotección en sacarosa se realizaron cortes coronales de (40 µm) mediante un micrótopo de deslizamiento de congelación (Leica SM2010R, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Para cada cerebro se obtuvieron seis series de secciones.

Inmunohistoquímica para relaxina-3

Para el análisis de RLN3 se utilizó el anticuerpo monoclonal producido en un hibridoma de células de ratón con una secuencia recombinante. El anticuerpo HK 4-144-10 fue obtenido frente al extremo terminal de la cadena B que es una secuencia conservada en rata y humanos. La preabsorción con 0.18 µm IgG y 18 µm del péptido RLN3 a 37°C durante 2 h eliminó completamente el marcaje y confirmó la especificidad del anticuerpo (Tanaka et al.,

2005). El medio de cultivo en el que se desarrollaba el cultivo se estalló y se liofilizó. Tras lo cual se resuspenció en agua para obtener el anticuerpo primario. Los cortes fueron sometidos a un protocolo estándar de inmunohistoquímica. Los cortes se lavaron dos veces en un tampón Tris salino 0.05 M con pH 0.8 (TBS) y transferidos en una solución de bloqueo (suero de burro normal al 4% (NDS), albúmina de suero bovino (BSA) al 2% y Triton X100 al 0.2% en TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron transferidos a un medio de incubación que contenía anti-RLN3 de ratón 1:10 en TBS que contenía 2% de NDS, 2% BSA y 0.2% de Triton X100 durante 48 horas a 4°C. A continuación, los cortes fueron lavados dos veces en TBS e incubados en anticuerpo secundario donkey anti-ratón biotinilado durante 2h. Después, los cortes fueron enjuagados en dos veces en TBS y transferidos a ABC 1:50. Tras el enjuague (2 X TBS) el inmunomarcaje se reveló como un producto de reacción marrón sumergiendo los cortes en 0.025% DAB, 0.0024% H₂O₂ en HCl Tris, pH 7.6. Tras varios lavados con PBS 0.01M, los cortes se montaron en portaobjetos revestidos con gelatina de alumbre de cromo, secadas al aire, deshidratadas con etanol graduado, limpiadas con xileno y cubiertas con DPX.

Estudio

Las secciones fueron estudiadas mediante una cámara clara acoplada a un microscopio Leica y fotografiadas mediante un microscopio Nikon E800. Observábamos las fibras como finos tractos de coloración marrón dispersos por todo el corte. Observamos las muestras a veinte aumentos y fuimos dibujando todas las áreas talámicas e hipotalámicas y las fibras de RLN3 que veíamos. Posteriormente, todos estos dibujos fueron procesados con ayuda de los programas Photoshop e Illustrator para dar como resultado final una imagen de cada corte en la que se encontraban unificados todos los dibujos.

RESULTADOS

Utilizamos un microscopio óptico con cámara clara acoplada para la visualización de las fibras de RLN3 y su dibujo. La reacción de fondo permitió la identificación de los principales tractos como el fornix, el fascículo prosencefálico medial, el tracto mamilotalámico y el tracto mamilotegmental. Estos tractos permitieron la identificación de las zonas anejas que presentaban o no marcaje. Además, algunas áreas, como el núcleo paraventricular resultaron de fácil identificación incluso en ausencia de tinción de contraste. Cuando fue necesario se utilizaron series de cortes teñidos mediante Giemsa para identificar los núcleos y áreas con marcaje. Perfilamos las zonas anatómicas de mayor relevancia y resaltamos las fibras

aumentando su grosor y tiñéndolas de rojo para mejor visualización de su distribución (ver tabla 1 para abundancia relativa de fibras).

Nivel 1: Preóptico (figura 1)→ El nivel se identificó por la presencia del quiasma óptico y el núcleo supraquiasmático sobre él. A este nivel, el hipotálamo ocupa toda la extensión anterior del diencefalo (Fig 1A). A este nivel se pudo visualizar gran cantidad de fibras de RLN3(ver Figura 1B) en zona posterior intermedia del núcleo medial de la estría terminal (STMPI), parte anterior del núcleo talámico paraventricular (PVA), área hipotalámica anterior (AH), área preóptica lateral (LPO) (figura 1D) y área retroquiasmática (RCh) (figura 1E). De igual forma, encontramos abundantes fibras aunque en menor cantidad que en los anteriores en el núcleo talámico paratenial (PT) y núcleo supraquiasmático (SuCh).

Nivel 2: Anterior (figura 2)→ El nivel anterior se caracterizó por el desarrollo del núcleo paraventricular dorsalmente y del área retroquiasmática ventralmente (Fig 2A). Se observó una abundante cantidad de fibras de RLN3(Fig 2B) en SPLH, PLH, área hipotalámica anterior (AH) y núcleo periventricular hipotalámico. Se observaron abundantes fibras alrededor del núcleo paraventricular que, sin embargo, dejaron a este núcleo sin marcaje (Fig 2C). El marcaje, sin embargo, fue muy abundante en el Área lateral hipotalámica (Fig 2D) y en el área retroquiasmática. Aunque no se corresponde con el hipotálamo, algunas fibras de relaxin3 cursaban dorsalmente hacia el subtálamo (zona incerta), tálamo intralaminar de la línea media y epitálamo dejando marcaje en el núcleo xifoides (Xi), en el núcleo reuniens (Re), núcleo paraventricular y habénula lateral.

Nivel 3: Tuberal (figura 3) → Tuberal (figura 3)→ La región tuberal se caracterizó por la extensión basal del hipotálamo en el que se hace muy evidente el núcleo arcuatus alrededor de la eminencia media y el núcleo ventromedial del hipotálamo (Fig 3A). A este nivel se visualizó una gran cantidad de fibras de RLN3 (figura 3B) en el área lateral hipotalámica (LH) (figura 3E), zona incerta (ZI) y área posterior hipotalámica (PH). Y una menor densidad de fibras en parte dorsal del núcleo premamilar (PMD), arcuato (Arc) y EP.

Nivel 4: Mamilar (figura 4)→ El nivel mamilar incluye también los núcleos premamilares y viene caracterizado por la proyección de los cuerpos mamilares ventralmente (Fig 4A). En este nivel se pudo observar la abundancia de fibras de RLN3(figura 3B) en área hipotalámica dorsal (DA), zona dorsal del núcleo hipotalámico dorsomedial (DMD), área perifornical (PeF), área lateral hipotalámica (LH) (figura 3D), zona incerta (ZI) y subincerta (SubI), núcleo hipotalámico periventricular (Pe) y núcleo reuniens (Re). Y algo menos de concentración en la decusación supraóptica (sox), tracto óptico (opt), cápsula interna (ic) y globo pálido medial (MGP),

mientras que en el área ventromedial hipotalámica (VMH) las fibras son prácticamente inapreciables.

Tabla 1.- Abundancia relativa del marcaje de fibras de relaxina3 en los distintos niveles analizados.

Preóptico	Abundancia relativa
- STMPI	++++
- PVA	++++
- AH	+++
- LPO	+++
- RCh	+
- PT	++
- SuCh	++
- PV	+

Anterior	Abundancia relativa
- SPLH	++++
- PLH	++++
- AH	++
- Pa	++
- Re	++
- Xi	++
- Pe	++
- Arc	+

Tuberal	Abundancia relativa
- LH	++++
- ZI	++++
- PH	++++
-	
- PMD	++
- DMD	+
- Arc	+
- EP	+++

Premamilar	Abundancia relativa
- DMD	+++
- PeF	+++
- LH	++
- ZI	+++
- Subl	+++
- Pe	++
- Re	++
- VRe	+++
- Sox	+
- Opt	+
- Ic	++
- MGP	+
- VMH	+
- Arc	+

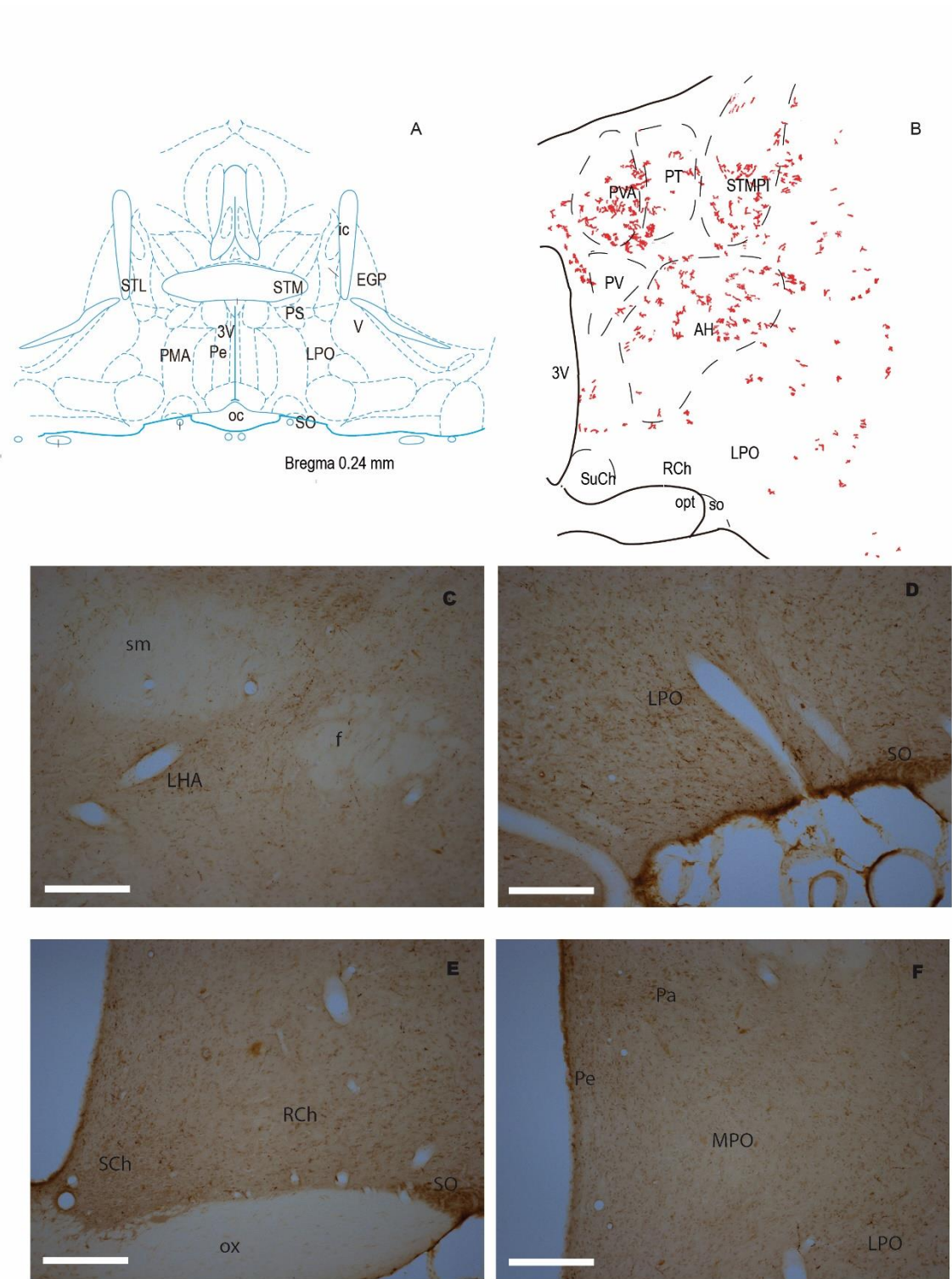
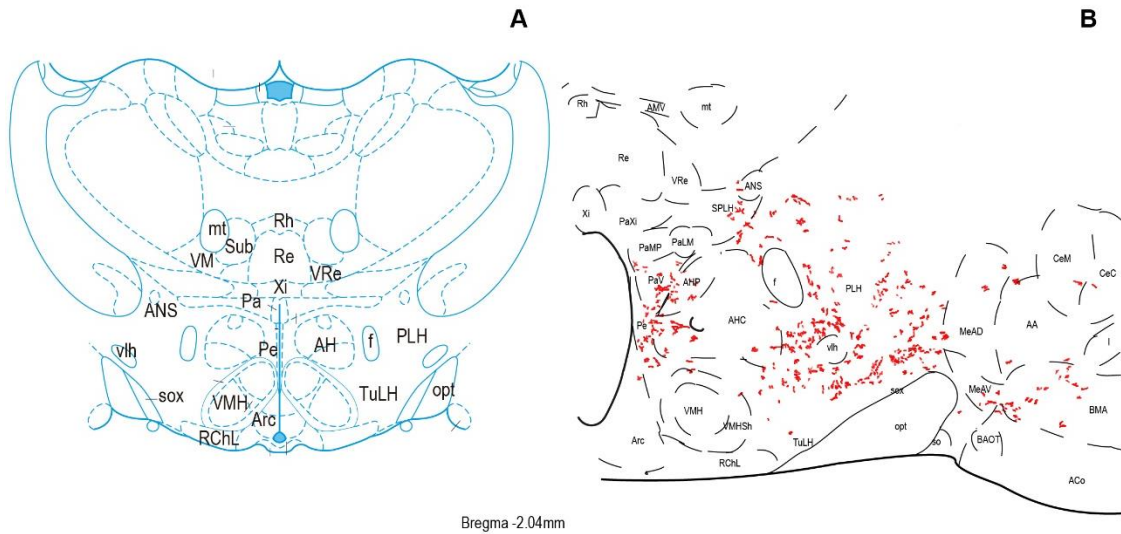


Figura 1. Nivel preóptico hipotalámico. (A) Esquema representativo adaptado del atlas Paxinos 1986, Bregma -0.24 mm. (B) Representación esquemática de la distribución de RLN3 a lo largo del cerebro de la rata (fibras rojas). (C) Fotomicrografía ilustrando la distribución de RLN3 en hipotálamo lateral. (D) Núcleo preóptico lateral (LPO). (E) Regiones supra y retroquiasmática. (F) Región retroquiasmática. Barra de calibración 100 μ m.



Bregma -2.04mm

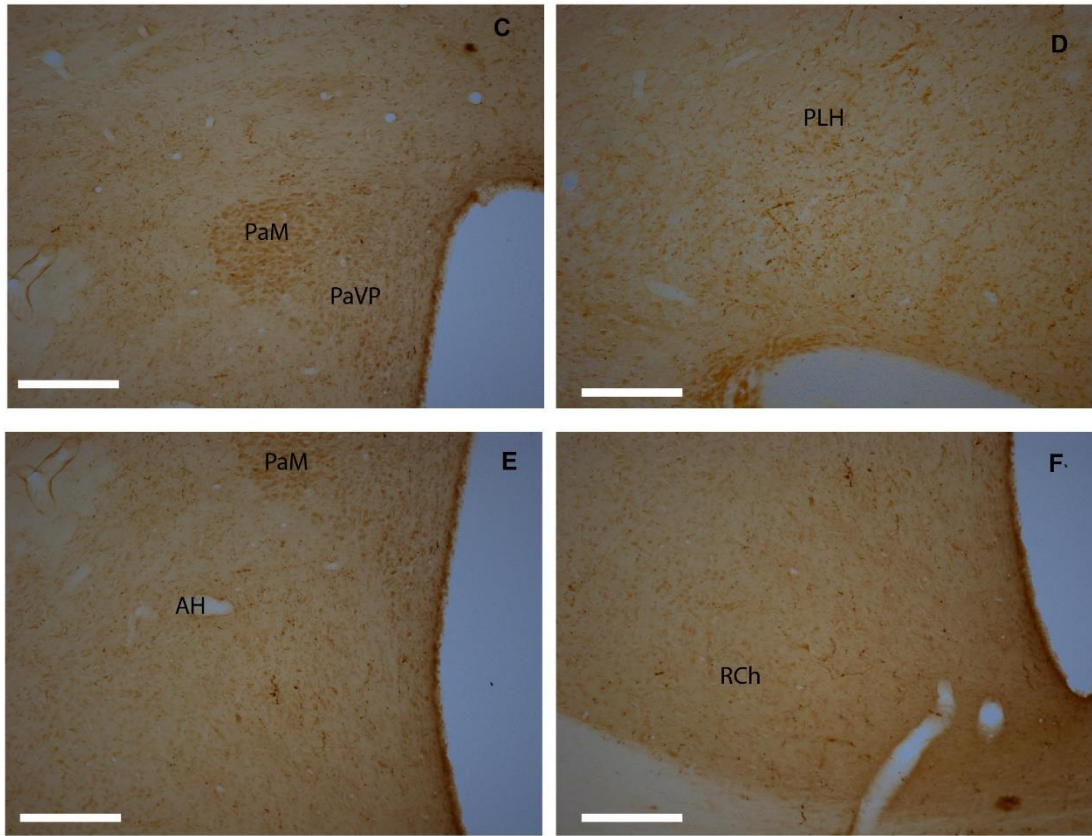


Figura 2. Nivel anterior hipotalámico. (A) Esquema representativo adaptado del atlas Paxinos 1986, Bregma -2.04mm. (B) Representación esquemática de la distribución de RLN3 a lo largo del cerebro de la rata (fibras rojas). (C) Fotomicrografía ilustrando la distribución de RLN3 en zona paraventricular. (D) Zona lateral hipotalámica. (E) Núcleo dorsal hipotalámico. (F) Región retroquiasmática. Barra de calibración 100µm.

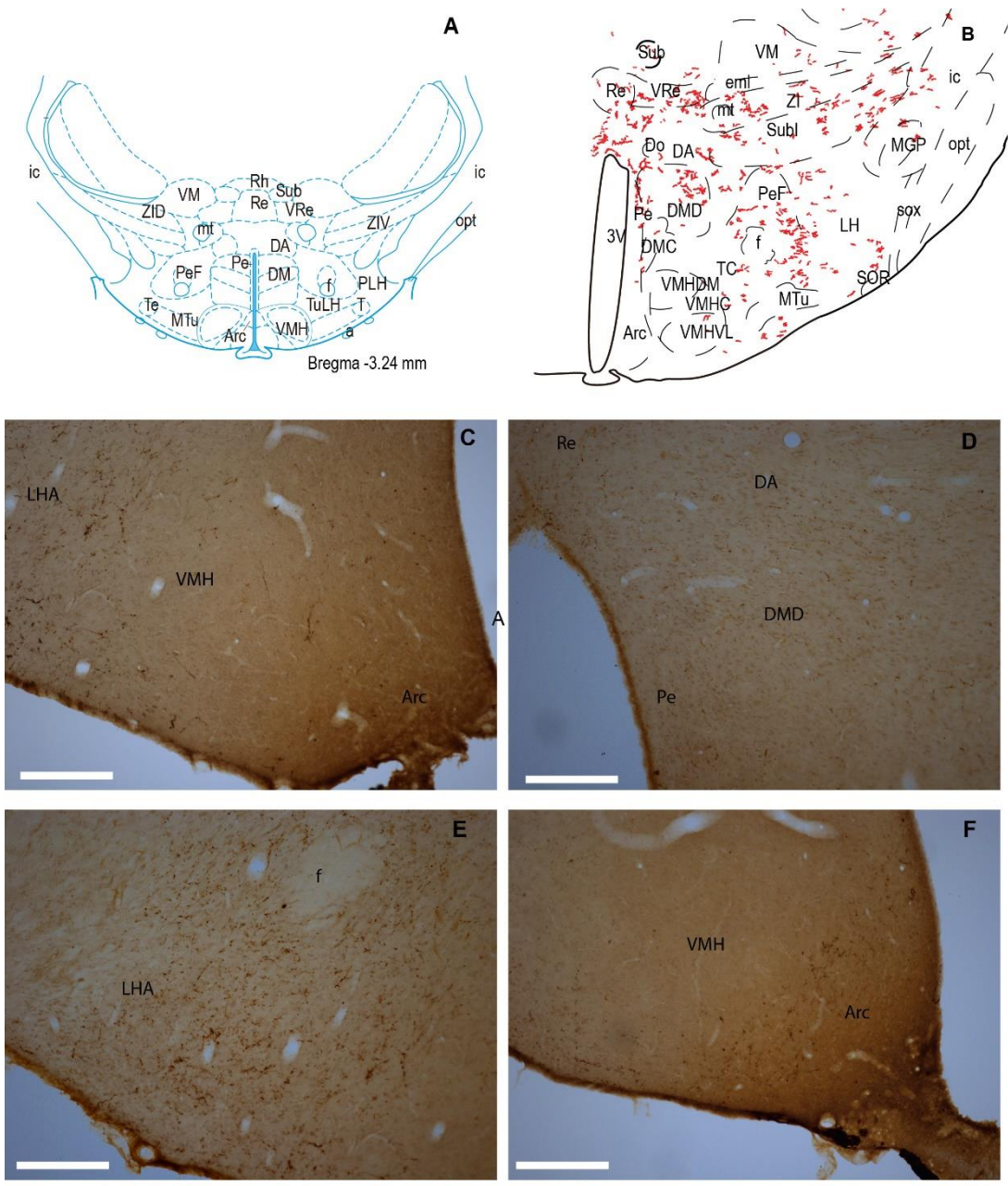


Figura 3. Nivel tuberal hipotalámico. (3A) Esquema representativo adaptado del atlas Paxinos 1986, Bregma -4.44mm. (3B) Representación esquemática de la distribución de RLN3 a lo largo del cerebro de la rata (fibras rojas). (3C) Fotomicrografía ilustrando la distribución de RLN3 en área posterior hipotalámica. (3D) Hipotálamo lateral y núcleo magnocelular. (3E) Arcuatus. (3F) Región supramamilar. Barra de calibración 100μm.

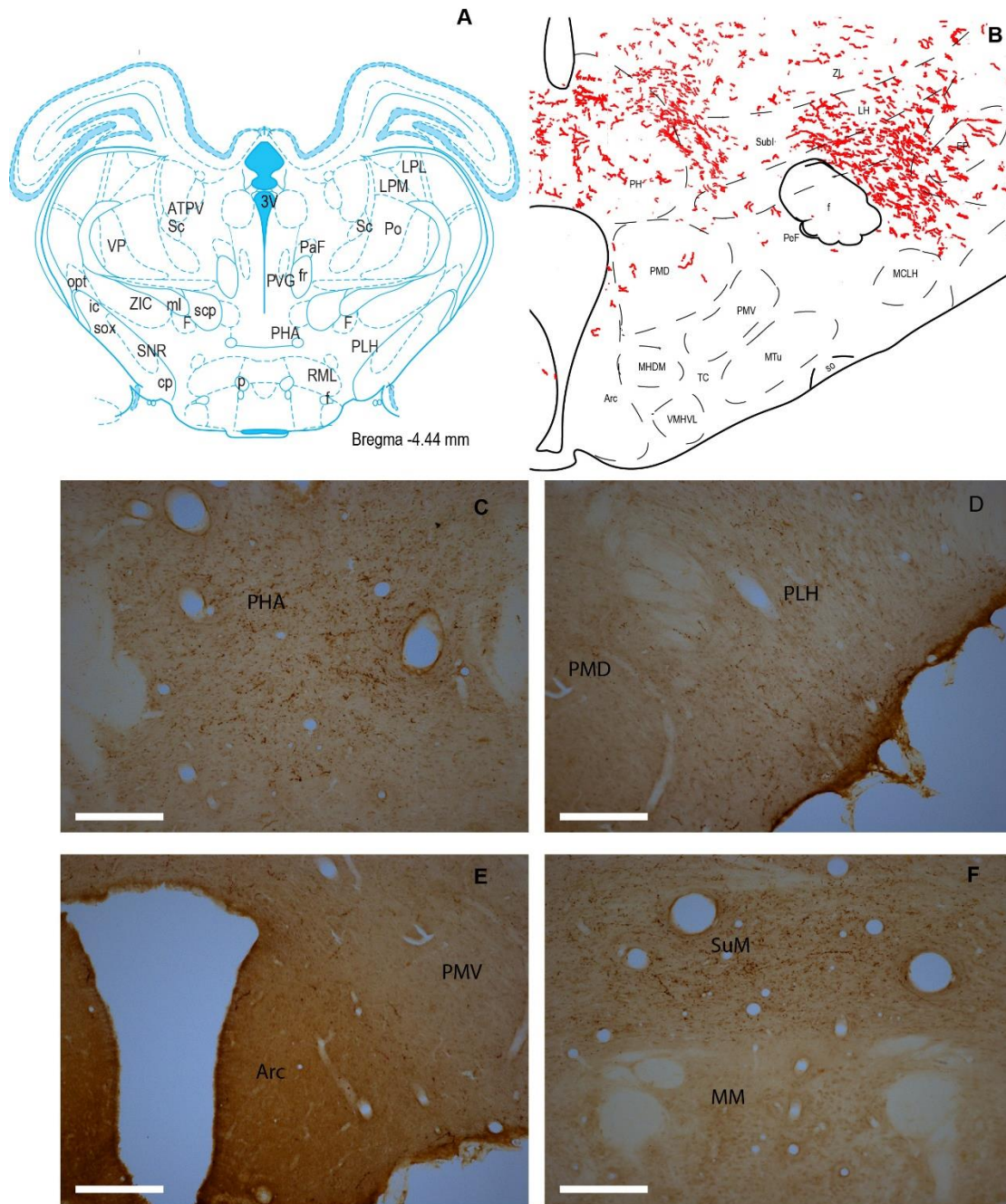


Figura 4. Nivel premamilar hipotalámico. (A) Esquema representativo adaptado del atlas Paxinos 1986, Bregma -4.44mm. (B) Representación esquemática de la distribución de RLN3 a lo largo del cerebro de la rata (fibras rojas). (C) Fotomicrografía ilustrando la distribución de RLN3 en área posterior hipotalámica. (D) Hipotálamo lateral y núcleo magnocelular. (E) Arcuatus. (F) Región supramamilar. Barra de calibración 100 μ m.

DISCUSIÓN

De acuerdo con estudios de inmunohistoquímica previos, el presente estudio demuestra abundancia de fibras de RLN3 en el hipotálamo lateral, coincidiendo con lo reportado ya en estudios previos (S. Ma et al., 2007; C. M. Smith et al., 2010; Tanaka et al., 2005), en hipotálamo posterior, hipotálamo lateral de forma similar a lo observado por los autores de los estudios (S. Ma et al., 2007; C. M. Smith et al., 2010), en hipotálamo anterior y núcleo dorsomedial hipotalámico también de acuerdo con lo establecido en (S. Ma et al., 2007). De igual modo, nuestros hallazgos coinciden con los observado por otros autores (C. M. Smith et al., 2010) al describir abundancia de fibras en zona incerta y escasez de las mismas en ventromedial hipotalámico, y presencia de relaxin3 prácticamente indetectable en el núcleo paraventricular (C. M. Smith et al., 2010; Tanaka et al., 2005).

Por el contrario, los resultados no coinciden en cuanto a la abundancia de fibras de RLN3 en el Arcuato en comparación con estudios de otros autores (S. Ma et al., 2007; Tanaka et al., 2005), quienes describen alta presencia de fibras en el mismo, al contrario que lo observado en nuestro estudio, lo cual se podría deber a una discrepancia en la delimitación de los límites de los núcleos hipotalámicos.

Los trastornos de la conducta alimentaria y de la ingesta de alimentos se caracterizan por una alteración persistente en la alimentación o en el comportamiento relacionado con la alimentación que lleva a una alteración en el consumo o en la absorción de los alimentos y que causa un deterioro significativo de la salud física o del funcionamiento psicosocial. (American Psychiatric Association, 2014).

Actualmente, múltiples estudios relacionan procesos como el estrés y la ingesta alimentaria con el NI, dada la actividad orexígena de RLN3 y su relación con otros neuropéptidos con función orexígena (orexina) o anorexígena (CRF) (Piccoli et al., 2012). Además, existen múltiples patologías (bulimia, anorexia purgativa) que muestran una relación inequívoca entre estrés e ingesta alimentaria compulsiva y desestructurada (American Psychiatric Association, 2014).

Otro dato interesante es la prevalencia de los trastornos alimentarios, particularmente alta en la población femenina (Woodside et al., 2001). De hecho, los trastornos alimentarios afectan a más mujeres que hombres, con una proporción entre mujeres y hombres de 3: 1 a 10: 1 (Hoek, 2006; Hudson et al., 2007; Preti et al., 2009). Como resultado, el 93% de los individuos hospitalizados cada año por trastornos alimentarios son mujeres (Calvez, de Ávila, et al., 2016).

La ingesta compulsiva afecta al 4,5% de la población general y es un síntoma central en el trastorno por atracón, bulimia nerviosa y el subtipo de compulsión/purga de la anorexia nerviosa. Se caracteriza por el consumo excesivo de alimentos en un breve período de tiempo aun cuando no se está hambriento (Calvez, De Ávila, et al., 2016). La ingesta compulsiva se encuentra frecuentemente estimulada por el estrés (Piccoli et al., 2012), y así se ha demostrado en varios estudios con ratas en los que cuando se las sometía a estrés, las ratas propensas a la ingesta compulsiva (BEP) mostraron expresión elevada de ARNm de RLN3 en el NI y de ARNm de RXFP3 en el PVN y SON.

Asimismo, se ha visto que la administración central de un agonista selectivo del receptor RXFP3 reproducía los mismos efectos orexigénicos de la relaxina-3 (McGowan et al., 2005) y a su vez, los aumentos de la ingesta de sacarosa inducida por estrés en las ratas BEP se previnieron con la administración central de un antagonista de RXFP3, lo que sugiere una participación de RLN3 / RXFP3 en los atracones inducidos por estrés en este modelo (Calvez, De Ávila, et al., 2016).

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diferencias sexo-específicas en la relación entre RLN3 y el aumento de la ingesta y de la ganancia ponderal. El estado de ánimo negativo y el estrés de la vida son los antecedentes más comunes de la obesidad en los trastornos alimentarios (Berg et al., 2015), y el comer emocional ha sido significativamente asociado con la obesidad en las mujeres, pero no entre los hombres (Laitinen, Ek, & Sovio, 2002). De hecho, hay estudios que muestran que las hembras presentan mayor sensibilidad a dosis menores de RLN3 y que ciclos repetidos de restricción nutricional, el acceso intermitente a alimentos sabrosos y estrés fueron acompañados de un aumento en la expresión de RLN3 en el NI y de hiperfagia en ratas hembras, pero no en ratas macho (Calvez, de Ávila, et al., 2016).

En cuanto a la relación de los trastornos de la conducta alimentaria y el estrés, se ha observado que la exposición aguda al estrés no causa diferencias significativas en la ingesta de las ratas, pero sí cuando se las somete de forma repetida al mismo, pues se acaba viendo una disminución de la ingesta y del peso corporal en ratas macho pero no en ratas hembra (C. Lenglos et al., 2013). En ratas hembra, aquellas sometidas a un estrés inducido por restricción de la dieta se observó una conducta de sobreingesta durante los días de “recuperación”, lo que se veía reflejado en un aumento del peso corporal (C. Lenglos et al., 2013). Además, tras un estrés producido de forma intermitente por la restricción de acceso a la comida, el acceso intermitente a comida sabrosa, como azúcar, galletas dulces... puede favorecer la aparición de un patrón de ingesta compulsivo de estos alimentos, y continuar con estrés intermitente y

restricción de la ingesta puede exacerbar este comportamiento (Avena, Rada, & Hoebel, 2008; C. Lenglos et al., 2013).

Estos hallazgos destacan el potencial del sistema RLN3 / RXFP3 como una nueva diana farmacológica para el tratamiento de los trastornos de la conducta alimentaria.

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio, se ha analizado mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia y distribución de fibras de RLN3 en el hipotálamo de la rata. El presente estudio demuestra abundancia de fibras de RLN3 en hipotálamo lateral, hipotálamo anterior y posterior, tres de los principales núcleos hipotalámicos conocidos por su participación en la regulación del hambre y la saciedad, así como en el núcleo dorsomedial hipotalámico, núcleo preóptico lateral LPO, núcleo paraventricular anterior, zona incerta y subincerta, reuniens, y zona posterior intermedia del núcleo medial de la estría terminal (STMPI).

Todo esto, apoya la relación ya establecida en otros trabajos, entre relaxina-3/NI y el control de la conducta alimentaria. Futuros estudios podrían ayudar al desarrollo de fármacos que modulasen la ingesta actuando sobre el sistema RLN3-RXFP3-NI, sentando así las bases de un nuevo enfoque terapéutico de los trastornos de la conducta alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolphs, R. (2008). Fear, faces, and the human amygdala. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.06.006>
- Aggleton, J. P. (1993). The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends in Neurosciences*, 16(8), 328–333. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90110-8)
- American Psychiatric Association. (2014). DSM-5. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. *Editorial Médica Panamericana*.
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(1), 20–39. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>
- Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF AND CRF RECEPTORS : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44(1), 525–557. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410>
- Banerjee, A., Shen, P.-J., Ma, S., Bathgate, R. A. D., & Gundlach, A. L. (2010). Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of RLN3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology*, 58(1), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.019>
- Bathgate, R. A. D., Lin, F., Hanson, N. F., Otvos, L., Guidolin, A., Giannakis, C., ... Wade, J. D. (2006). Relaxin-3: Improved Synthesis Strategy and Demonstration of Its High-Affinity Interaction with the Relaxin Receptor LGR7 Both *In Vitro* and *In Vivo*[†]. *Biochemistry*, 45(3), 1043–1053. <https://doi.org/10.1021/bi052233e>
- Bathgate, R. A. D., Samuel, C. S., Burazin, T. C. D., Gundlach, A. L., & Tregear, G. W. (2003). Relaxin: new peptides, receptors and novel actions. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 14(5), 207–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826326>
- Berg, K. C., Crosby, R. D., Cao, L., Crow, S. J., Engel, S. G., Wonderlich, S. A., & Peterson, C. B. (2015). Negative affect prior to and following overeating-only, loss of control eating-only, and binge eating episodes in obese adults. *International Journal of Eating Disorders*, 48(6), 641–653. <https://doi.org/10.1002/eat.22401>

- Bittencourt, J. C., & Sawchenko, P. E. (2000). Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(3), 1142–1156. Retrieved from <https://www.mendeley.com/research-papers/centrally-administered-neuropeptides-access-cognate-receptors-analysis-central-corticotropinreleasin/>
- Blasiak, A., Gundlach, A. L., Hess, G., & Lewandowski, M. H. (2017). Interactions of Circadian Rhythmicity, Stress and Orexigenic Neuropeptide Systems: Implications for Food Intake Control. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 127. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00127>
- Bonn, M., Schmitt, A., Lesch, K.-P., Van Bockstaele, E. J., & Asan, E. (2013). Serotonergic innervation and serotonin receptor expression of NPY-producing neurons in the rat lateral and basolateral amygdaloid nuclei. *Brain Structure and Function*, 218(2), 421–435. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0406-5>
- Callander, G. E., Ma, S., Ganella, D. E., Wimmer, V. C., Gundlach, A. L., Thomas, W. G., & Bathgate, R. A. D. (2012). Silencing RLN3 in nucleus incertus of adult rodents: A viral vector-based approach to investigate neuropeptide function. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042300>
- Calvez, J., De Ávila, C., Matte, L. O., Guèvremont, G., Gundlach, A. L., & Timofeeva, E. (2016). Role of relaxin-3/RXFP3 system in stress-induced binge-like eating in female rats. *Neuropharmacology*, 102(December), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.014>
- Calvez, J., de Ávila, C., & Timofeeva, E. (2016). Sex-specific effects of RLN3 on food intake and body weight gain. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.13530>
- Christianson, J. P., Ragole, T., Amat, J., Greenwood, B. N., Strong, P. V., Paul, E. D., ... Maier, S. F. (2010). 5-Hydroxytryptamine 2C Receptors in the Basolateral Amygdala Are Involved in the Expression of Anxiety After Uncontrollable Traumatic Stress. *Biological Psychiatry*, 67(4), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.011>
- Ganella, D. E., Ryan, P. J., Bathgate, R. A. D., & Gundlach, A. L. (2012). Increased feeding and body weight gain in rats after acute and chronic activation of RXFP3 by RLN3 and receptor-selective peptides. *Behavioural Pharmacology*, 23(5 and 6), 516–525. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283576999>

- Goto, M., Swanson, L. W., & Canteras, N. S. (2001). Connections of the nucleus incertus. *The Journal of Comparative Neurology*, 438(1), 86–122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503154>
- Greco, M. A., & Shiromani, P. J. (2001). *Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. Molecular Brain Research* (Vol. 88). [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00039-0)
- HIDA, T., TAKAHASHI, E., SHIKATA, K., HIROHASHI, T., SAWAI, T., SEIKI, T., ... KUROMITSU, J. (2006). Chronic Intracerebroventricular Administration of RLN3 Increases Body Weight in Rats. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 26(3), 147–158. <https://doi.org/10.1080/10799890600623373>
- Hoek, H. W. (2006). Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, 19(4), 389–394. <https://doi.org/10.1097/01.yco.0000228759.95237.78>
- Hudson, J. I., Hiripi, E., Pope, H. G., Kessler, R. C., Kessler, R. C., Kendler, K. S., & al., et. (2007). The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biological Psychiatry*, 61(3), 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.040>
- Kania, A., Gugula, A., Grabowiecka, A., de Ávila, C., Blasiak, T., Rajfur, Z., ... Blasiak, A. (2017). Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3-RXFP3 signalling. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP273787>
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., & Tanaka, M. (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience Letters*, 162(1–2), 81–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8121642>
- Korosi, A., & Baram, T. Z. (2008). The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.066>
- Laitinen, J., Ek, E., & Sovio, U. (2002). Stress-Related Eating and Drinking Behavior and Body Mass Index and Predictors of This Behavior. *Preventive Medicine*, 34(1), 29–39. <https://doi.org/10.1006/pmed.2001.0948>

- Lenglos, C., Calvez, J., & Timofeeva, E. (2015). Sex-specific effects of RLN3 on food intake and brain expression of corticotropin-releasing factor in rats. *Endocrinology*, *156*(2), 523–533. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1743>
- Lenglos, C., Mitra, A., Guèvremont, G., & Timofeeva, E. (2013). Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and RLN3 in rats. *Genes, Brain and Behavior*, *12*(4), 370–387. <https://doi.org/10.1111/gbb.12028>
- Lenglos, C., Mitra, A., Guèvremont, G., & Timofeeva, E. (2014). Regulation of expression of RLN3 and its receptor RXFP3 in the brain of diet-induced obese rats. *Neuropeptides*, *48*(3), 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2014.02.002>
- Ludwig, D. S., Tritos, N. A., Mastaitis, J. W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., ... Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *107*(3), 379–86. <https://doi.org/10.1172/JCI10660>
- Ma, S., Bonaventure, P., Ferraro, T., Shen, P. J., Burazin, T. C. D., Bathgate, R. A. D., ... Gundlach, A. L. (2007). RLN3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience*, *144*(1), 165–190. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.072>
- Ma, S., & Gundlach, A. L. (2015). Ascending Control of Arousal and Motivation : Role of Nucleus Incertus and its Peptide Neuromodulators in Behavioural Responses to Stress *Neuroendocrinology*, (4), 457–467. <https://doi.org/10.1111/jne.12259>
- Ma, X., Zubcevic, L., Brüning, J. C., Ashcroft, F. M., & Burdakov, D. (2007). Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(7), 1529–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3583-06.2007>
- McGowan, B. M. C., Stanley, S. A., Smith, K. L., White, N. E., Connolly, M. M., Thompson, E. L., ... Bloom, S. R. (2005). Central RLN3 administration causes hyperphagia in male wistar rats. *Endocrinology*, *146*(8), 3295–3300. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1532>
- Merchenthaler, I., Vigh, S., Petrusz, P., & Schally, A. V. (1982). Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *American Journal of Anatomy*, *165*(4), 385–396. <https://doi.org/10.1002/aja.1001650404>

- Miyamoto, Y., Watanabe, Y., & Tanaka, M. (2008a). Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regulatory Peptides*, 145(1–3), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.010>
- Miyamoto, Y., Watanabe, Y., & Tanaka, M. (2008b). Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain. *Regulatory Peptides*, 145(1–3), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.010>
- Mo, B., Feng, N., Renner, K., & Forster, G. (2008). Restraint stress increases serotonin release in the central nucleus of the amygdala via activation of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Research Bulletin*, 76(5), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.011>
- Núñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F., Ruiz-Torner, A., & Teruel, V. (2006). Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2731–2738. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04797.x>
- Olucha-Bordonau, F. E., Otero-García, M., Sánchez-Pérez, A. M., Núñez, Á., Ma, S., & Gundlach, A. L. (2012). Distribution and targets of the RLN3 innervation of the septal area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 520(9), 1903–1939. <https://doi.org/10.1002/cne.23018>
- Olucha-Bordonau, F. E., Teruel, V., Barcia-González, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A. A., & Martínez-Soriano, F. (2003). Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 62–97. <https://doi.org/10.1002/cne.10774>
- Phelps, E. A. (2006). Emotion and Cognition: Insights from Studies of the Human Amygdala. *Annual Review of Psychology*, 57(1), 27–53. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.56.091103.070234>
- Piccoli, L., Micioni Di Bonaventura, M. V., Cifani, C., Costantini, V. J. A., Massagrande, M., Montanari, D., ... Corsi, M. (2012). Role of Orexin-1 Receptor Mechanisms on Compulsive Food Consumption in a Model of Binge Eating in Female Rats. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 1999–2011. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.48>
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., ... Vale, W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 91(19), 8777–81. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090722>
- Preti, A., Girolamo, G. de, Vilagut, G., Alonso, J., Graaf, R. de, Bruffaerts, R., ... Morosini, P. (2009). The epidemiology of eating disorders in six European countries: Results of the ESEMeD-WMH project. *Journal of Psychiatric Research*, 43(14), 1125–1132.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.04.003>
- Rajkumar, R., Wu, Y., Farooq, U., Tan, W. H., & Dawe, G. S. (2016). Stress activates the nucleus incertus and modulates plasticity in the hippocampo-medial prefrontal cortical pathway. *Brain Research Bulletin*, 120, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.10.010>
- Roh, E., & Kim, M. (2016). Review Article Brain Regulation of Energy Metabolism, 519–524.
- Ryan, P. J., Büchler, E., Shabanpoor, F., Hossain, M. A., Wade, J. D., Lawrence, A. J., & Gundlach, A. L. (2013). Central RLN3receptor (RXFP3) activation decreases anxiety- and depressive-like behaviours in the rat. *Behavioural Brain Research*, 244, 142–151.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.034>
- Ryan, P. J., Kastman, H. E., Krstew, E. V., Rosengren, K. J., Hossain, M. A., Churilov, L., ... Lawrence, A. J. (2013). Relaxin-3/RXFP3 system regulates alcohol-seeking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20789–20794.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1317807110>
- Ryan, P. J., Ma, S., Olucha-Bordonau, F. E., & Gundlach, A. L. (2011). Nucleus incertus—An emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(6), 1326–1341. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.004>
- Santos, F. N., Pereira, C. W., Sánchez-Pérez, A. M., Otero-García, M., Ma, S., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2016). Comparative Distribution of RLN3Inputs and Calcium-Binding Protein-Positive Neurons in Rat Amygdala. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(April), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00036>
- Segal-Lieberman, G., Bradley, R. L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D. J., Wang, X., ... Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 10085–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633636100>
- Smith, C. M., Lawrence, A. J., Sutton, S. W., & Gundlach, A. L. (2009). Behavioral Phenotyping

- of Mixed Background (129S5:B6) RLN3 Knockout Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1160(1), 236–241. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03953.x>
- Smith, C. M., Shen, P. J., Banerjee, A., Bonaventure, P., Ma, S., Bathgate, R. A. D., ... Gundlach, A. L. (2010). Distribution of RLN3 and RFXP3 within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 518(19), 4016–4045. <https://doi.org/10.1002/cne.22442>
- Smith, H. R., & Porrino, L. J. (2008). The comparative distributions of the monoamine transporters in the rodent, monkey, and human amygdala. *Brain Structure and Function*, 213(1–2), 73–91. <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0176-2>
- Steinbusch, H. W. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4), 557–618. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017455>
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., & Vale, W. W. (1983). Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*, 36(3), 165–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601247>
- Tanaka, M. (2010). Relaxin-3/insulin-like peptide 7, a neuropeptide involved in the stress response and food intake. *FEBS Journal*, 277(24), 4990–4997. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07931.x>
- Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., & Ibata, Y. (2005). Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1659–1670. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x>
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M., & Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience*, 7(5), 493–4. <https://doi.org/10.1038/nn1226>
- Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior*, 74(4–5), 683–701. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00612-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00612-6)
- Woodside, D. B., Garfinkel, P. E., Lin, E., Goering, P., Kaplan, A. S., Goldbloom, D. S., & Kennedy,

S. H. (2001). Comparisons of Men With Full or Partial Eating Disorders, Men Without Eating Disorders, and Women With Eating Disorders in the Community. *American Journal of Psychiatry*, *158*(4), 570–574. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.4.570>

Yokoyama, M., Suzuki, E., Sato, T., Maruta, S., Watanabe, S., & Miyaoka, H. (2005). Amygdalic levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. *Neuroscience Letters*, *379*(1), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.12.047>