

## Patrones de colateralización de los núcleos del rafe y del núcleo incertus al sistema septo-hipocámpico

MÓNICA NAVARRO SÁNCHEZ  
monavarr@uji.es

ISIS GIL MIRAVET  
gili@uji.es

DANIEL MONTERO CABALLERO  
al374569@uji.es

CHAIMA LASSILI  
chaimaa.laassili@gmail.com

SOUKAINA ES-SAFI  
essafisoukaina10@gmail.com

FRANCISCO ELISEO OLUCHA BORDONAU  
folucha@uji.es

### Resumen

El núcleo incertus (NI), rico en relaxina 3 (RLN3), y los núcleos del rafe, ricos en serotonina (5HT), son unidades modulares de la línea media del tronco cerebral que influyen en diversas funciones cerebrales, entre ellas la percepción del contexto. Este estudio pretende caracterizar el patrón de colateralización del sistema de proyecciones del NI sobre los núcleos del rafe y el núcleo supramamilar (SUM) en sus proyecciones sobre el sistema septohipocámpico. Para ello, se inyectaron trazadores retrógrados de fluorogold (FG) y subunidad B de la toxina del cólera (CTB) en el septum medial (MS) y en el giro dentado (DG), combinados con inmunofluorescencia de 5HT, RLN3, FG y CTB. Nuestros resultados muestran una alta densidad de fibras de proyección RLN3 en las regiones del rafe medio y dorsal. En esta zona, se observaron fibras de RLN3 en estrecha proximidad al soma neuronal 5HT, mientras que otras se observaron en conexiones de tipo sináptico. Se revelaron pocas neuronas 5HT del MS en el rafe medial y dorsal. Por último, una población de neuronas de SUM envía proyecciones laterales al sistema entorrinal / hipocámpico y al MS; además, esta población está inervada por las células RLN3 del NI. Estos hallazgos revelaron el mapeo del circuito modulador entre el RLN3 del NI y el 5HT del rafe, y las interacciones con el septohipocampo, que recibe proyecciones del SUM. En base a este núcleo de evidencias, se puede postular que SUM es un componente clave de las proyecciones del NI ascendente al circuito entorrinal-hipocámpico que está implicado en la generación, codificación y recuerdo de las memorias contextuales.

**Palabras clave:** Relaxina 3, núcleo incertus, núcleos del rafe, núcleo supramamilar, septo-hipocampo.

## Abstract

The relaxin 3 (RLN3), rich nucleus incertus (NI), and the serotonin (5HT), rich raphe nuclei, are modular midline brainstem units that influence various brain functions, including context perception. This study aims to characterise the collateralisation pattern of the NI projection system on the raphe nuclei and the supramammillary nucleus (SUM) in its projections to the septohippocampal system. For this purpose, retrograde tracers fluorogold (FG) and cholera toxin subunit B (CTB) were injected into the medial septum (MS) and dentate gyrus (DG), combined with immunofluorescence of 5HT, RLN3, FG and CTB. Our results show a high density of RLN3 projection fibres in the medial and dorsal raphe regions. In this area, RLN3 fibres were observed in close proximity to the 5HT neuronal soma, while others were observed in synaptic-like connections. Few 5HT neurons from the MS were revealed in the medial and dorsal raphe. Finally, a population of SUM neurons sends collateral projections to the entorhinal/hippocampal system and to the MS, and this population is innervated by NI RLN3 cells. These findings revealed the mapping of the modulatory circuitry between NI RLN3 and raphe 5HT, and interactions with the septo-hippocampus, which receives projections from the SUM. Based on this core evidence, it can be postulated that SUM is a key component of projections from the ascending NI to the entorhinal-hippocampal circuitry that is involved in the generation, encoding and recall of contextual memories.

**Key Words:** Relaxin 3, nucleus incertus, raphe nuclei, supramammillary nucleus, septo-hippocampus.

## Introducción

El conocimiento de la conectividad estructural y funcional de las regiones cerebrales específicas es un elemento clave para la comprensión del vínculo entre la actividad neuronal y el comportamiento.

El sistema septo-hipocámpico está implicado en el control del ritmo theta hipocámpico (Müller and Remy 2018). Este ritmo es una oscilación sincrónica de la actividad eléctrica cerebral (de entre 4-8Hz en humanos y 5-12Hz en roedores) el cual se ha asociado con la exploración activa del entorno hipocámpico (Smith et al. 2011), y se ha sugerido que presenta un papel principal en el control de funciones mnemónicas asociadas al circuito de Papez (Vertes, Albo y Viana Di Prisco 2001). Papez, en 1937 afirmó que el hipotálamo, el núcleo talámico anterior, el giro cingulado, el hipocampo y sus interconexiones, constituyen un circuito cerrado que puede participar en la

elaboración y expresión de emociones. Sin embargo, posteriormente Paul MacLean (1949) añadió otras áreas como el córtex prefrontal, amígdala y medial septum (MS) y pasó a ser denominado «circuito límbico». Los trabajos posteriores del laboratorio de Joseph LeDoux señalaron no obstante que el centro del procesamiento emocional no se localizaba en el circuito de Papez, sino en la amígdala (LeDoux 2000). A pesar de ello, los circuitos alrededor del sistema hipocámpico podrían aportar a los sistemas emocionales mecanismos de percepción contextual (Sparks y LeDoux 1995).

Los cuerpos mamilares representan una importante vía de salida del hipotálamo en el circuito de Papez/circuito límbico; además, está establecido que estos proyectan masivamente al tálamo anterior (Vertes, Albo y Viana Di Prisco 2001). Específicamente, el núcleo supramamilar (SUM) envía proyecciones largas y directas a la formación hipocámpica, sus fibras inervan dos de sus regiones, el giro dentado y el CA2/CA3, y se postula que puede tener efectos moduladores en las actividades del hipocampo así como de la corteza temporal, pues las células de este núcleo están implicadas en la modulación de la actividad theta hipocámpica (Choi et al. 2012; Ajibola et al. 2021).

El rafe dorsal (RD) es la principal fuente de inervación serotonérgica del cerebro anterior (Rallu, Corbin y Fishell 2002) y está relacionado con la modulación de la red neuronal implicada en la ansiedad, como se ha demostrado por la administración de diversas drogas, como la cafeína (Lawther et al. 2018).

La activación del núcleo del rafe mediano inhibe el ritmo theta hipocámpico, mientras que su lesión genera un incremento en ratas anestesiadas con uretano (Kinney, Kocsis y Vertes 1995). Del mismo modo, la actividad de las neuronas del rafe mediano dispara sincrónicamente en fase con el ritmo theta hipocámpico (Kocsis y Vertes 1996).

Finalmente, el núcleo incertus (NI) se localiza en el tegmento pontino. Es el principal componente del sistema que produce y libera relaxina 3 (RLN3), y también está relacionado con la expresión de conductas ansiosas (Lawther et al. 2018; Olucha-Bordonau et al. 2018), así como en la conducta de ingesta, estrés, activación, búsqueda de alcohol, conducta afectiva, aprendizaje y memoria (Olucha-Bordonau et al. 2018; Gil-Miravet et al. 2021).

El septum medial es el elemento central que recoge las proyecciones subcorticales y con ellas constituye un marcapasos del ritmo theta hipocámpico (Vertes and Kocsis 1997). Los estudios neuroanatómicos han señalado que, efectivamente contienen una alta concentración de fibras de relaxina 3 que realizan contactos sinápticos de tipo inhibitorio (Olucha-Bordonau et al. 2012). De hecho, las neuronas GABAérgicas del septum medial expresan específicamente el receptor de relaxina 3, RXFP3 (Albert-Gascó et al. 2018). En virtud de estas conexiones, se propuso que las proyecciones de relaxina 3 sobre el septum medial podrían mediar el papel de RLN3 sobre la generación del ritmo theta hipocámpico (Ma et al. 2009).

Dada su relevancia en diversidad de funciones cognitivas como la ansiedad y la formación de memorias de este circuito. En el presente artículo se pretende caracterizar las vías de colateralización de los núcleos del rafe y del núcleo incertus al sistema septo-hipocámpico, incluyendo el SUM, el cual se postula que pueda tener efectos moduladores en las actividades mediadas por el hipocampo.

De acuerdo con todos los datos anteriores y en base a esta serie de proyecciones ascendentes superpuestas desde el NI al hipocampo, y dado que el hipocampo juega

un papel clave en los procesos mnemónicos junto con las proyecciones aferentes que recibe del NI, podemos hipotetizar que el SUM es un componente clave de las proyecciones del NI ascendente a los circuitos entorrinal-hipocámpicos que están implicados en la generación, codificación y recuerdo de las memorias espaciales.

## Método

### *I. Animales*

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho (300-400 g, n = 6). Todos los protocolos fueron aprobados por los Comités de Ética Animal de la Universitat Jaume I de Castellón (España). Todos los procedimientos se ajustaron a la Directiva 86/609/CEE de la Comunidad Europea relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (código: GURTE/2019/480535).

### *II. Inyecciones de trazador*

Los sujetos fueron anestesiados con gas isoflurano (1,5-3% en oxígeno) y colocados en un aparato estereotáxico. Se separó la piel y se perforaron agujeros en el cráneo en las siguientes coordenadas relativas a bregma AP -6,5, ML  $\pm$ 6, DV -6,5 para el giro dentado, y AP +0,2, ML 0,2, DV -7,0 para el medial septum.

A través de estas trepanaciones se inyectaron los trazadores retrógrados Fluorogold (FG, 5-hidroxiestabilamida; Cat No. 80014, Biotium, Hayward, CA, EE. UU.) y subunidad B de la toxina de Cólera (CTB, Cat No. 104, List Biological Inc., Cambel, CA, EE. UU.) utilizando una jeringa Hamilton de 1  $\mu$ l. Se inyectó un volumen de 0,2  $\mu$ l de FG o CTB en MS o DG a una velocidad de 0,05  $\mu$ l /min. Finalizada la inyección, la jeringa se mantuvo colocada durante 5 minutos antes de ser retirada. A continuación, se suturó la piel y se administró una inyección subcutánea de analgésico Metacam (0,05 mg/kg, i.p., Lab Esteve, Barcelona, España) para evitar el dolor e inflamación durante el periodo postoperatorio.

### *III. Fijación y seccionamiento del cerebro*

Tras una supervivencia de 7 días desde la inyección de los trazadores, las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (Dolethal, 200 mg/kg i.p.; Vetoquinol S.A., Madrid, España) y perfundidas transcárdialmente con solución salina al 0,9% y heparina (1mg/L), seguida de fijador (paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4) durante 30 minutos (~500 ml). A continuación, se extrajeron los cerebros del cráneo y se sumergieron en el mismo fijador toda la noche a 4 °C. Tras la postfijación, los cerebros se sumergieron en sacarosa al 30% en PBS 0,01 M con pH 7,4 durante 48 horas a 4°C, y se recogieron secciones coronales (40  $\mu$ m) utilizando un microtomo de congelación (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Para cada cerebro, se obtuvieron 6 series de secciones que

se recogieron en flotación libre en solución crioprotectora (30% Ethylene Glycol, 30% Glicerol, 40% 0,1 M PBS, pH 7,4) y se almacenaron a -20°C hasta su uso para las distintas técnicas inmunológicas.

#### IV. Inmunohistoquímica

Se realizó una cuádruple tinción de inmunofluorescencia para la detección de 5HT, RLN3 y los trazadores CTB y FG. Las secciones de tejido se enjuagaron en 3 lavados con PBS 0,01M durante 10 minutos y se sumergieron en una solución de bloqueo (NGS 2%, NDS 2% y PBS 0,01M+0,2% Tritón (PBST)) durante 1 hora. A continuación, las secciones se incubaron durante la noche en agitación a temperatura ambiente en una solución de anticuerpos primarios que contenía Goat anti CTB (1:5000, Jackson ImmunoResearch), Mouse anti RLN3 (1:5, Jackson ImmunoResearch), Rat anti 5HT (1:1000, abcam), Rabbit anti FG (1:500 Jackson ImmunoResearch) con PBST y 2% NDS.

A continuación, las secciones se enjuagaron 3x10 minutos en PBS 0,01M y se incubaron durante 2 horas con una solución de anticuerpos secundarios que contenía PBST, Donkey anti-goat conjugado Cy3 IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch), Donkey anti-mouse conjugado en Alexa-647 IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch), Donkey anti Rat conjugado en Alexa-421IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch) y Donkey anti Rabbit 488 (1:200, Jackson ImmunoResearch).

Finalmente, las secciones se lavaron en 3x10 minutos con PBS 0,01M y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina de cromo-aluminio y se cubrieron con medio de montaje Mowiol.

#### V. Obtención y análisis de las imágenes

Cada corte se analizó con una unidad de escaneo confocal láser TCSSP2 acoplada a un microscopio Leica invertido DMIRB. Para el fluoróforo Alexa 488, la excitación fue de 493 nm para una emisión de 520 nm, para CY3 la excitación fue de 549 nm para una emisión de 562 nm, para Alexa 647 la excitación fue de 650 nm para una emisión de 665 nm, para Alexa 421 la excitación fue de 405 nm para una emisión de 421 nm. Se capturaron las imágenes con un aumento de 20x utilizando el software Leica (V 2.61). Todas las imágenes fueron analizadas usando el programa FIGI.

## Resultados

En el presente estudio, se inyectaron los trazadores retrógrados FG y CTB, respectivamente, en el MS y el DG (Figura 1).

Estas inyecciones dieron lugar a marcaje retrógrado en el núcleo supramamilar (Figura 2). Las inyecciones en el giro dentado dieron lugar a marcaje localizado fundamentalmente en el lado ipsilateral a la inyección y en las porciones del núcleo localizadas fundamentalmente lateral a los tractos mamilotalámicos y mamilotegmental. En cambio, el trazador inyectado en el medial septum originaba neuronas

localizadas medialmente a estos tractos. Del mismo modo, el marcaje retrógrado tras inyección en el septum medial se localizaba también en el lado ipsilateral de un modo preferente.

En el caso del área SUM, se observó un marcaje retrógrado en todos los casos (Figura 3). Sin embargo, las inyecciones de trazador retrógrado en medial septum producían cuerpos neuronales marcados fundamentalmente en el rafe mediano (RM) (Figura 4) mientras que las inyecciones de trazador en el giro dentado producían una mayor densidad de neuronas marcadas en el rafe dorsal (RD) (Figura 5).

Nuestros resultados mostraron que cuando la inyección se realizaba en la línea media del septum medial compitiendo a ambos lados, el marcaje retrógrado para FG se concentró en ambos lados, ipsilateral y contralateral, oscilando entre el 68% y el 93% del total de células marcadas en el lado ipsilateral y entre el 78% y el 100% en el lado contralateral del SUM. Sin embargo, el trazador retrógrado CTB inyectado en uno de los lados del giro dentado originó marcaje concentrado en el lado ipsilateral, con un rango del 7% al 32%, y del 2% al 23% en el lado contralateral. Las neuronas doblemente marcadas con FG y CTB en SUM oscilaban entre el 1% y el 3% ipsilateralmente y estaban casi ausentes en el lado contralateral (Tabla 1). No encontramos neuronas doblemente marcadas con FG y CTB ni en RD ni en RM.

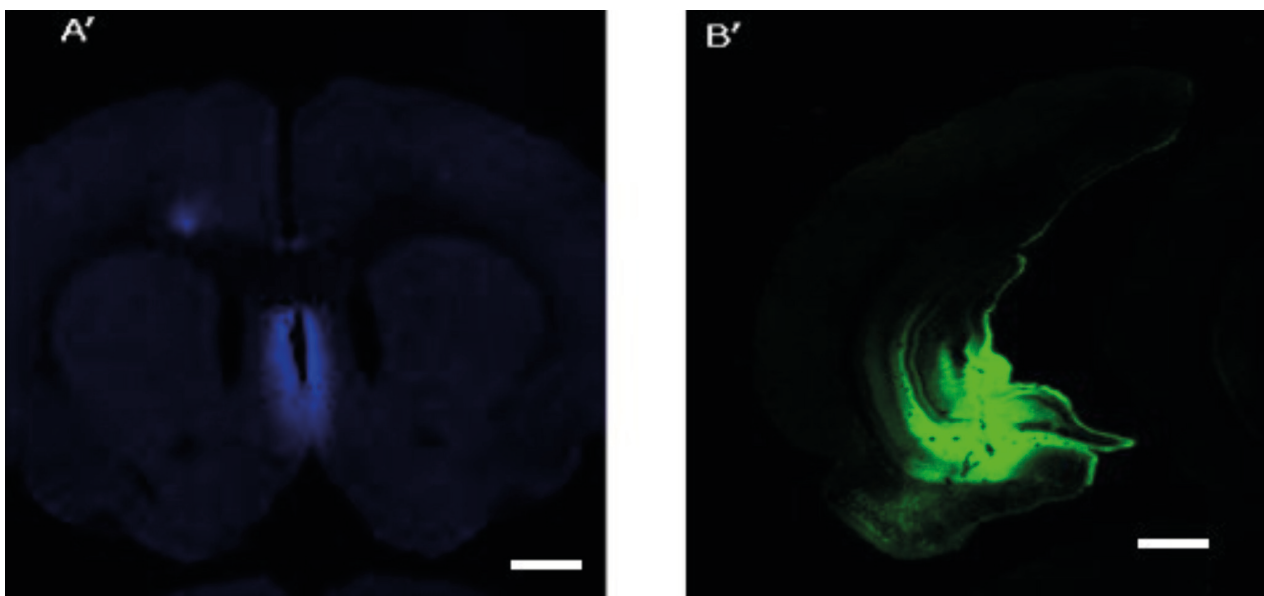


Figura 1  
Inyección de FG (A') en MS y CTB (B') en DG.  
La barra de escala para todas las imágenes corresponde a 1mm

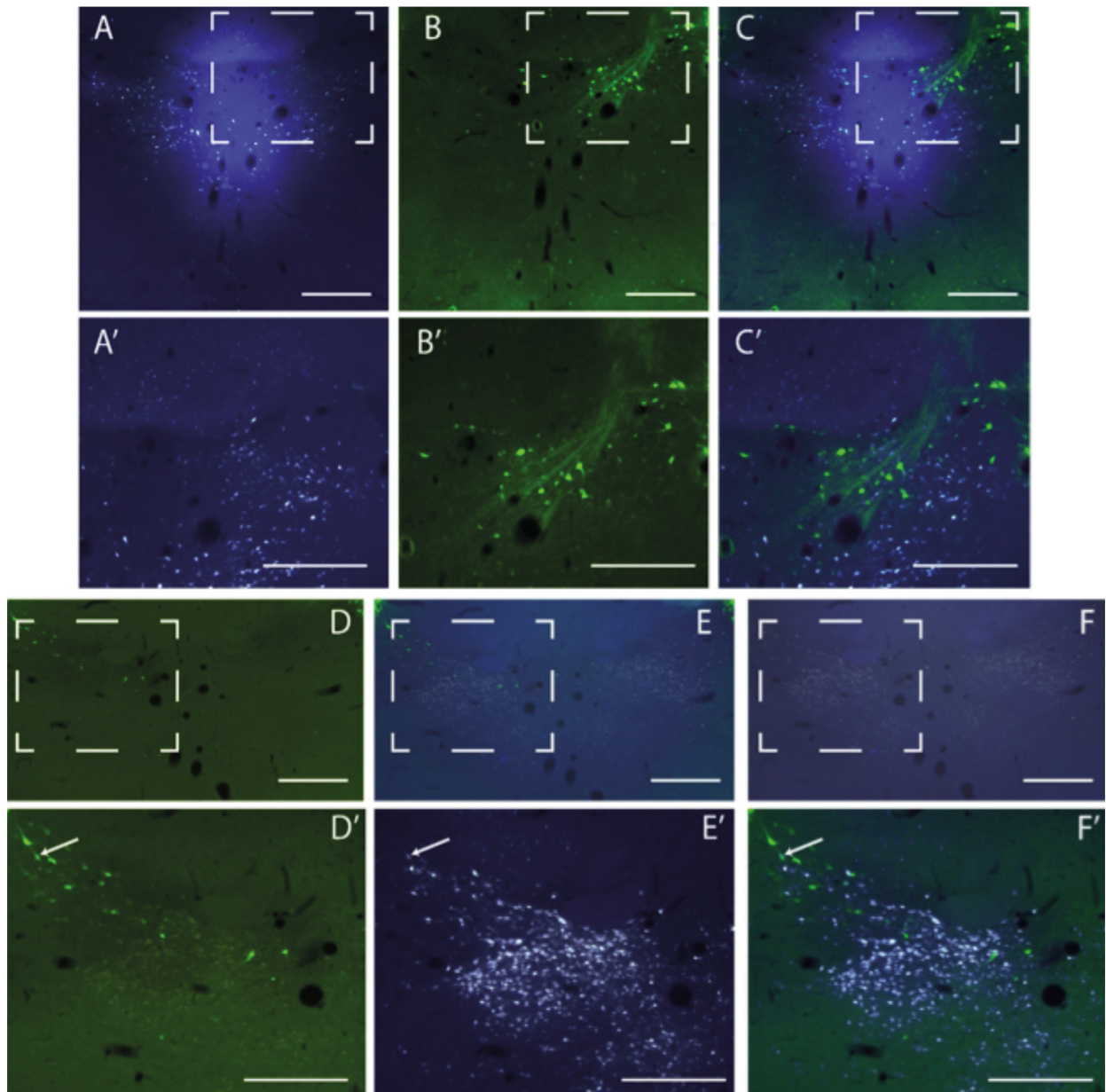


Figura 2

(A) Neuronas del SuM ipsilateral etiquetadas retrógradamente con FG proyectando al MS con el objetivo de 4x. (A') Ampliación de A. (B) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM ipsilateral con CTB proyectando al GD con el objetivo de 4x. (B') Ampliación de B. (C) Imagen fusionada (A+B) en el SuM. (C') Ampliación de C. (D) Neuronas del SuM ipsilateral marcadas retrógradamente con FG proyectando a la MS con el objetivo 4x. (D') Ampliación de D. (E) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM ipsilateral con CTB proyectando al GD con el objetivo de 4x. (E') Ampliación de E. (F) Imagen fusionada (D+E) en el SuM. (F') Ampliación de F. Las puntas de flechas señalan neuronas doblemente marcada con CTB y FG. La barra de escala para todas las imágenes corresponde a 500  $\mu\text{m}$

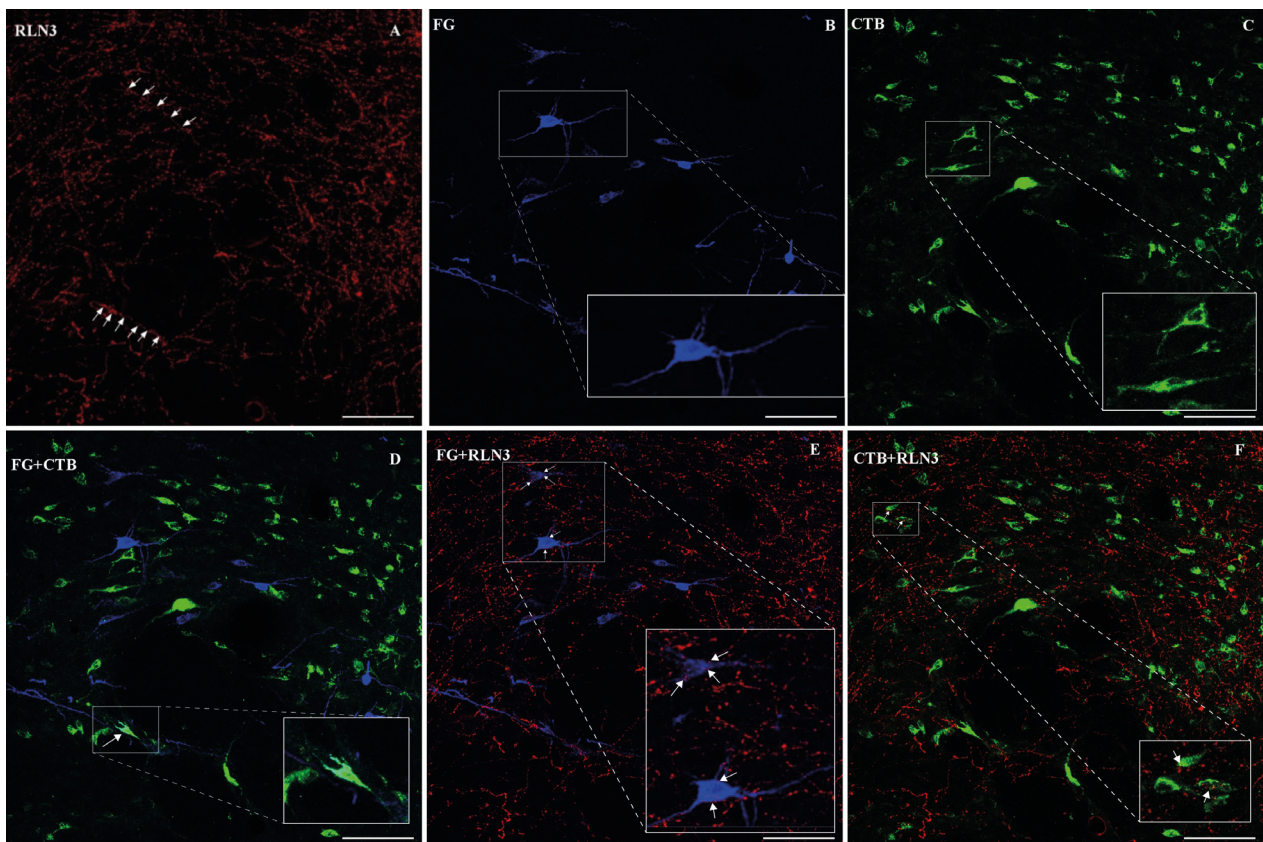


Figura 3

(A) RLN3 en el SuM. RLN3 en el SuM. La colocalización de las fibras y los terminales putativos se indica con puntas de flecha. (B) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM con FG proyectando al MS. (C) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM con CTB proyectándose al GD. (D) Imagen fusionada que muestra las neuronas doblemente marcadas en el SuM. La punta de flecha señala la neurona doblemente marcada con CTB y FG. (E) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM con FG proyectándose a la MS recibiendo el contacto de las fibras RLN3. Los contactos de relaxina 3 con las neuronas marcadas con FG se señalan con puntas de flecha. (F) Neuronas marcadas retrógradamente en el SuM con CTB proyectándose al GD recibiendo el contacto de las fibras RLN3. Los contactos de relaxina 3 con las neuronas marcadas con CTB se señalan con puntas de flecha. La barra de escala para todas las imágenes corresponde a 100  $\mu\text{m}$

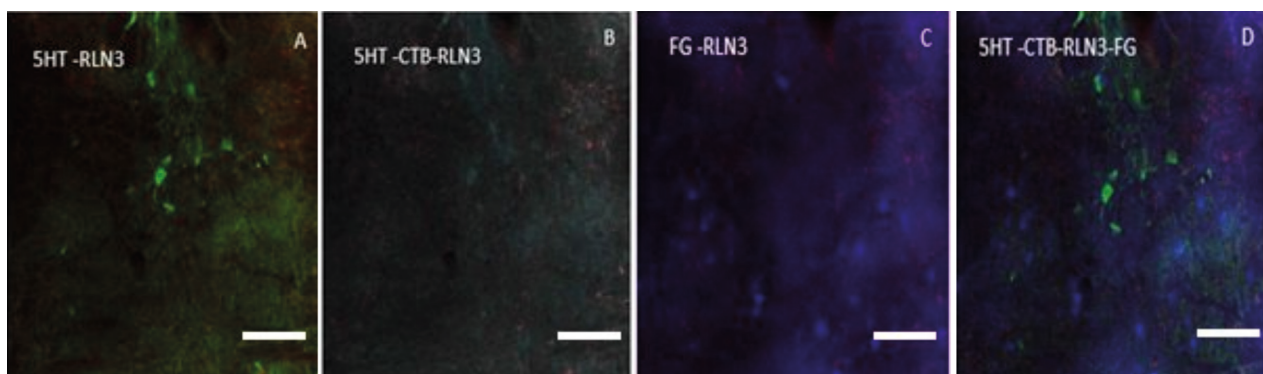


Figura 4

(A) Neuronas serotoninérgicas en MR reciben aferencias de RLN3. (B) Marcaje de CTB del DG en el MR. (C) Neuronas procedentes del MS, marcadas con FG, en el MR, reciben aferencias de RLN3. (D) Imagen fusionada que muestra las neuronas marcadas con FG, CTB, 5HT y RLN3 en el MR. La barra de escala para todas las imágenes corresponde a 100  $\mu\text{m}$



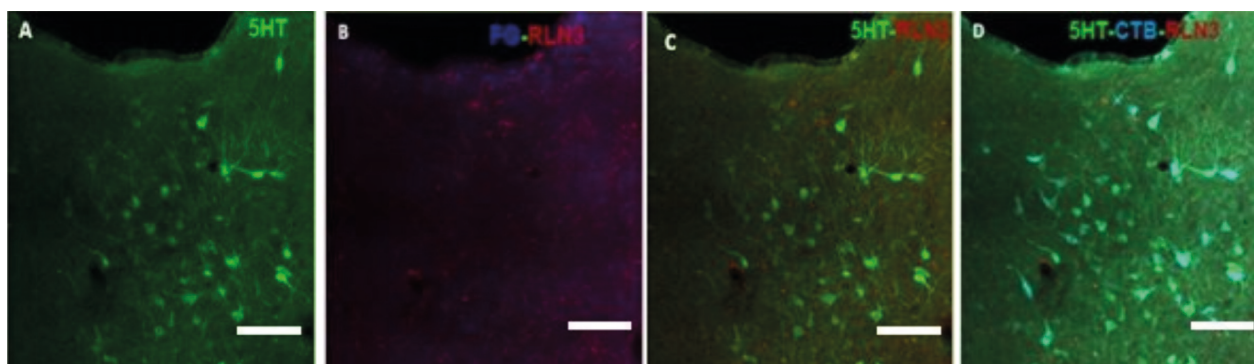


Figura 5

(A) Neuronas serotoninérgicas en el DR. (B) Marcaje de FG y RLN3 en RD (C) Neuronas serotoninérgicas en RD reciben aferencias de RLN3. (D) Imagen fusionada que muestra las neuronas marcadas con CTB, RLN3 y 5HT. La barra de escala para todas las imágenes corresponde a 100  $\mu$ m

	Contralateral			Ipsilateral		
	%FG	%CTB	Doble	% FG	% CTB	Doble
MS 34-1	78	23	0	68	32	0
MS 34-2	100	0	0	76	24	0
MS 37-1	95	5	1	85	15	0
MS -2	100	0	0	89	11	0
MS 38-1	93	7	0	93	7	2
MS 38-2	98	2	0	90	10	6
Mean	94	6,17	0,17	83,5	16,5	1,33

Tabla 1

Porcentaje de neuronas positivas a FG, CTB y ambos, en relación al número total de neuronas marcadas, para cada uno de los casos seleccionados

## Discusión y conclusiones

Nuestro estudio se ha centrado en la inervación de RLN3 al núcleo SUM y los núcleos del rafe. En el caso del área SUM, se observó un marcaje retrógrado en todos los casos tanto de FG procedente del MS como de CTB procedente del DG (Figura 3). Este hecho demuestra la existencia de un patrón de conexión del núcleo SUM con el medial septum y el giro dentado del hipocampo. Los resultados siguen la misma línea que estudios previos (Vertes 1992; Ajibola et al. 2021; Choi et al. 2012). Este patrón de colateralización podría influir directa o indirectamente en el control del ritmo theta hipocámpico, y por ende a las funciones mnemónicas derivadas de este (Ajibola et al. 2021;

Vertes 1992). Además, datos adicionales indican la presencia de contactos directos entre las fibras positivas de RLN3 del NI y las neuronas marcadas retrógradamente del MS y DG en el núcleo SUM. En estudios previos ya se había descrito la aparición de fibras de relaxina 3 en el SUM (Olucha-Bordonau et al. 2003; Smith et al. 2011). Sin embargo, la expuesta interconexión de este núcleo con el MS y el DG demuestra la relevancia del núcleo supramamilar en la vía ascendente del núcleo incertus.

En la línea de estudios previos, en el presente trabajo se muestra la proyección de los núcleos del rafe al DG y MS (Besnard y Leroy 2022). Curiosamente se observa un patrón diferencial entre rafe medial y dorsal. El RM proyecta al MS pero no se encontró marcaje retrógrado del DG, mientras que en el DR se encontró el patrón opuesto, proyecta al DG pero no al MS.

Finalmente, también se observó contacto de las fibras de relaxina tanto con rafe mediano como dorsal. Estos resultados están en concordancia con estudios previos (Smith et al. 2011; Ma y Gundlach 2015).

La existencia de estas proyecciones puede tener una cierta repercusión en la funcionalidad del sistema de generación de memoria y ritmo theta ya que proyecciones diferenciales podrían indicar distintas propiedades de procesamiento y/o distinto procesamiento aferente. Por otra parte, se ha mostrado que el núcleo supramamilar y los núcleos del rafe podrían tener funciones antagónicas en el procesamiento del ritmo theta, mientras el núcleo supramamilar ha sido asociado con la modulación de la amplitud y frecuencia (Pan y McNaughton 1997), los núcleos del rafe parecen inhibir la generación de la oscilación (Kinney, Kocsis y Vertes 1995; Kocsis and Vertes 1996).

Se requieren más estudios para caracterizar la naturaleza de estas proyecciones y conocer en qué modo están implicadas en la generación del ritmo theta y en las funciones comportamentales asociadas.

## Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la Fundación Alicia Koplowitz, España, beca número 19I436; AICO Generalitat Valenciana, número AICO21I376; Plan Nacional de Drogas Ministerio de Sanidad, número 20I511.

## Referencias bibliográficas

- Ajibola, Musa Iyiola, Jei Wei Wu, Wahab Imam Abdulmajeed y Cheng Chang Lien. 2021. «Hypothalamic Glutamate/GABA Cotransmission Modulates Hippocampal Circuits and Supports Long-Term Potentiation». *Journal of Neuroscience* 41 (39): 8181-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0410-21.2021>.
- Albert-Gascó, Héctor, Sherie Ma, Francisco Ros-Bernal, Ana María Sánchez-Pérez, Andrew L. Gundlach y Francisco E. Olucha-Bordonau. 2018. «GABAergic Neurons in the Rat Medial Septal Complex Express Relaxin-3 Receptor (RXFP3) mRNA». *Frontiers in Neuroanatomy* 11 (January): 133. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00133>.

- Besnard, Antoine y Felix Leroy. 2022. «Top-down Regulation of Motivated Behaviors via Lateral Septum Sub-Circuits». *Molecular Psychiatry* 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01599-3>.
- Choi, Woong Ki, David Wirtshafter, Hyun Jung Park, Mi Sook Lee, Song Her e Insop Shim. 2012. «The Characteristics of Supramammillary Cells Projecting to the Hippocampus in Stress Response in the Rat». *Korean Journal of Physiology and Pharmacology* 16 (1): 17-24. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2012.16.1.17>.
- Gil-Miravet, Isis, Aroa Mañas-Ojeda, Francisco Ros-Bernal, Esther Castillo-Gómez, Héctor Albert-Gascó, Andrew L. Gundlach y Francisco E. Olucha-Bordonau. 2021. «Involvement of the Nucleus Incertus and Relaxin-3/RXFP3 Signaling System in Explicit and Implicit Memory». *Frontiers in Neuroanatomy* 15 (March). <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.637922>.
- Kinney, G. G., Barbara Kocsis y Robert P. Vertes. 1995. «Injections of Muscimol into the Median Raphe Nucleus Produce Hippocampal Theta Rhythm in the Urethane Anesthetized Rat». *Psychopharmacology* 120 (3): 244-48.
- Kocsis, Barbara y Robert P. Vertes. 1996. «Midbrain Raphe Cell Firing and Hippocampal Theta Rhythm in Urethane-Anaesthetized Rats». *Neuroreport* 7 (18): 2867-72.
- Lawther, Adam J., Andrew Flavell, Sherie Ma, Stephen Kent, Christopher A. Lowry, Andrew L. Gundlach y Matthew W. Hale. 2018. «Involvement of Serotonergic and Relaxin-3 Neuropeptide Systems in the Expression of Anxiety-like Behavior». *Neuroscience* 390: 88-103. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.08.007>.
- LeDoux, Joseph E. 2000. «Emotion Circuits in the Brain». *Annual Review of Neuroscience* 23: 155-84. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.23.1.155>.
- Ma, Sherie y Andrew L. Gundlach. 2015. «Ascending Control of Arousal and Motivation: Role of Nucleus Incertus and Its Peptide Neuromodulators in Behavioural Responses to Stress». *Journal of Neuroendocrinology* 27 (6): 457-67. <https://doi.org/10.1111/JNE.12259>.
- Ma, Sherie, Francisco E. Olucha-Bordonau, M. Akhter Hossain, Feng Lin, Chester Kuei, Changlu Liu, John D. Wade, Steven W Sutton, Angel Nuñez y Andrew L. Gundlach. 2009. «Modulation of Hippocampal Theta Oscillations and Spatial Memory by Relaxin-3 Neurons of the Nucleus Incertus». *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)* 16 (11): 730-42. <https://doi.org/10.1101/lm.1438109>.
- Müller, Christina y Stefan Remy. 2018. «Septo-Hippocampal Interaction». *Cell and Tissue Research* 373 (3): 565-75. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2745-2>.
- Olucha-Bordonau, Francisco E., Héctor Albert-Gascó, Francisco Ros-Bernal, Valeria Rytova, Emma K.E. Ong-Pålsson, Sherie Ma, Ana M. Sánchez-Pérez y Andrew L. Gundlach. 2018. «Modulation of Forebrain Function by Nucleus Incertus and Relaxin-3/RXFP3 Signaling». *CNS Neuroscience and Therapeutics* 24 (8): 694-702. <https://doi.org/10.1111/cns.12862>.
- Olucha-Bordonau, Francisco E., Vicent Teruel, Jorge Barcia-González, Amparo Ruiz-Torner, Alfonso A. Valverde-Navarro y Francisco Martínez-Soriano. 2003. «Cytoarchitecture and Efferent Projections of the Nucleus Incertus of the Rat». *The Journal of Comparative Neurology* 464 (1): 62-97. <https://doi.org/10.1002/CNE.10774>.
- Olucha-Bordonau, Francisco E., Marcos Otero-García, Ana M. Sánchez-Pérez, Ángel Nuñez, Sherie Ma y Andrew L. Gundlach. 2012. «Distribution and Targets of the

- Relaxin-3 Innervation of the Septal Area in the Rat». *The Journal of Comparative Neurology* 520 (9): 1903-39. <https://doi.org/10.1002/cne.23018>; 10.1002/cne.23018.
- Pan, Wei Xing y Neil McNaughton. 1997. «The Medial Supramammillary Nucleus, Spatial Learning and the Frequency of Hippocampal Theta Activity». *Brain Research* 764 (1-2): 101-8. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00431-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00431-9).
- Rallu, Murielle, Joshua G. Corbin y Gord Fishell. 2002. «Parsing the Prosencephalon». *Nature Reviews Neuroscience* 2002 3: 12 3 (12): 943-51. <https://doi.org/10.1038/nrn989>.
- Smith, Craig M., Philip J. Ryan, Ihaia T. Hosken, Sherie Ma y Andrew L. Gundlach. 2011. «Relaxin-3 Systems in the Brain-The First 10 Years». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 42 (4): 262-75. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.013>.
- Sparks, Peter D. y Joseph E. LeDoux. 1995. «Septal Lesions Potentiate Freezing Behavior to Contextual but Not to Phasic Conditioned Stimuli in Rats». *Behavioral Neuroscience* 109 (1): 184-88. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.109.1.184>.
- Vertes, Robert P. 1992. «PHA-L Analysis of Projections from the Supramammillary Nucleus in the Rat». *Journal of Comparative Neurology* 326 (4): 595-622. <https://doi.org/10.1002/CNE.903260408>.
- Vertes, Robert P. y Barbara Kocsis. 1997. «Brainstem-Diencephalo-Septohippocampal Systems Controlling the Theta Rhythm of the Hippocampus». *Neuroscience* 81 (4): 893-926. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00239-X).
- Vertes, Robert P, Zimbul Albo y Gonzalo Viana Di Prisco. 2001. «Theta-Rhythmically Firing Neurons in the Anterior Thalamus: Implications for Mnemonic Functions of Papez's Circuit». *Neuroscience* 104 (3): 619-25. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00131-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00131-2).