

**LA PROYECCIÓN DE RELAXIN-3 SOBRE EL NÚCLEO  
SUPRAMAMILAR. IMPLICACIONES SOBRE LA MEMORIA**

**Trabajo Final de Grado**

**Grado en Medicina**

**Autora: Ana Reverte Lorenzo  
Tutor: Francisco Eliseo Olucha Bordonau  
Unidad Predepartamental de Medicina**

**Curso 2020/21  
Castellón de la Plana, junio 2021**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>EXTENDED SUMMARY</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1.1.2 Hipocampo (HC)	11
1.1.2.3 Ondas theta hipocámpicas	15
1.1.3.2 Implicaciones del núcleo supramamilar en la memoria de trabajo	18
1.1.4 <i>Nucleus incertus</i> (NI) y relaxin 3 (RLN3)	20
1.1.4.1 Relaxin-3/RXFP3 en procesos de memoria plástica	21
1.1.4.2 Núcleo incertus y ritmo theta del Hipocampo	22
1.1.4.3 NI / RLN3: su implicación en la actividad motora y la excitación	22
<b>1.2 HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>1.3 OBJETIVO</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>Animales</b>	<b>24</b>
<b>Procedimiento quirúrgico</b>	<b>24</b>
<b>Perfusión y Fijación</b>	<b>25</b>
Microtomía	25
<b>Immunocitoquímica</b>	<b>26</b>
<b>Immunofluorescencia</b>	<b>27</b>
<b>Estudio microscópico</b>	<b>28</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>

# LA PROYECCIÓN DE RELAXIN-3 SOBRE EL NÚCLEO SUPRAMAMILAR. IMPLICACIONES SOBRE LA MEMORIA

## RESUMEN

El hipocampo constituye el órgano central de procesamiento de la memoria explícita. Su actividad está modulada por proyecciones subcorticales con origen en los cuerpos mamilares y en el núcleo incertus. Estas dos estructuras participan en la generación del ritmo theta hipocámpico, una onda de 4 a 12 Hz del potencial de campo asociada a la memoria espacial. Los cuerpos mamilares son la principal estructura afectada en el síndrome de Korsakoff resulta en una amnesia global. Los cuerpos mamilares y el hipocampo reciben proyecciones desde el núcleo incertus y, en este sentido, nuestra hipótesis es que esta proyección juega un papel relevante en la generación de memoria. El objetivo de este estudio es la comprobación de la existencia de conexión sináptica entre el núcleo incertus y las neuronas supramamilares con proyección hipocámpica. Para ello, se han realizado inyecciones del trazador retrógrado fluorogold en el hipocampo y a la vez del anterógrado BDA en el núcleo incertus. En estos casos, se observó que, efectivamente, en el núcleo supramamilar lateral aparecían neuronas marcadas con fluorogold que tenían a su alrededor fibras marcadas con BDA. En estas mismas preparaciones se hizo un triple revelado para observar, además, la presencia del marcador sináptico sinaptofisina. Se observó que, efectivamente, las fibras marcadas anterógradamente que se localizaban en la proximidad de somas marcados retrógradamente contenían el marcador sináptico. Por lo tanto, el núcleo incertus envía fibras a los cuerpos mamilares que realizan contactos sinápticos con las neuronas de este centro que proyectan al hipocampo.

**Palabras clave:** hipocampo, relaxin3, región supramamilar, nucleus incertus.

## **ABSTRACT**

The hippocampus is considered to be the central organ for processing explicit memory. Its activity is modulated by subcortical projections originating from the mammillary bodies and the nucleus incertus. These two structures participate in the generation of the hippocampal theta rhythm, a 4 to 12 Hz wave of the field potential associated with spatial memory. The mammillary bodies are the main structure affected in Korsakoff syndrome resulting in global amnesia. The mammillary bodies and the hippocampus receive projections from the nucleus incertus and, in this sense, our hypothesis is that this projection plays a relevant role in memory generation. The aim of this study is to verify the occurrence of a synaptic connection between the nucleus incertus and hippocampally projecting supramamillary neurons. To do this, injections of the retrograde fluorogold tracer have been made in the hippocampus and at the same time the anterograde BDA in the nucleus incertus. In these cases, it was observed that, indeed, in the lateral supramamillary nucleus there were fluorogold neurons surrounded by BDA labeled fibers. In these same preparations, a triple development was made to observe, in addition, the occurrence of the synaptic marker synaptophysin. It was observed that, indeed, anterograde labeled fibers that were located in the vicinity of retrograde labeled somata contained the synaptic marker. Therefore, the nucleus incertus sends fibers to the mammillary bodies that make synaptic contacts with the neurons of this center that project to the hippocampus.

**Key words:** hippocampus, relaxin3, supramamillary region, nucleus incertus.

## **EXTENDED SUMMARY**

The central nervous system is made up of a complex set of dynamic cells organized in different neuroanatomical areas. In one of these systems, the so-called limbic system is where the responses to stimuli driven by hunger, emotions and memory (explicit and implicit) are found. Therefore, it is the central core for the normal behavior of human beings.

The hippocampus constitutes the key structure of the limbic system circuit. The hippocampus contains a set of areas that share a three-layered cortical pattern composed of the dentate gyrus (fascia dentata), Ammon's horn (fields CA1, CA2 and CA3), presubiculum, subiculum and parasubiculum. Each of these structures provides a particular contribution in the process of generating explicit memories.

Nowadays it is admitted that one of the main functions performed by the hippocampus is related to cognitive processes related to the generation of explicit memory, including spatial orientation.

Higher cognitive and emotional mental functions are modulated by subcortical inputs. Subcortical modulation is defined as part of the ascending reticular activator system (SARA) and is one of the two major subunits of the reticular formation.

One of the components of the activation system is the nucleus incertus (NI), which provides a strong GABAergic innervation over most of limbic structures. NI GABAergic neurons express some peptides, including relaxin 3 (RLN3). Relaxin 3 is a peptide of the relaxin-insulin superfamily, which is expressed mainly in the NI. This neuropeptide uses the G protein-coupled receptor RXFP3. This receptor is distributed throughout the CNS, and this relaxin 3 / RXFP3 receptor system has been the subject of previous studies.

In particular, NI neurons project to most components of the SARA, including those responsible for subcortical activation of the hippocampal theta rhythm, and are therefore well positioned to play a role in modulating the acquisition and recovery of the memory.

Given that the projection of the nucleus incertus on the supramammillary region is intense and reciprocal, the relay at this point of the ascending connections from the nucleus incertus on the hippocampus could modulate specific aspects associated with the functionality of the system both in terms of hippocampal theta synchronization and in the generation of spatial memories. The first step in solving this hypothesis is the verification of the existence of a synaptic connection between relaxin 3-positive fibers from the

nucleus incertus and neurons of the supramammillary complex that project to the hippocampus.

To carry out this study, six rats, male and female of the wistar breed, were used, complying with all the protocols approved by the UJI committee of ethics and animal experimentation. These animals received an injection of the retrograde tracer fluorogold in the hippocampus and an injection of the anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) in the nucleus incertus. After 7 days of recovery, the animals were anesthetized with an overdose of euthalender and transcardially perfused with saline followed by the fixative PFA. Then the brains were removed from the skulls and immersed in the same fixative for 4 h at 4°C. After that, the brains were cryoprotected and sectioned at 40 µm in a freezing sliding microtome. Then they were prepared for immunofluorescence of fluorogold, BDA and the synaptic marker synaptophysin.

With these preparations we observed retrograde labeling in the supramammillary area mainly located in the lateral part. At the same time, we also observed some anterograde labeling that entered in the mammillary complex from the medial forebrain bundle and gave rise to a dense plexus in the external parts of the lateral mammillary nucleus. From this area some fibers ran dorsally and formed a dense plexus surrounding retrogradely labeled somata. When applying a third labeling with the synaptic marker synaptophysin, we observed that most of anterogradely labeled fibers also contained syn.

The occurrence of this pattern fulfills a scheme of overlapping upwards labeling on structures involved in hippocampal theta rhythm. It has been usually observed that the medial septum is pacemaker of the hippocampal theta rhythm, the fact that the supramammillary nucleus projects to both, the hippocampus and the medial septum adds some complexity to the system.

However, the supramammillary area do not contain neurons with a rhythmic activity like the septal or hippocampal ones. Thus rhythmicity can come after this overlapping system over the medial septum and hippocampus. On the other hand, it has been found that the supramammillary nucleus provides several features over the rhythm such as the amplitude and duration. Thus, the NI projection to the supramammillary nucleus may affect to this features that could be essential in the codification of the explicit memories.

In conclusion, the NI provides a dense projection that synaptically targets the hippocampal projecting neurons of the lateral supramammillary nucleus. This projection may be relevant in generating the hippocampal theta rhythmicity and in some aspects of this rhythm such as amplitude and duration.

## ABREVIATURAS

CA	Asta de Ammón
CA1	Región 1 del cuerno de Ammón
CA2	Región 2 del cuerno de Ammón
CA3	Región 3 del cuerno de Ammón
CA4	Región 4 del cuerno de Ammón
CCMM	Cuerpos mamilares
CE	Corteza entorrinal
CFP	Corteza prefrontal
CL	Células del lugar
CpF	Corte prefrontal
DR	Núcleo dorsal del raphe
DT	Núcleo dorsal tegmental
EEG	Encefalografía
GD	Giro dentado
HC	Hipocampo
LEC	Corteza entorrinal lateral
MCP	Memoria a corto plazo
MEC	Corteza entorrinal medial
mfB	Haz prosencefálico medial
MH	Memoria humana
mp	Pedúnculo mamilar
NI	Nucleus incertus
Nic	Pars compacta
NId	Pars dissipata
PAG	Sustancia gris periacueductal
Relaxin 3	RLN3
RM	Región mamilar
RPO	Formación reticular del puente oral
SM	Septum medial
SMBD	Septum medial banda diagonal
SNC	Sistema nervioso central
SO	Stratum oriens
spv	Sistema periventricular
SARA	Sistema activador reticular ascendente

SuM

Región Supramamilar

TV

Núcleo tegmental ventral

# **LA PROYECCIÓN DE RELAXIN-3 SOBRE EL NÚCLEO SUPRAMAMILAR. IMPLICACIONES SOBRE LA MEMORIA**

## ***1. INTRODUCCIÓN***

El sistema nervioso central (SNC) está formado por un complejo conjunto de células, dinámicas, activadas en diferentes zonas neuroanatómicas. En uno de estos sistemas, el llamado sistema límbico (SL), es donde se encuentran las respuestas a los estímulos impulsados por el hambre, las emociones, la memoria (explícita e implícita), entre otros. Aun cuando existen amplias controversias acerca de si se trata de un sistema segregable del conjunto conceptual del SNC, el SL está configurado por una red de neuronas que computan aspectos tales como la regulación de la actividad vegetativa del organismo, las emociones, el olfato, el aprendizaje y algunos tipos de memoria (p.e. memoria a corto plazo, MCP). Por lo tanto, resulta obvio afirmar que su influencia sobre otras partes del sistema nervioso es determinante para la conducta normal de los seres humanos.

Entre las estructuras citadas que responden a la memoria, se encuentra el Hipocampo (HC), cuya función es el almacenamiento y procesamiento de la memoria, considerándose como centro esencial en la configuración del comportamiento humano y en el aprendizaje y desarrollo de funciones tanto cognitivas como afectivas.

Las funciones mentales superiores cognitivas y emocionales están moduladas por entradas subcorticales. Esta modulación sobre el hipocampo, amígdala y neocórtex ha sido objeto de estudios que, en la actualidad, vienen siendo revisados ya que es necesario un conocimiento detallado de los mecanismos que actúan en la modulación subcortical.

La modulación subcortical se define como parte del sistema activador reticular ascendente (SARA) y es una de las dos subunidades principales de la formación reticular. Está implicada en la vigilia, la atención y los cambios sueño-vigilia. Sin embargo, la complejidad de las proyecciones ascendentes, llevan a considerar al telencéfalo basal como una pieza clave para estos sistemas ascendentes (Gil-Miravet et al., 2021).

Uno de los componentes del sistema de activación, es el núcleo incertus (NI), el cual proporciona una fuerte inervación GABAérgica del hipocampo, telencéfalo basal, amígdala, corteza prefrontal y núcleo supramamilar. Las neuronas NI GABAérgicas expresan algunos péptidos, incluyendo el relaxin 3 (RLN3), neuromedin-B y colecistoquinina (Smith et al., 2010).

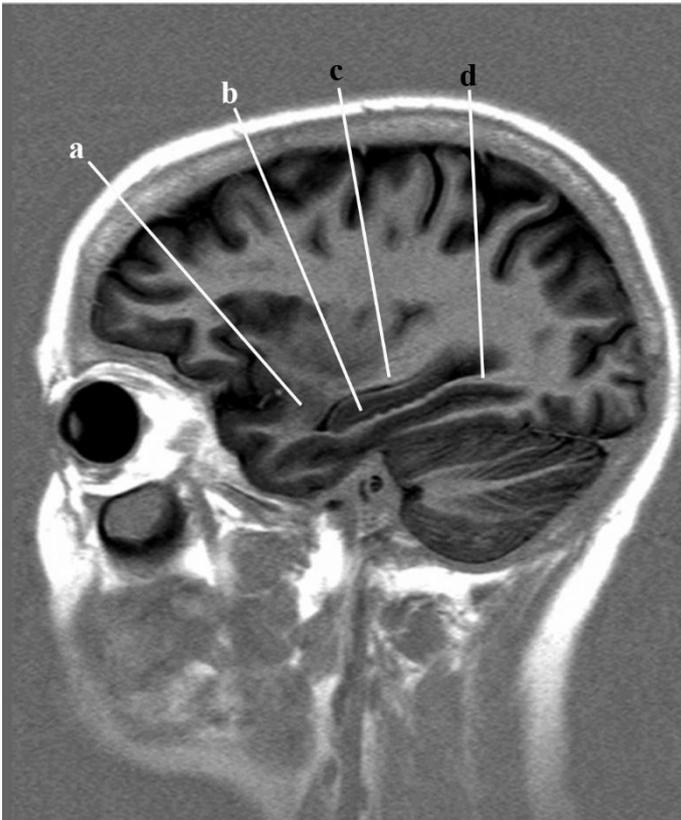
## **1.1 EL CIRCUITO DE LA MEMORIA**

### **1.1.1 Caso H.M.**

Henry Gustav Molaison, conocido como H.M., ha sido considerado como uno de los pacientes de mayor importancia en la neurociencia. En su infancia, sufrió un trauma craneoencefálico que derivó en un cuadro de convulsiones graves que se hicieron más agudas en los siguientes años. Para mitigar la epilepsia intratable se planteó la ablación del lóbulo temporal causante de las crisis. Tras la intervención, las crisis cesaron, pero H.M. presentó un síndrome de amnesia anterógrada profunda, perdiendo la capacidad de almacenar episodios concretos para nuevos recuerdos, así como de tipo semántico. La intervención había consistido en la extirpación bilateral quirúrgica del lóbulo medial temporal (LMT), parte de las amígdalas y el giro hipocámpico. La pérdida en la capacidad de generar memorias de tipo anterógrado produjo un cambio de concepto ya que, hasta mediados del siglo XX, se sostenía que la memoria se distribuía en porciones amplias y difusas del cerebro. Este punto de vista cambió como resultado de las pruebas a las que fue sometido en las que se demostró que al menos había en el cerebro dos sistemas en la creación de nuevos recuerdos: a) la memoria declarativa o explícita; y, b) memoria implícita. La primera depende del hipocampo y la segunda se puede subdividir en varios tipos cada uno de los cuales presenta un centro cerebral clave. La clasificación de los tipos de memoria constituye la taxonomía de la memoria.

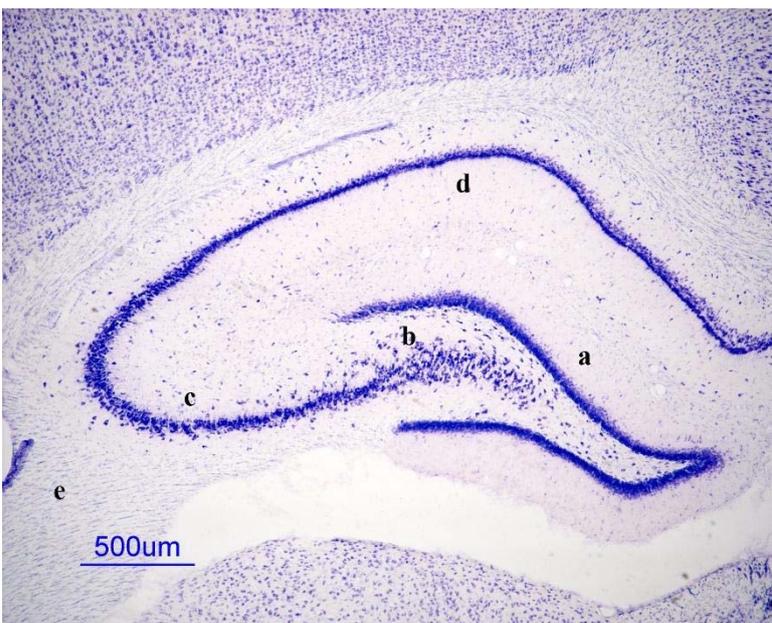
### **1.1.2 Hipocampo (HC)**

El HC se ubica en el lóbulo temporal, y constituye el núcleo central del circuito del sistema límbico. El HC lo forma un grupo de áreas que comparten una estructura de corteza de tres capas integrado por el giro dentado (fascia dentada), asta de Ammon (campos CA1, CA2 y CA3), presubiculum, subiculum y parasubiculum. Cada una de las subestructuras presenta una particular contribución en el proceso de generación de memorias explícitas.



**Figura 1:** Corte parasagital de una resonancia magnética donde queda evidente la localización relativa del hipocampo y la amígdala. a) amígdala, b) hipocampo, c) estría terminal, d) fórnix

En cualquier corte se puede observar que el hipocampo está configurado por el asta de Ammon con sus áreas CA1, CA2 y CA3, y el giro dentado que contiene la región polimórfica.



**Figura 2:** Microfotografía de una sección coronal del cerebro de rata con las principales divisiones del hipocampo. a) giro dentado, b) región polimórfica del giro dentado, c) campo CA3, d) campo CA1, e) fimbria

Por último, resulta necesario indicar que específicamente parece que el HC guarda una estrecha relación con el córtex prefrontal, el área septal y el núcleo supramamilar.

Hoy en día está admitido que una de las principales funciones que desempeña el HC, están relacionadas con los procesos cognitivos relacionados con la generación de la memoria declarativa incluyendo la orientación espacial.

Los principales trabajos que la literatura muestra sobre estas funciones se deben a (O'Keefe et al., 1971), (O'Keefe, 1976) y (O'Keefe and Nadel, 1978). Mediante experimentos con animales roedores en laboratorio, se demostró la participación del HC en las funciones descritas.

La primera de ellas, la inhibición, está determinada tanto por la inhibición conductual como en el desarrollo de la ansiedad, basándose el estudio en buscar la sincronización de la actividad cerebral entre las regiones del cerebro ya que este factor constituye un signo de transferencia de información; como el HC y la corteza prefrontal (CpF) están conectados, la sincronización se hizo patente en todos los entornos en los que se exponían los ratones. Sin embargo, en las situaciones en que producía ansiedad a los animales se observó que se incrementa la sincronización entre ambas partes cerebrales. En esta investigación se logró concluir que el HC es el encargado de transmitir la información necesaria para inhibir ciertas conductas.

Respecto de la segunda función señalada, la memoria, se puede afirmar que hoy en día hay un amplio consenso científico sobre la importancia de esta región. En este sentido, se asevera que constituye una estructura muy importante para el funcionamiento y el desarrollo de la memoria. Principalmente se defiende que el HC es la estructura cerebral que permite la formación de nuevos recuerdos en los acontecimientos experimentados, tanto episódicos como autobiográficos. De este modo, se concluye que el hipocampo es la zona del cerebro que permite el aprendizaje y la retención de la información.

Por último, la tercera función indicada, la orientación espacial, ha podido determinarse en ciertos experimentos con ratas en donde se han puesto de manifiesto que el hipocampo contiene una serie de neuronas que tienen campos de lugar; esto quiere decir que un grupo de neuronas del HC, desencadenan potenciales de acción o transmiten información cuando el animal pasa por un sitio concreto de su entorno. De este modo, estos trabajos con roedores han evidenciado que el hipocampo podría ser una región vital en el desarrollo de la capacidad de orientación y la memoria espacial.

### **1.1.2.1 El hipocampo en la representación espacial**

En el HC hay ciertas neuronas que proyectan en determinadas zonas del espacio donde se ubica el animal, conocidas como células del lugar, lo cual pone de manifiesto la importancia del HC en la representación espacial.

(O'Keefe and Nadel, 1978) manifestaron que en la representación del espacio donde se ubica un animal, además del HC intervienen distintas estructuras del sistema límbico. Es decir, no solamente las células del lugar, sino que se han descrito células del postsubiculum que responden a la orientación de la cabeza del animal, tal y como señalan (Taube et al., 1990) y células del córtex entorrinal medial que integran la información de posición, orientación y velocidad de forma independiente del entorno.

Según (O'Keefe and Burgess, 2005), consideran que la navegación del animal es una integración del mapa espacial construido con el tiempo. Por lo tanto, la integración no tiene lugar únicamente en el hipocampo o el córtex entorrinal sino también en los generadores subcorticales del ritmo theta (Blair et al., 2008).

En consecuencia, esta combinación de las células implicadas en la ubicación con las fases de la oscilación theta es la explicación del sistema de representación tanto de la ubicación en el espacio como de la velocidad desarrollada.

En otro estudio (Olton, 1986), se llevaron a cabo experimentos basados en pacientes con lesión de fimbria-fórnix (como el caso H.M.), concluyendo que además de déficits de memoria operativa, experimentaban una distorsión en la percepción del tiempo. Por ello, esta discriminación temporal debe implicar a los mismos procesos neuronales, destacándose la trascendencia del hipocampo en estos procesos.

De acuerdo a este planteamiento, la función hipocámpica participa en la constitución de un mapa cognitivo espacial y uno temporal, lo que permite interrelacionar los eventos procesados y gestionar con ellos la memoria.

### **1.1.2.2 El giro dentado**

Se trata de una zona cortical de tres capas con células granulares, piramidales y musgosas, además de una extensa red de interneuronas inhibitorias. Además, una de las principales características de las células de la fascia dentada es la gran cantidad de conexiones que puede establecer con células piramidales de CA3, lo que le otorga una gran plasticidad sináptica (Amaral et al., 2007), mecanismo al que se asocian los procesos de aprendizaje y memoria.

En roedores, las proyecciones de las células musgosas se quedan a nivel del giro dentado y, como filtro de la información que entra en el HC, sirven de retroalimentación excitatoria (Hsu, 2007)

Por último, la red de interneuronas inhibitorias está implicada en la activación rítmica de las células granulares, lo que hace que participen en la generación del ritmo theta.

### **1.1.2.3 Ondas theta hipocámpicas**

El estudio del ritmo theta en hipocampo es importante puesto que se correlaciona con actividades como la realización del movimiento voluntario, atención, aprendizaje y la fase del sueño llamada REM asociada al movimiento rápido de ojos.

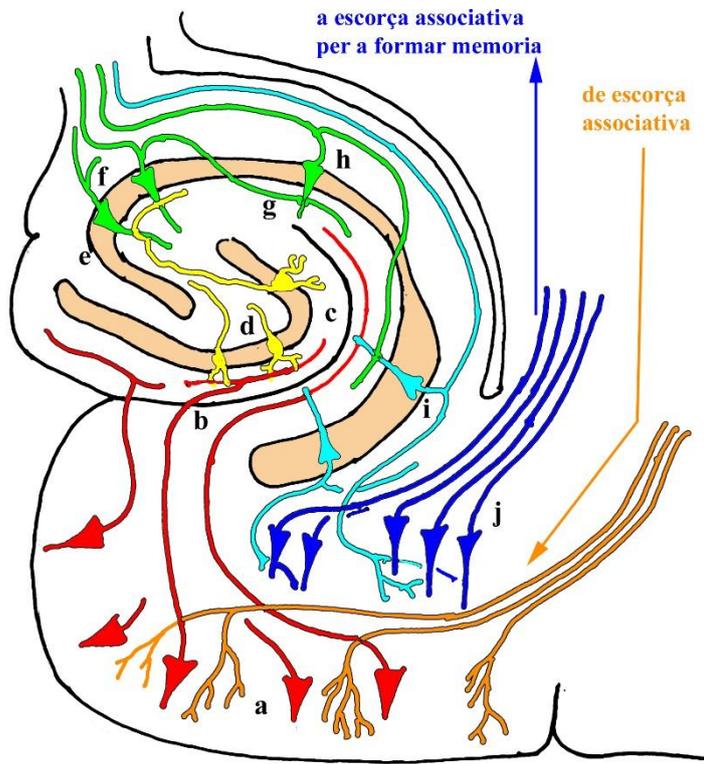
En el HC se produce una actividad eléctrica complementaria a la actividad neuronal. A través de medidas de encefalografía (EEG), se han observado ondas con frecuencias entre 4 a 12 Hz tanto en estado de actividad como en reposo. Su generación depende de la descarga rítmica de una población de neuronas localizadas en el núcleo medial del *septum*. La estimulación de estas áreas genera ritmo theta en el HC y, en el caso de lesiones en estos núcleos o en el fórnix dorsal, abolen el ritmo theta y la ritmicidad de las descargas en el HC.

Estos resultados se han obtenido en laboratorio, con ratas, y modulan la tasa de disparo de las neuronas del HC, sincronizándose por todo el HC por un patrón conocido como ritmo theta o RSA (*rhythmic slow activity*), y según (O'Keefe and Nadel, 1978), este ritmo se asocia al comienzo de movimientos voluntarios, con variabilidad de la frecuencia en función de las características del movimiento; es decir, se asocian los momentos (el tiempo) y la representación espacial a través de la actividad oscilatoria, tal y como señalan (O'Keefe and Burgess, 2005)

En consecuencia, la actividad de las células interviene no solamente en un elemento, sino en otros que se relacionan en (Blair et al., 2008) como el córtex entorrinal y en los generadores subcorticales del ritmo theta. Así que la combinación de las tasas de disparo de las células implicadas en la localización espacial, con las fases de la oscilación theta donde disparan, permite conocer la representación de la ubicación del animal y su velocidad de movimiento.

La literatura muestra trabajos en los que se señala que, el ritmo theta, se asocia también a la intencionalidad de los movimientos espaciales, si bien, algunos otros estudios añaden que más que estas acciones, la oscilación está relacionada en procesos de integración

sensorial al explorar los terrenos, y en la gestión de la memoria, conocido actualmente con la navegación (Buzsáki and Moser, 2013).



**Figura 3:** Esquema que representa los circuitos intrahipocámpicos responsables de la codificación y la formación de memoria que será almacenada en la corteza cerebral, el circuito comienza en la entrada de información procedente de la corteza de asociación (por ejemplo una manzana roja muy buena) esta información entra en el

hipocampo desde los estratos superficiales de la corteza entorrinal y en el hipocampo comienzan unos circuitos reverberantes responsables de cambios a largo plazo, finalmente esta información se lanzada de nuevo a la misma corteza asociativa de la que venía donde quedará fijada como memoria a largo plazo. a) estratos superficiales de la corteza entorrinal, b) vía perforante, c) giro dentado, d) células granulares del giro dentado, e) campo CA3 del asta (cuerno) de Amón, f) células piramidales de CA3, g) colateral, h) célula piramidal de CA1, i) subículo, j) estratos profundos de la corteza entorrinal.

### 1.1.3 Núcleo Supramamilar

#### 1.1.3.1 Núcleo supramamilar y sus conexiones

(Sziklas V., Petrides M., Leri, 1996) señalan que la región mamilar (en lo sucesivo RM) se localiza en la porción más caudal del hipotálamo y se compone de varios núcleos, tales como los cuerpos mamilares, el núcleo premamilar, el núcleo supramamilar (en lo sucesivo SuM) y el núcleo tegmental ventral (en lo sucesivo TV), siendo los cuerpos mamilares y el núcleo SuM aquellos que se han asociado con el HC y con la memoria.

Los CCMM se conectan con otros núcleos cerebrales a través del fórnix cuya función más clara es la de permitir la transmisión de la información.

La literatura muestra trabajos en los que se detallan las distintas proyecciones que originan en el HC entre sus estructuras asociadas y moléculas y/o neuronas que transmiten dichas proyecciones, sean las recogidas como eferencias (conducción desde las partes interiores del SNC a las partes exteriores o periféricas) y aferencias (comunicación desde las partes periféricas a las partes interiores). Así, (Vertes y McKenna, 1997) señalan que se originan estas proyecciones del SuM hacia el HC, mayoritariamente, en las zonas laterales del SuM. Tales proyecciones enlazan el giro dentado (GD) y la región CA2/CA3a del asta de Ammón en el hipocampo dorsal.

Concretamente, en el trabajo de (Kiss et al., 2000), se indica que las proyecciones hipocámpales del SuM, finalizan en la capa granular del giro dentado y en a) el *stratum oriens* (SO) con varios tipos de células (células horizontales con axón descendente y células poligonales con axón ascendente) y b) piramidal de la región CA2/CA3a, tanto en células principales (granulares y piramidales) como GABAérgicas. Estas proyecciones directas de las neuronas del SuM, son de tipo excitatorio, siendo el glutamato el neurotransmisor mayoritariamente empleado en esta vía.

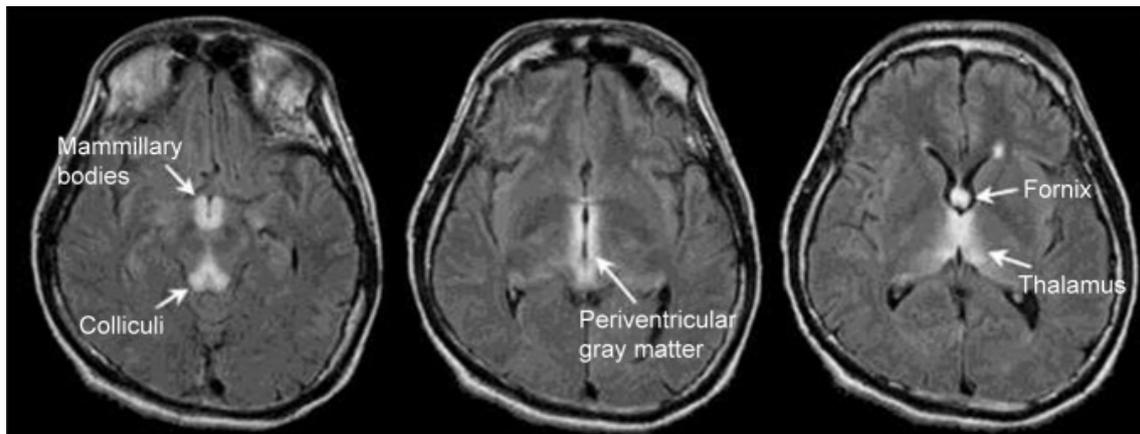
Además de las eferencias hipocámpales, (Wei Pan and McNaughton, 2004) señalan que el SuM recibe aferentes hipocámpales, siendo éstas de menor importancia y que alcanzan el fórnix a través de parte inferior denominada fimbria, que es un haz de fibras que constituye el borde ventrolateral del hipocampo durante alguna distancia. Y las vías eferentes del hipocampo consisten en las proyecciones corticales y subcorticales de las células piramidales del hipocampo.

En consecuencia, (Kiss et al., 2000), afirman que el patrón de proyecciones que presenta el SuM, sea el que pueda modular la función hipocámpal de dos modos: a) directamente, a través de sus proyecciones hipocámpales y b) indirectamente, a través del área septal medial. En este sentido, (McKenna and Vertes, 2001) han demostrado la existencia de un subconjunto de neuronas SuM con proyecciones colaterales al septum medial y al hipocampo, lo que indica la capacidad de estas neuronas para modular funcionalmente ambas regiones al mismo tiempo.

### 1.1.3.2 Implicaciones del núcleo supramamilar en la memoria de trabajo

El papel de los cuerpos mamilares en la generación de memoria ha quedado evidenciado desde el punto de vista clínico en los estudios sobre el síndrome de Korsakoff. Se trata de un síndrome residual por ingesta de alcohol que resulta en la encefalopatía del síndrome de Wernicke cuando no se produce un tratamiento de sustitución de tiamina (Kopelman, 1995). La principal manifestación de este síndrome es la amnesia global que puede ser muy profunda y se produce en combinación con otros déficits cognitivos y de comportamiento que, a su vez, son más profundos en estadios más severos de la enfermedad.

A nivel neuroanatómico se ha demostrado una importante afectación de los cuerpos mamilares y otras estructuras directamente relacionadas con el 3er ventrículo como el tálamo dorsal o la sustancia gris del acueducto (Figura 4). El funcionamiento anómalo de los circuitos envueltos en las proyecciones de los cuerpos mamilares serían las causas más probables que subyacen a la amnesia global y al procesamiento anómalo de los recuerdos persistentes.

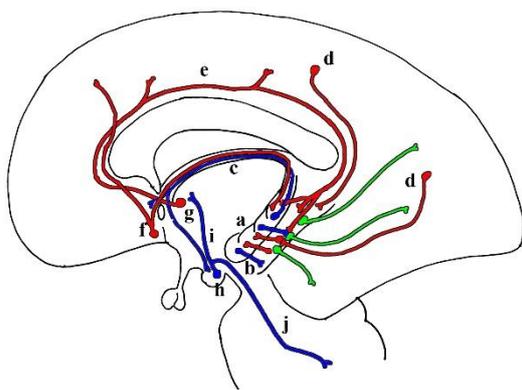


**Figura 4:** Tres imágenes de recuperación de inversión atenuada por líquido (FLAIR) (5 mm de grosor con un espaciado de 2,5 mm) de un hombre de 35 años con esquizofrenia y encefalopatía de Wernicke inducida por deficiencia nutricional aguda (WE). Se observa la señal hipertensa en las regiones situadas alrededor del 3er ventrículo especialmente en los cuerpos mamilares. Imagen obtenida de (Sullivan and Pfefferbaum, 2009).

Entre los estudios que han abordado la participación de los cuerpos mamilares en la modulación de la memoria se encuentran los desarrollados por Béracochéa y su grupo (Béracochéa and Jaffard, 1995; Jaffard et al., 1991), que apoyan una participación de los cuerpos mamilares en tareas de memoria de trabajo cuando se incrementa la dificultad .

No obstante, la mayor parte de los estudios de lesión sobre los que se asientan parcialmente sus conclusiones, además de incluir los cuerpos mamilares afectan sistemas de fibras como el tracto mamilotalámico y/o lesiones en SuM, localizado dorsalmente a los cuerpos mamilares.

Hay cierta evidencia experimental que permite asociar el SuM con la memoria. La lesión de la región mamilar conduce a la aparición de severas alteraciones de memoria, tanto en animales de experimentación (Aranda et al., 2008), como en humanos (Dusoir, Kapur, Byrnes, McKinstry y Hoare, 1990; Hildebrandt, Müller, Busmann-Mork, Goebel y Eilers, 2001; Rosenbaum et al., 2015). Se ha observado un aumento en la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en el SuM asociada con la memoria espacial (Ito, Shirao, Doya y Sekino, 2009).



**Figura 5:** Esquema que representa las principales vías implicadas en la formación de memoria explícita. a) hipocampo, b) corteza entorrinal, c) fórnix, d) corteza (neocórtex), e) corteza cingular, f) complejo septum medial banda diagonal, g) núcleos talámicos anteriores, h) cuerpos mamilares, i) tracto mamilotalámico, j) tracto mamilotegmental.

mamilotegmental.

El informe neuropsicológico reflejó que H.M. presentaba una dificultad importante en la formación de mapas espaciales y en la precisión de más de dos puntos de referencia próximos a lo largo de una ruta (Rosenbaum et al., 2015).

Por otro lado, otros estudios han mostrado que la alteración circunscrita a los cuerpos mamilares debido a diferentes procesos patológicos es suficiente para inducir alteraciones severas y persistentes en la memoria declarativa. De este modo, Dusoir et al. (1990) observaron una grave alteración de la memoria visoespacial y de la memoria verbal (en tareas de recuerdo libre y demorado, pero no de reconocimiento) debida a la lesión bilateral de los cuerpos mamilares.

Estos resultados muestran que un pequeño daño a los cuerpos mamilares es condición suficiente para inducir alteraciones de memoria declarativa en los seres humanos.

#### **1.1.4 *Nucleus incertus* (NI) y relaxin 3 (RLN3)**

El NI fue descrito (Streeter, 1903) como una región situada en el suelo del cuarto ventrículo que se extendía desde los niveles en que se observa la rodilla del nervio facial hasta la sustancia gris periacueductal del cerebro humano en el tegmentum pontino.

Su localización es caudal al núcleo dorsal del raphe (DR), y es medial con respecto al núcleo dorsal tegmental (DT); se diferencia un área paramedial integrada por dos tipos de células: a) las denominadas *pars compacta* (NIc), densamente empaquetadas; y, b) con el nombre de *pars dissipata* (NI<sub>d</sub>) se encuentran un grupo de células que están más dispersas.

Además, los datos anatómicos sugieren que el núcleo pontino del rafe es una extensión rostral del NI (Nasirova et al., 2020). Si bien a menudo se considera un núcleo serotoninérgico (Hale and Lowry, 2011), el número de neuronas positivas para serotonina (5-HT) en el núcleo pontino del rafe es menor que el número de neuronas positivas para relaxina 3 (Tanaka et al., 2005).

Tal y como indican (Olucha-Bordonau et al., 2003), el NI presenta un extenso patrón de conexiones por lo que puede desarrollar funciones moderadoras sobre la actividad específica de las estructuras telencefálicas sobre las que proyecta.

En (Olucha-Bordonau et al., 2003), se señala que el NI es de naturaleza GABAérgica y sus proyecciones se dispersan en el mesencéfalo incluyendo el colículo superior, núcleos interpedunculares y la sustancia gris del acueducto, diencefalo incluyendo los núcleos intralaminares de la línea media, habénula lateral, núcleo supramamilar área perifornical, hipotálamo preóptico y área lateral hipotalámica y telencefalo incluyendo septum medial, hipocampo, amígdala extendida y corteza entorrinal. El neocortex está esencialmente libre de proyecciones desde el núcleo incertus.

El NI es una estructura compleja compuesta predominantemente por neuronas GABAérgicas en el cerebro de la rata y del ratón, y coexpresan neuromedina-B (NMB) (Lu et al., 2020), colecistoquinina (Olucha et al., 2003) y / o neurotensina (Jennes et al., 1982), así como relaxina-3.

Con respecto a la modulación de la excitación durante la función de vigilia / sueño, se propuso ampliamente que los centros promotores de ARAS en el tronco cerebral actúan a través de mecanismos lentos impulsados por sistemas monoaminérgicos, colinérgicos y peptidérgicos (Xu et al., 2004). Este punto de vista fue desafiado por varios experimentos en los que la ablación múltiple de estos sistemas produjo poco efecto sobre las proporciones de vigilia / sueño. Esto dio como resultado un enfoque en la posibilidad de que proyecciones glutamatérgicas / GABAérgicas rápidas conduzcan a un control más preciso de los centros de excitación (Saper and Fuller, 2017). En este sentido, la NI proporciona una proyección ascendente que contiene el transmisor rápido, GABA (Olucha-Bordonau et al., 2003), y una serie de moduladores peptidérgicos de acción más lenta (Ma et al., 2007).

En particular, las neuronas NI se proyectan a la mayoría de los componentes del ARAS, incluidos los responsables de la activación subcortical del ritmo theta del hipocampo (Ma et al., 2007); (Smith et al., 2010); (Tanaka et al., 2005); (Vertes y McKenna, 1997) , y por lo tanto están bien posicionados para desempeñar un papel en la modulación de la adquisición y recuperación de la memoria. En línea con las proyecciones generalizadas del sistema de NI, varias líneas de investigaciones han indicado su participación en una variedad de funciones, incluido el estrés, la ingesta de alimentos, adicción al alcohol (Ryan et al., 2014), excitación y generación y recuperación de memoria (Lu et al., 2020; (Nategh et al., 2015); Szőnyi et al., 2019).

#### **1.1.4.1 Relaxin-3/RXFP3 en procesos de memoria plástica**

RNL3 es un péptido que representa la forma ancestral de los otros péptidos de la familia de la relaxina. Similar a los péptidos de insulina, la relaxina-3 está formada por cadena A y B unidas por dos enlaces disulfuro. Se encontró que la expresión de ARNm de relaxina-3 era más abundante en el cerebro (Burazin et al., 2002), con cierta expresión en otros órganos como los pulmones, el hígado, el bazo, el timo y las gónadas (Bathgate et al., 2002).

Relaxina3 es de la familia de las relaxinas e insulinas (Wilkinson et al., 2005) y se le relaciona con la memoria y otros episodios neurológicos. Se origina en el NI, liberándose por diversas zonas del SNC, entre otros en el Núcleo supramamilar y el hipocampo.

La expresión de relaxina-3 se localiza predominantemente en neuronas del NI del tegmento pontino en ratas, ratones y macacos (Ma et al., 2007; Smith et al., 2010; Tanaka et al., 2005).

La investigación ha descubierto que el sistema relaxin-3/RXFP3 está implicado en funciones tales como la modulación del estrés, ansiedad, la búsqueda de comida, los comportamientos adictivos y sociales (Olucha et al., 2018).

#### **1.1.4.2 Núcleo incertus y ritmo theta del Hipocampo**

El papel de la NI en la generación del ritmo theta se planteó por primera vez la hipótesis sobre la base de su conectividad anatómica (Olucha et al., 2003). Conexiones ascendentes que surgen de NI y contactan secuencialmente al rafe medio y dorsal, núcleo supramamilar, septum medial, corteza entorrinal y el hipocampo, y cada uno de estos nodos proporciona conexiones ascendentes adicionales a los componentes ascendentes del sistema, que convergen en el hipocampo (Olucha et al., 2003).

La relación entre las oscilaciones theta en el hipocampo y el NI se ha observado de forma constante utilizando registros agudos en ratas anestesiadas con uretano. Se observó una fuerte coherencia en el potencial del campo local entre el hipocampo y la NI después de la estimulación sensorial (Cervera-Ferri et al., 2011). Las neuronas caracterizadas químicamente también mostraron un disparo diferencial en relación con la theta del hipocampo. Mientras que las neuronas relaxina-3 negativas del NI no se activan de una manera particular en relación con theta, las neuronas positivas para relaxina-3 se activan principalmente en la fase ascendente de theta del hipocampo (Ma et al., 2013).

En resumen, como sustrato anatómico de este acoplamiento electrofisiológico entre el hipocampo y la NI, se identificaron conexiones bidireccionales asimétricas entre estas estructuras en la rata, con una proyección de NI ascendente a hipocampo más fuerte que la conexión descendente opuesta (Sánchez-Pérez et al., 2015).

#### **1.1.4.3 NI / RLN3: su implicación en la actividad motora y la excitación**

En animales, un componente principal de theta del hipocampo se deriva de la actividad locomotora (Vanderwolf, 1969). También hay evidencia de una relación entre la actividad locomotora, la excitación conductual y la actividad de NI (Ryan et al., 2011).

En términos de interacciones con otros sistemas de excitación central, las neuronas NI en la rata expresan una alta densidad del receptor 1 de CRF (CRF1) (Van Pett et al., 2000).

La activación en el NI representa un mecanismo para distribuir una respuesta de excitación provocada por CRF durante condiciones estresantes (Tanaka et al., 2005). De hecho, se ha demostrado que los factores estresantes específicos aumentan la actividad de NI (Calvez et al., 2016). Además, las neuronas de NI en la rata expresan los receptores de orexina, OX1 y OX2 (Blasiak et al., 2015), que representa otro mecanismo de señalización para conducir estímulos relacionados con la excitación a los NI.

La relación de la actividad del núcleo incertus con la actividad locomotora se ha comprobado en una serie de experimentos con diferentes aproximaciones. La microestimulación eléctrica de alta frecuencia del núcleo incierto fue suficiente para inducir la locomoción y la rotación hacia adelante. Las latencias de la locomoción evocada fueron consistentes con un papel del núcleo incertus en la modulación de áreas premotoras, posiblemente el eje septo-hipocámpal. La microestimulación eléctrica del núcleo incierto aumentó la velocidad, la movilidad y las rotaciones durante la estimulación y post-estimulación (Farooq et al., 2016). Por otra parte, la estimulación optogenética del núcleo incertus produjo la desincronización cortical propia de los estados de alerta y un aumento concomitante de actividad locomotora (Ma et al., 2017). También la estimulación optogenética del núcleo incertus asociado a las neuronas neuromedina B positivas produjo un aumento de la actividad locomotora, activación vegetativa y aumento de la actividad theta hipocámpica (Lu et al., 2020). Finalmente, también aumentó la actividad locomotora la inyección intracerebroventricular de un agonista de relaxina-3 (Albert-Gascó et al., 2017).

Por lo tanto, varios hallazgos que utilizan diferentes enfoques, en ratas y ratones, apuntan a una asociación directa entre la actividad locomotora y el ritmo theta del hipocampo y revelan que ambos pueden desencadenarse por la activación de neuronas NI.

## **1.2 HIPÓTESIS**

Dado que la proyección del núcleo incertus sobre la región supramamilar es intensa (Goto et al., 2001, Olucha-Bordonau et al., 2003) y recíproca (Goto et al., 2001), el relevo en este punto de las conexiones ascendentes desde el núcleo incertus sobre el hipocampo podrían modular aspectos concretos asociados con la funcionalidad del sistema tanto en lo referente a la sincronización theta hipocámpica como a la generación de memorias espaciales. El primer paso en la resolución de esta hipótesis es la comprobación de la

existencia de conexión sináptica entre fibras relaxina 3 positivas procedentes del núcleo incertus y neuronas del complejo supramamilar que proyectan al hipocampo.

### **1.3 OBJETIVO**

Determinar mediante técnicas de trazado e inmunofluorescencia la existencia de estas proyecciones. Para las técnicas de trazado se utilizarán inyecciones de trazador retrógrado en el hipocampo y a la vez trazador anterógrado en el núcleo incertus y se comprobará la existencia de aposiciones entre somas retrógradamente marcadas y fibras anterógradamente marcadas. En segundo lugar, se estudiará si las neuronas retrógradamente marcadas reciben fibras relaxin3 positivas que, a su vez contengan marcadores sinápticos como sinaptofisina.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

El presente trabajo está basado en el estudio de 6 animales ratas wistar de 300-400gr machos y hembras. Todos los protocolos han sido aprobados por el comité de ética y experimentación animal de la Universitat Jaume I.

### **Procedimiento quirúrgico**

Los animales fueron anestesiados mediante isoflurano y tras una anestesia profunda la piel de la cabeza fue rasurada y la cabeza colocada en un marco estereotáxico David Kopf fijándose mediante las barras en los conductos auditivos externos y una pinza para la nariz e incisivos tras lo cual se aplicó antiséptico y anestesia local con lidocaína. Una vez colocado se practicó una incisión longitudinal medial desde la parte posterior de las órbitas hasta la inserción de la musculatura del cuello. A continuación, se levantó la fascia epicraneana dejando visibles las líneas de sutura entre los huesos frontales, parietales y occipital. En este momento son localizables el punto bregma en la intersección de las placas frontales y parietales y el punto lambda justo detrás de la intersección de las placas parietales y occipital.

A continuación, se tomaron medidas para equilibrar los puntos bregma y lambda como plano horizontal y se marcaron los puntos para las coordenadas del giro dentado y del núcleo incertus. Giro dentado anteroposterior – 6.5, mediolateral -6.0 y dorsoventral -6.5 mm desde bregma. Las coordenadas del núcleo incertus fueron, anteroposterior -0.6,

mediolateral 0.0 y dorsoventral -7.0 mm desde lambda. Tras el marcado de los puntos se practicaron unos trépanos dejando visible la duramadre que se perforó con una punta de aguja de inyectable de 24 gauges. Tras taponar las posibles hemorragias se bajó una jeringa Hamilton de 1 ul a las estructuras diana y se inyectaron 0.2 ul de fluorogold (Biotium) al 4% en el giro dentado y de dextranamina biotinilada de 70kD (Molecular Probes) al 10% en el núcleo incertus. Para la inyección en el núcleo incertus la barra de los incisivos se bajó 18 mm por debajo de las barras de los oídos.

Tras las inyecciones, se dejaron las puntas 10 minutos antes de ser retiradas tras lo cual se cerró la herida y se aplicó analgesia Metacam.

Tras a cirugía el animal se dejó recuperar durante 7 días.

### **Perfusión y Fijación**

Tras los 7 días de recuperación los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de Dolethal 120mgr/Kg. Tras la pérdida total de reflejos se practicó una laparotomía transversa, se cortó el diafragma y se aplicaron dos cortes laterales para levantar el peto pectoral y dejar expuesto el corazón y los grandes vasos. A continuación, se introdujo una aguja de 14 gauges en el ventrículo izquierdo hasta posicionar la punta en la salida de la aorta. A continuación, se clampó la aguja, la aorta descendente y la cava inferior y se practicó un corte en la aurícula izquierda.

Una vez realizada esta preparación se introdujeron 200 ml de solución salina seguidos de 500 ml de la solución fijadora que contenía paraformaldehído al 4% e tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. La introducción primero de la solución salina y posteriormente del fijador duraba aproximadamente 30 minutos.

Tras la perfusión se separó la cabeza y se extrajo el cerebro que se sumergió en la misma mezcla fijadora durante 4h a 4°C.

### **Microtomía**

Transcurrido el periodo de fijación los cerebros se pasaron a una solución crioprotectora que contenía sacarosa al 30 % en tampón fosfato 0.01M pH 7.4 durante 2-3 días. Al final de este proceso los cerebros debían hundirse en el fondo de los tubos.

Tras la crioprotección, se practicó un corte en la parte posterior del cerebelo y la superficie resultante se colocó sobre la plantina de congelación lo que permitió obtener series

completas de cortes de 40µm mediante un micrótopo Leica SM2000R conectado a una unidad Frigomobil. La temperatura de corte se situó entre -20 y -25°C.

Las secciones se recogieron en eppendorfs de 2ml que contenían solución crioprotectora consistente en glicerol etilenglicol en tampón fosfato 0.01 M pH 7.4. De cada cerebro se obtuvieron 6 series paralelas de modo que cada serie tenía una sección de 40 micras de cada 240 µm y todo el cerebro estaba representado en cada subserie. Una vez obtenidas las secciones, las series fueron almacenadas en un congelador a -20°C.

### **Immunocitoquímica**

Para el revelado inmunocitoquímico, las series a utilizar se pasaban a temperatura ambiente y se realizó el siguiente protocolo para el revelado cromogénico.

Las secciones fueron transferidas a pocillos con una rejilla en el fondo para los sucesivos lavados e incubaciones y se siguieron los siguientes pasos sobre la base del protocolo propuesto por Lanciego et al., (2000).

#### Revelado de BDA

- Lavado 3x10 min en tampón tris salino 0.05M pH 8.0 conteniendo 0.1% de triton X-100 (TBS-Tx) a temperatura ambiente
- Incubación en la solución ABC (Vector Labs) durante 90 minutos a temperatura ambiente
  - 80 µl A
  - 80 µl B
  - 1 ml de 0.05M TBS-Tx
- Lavado 2x10 min en TBS-Tx
- Lavado 3x10 min en tampón tris (Tris-HCl) 0.05M pH 8.0
- Incubación en DAB intensificada con níquel durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución DAB-Ni contenía 200 mgr de sulfato de amonio y níquel, 7.5 mgr de DAB, 50 ml de Tris-HCl pH 8.0 y 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 33%
- Lavado 3x10 min en Tris-HCl
- Revelado de FG
- Lavado 3x10 min en TBS-Tx
- Incubación en 1:2000 antiFG de conejo (Chemicon) y 2% BSA en TBS-Tx durante 48h a 4°C

- Lavado 3x10 min en TBS-Tx
- Incubación en 1:200 cabra anti-conejo biotinilado (de Vector)
- Lavado 3x10 min en TBS-Tx
- Incubación en la solución ABC (Vector Labs) durante 90 minutos a temperatura ambiente
  - 80 µl A
  - 80 µl B
  - 1 ml de 0.05M TBS-Tx
- Lavado 2x10 min en TBS-Tx
- Lavado 3x10 min en tampón tris (Tris-HCl) 0.05M pH 7.4
- Incubación en DAB durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución DAB contenía 7.5 mgr de DAB, 50 ml de Tris-HCl pH 7.6 y 10µl de H2O2 del 33%
- Lavado 3x10 min en Tris-HCl
- Lavado 3x10 min en PBS 0.01M pH 7.4
- Montar en portaobjetos untados con gelatina alumbre de cromo
- Secado al aire
- Deshidratar en TBS-Tx y montar en DPX

### **Immunofluorescencia**

Para el revelado inmunofluorescente se siguieron dos protocolos. Combinación de a) BDA-FG y sinaptofisina y b) combinación de CTB, relaxin3 y sinaptofisina

Combinación a.-

- Lavado 3x10 min en tampón tris salino 0.05M pH 8.0 conteniendo 0.1% de triton X-100 (TBS-Tx) a temperatura ambiente
- Incubación en sueros de bloqueo: 4% seroalbúmina bovina, 4% normal donkey serum en 0.05M TBS-Tx 1 h
- Incubación en 1:1000 guinea pig anti-synaptophysin en 2% seroalbúmina bovina, 2% normal donkey serum en 0.05M TBS-Tx 1 h., 12h a temperatura ambiente
- Lavado 3x10 min en tampón tris salino 0.05M pH 8.0 conteniendo 0.1% de triton X-100 (TBS-Tx) a temperatura ambiente

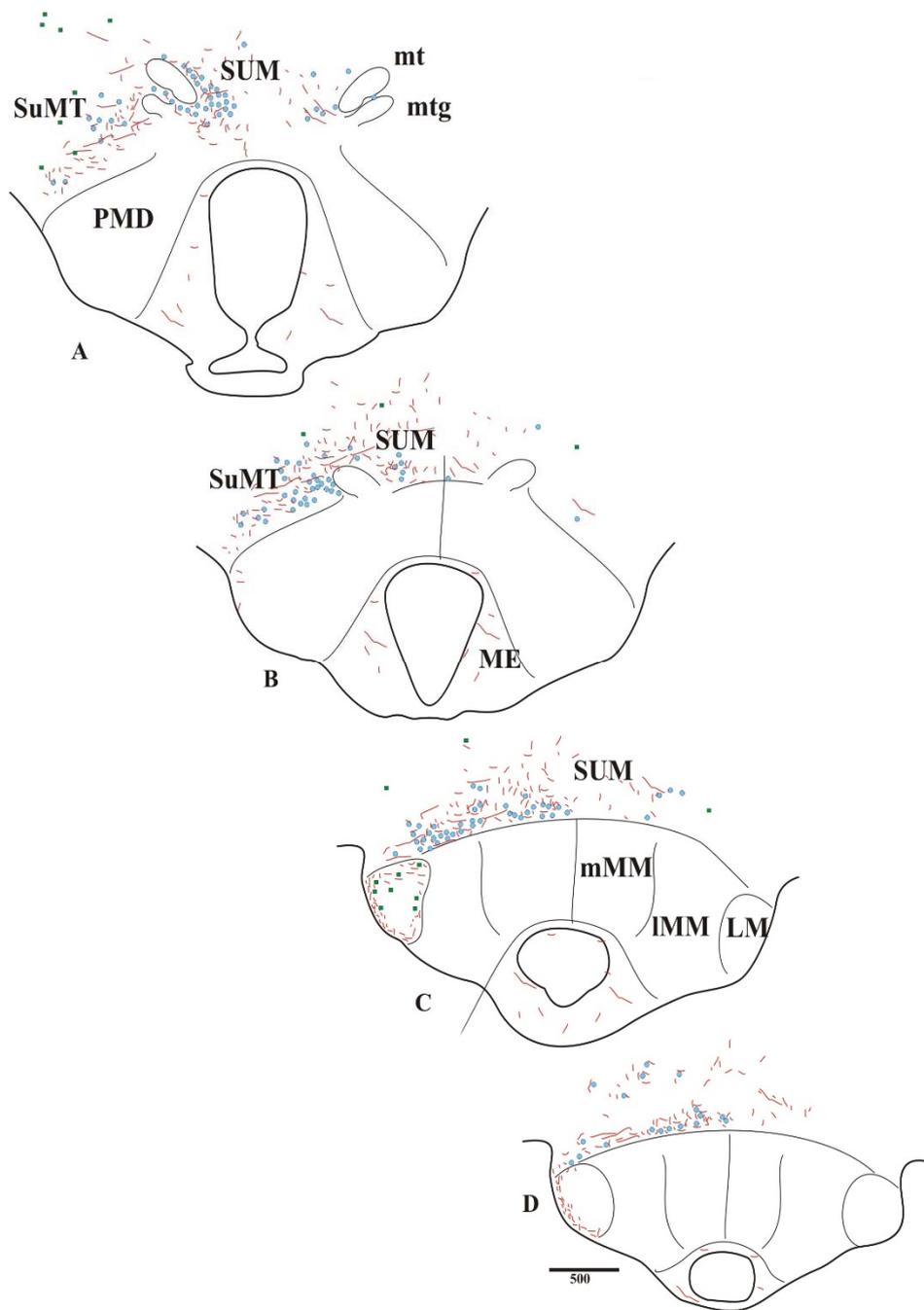
- Incubación en 1:200 de estreptavidina-cy3, donkey anti guinea pig Alexa-488 sueros de bloqueo: 4% seroalbúmina bovina, 4% suero normal de burro en 0.05M TBS-Tx 1 h
- Lavado 3x10 min en tampón tris (Tris-HCl) 0.05M pH 8.0
- Montar en portaobjetos gelatinizados
- Cubrir con fluorosafe

### **Estudio microscópico**

Las preparaciones de fluorescencia y de reacción cromogénica fueron analizadas con un Microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Leica DFC550 (Leica Microsystems, Tokio, Japón). Para los mapas de trazado se utilizó un tubo de cámara clara unida a un microscopio Leica DM750 (Leica Microsystems) los mapas fueron realizados con el objetivo 20x. Estos mapas fueron escaneados y reducidos al tamaño final para su reproducción. La inmunofluorescencia se analizó con una unidad de escaneo confocal láser TCS-SP2, equipada con rayos láser de argón y helio-neón conectados a un microscopio Leica invertido DMIRB (Leica Microsystems). Para el fluoróforo Cy3, la excitación fue de 433 nm para la emisión de 560-618 nm. Para Alexa 488, la excitación fue de 488 nm para una emisión de 510-570 nm.

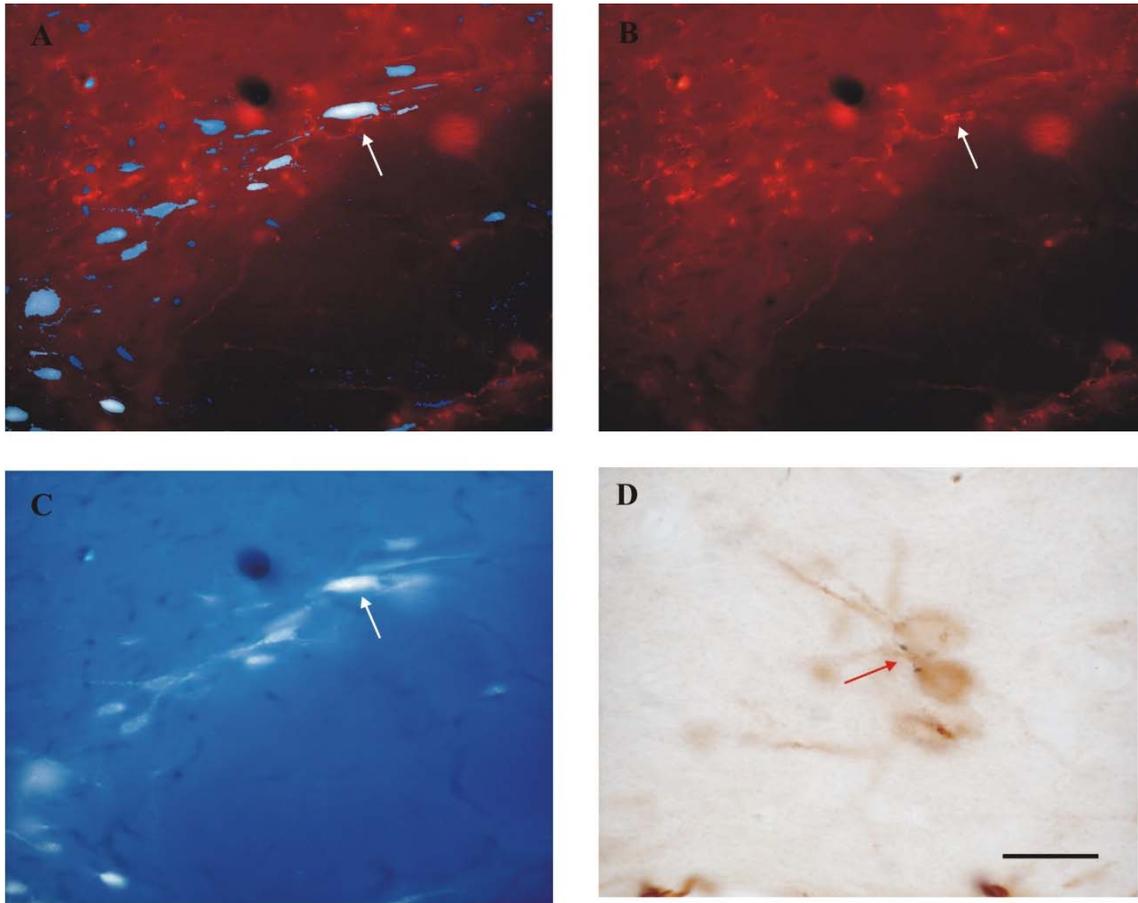
### **3. RESULTADOS**

En 3 casos se obtuvieron inyecciones restringidas de FG en el hipocampo y, a la vez, de BDA en el núcleo incertus. En estos casos se pudo seguir la presencia de dobles marcajes a lo largo del complejo mamilar. El marcaje retrógrado estuvo presente tanto en el núcleo submamilotalámico como en la parte lateral del núcleo supramamilar concentrándose el marcaje retrógrado en la parte ipsilateral. Por lo tanto, sobre todo el núcleo supramamilar constituye una estación de relevo entre el NI y el hipocampo, las neuronas retrógradamente marcadas presentaban un soma neuronal pequeño, pero con ramas dendríticas muy extendidas y con espinas. El marcaje doble sobre el núcleo supramamilar se continúa con el núcleo submamilotalámico (Fig 6A-D). El área posterior hipotalámica presentó marcaje anterógrado pero no retrógrado. El núcleo mamilar lateral presentó un marcaje anterógrado muy intenso. Además, este núcleo también contenía neuronas marcadas retrógradamente con BDA. (Fig 6A-D).



**Figura 6:** Dibujos de cámara clara, en los que se representa la distribución rostro caudal dentro del complejo del marcaje retrógrado (círculos azules) y anterógrado (líneas rojas)

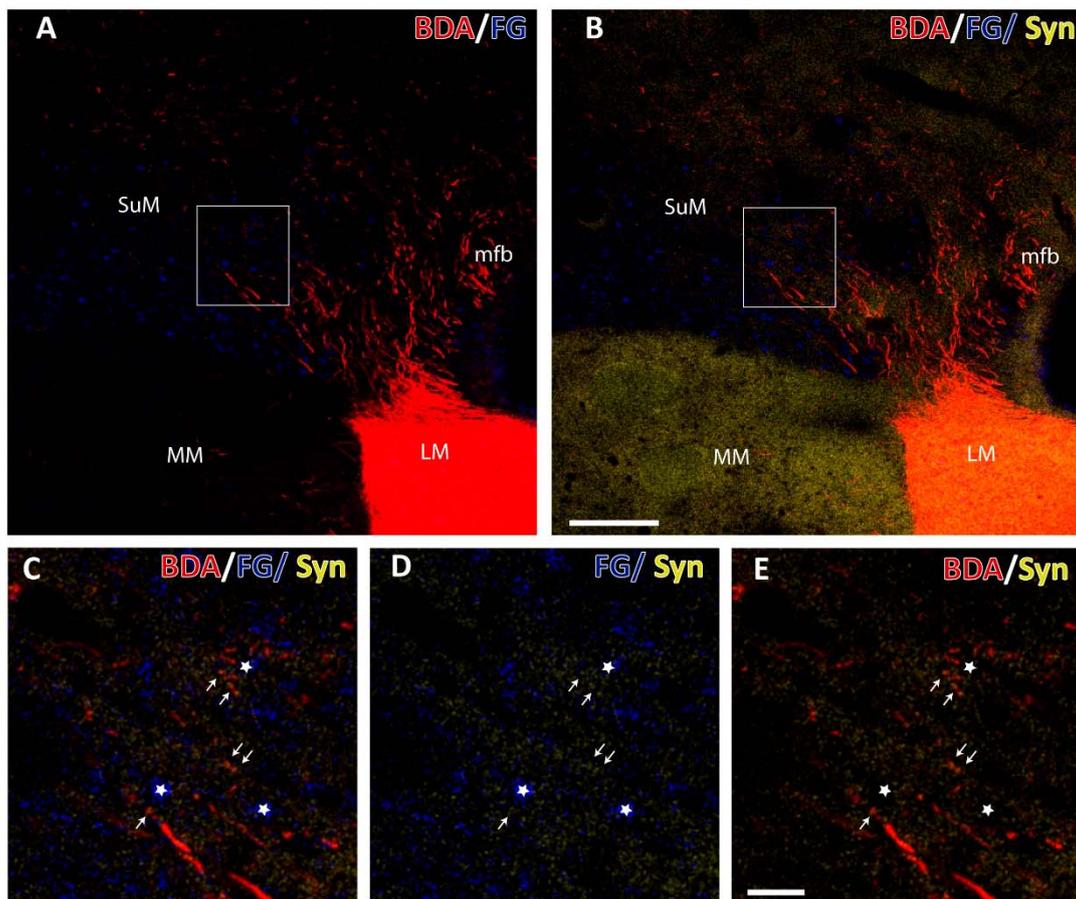
El núcleo supramamilar y el núcleo submamilotalámico constituyen centros de relevo doble tanto respecto al hipocampo como respecto a la corteza prefrontal medial, mientras que el núcleo mamilar lateral, al igual que la habénula lateral constituye un centro de proyección recíproca con el núcleo incertus. En el análisis con microscopía confocal se pudo observar la consistencia del marcaje doble (Fig. 7A) en ocasiones se observaron también neuronas marcadas con miniruby, pero en ningún caso se observó colocación con neuronas marcadas con FG (Fig. 7B).



**Figura 7:** *Imágenes microscópicas del marcaje retrógrado (azul o marrón) y anterógrado (rojo o negro en la región supramamilar. A-C secuencia de la misma región tomada con el filtro de Texas red (B) o DAPI (C) o el solapamiento de las dos imágenes eliminando de C el background y dejando en evidencia la existencia de contactos entre las fibras de BDA y somas de fluorogold (flecha). D imagen de campo claro con una reacción cromogénica en marrón para inmunocitoquímica de fluorogold o histoquímica para BDA en negro. También en este caso se aprecia la existencia de contactos entre fibras BDA y somas de fluorogold. Barra de calibración 100 um.*

En el estudio mediante microscopía confocal se observó que, efectivamente las fibras procedentes del fascículo longitudinal medial (mfb) a nivel de los cuerpos mamilares lo abandonan en dirección medial para adentrarse en el núcleo supramamilar, aunque algunas de ellas forman un denso plexo de fibras dentro del núcleo mamilar lateral (Figura 8,A-). Cuando se analiza además la expresión de la proteína sináptica sinaptofisina (syn) (Figura 8,B-) se observa un marcaje difuso y granular. Aparentemente el marcaje con syn cubre todo el neuropilo, sin embargo, cuando se observa en detalle se pueden apreciar

espacios que no contienen reacción. Estos espacios huecos, en ocasiones están ocupados por somas neuronales retrógradamente marcados. En un análisis fino, se puede observar que de entre las fibras que entran en el complejo supramamilar, algunas de ellas son de grueso calibre, mientras que las más finas suelen colocalizar con granulaciones de syn (Figura 8,C-E). Algunas de estas granulaciones en las que colocalizan fibras marcadas con BDA y syn se localizan en la proximidad de neuronas marcadas retrógradamente, indicando que, efectivamente las proyecciones desde el núcleo incertus contactan con neuronas que, a su vez, proyectan sobre el hipocampo.



**Figura 8:** *Imágenes capturadas mediante microscopia confocal de la proyección del núcleo incertus sobre el núcleo supramamilar. A) Imagen con los canales rojo para BDA y azul para fluorogold. Se puede observar como las fibras procedentes del fascículo prosencefálico medial originan un denso plexo en el núcleo mamilar lateral y posteriormente en el núcleo supramamilar. B) la misma imagen con el canal añadido para sinaptofisina Barra de calibración en A y B 100 micras. C-E Detalle de la zona*

*enmarcada donde se aprecia la presencia de partículas de sinaptosina en fibras marcadas anterógradamente. Barra de calibración 10 um.*

#### **4. DISCUSIÓN**

De los resultados del presente trabajo se desprende que el núcleo incertus envía una proyección que contacta con las neuronas del núcleo supramamilar que proyectan al hipocampo. Esta proyección puede tener efectos relevantes en la generación y/o modulación del ritmo theta.

El ritmo theta constituye un elemento central en el procesamiento temporal de la locomoción tal como queda demostrado por el proceso de precesión cuando el animal atraviesa el campo de la célula de lugar hipocámpica (O'Keefe and Recce, 1993). Desde los años 90, varias líneas de trabajo en diferentes laboratorios han evidenciado que la generación y modulación del ritmo theta hipocámpico depende en buena medida de una serie de proyecciones ascendentes en las que participan núcleos de la formación reticular como la formación reticular del puente oral (RPO), el núcleo mediano del rafe y el complejo supramamilar, pero todas estas proyecciones convergen en el complejo septum medial/banda diagonal que es el primer centro en el que se pueden localizar neuronas con una actividad rítmica similar a la que produce la actividad theta hipocámpica en el rango de 4-12 Hz (Vertes and Kocsis, 1997).

Todos los centros que han sido mostrados con una actividad relacionada con el ritmo theta reciben proyecciones desde el núcleo incertus (Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003). Esta circunstancia llevó a la hipótesis de que el núcleo incertus podría participar en la generación de esta onda sincrónica. En efecto la estimulación del núcleo incertus incrementaba la actividad theta hipocámpica, del mismo modo que la lesión del núcleo incertus eliminaba la actividad theta generada bien por la estimulación nociceptiva bien por la estimulación eléctrica en el RPO (Nuñez et al., 2006). Del mismo modo, la infusión de un agonista de relaxin3, péptido producido por el núcleo incertus y liberado en el septum medial, produce un aumento significativo de la actividad theta hipocámpica que es revertido por la previa aplicación de un antagonista (Ma et al., 2009).

La participación de la proyección desde el núcleo incertus sobre el complejo supramamilar en la actividad theta no ha sido evaluada todavía, pero podría estar relacionada con otros efectos observados cuando se analiza la participación del complejo mamilar en la sincronización hipocámpica. En un estudio en el que se comparan los

potenciales de campo entre los cuerpos mamilares y el hipocampo se ha visto que los potenciales de campo theta también se registraron en el SUM / MB y avanzaron una cuarta parte del ciclo en relación con las oscilaciones theta CA1 (Kocsis and Vertes, 1997). La existencia de una secuencia temporal entre los ciclos mamilar e hipocámpico podría implicar una relación casual. En un estudio realizado en ratas en movimiento libre se ha observado que la inactivación del septum medial atenuó la potencia theta de la región mamilar, al tiempo que aumentó su frecuencia. La inactivación de MS también redujo la potencia cuadrática media tanto en el hipocampo como en la región mamilar, pero redujo la potencia theta diferencialmente en el dominio del tiempo. En este estudio se proporcionó evidencia convergente de que el núcleo supramamilar está involucrado preferentemente en la codificación de HPC theta a frecuencias más altas, y que el circuito medial septum-hipocampo impone una modulación de limitación de frecuencia sobre el área mamilar (Ruan et al., 2017).

Todos estos datos implican que los circuitos ascendentes y descendentes al y desde el hipocampo hasta el núcleo incertus estarían conectados de un modo bidireccional de modo que la actividad entre estos centro podría presentar un proceso de autorregulación. Efectivamente, existen rutas bidireccionales entre el sistema entorrino-hipocámpico y supramamilar mediado por el septum (Leranth et al., 1999). El septum medial está recíprocamente conectado con el núcleo incertus (Sánchez-Pérez et al., 2015) y del mismo modo, el núcleo supramamilar está recíprocamente conectado con el núcleo incertus (Goto et al., 2001).

## **5. CONCLUSIONES**

El núcleo incertus envía una proyección sobre el núcleo supramamilar cuyas fibras presentan contactos sinápticos con las neuronas el núcleo que proyectan al hipocampo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Albert-Gascó, H., García-Avilés, Á., Moustafa, S., Sánchez-Sarasua, S., Gundlach, A. L., Olucha-Bordonau, F. E., et al. (2017). Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation increases ERK phosphorylation in septal cholinergic neurons and impairs spatial working memory. *Brain Struct. Funct.* 222, 449–463. doi:10.1007/s00429-016-1227-8.
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* 163. doi:10.1016/S0079-6123(07)63001-5.
- Béracochéa, D. J., and Jaffard, R. (1995). The effects of mammillary body lesions on delayed matching and delayed non-matching to place tasks in the mice. *Behav. Brain Res.* 68, 45–52. doi:10.1016/0166-4328(94)00158-C.
- Blair, H. T., Gupta, K., and Zhang, K. (2008). Conversion of a phase- to a rate-coded position signal by a three-stage model of theta cells, grid cells, and place cells. *Hippocampus* 18, 1239–1255. doi:10.1002/hipo.20509.
- Blasiak, A., Siwiec, M., Grabowiecka, A., Blasiak, T., Czerw, A., Blasiak, E., et al. (2015). Excitatory orexinergic innervation of rat nucleus incertus - Implications for ascending arousal, motivation and feeding control. *Neuropharmacology* 99, 432–447. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.08.014.
- Buzsáki, G., and Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* 16, 130–8. doi:10.1038/nn.3304.
- Calvez, J., de Ávila, C., Matte, L.-O., Guèvremont, G., Gundlach, A. L., and Timofeeva, E. (2016). Role of relaxin-3/RXFP3 system in stress-induced binge-like eating in female rats. *Neuropharmacology* 102, 207–15. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.014.
- Cervera-Ferri, A., Guerrero-Martínez, J., Bataller-Mompeán, M., Taberner-Cortes, A., Martínez-Ricós, J., Ruiz-Torner, A., et al. (2011). Theta synchronization between the hippocampus and the nucleus incertus in urethane-anesthetized rats. *Exp. Brain Res.* 211, 177–192. doi:10.1007/s00221-011-2666-3.
- Farooq, U., Kumar, J. R. R., Rajkumar, R., and Dawe, G. S. S. (2016). Electrical microstimulation of the nucleus incertus induces forward locomotion and rotation

- in rats. *Physiol. Behav.* 160, 50–58. doi:10.1016/j.physbeh.2016.03.033.
- Gil-Miravet, I., Mañas-Ojeda, A., Ros-Bernal, F., Castillo-Gómez, E., Albert-Gascó, H., Gundlach, A. L., et al. (2021). Involvement of the Nucleus Incertus and Relaxin-3/RXFP3 Signaling System in Explicit and Implicit Memory. *Front. Neuroanat.* 15, 637922. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33867946> [Accessed July 8, 2021].
- Goto, M., Swanson, L. W. W., and Canteras, N. S. S. (2001). Connections of the nucleus incertus. *J. Comp. Neurol.* 438, 86–122. doi:10.1002/cne.1303.
- Hale, M. W., and Lowry, C. A. (2011). Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: Implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology (Berl.)* 213, 243–264. doi:10.1007/s00213-010-2089-z.
- Hsu, D. (2007). The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead. *Prog. Brain Res.* 163, 601–613. doi:10.1016/S0079-6123(07)63032-5.
- Jaffard, R., Beracochea, D., and Cho, Y. (1991). The hippocampal-mammillary system: Anterograde and retrograde amnesia. *Hippocampus* 1, 275–278. doi:10.1002/HIPO.450010315.
- Kiss, J., Csaki, A., Bokor, H., Shanabrough, M., and Leranth, C. (2000). The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [3H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience* 97, 657–669.
- Kocsis, B., and Vertes, R. P. (1997). Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus* 7, 204–214. doi:2-M.
- Kopelman, M. (1995). The Korsakoff syndrome. *Br. J. Psychiatry* 166, 154–173.
- Leranth, C., Carpi, D., Buzsaki, G., and Kiss, J. (1999). The entorhino-septo-supramammillary nucleus connection in the rat: morphological basis of a feedback mechanism regulating hippocampal theta rhythm. *Neuroscience* 88, 701–718. doi:10.1016/S0306-4522(98)00245-0.
- Lu, L., Ren, Y., Yu, T., Liu, Z., Wang, S., Tan, L., et al. (2020). Control of locomotor speed, arousal, and hippocampal theta rhythms by the nucleus incertus. *Nat. Commun.* 11, 262–278. doi:10.1038/s41467-019-14116-y.

- Ma, S., Allocca, G., Ong-Pålsson, E. K. K. E., Singleton, C. E. E., Hawkes, D., McDougall, S. J., et al. (2017). Nucleus incertus promotes cortical desynchronization and behavioral arousal. *Brain Struct. Funct.* 222, 515–537. doi:10.1007/s00429-016-1230-0.
- Ma, S., Blasiak, A., Olucha-Bordonau, F. E., Verberne, A. J. M., and Gundlach, A. L. (2013). Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat. *J. Physiol.* 591, 3981–4001. doi:10.1113/jphysiol.2013.254300.
- Ma, S., Bonaventure, P., Ferraro, T., Shen, P.-J. J., Burazin, T. C. . C. D., Bathgate, R. A. D. R., et al. (2007). Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience* 144, 165–190. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.072.
- Ma, S., Olucha-Bordonau, F. E., Hossain, M. A., Lin, F., Kuei, C., Liu, C., et al. (2009). Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. *Learn. Mem.* 16, 730–742. doi:10.1101/lm.1438109.
- McKenna, J. T., and Vertes, R. P. (2001). Collateral projections from the median raphe nucleus to the medial septum and hippocampus. *Brain Res. Bull.* 54, 619–630.
- Nasirova, N., Quina, L. A., Morton, G., Walker, A., and Turner, E. E. (2020). Mapping Cell Types and Efferent Pathways in the Ascending Relaxin-3 System of the Nucleus Incertus. *eneuro*, ENEURO.0272-20.2020. doi:10.1523/eneuro.0272-20.2020.
- Nategh, M., Nikseresht, S., Khodaghali, F., and Motamedi, F. (2015). Nucleus incertus inactivation impairs spatial learning and memory in rats. *Physiol. Behav.* 139, 112–120. doi:10.1016/j.physbeh.2014.11.014.
- Núñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F. ., Ruiz-Torner, A., and Teruel, V. (2006). Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2731–2738. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04797.x.
- O’Keefe, J. (1976). Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51, 78–109. doi:10.1016/0014-4886(76)90055-8.

- O'Keefe, J., and Burgess, N. (2005). Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: Theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus* 15, 853–866. doi:10.1002/hipo.20115.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J., and J. O'Keefe, J. D. (1971). The hippocampus as a spatial map . Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.
- O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press Available at: <http://hdl.handle.net/10150/620894> [Accessed August 22, 2020].
- O'Keefe, J., and Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3, 317–330. doi:10.1002/hipo.450030307.
- Olton, S. (1986). A Novel Mechanism for the Grid-to-Place Cell Transformation Revealed by Transgenic Depolarization of Medial Entorhinal Cortex Layer II. *Neuron* 93, 1480-1492.e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.03.001.
- Olucha-Bordonau, F. E., Teruel, V., Barcia-González, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A. A., and Martínez-Soriano, F. (2003). Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 464, 62–97. doi:10.1002/cne.10774.
- Ruan, M., Young, C. K., and McNaughton, N. (2017). Bi-directional theta modulation between the septo-hippocampal system and the mammillary area in free-moving rats. *Front. Neural Circuits* 11. doi:10.3389/fncir.2017.00062.
- Ryan, P. J. J., Krstew, E. V. V, Sarwar, M., Gundlach, A. L. L., and Lawrence, A. J. J. (2014). Relaxin-3 mRNA levels in nucleus incertus correlate with alcohol and sucrose intake in rats. *Drug Alcohol Depend.* 140, 8–16. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.04.017.
- Ryan, P. J., Ma, S., Olucha-Bordonau, F. E., and Gundlach, A. L. (2011). Nucleus incertus-An emerging modulatory role in arousal, stress and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1326–1341. doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.004.
- Sánchez-Pérez, A. M., Arnal-Vicente, I., Santos, F. N., Pereira, C. W., El Mili, N., Sanjuan, J., et al. (2015). Septal projections to the nucleus incertus in the rat:

- Bidirectional pathways for modulation of hippocampal function. *J Comp Neurol* 523, 565–588. doi:10.1002/cne.23687.
- Saper, C. B., and Fuller, P. M. (2017). Wake–sleep circuitry: an overview. *Curr. Opin. Neurobiol.* 44, 186–192. doi:10.1016/j.conb.2017.03.021.
- Smith, C. M. M., Shen, P.-J. J. J., Banerjee, A., Bonaventure, P., Ma, S., Bathgate, R. A. D. A. D., et al. (2010). Distribution of relaxin-3 and RXFP3 within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 4016–4045. doi:10.1002/cne.22442.
- Streeter, G. L. (1903). Anatomy of the floor of the fourth ventricle. (The relations between the surface markings and the underlying structures.). *Am. J. Anat.* 2, 299–313.
- Sullivan, E. V., and Pfefferbaum, A. (2009). Neuroimaging of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol.* 44, 155–165. doi:10.1093/alcalc/agn103.
- Sziklas V., Petrides M., Leri, F. (1996). The effects of lesions to the mammillary region and the hippocampus on conditional associative learning by rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 106–115. doi:10.1111/J.1460-9568.1996.TB01171.X.
- Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., et al. (2005). Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1659–1670. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x.
- Taube, J. S., Muller, R. U., and Ranck, J. B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J. Neurosci.* 10, 436–447. doi:10.1523/jneurosci.10-02-00436.1990.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J. C. C., Chan, R. K. W. K., Li, H. Y. Y., Arias, C., et al. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.* 428, 191–212. doi:10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::AID-CNE1>3.0.CO;2-U.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 26, 407–418. doi:10.1016/0013-4694(69)90092-3.
- Vertes, R. P. P., and Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81, 893–

926. doi:10.1016/S0306-4522(97)00239-X.

Vertes y McKenna (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81, 893–926. doi:10.1016/S0306-4522(97)00239-X.

Wei Pan and McNaughton (2004). The effects of lesions to the mammillary region and the hippocampus on conditional associative learning by rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 106–115. doi:10.1111/J.1460-9568.1996.TB01171.X.

Xu, Y.-L., Reinscheid, R. K., Huitron-Resendiz, S., Clark, S. D., Wang, Z., Lin, S. H., et al. (2004). Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 43, 487–97. doi:10.1016/j.neuron.2004.08.005.