

## La proyección de Relaxina-3 sobre centros serotoninérgicos en el cerebro de la rata

DANIEL MONTERO CABALLERO  
al374569@uji.es

MÓNICA NAVARRO SÁNCHEZ  
monavarr@uji.es

ISIS GIL MIRAVET  
gili@uji.es

FRANCISCO ELISEO OLUCHA BORDONAU  
folucha@uji.es

### Resumen

La modulación de los sistemas cognitivos y emocionales dependen de una serie de conexiones ascendentes entre las que se encuentran las conexiones serotoninérgicas (5HT) y también las peptidérgicas. La Relaxina-3 (RLN3) es un neuropeptido que se produce principalmente en el núcleo incertus (NI) en el tegmento pontino. Aunque los núcleos del rafe (principales centros que contienen neuronas 5HT) reciben fibras originadas en el NI, las interacciones de RLN3 con el sistema 5HT sólo han sido estudiadas en el desarrollo postnatal. Se ha hipotetizado que el sistema 5HT interacciona mutuamente con el RLN3. Se pretende conocer el sustrato anatómico de la proyección de RLN3 sobre los núcleos del rafe en ratas. Para ello, se realizará inmunofluorescencia cuádruple para analizar las relaciones anatómicas entre la RLN3, el transportador vesicular de glutamato (vGlut2), la 5HT y el transportador vesicular de GABA (VGAT). En este estudio se han cuantificado el número de posibles contactos de RLN3 sobre estructuras 5HT positivas y el número de contactos asociados a proyecciones GABAérgicas y a proyecciones glutamatérgicas. Los resultados preliminares señalan la existencia efectiva de una importante proporción de fibras de RLN3 que contienen marcadores de vGlut2 y contactan con células positivas de 5HT; adicionalmente se ha asociado menor proporción al VGAT. Por otra parte, la mayor parte de neuronas 5HT presentan comarcaje con vGluT2. Los datos preliminares indican, por tanto, un papel relevante del sistema RLN3 en la funcionalidad de los sistemas 5HT.

**Palabras clave:** Relaxina-3, Serotonina, núcleos del Rafe, GABA, Glutamato.

## Abstract

The modulation of cognitive and emotional systems depends on several upstream connections such as serotonin (5HT) and peptidergic connections. Relaxin-3 (RLN3) is a neuropeptide that is mainly produced by the nucleus incertus (NI) in the pontine tegmentum. Although the raphe nuclei (major centers containing 5HT neurons) receive fibers originating from the NI, the interactions of RLN3 with the 5HT system have only been studied in postnatal development. It has been hypothesized that the 5HT system interacts with the RLN3 system. We aim to understand the anatomical substrate of RLN3 projection on the raphe nuclei in rats. For this purpose, quadruple immunofluorescence will be performed to analyze the anatomical relationships of RLN3, vesicular glutamate transporter (vGlut2), 5HT and vesicular GABA transporter (VGAT). In this study we have quantified the number of possible RLN3 contacts on 5HT -positive structures and the number of these contacts associated with GABAergic projections and glutamatergic projections. Preliminary results point to the effective existence of a significant proportion of RLN3 fibers containing vGlut2 markers and contacting 5HT -positive cells, a smaller proportion being associated with VGAT. Moreover, the majority of 5HT neurons are also vGluT2-positive. Preliminary data indicate, therefore, a relevant role of the RLN3 system in the functionality of 5HT systems.

**Key Words:** Relaxin-3, Serotonin, Raphe nucleus, GABA, Glutamate.

## Introducción

El núcleo incertus (NI) del tegmento pontino está formado fundamentalmente por neuronas GABAérgicas que co-expresan el neuropéptido RLN3 (Ma et al. 2007). Los datos referidos a la funcionalidad del sistema indican que ejerce una acción en la respuesta del estrés, en la ingesta de alimentos, el aprendizaje y memoria, la conducta social y la función neuroendocrina (García Díaz et al. 2021; Ryan et al. 2011; Smith et al. 2011).

La RLN3, también está presente en poblaciones más pequeñas de los núcleos del rafe pontinos (17,5% respecto al NI), la sustancia gris periacueductal medial y ventrolateral (27,5% respecto al NI), y la sustancia negra en su división lateral (17,5% respecto al NI) (Ma et al. 2017). Adicionalmente, las principales entradas al NI provienen de la línea media de la sustancia gris periacueductal, la corteza prefrontal, la habénula lateral, el núcleo interpeduncular, los núcleos del rafe medio (MNR) y el hipotálamo lateral (Goto et al. 2001).

Los datos neuroanatómicos indican que el NI es el origen de un sistema de proyecciones ascendentes que contacta sucesivamente con núcleos implicados en la generación del ritmo theta hipocámpico entre ellos, los núcleos del rafe, el núcleo supramamilar y el septum medial (Goto et al. 2001; Olucha Bordonau et al. 2003). El Ritmo Theta es un tipo de actividad sincrónica en el cerebro con una oscilación casi sinusoidal de baja frecuencia de 5 a 12 Hz, la cual está asociada a fenómenos de memoria y la potenciación a largo

plazo (Kocsis y Vertes 1997). De hecho, se ha demostrado que el NI y su sistema de proyecciones mediante RLN3 son capaces de modular el ritmo theta (Ma et al. 2009; Núñez et al. 2006). Por otra parte, los núcleos del rafe parecen tener una acción antagónica sobre la actividad theta, ya que la estimulación del rafe mediano inhibe la actividad theta mientras que su inactivación la incrementa (di Prisco et al. 2002; Kocsis y Vertes 1996). Además de la evidencia del ritmo theta, existen pocos estudios acerca de las interrelaciones entre los sistemas RLN3 y 5HT. No obstante, en un trabajo sobre el desarrollo del NI se observó que la depleción de 5HT mediante clorofenilalanina provocaba una mayor expresión del gen de la RLN3 en el NI en el adulto joven (Miyamoto et al. 2008). Este dato sugiere que la función de las neuronas de RLN3 en el cerebro está influenciada por la actividad 5HT que ejercería una función limitadora del grado de desarrollo del NI. El hecho de que los dos sistemas controlen aspectos similares del comportamiento, sobre todo sobre aspectos emocionales, permite concluir que la interacción entre el sistema 5HT y el RLN3 permitiría realizar una serie de interajustes. Ya se ha observado la existencia de una proyección de 5HT sobre el NI que utilizaría receptores  $H_{1A}$  (Miyamoto et al. 2008), sin embargo, el circuito recíproco desde el NI sobre los núcleos del rafe no ha sido analizado en detalle.

De este modo, el presente trabajo pretende analizar las interacciones de la RLN3 con el sistema 5HT en los núcleos del rafe dorsal (DR) y MNR, y estudiar su naturaleza gabaérgica y/o glutamatérgica.

## Método

### *Animales*

En este estudio se utilizaron 3 ratas adultas hembras Wistar de un peso entre 350-450gr. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universitat Jaume I de Castellón (España). Todos los procedimientos fueron ajustados a la Directiva 86/609/CEE de la Comunidad Europea sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### *Fijación y seccionamiento del cerebro*

Para la inmunofluorescencia se eutanasió a ratas no tratadas mediante una dosis letal de pentobarbital (Dolethal, 200 mg/kg i.p; Vetoquinol S.A., Madrid, España). Tras perder todos los signos de conciencia y los reflejos sensoriales, los animales fueron perfundidos transcardialmente con una solución salina (250 ml) 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 durante 4 horas a 4°C. Posteriormente, los cerebros se sumergieron en sacarosa al 30% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4, durante 48 horas a 4°C, y se obtuvieron secciones coronales (40 µm) utilizando un micrótopo de congelación (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Para cada cerebro, se obtuvieron 6 conjuntos de secciones y se almacenaron en una solución crioprotectora (30% de glicerol, 30% de etilenglicol y 40% de PBS 0,1 M, pH 7,4).

### *Detección inmunofluorescente de marcadores neuronales*

Para la detección de las proteínas de los marcadores neuronales, se utilizaron 6 secciones de muestra por animal (n=3). Las secciones se enjuagaron 3 veces durante 10 minutos en PBS y se sumergieron en un medio de bloqueo de PBST que contenía 4% de NDS (Normal Donkey Serum), 4% de NGS (Normal Goat Serum) y 0,2% de Tritón X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron en una solución de anticuerpo primario que contenía Mouse anti-RLN3 (1:5; (Kizawa et al., 2003)), Rabbit anti-5HT (1:8000; Sigma-Aldrich), Guinea Pig anti-VGAT (1:500; Synaptic Systems), Chicken anti-VGlu2 IgY (1:250; Synaptic Systems), en PBST con 4% de NDS, 4% NGS y 0,2% Triton X100 durante 48 horas a 4°C. A continuación, las secciones se enjuagaron 3 veces durante 10 minutos en PBS y para el marcaje cuádruple se incubaron en Alexa 488 Donkey anti-Rabbit IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch), en Alexa 647 Donkey anti-Mouse IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch), en Alexa 405 Goat anti-Chicken IgG (1:200; Biotium) y en Cy3 Goat anti-Guinea Pig IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch) en PBST con 4% de NDS, 4% NGS y 0,2% Triton x100 durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Las secciones se enjuagaron brevemente en PBS 0,01 M y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, se secaron al aire y se cubrieron con Mowiol.

### *Análisis Microscópico*

El análisis de inmunofluorescencia se realizó con un microscopio confocal (Leica DMI8, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se tomaron con un objetivo 63x. Se hizo stack de 20 imágenes a 0,5 µm para cada una de las regiones. Las secciones seriadas de 0,5 µm se capturaron con el software Leica Confocal (V 2.61). Para vGlu2, se utilizó el láser 405 nm para una emisión de 410-493nm. Para la 5HT, se utilizó el láser 488 nm para una emisión de 493-553 nm. Para el VGAT, se utilizó el láser 532 nm para una emisión de 566-641 nm. Para RLN3, se utilizó el láser 647nm para una emisión de 649-776 nm.

### *Análisis de datos*

Se analizaron los resultados con Graphpad Prism 9. La variable dependiente en el estudio era el comarraje de RLN3 con células 5HT positivas. Se aplicó el test de normalidad; en el caso de ser positivo se realizaron una serie de pruebas-t.

## **Resultados**

### *Imágenes*

La inmunofluorescencia con 5HT ha dado lugar a un marcaje en células dispersas que estaban en el DR y en el MNR (véase Ilustración 1 (A) e Ilustración 3 (A)). Este marcaje nos ha mostrado una población heterogénea de células con somas circulares de



distintos tamaños. En algunas de las neuronas marcadas con 5HT fue posible observar las ramificaciones primarias y secundarias del árbol dendrítico en número variable. Por su parte, el marcaje de RLN3 da lugar a fibras con una trayectoria que se distribuye a lo largo de los núcleos del rafe mencionados (véase Ilustración 1 (B) e Ilustración 3 (B)). El marcaje de VGAT, con una distribución granulada, dejaba una serie de espacios vacíos que correspondían a los cuerpos celulares positivos para 5HT (véase Ilustración 1 (D) e Ilustración 3 (D)). En cambio, el marcaje de vGlut2 dio lugar a una granulación presente por superposición en algunos cuerpos celulares de 5HT positivos (véase Ilustración 1 (C) e Ilustración 3 (C)). Ambos casos se pueden observar en la ampliación de la imagen de la región marcada en rojo en la Ilustración 1 (A-E) e Ilustración 3 (A-E), donde observamos una única célula (véase Ilustración 2 (A-C) e Ilustración 4 (A-C)), donde se nos muestra la célula de 5HT con comarcaje de vGlut2 (véase Ilustración 2 (A) e Ilustración 4 (A)), y podemos observar que el VGAT deja el hueco libre a la célula de 5HT (véase Ilustración 2 (B) e Ilustración 4 (B)).

En el estudio se contabilizó las fibras de RLN3 que presentaban comarcaje con las células de 5HT positivas (véase Ilustración 2 e Ilustración 4). Posteriormente, se contabilizaron las fibras de RLN3 con comarcaje con 5HT, y de estas fibras de RLN3 cuales presentaban comarcaje con vGglut2 (véase Ilustración 2 (A) e Ilustración 4 (A)), con VGAT (véase Ilustración 2 (B) e Ilustración 4 (B)) o con ambos (véase Ilustración 2 (C) e Ilustración 4 (C)).

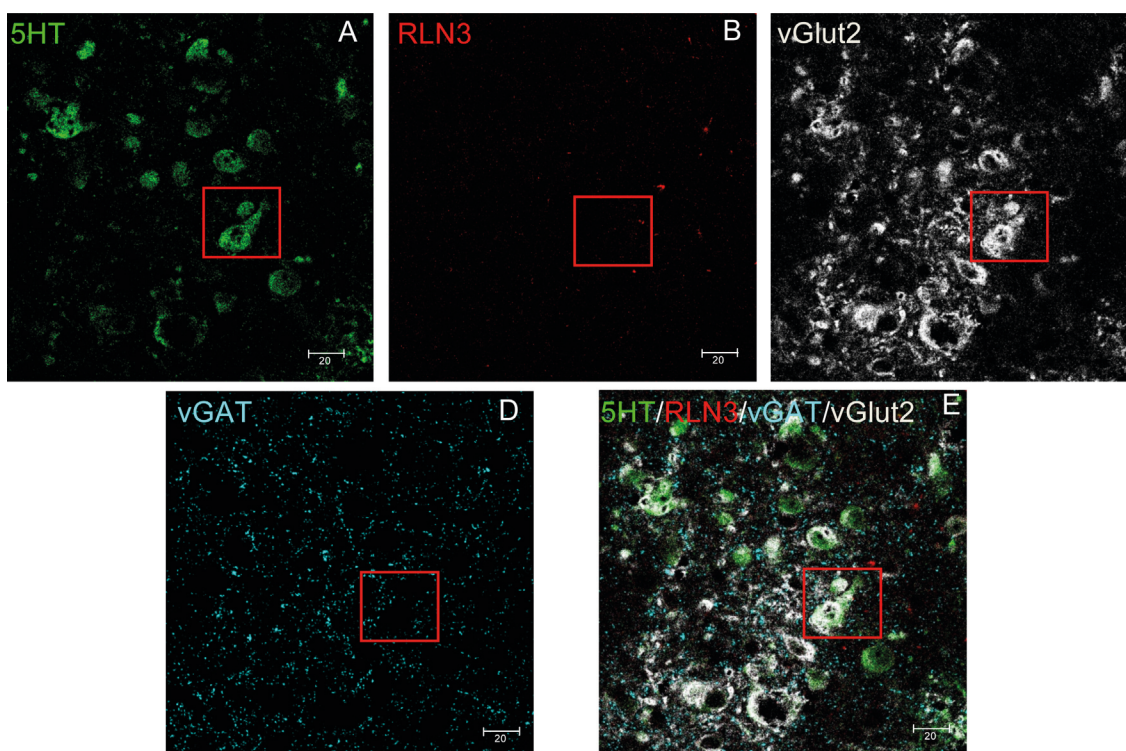
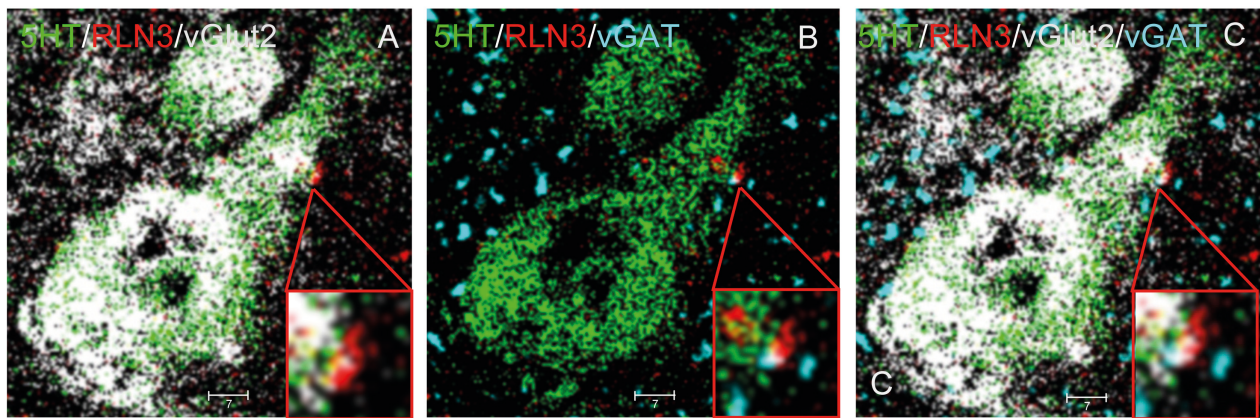


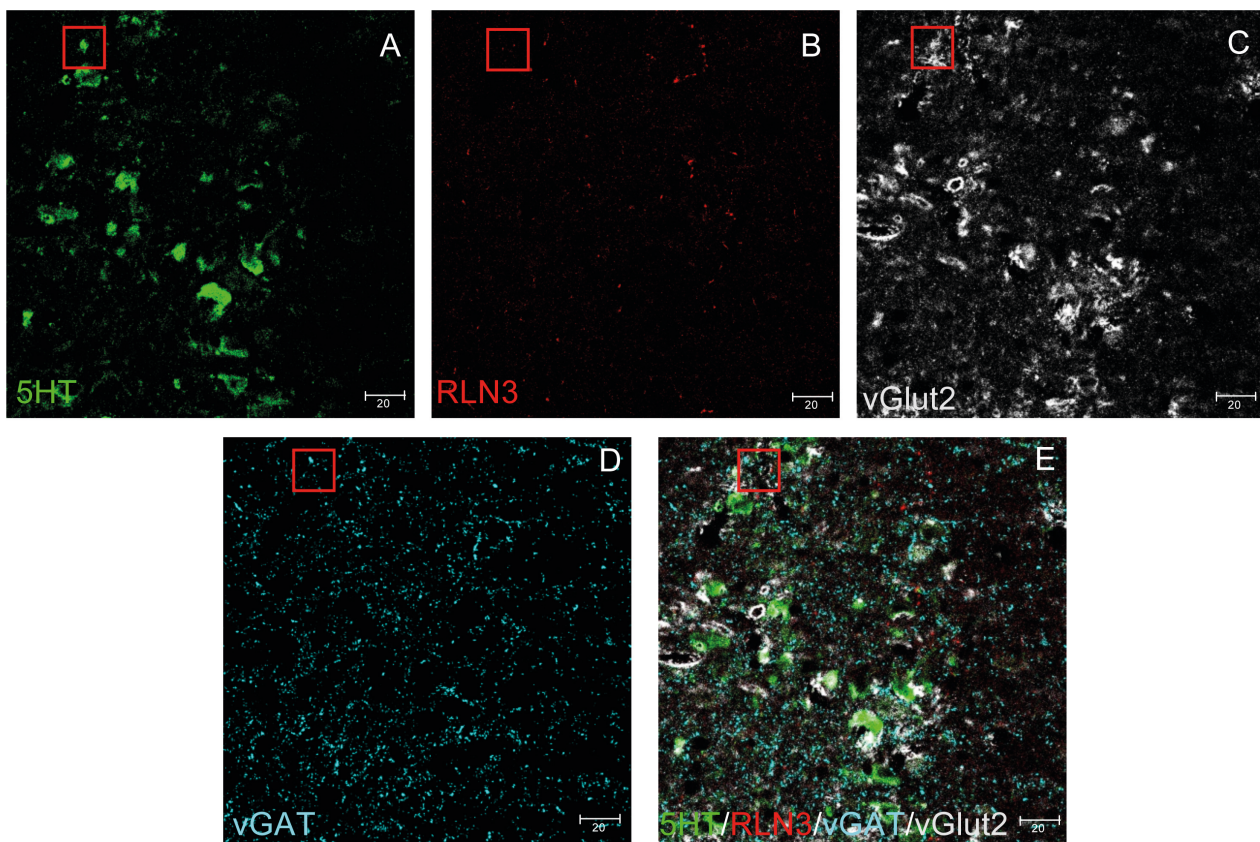
Ilustración 1

Imagen de una región del DR. (A) Marcaje de células 5HT positivas (en verde) en una sección de 0,5 µm. (B) Marcaje de fibras de RLN3 (en rojo) en máxima proyección de 10 µm. (C) Marcaje de vGlut2 (en blanco) en una sección de 0,5 µm. (D) Marcaje de VGAT (en cian) en una sección de 0,5 µm. (E) Marcaje de células de 5HT positivas junto con fibras de RLN3 en máxima proyección de 10 µm (F) Triple marcaje de células de 5HT positivas, fibras de RLN3 y de VGAT en máxima proyección de 10 µm



*Ilustración 2*

*Imagen de la célula señalada en las imágenes D, E y F de la Ilustración 1. (A) Marcaje de células 5HT positivas junto con RLN3 y vGlut2 en una sección de 0,5 µm (B) Marcaje de células 5HT positivas junto con RLN3 y vGAT en una sección de 0,5 µm (c) Marcaje cuádruple en la misma célula en una sección de 0,5 µm*



*Ilustración 3*

*Imagen de una región del MnR. (A) Marcaje de células 5HT positivas (en verde) en una sección de 0,5 µm. (B) Marcaje de fibras de RLN3 (en rojo) en máxima proyección de 10 µm. (c) Marcaje de vGlut2 (en blanco) en una sección de 0,5 µm. (d) Marcaje de vGAT (en cian) en una sección de 0,5 µm. (E) Marcaje de células de 5HT positivas junto con fibras de RLN3 en máxima proyección de 10 µm (F) Triple marcaje de células de 5HT positivas, fibras de RLN3 y de vGAT en máxima proyección de 10 µm*



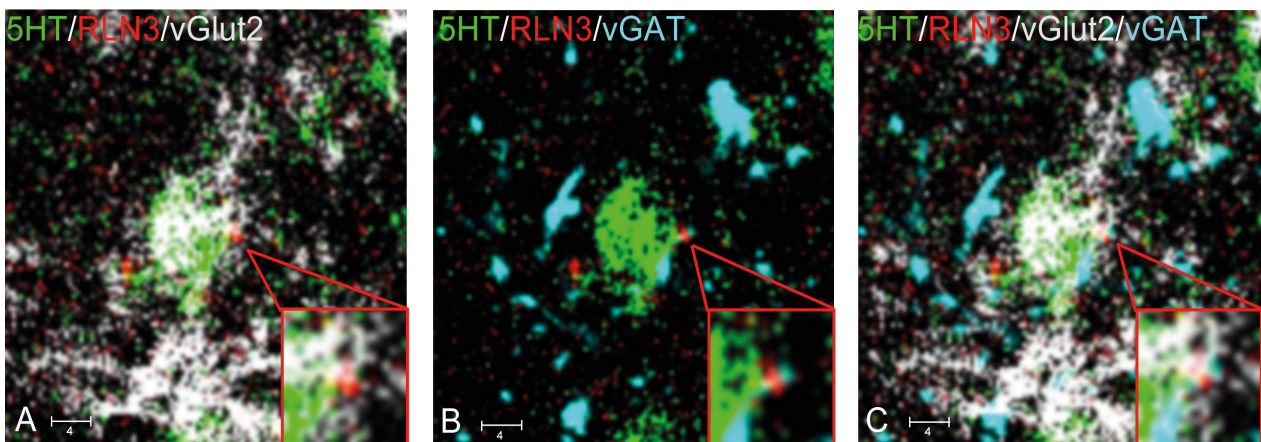


Ilustración 4

Imagen de la célula señalada en las imágenes D, E y F de la Ilustración 3. (A) Marcaje de células 5HT positivas junto con RLN3 y vGlut2 en una sección de 0,5  $\mu\text{m}$  (B) Marcaje de células 5HT positivas junto con RLN3 y vGAT en una sección de 0,5  $\mu\text{m}$  (C) Marcaje cuádruple en la misma célula en una sección de 0,5  $\mu\text{m}$

## Datos

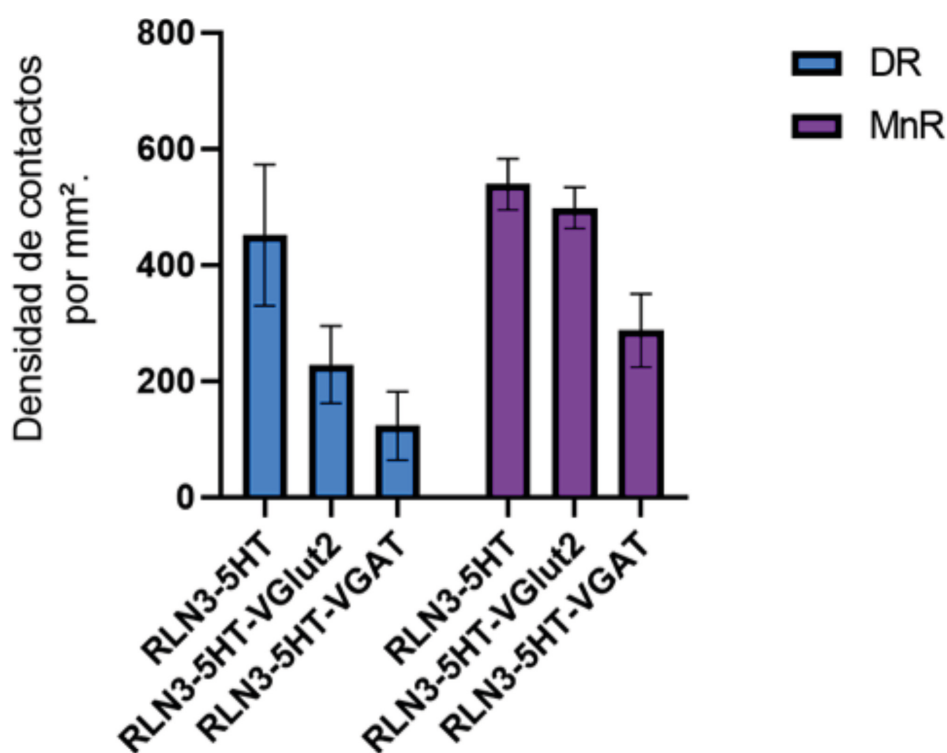
Las imágenes realizadas con el objetivo 63x en el microscopio confocal mostraron la presencia de entre 211 y 604 fibras por  $\text{mm}^2$  de RLN3 que presentaban comarcaje con células 5HT positivas. De estas fibras de RLN3 se ha observado que aproximadamente la mitad de ellas presentaban comarcaje con vGlut2 en el DR. En el MNR este comarcaje con el vGlut2 llega a ser el 92% del total de fibras de RLN3 con comarcaje con 5HT, donde se observó que oscilaba en torno a 105 y 539 contactos por  $\text{mm}^2$ . Respecto al comarcaje de RLN3 y vGAT se observó en torno a un 50% menos respecto al vGlut2, con una variabilidad que oscilaba entre los 23 y 399 contactos por  $\text{mm}^2$ . Por lo tanto, se ha observado una diferencia respecto al número de contactos que presenta el vGlut2 con la RLN3 frente al número de contactos del vGAT con la RLN3, donde se han visualizado un mayor número de contactos del vGlut2 (véase Tabla 1 e Ilustración 5).

La prueba de normalidad en todos los casos fue positiva, por lo que posteriormente se realizaron pruebas-t para RLN3 -5HT ( $p=0,6$   $df=2$ ), para RLN3 -5HT -vGlut2 ( $p=0,07$   $df=2$ ), RLN3 -5HT -vGAT ( $p=0,26$   $df=2$ ). Estos resultados muestran una clara tendencia en RLN3 -5HT -vGlut2 que requerirán de una ampliación de la muestra para futuros estudios anatómicos.

Tabla 1  
Densidad de contactos de RLN3 con 5HT por mm<sup>2</sup>

	RLN3-5HT	RLN3-5HT-VGlu2	RLN3-5HT-VGAT
Dorsal raphe nucleus	451	228	123
Median raphe nucleus	539	498	287

Nota: Densidad de contactos por mm<sup>2</sup>.



## Discusión y conclusiones

Los datos obtenidos son el resultado de un estudio preliminar sobre un número reducido de ejemplares que apuntan a la existencia de contactos entre fibras de RLN3 y neuronas positivas para 5HT. Existe también una asociación entre estos contactos y el marcaje característico de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico.

En cuanto a los resultados observados, se puede observar como las células de los núcleos del rafe reciben proyecciones de RLN3. Esta proyección se sitúa especialmente en dendritas o en soma de las células 5HT positivas, y estaría asociada al transportador vesicular de glutamato. Sin embargo, el marcaje obtenido con el vGlu2 es relativamente disperso y aunque en ocasiones parece efectivamente asociado a estructuras neuronales, también es posible observarlo sin estar asociado a ellas, por lo que podría contener elementos inespecíficos. Por contra, el marcaje con vGAT presenta en todos los casos

una apariencia granular que deja espacios no marcados que se corresponden con los cuerpos celulares de las neuronas 5HT y otros tipos celulares, por lo que se considera un marcaje específico asociado a la transmisión GABAérgica. Es necesario realizar análisis posteriores para discriminar la especificidad de estos sistemas de detección.

El carácter GABAérgico de las proyecciones ya fue señalado en los primeros trabajos de conexiones (Olucha Bordonau et al. 2003). También se ha demostrado su asociación con el péptido RLN3 (Ma et al. 2007). Dado el papel demostrado de la participación de RLN3 como activador del ritmo theta, esta acción podría ser el resultado de la inhibición de los núcleos del rafe cuya acción es antagónica al NI. El antagonismo entre los sistemas RLN3 y 5HT abre la posibilidad de un uso terapéutico mediado por RLN3. Los sistemas potenciadores de la transmisión 5HT han sido ampliamente utilizados como antidepresivos (di Giovanni et al. 2016; Mogha et al. 2012). También se han obtenido datos de un efecto ansiolítico y antidepresivo de la transmisión mediada por la RLN3 (Ryan et al. 2013).

Resulta necesario en pasos sucesivos determinar la presencia de marcadores sinápticos como sinaptofisina en las fibras de RLN3 de los núcleos del rafe, así como comprobar el patrón de colateralización sobre el septum medial y el hipocampo. Datos recientes indican que efectivamente los núcleos del rafe constituyen una población heterogénea de neuronas organizadas en conjuntos discretos, y que cada uno de ellos desarrolla acciones específicas (Paquelet et al. 2022). El NI y sus proyecciones sobre los núcleos del rafe podrían contribuir a esta subdivisión de compartimentos funcionales.

Entre los siguientes objetivos también está el realizar una inmunofluorescencia con 5HT, RLN3, CTB (Cholera Toxin B) y FluoroGold (FG), en una muestra de ratas Wistar infundidas con los trazadores retrógrados CTB y FG en diferentes regiones. Otro de los pasos futuros a realizar para poder comprobar la hipótesis planteada es provocar un aumento de 5HT mediante la administración de prozac y observar los efectos en la expresión del gen de la RLN3, ya que como se ha podido observar en los estudios de (Miyamoto et al. 2008) la depleción de 5HT provocaba el aumento de la expresión del gen de la RLN3. Así pues, sería interesante ver si provoca el efecto contrario, es decir, una disminución de la expresión del gen de la RLN3. En el caso de tener un efecto, un paso final sería la administración de agonistas de RLN3 para observar si el aumento de la RLN3 tiene un efecto sobre el sistema 5HT en los núcleos del rafe, con el objetivo de confirmar que el sistema 5HT y el sistema RLN3 son de interacción mutua.

## Referencias bibliográficas

- di Giovanni, Giuseppe, Dubravka Svob Strac, Montse Sole, Mercedes Unzeta, Keith F. Tipton, Forotea Mück- Šeler, Irene Bolea, Laura Della Corte, Matea Nikolac Perkovic, Nela Pivac, Ilse J. Smolders, Anna Stasiak, Wieslawa A. Fogel y Philippe De Deurwaerdère. 2016. «Monoaminergic and histaminergic strategies and treatments in brain diseases». *Frontiers in Neuroscience* 10, Issue NOV: 541). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00541>
- di Prisco, Gonzala, Zimbul Albo, Robert P. Vertes y Bernat Kocsis. 2002. «Discharge properties of neurons of the median raphe nucleus during hippocampal theta

- rhythm in the rat». *Experimental Brain Research*, 145 (3): 383-394. <https://doi.org/10.1007/s00221-002-1123-8>
- García Díaz, Cristina, Isis Gil Miravet, Héctor Albert Gasco, Aroa Mañas Ojeda, Francisco Ros Bernal, Esther Castillo Gómez, Andrew L. Gundlach y Francisco Eliseo Olucha Bordonau. 2021. «Relaxin-3 Innervation From the Nucleus Incertus to the Parahippocampal Cortex of the Rat». *Frontiers in Neuroanatomy* 15: 43. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.674649>
- Goto, Marina, Larry W Swanson y Newton S Canteras. 2001. «Connections of the nucleus incertus». *The Journal of Comparative Neurology* 438 (1): 86-122. <https://doi.org/10.1002/cne.1303>
- Kizawa, Hideki, Kazunori Nishi, Yoshihiro Ishibashi, Masataka Harada, Tsuneo Asano, Yasuaki Ito, Nobuhiro Suzuki, Shuji Hinuma, Yukio Fujisawa, Haruo Onda, Osamu Nishimura y Masahiko Fujino. 2003. «Production of recombinant human relaxin 3 in AtT20 cells». *Regulatory Peptides* 113 (1-3): 79-84. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00304-X](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00304-X)
- Kocsis, Bernat y Robert Vertes. 1996. «Midbrain raphe cell firing and hippocampal theta rhythm in urethane-anaesthetized rats». *NeuroReport* 7(18): 2867-2872. <https://doi.org/10.1097/00001756-199611250-00012>
- Ma, Sherie, Pascal Bonaventure, Tania Ferraro, Peijuan Shen, Tanya Burazin, Ros Bathgate, Changlu Liu, Geoffrey W. Tregear, Steven W. Sutton y Andrew L. Gundlach. 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 (1): 165-190. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.072>
- Ma, Sherie, Francisco Eliseo Olucha Bordonau, M. Akhter Hossain, Feng Lin, Chester Kuei, Changlu Liu, John D Wade, Steven W Sutton, Ángel Núñez y Andrew L. Gundlach. 2009. «Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus». *Learning and Memory* 16(11): 730-742. <https://doi.org/10.1101/lm.1438109>
- Ma, Sherie, Craig M. Smith, Anna Blasiak y Andrew L. Gundlach. 2017. «Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain». *British Journal of Pharmacology* 174(10): 1034-1048. <https://doi.org/10.1111/bph.13659>
- Miyamoto, Yasumasa, Yoshihisa Watanabe y Masaki Tanaka. 2008. «Developmental expression and serotonergic regulation of relaxin 3/INSL7 in the nucleus incertus of rat brain». *Regulatory Peptides* 145(1-3): 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.010>
- Mogha, Amit, Sara Guariglia, Priya Ranjan Debata, Guang Y. Wen y Prabal Banerjee. 2012. «Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC $\alpha$  is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus». *Translational Psychiatry* 2(1): e66–e66. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.58>
- Núñez, Ángel, Ana Cervera Ferri, Francisco Eliseo Olucha Bordonau, Amparo Ruiz Torner y Vicent Teruel. 2006. «Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation». *European Journal of Neuroscience* 23 (10): 2731-2738. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04797.x>
- Olucha Bordonau, Francisco Eliseo, Vicent Teruel, Jorge Barcia González, Amparo Ruiz Torner, Alfonso Valverde Navarro y Francisco Martínez Soriano. 2003.



- «Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat». *Journal of Comparative Neurology* 464(1): 62-97. <https://doi.org/10.1002/cne.10774>
- Paquelet, Grace E., Kassandra Carrion, Clay O. Lacefield, Pengcheng Zhou, René Hen y Bradley R Miller. 2022. «Single-cell activity and network properties of dorsal raphe nucleus serotonin neurons during emotionally salient behaviors». *Neuron* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.015>
- Ryan, Philip J, Elena Büchler, Fazel Shabanpoor, Mohammed Akhter Hossain, John D. Wade, Andrew J Lawrence y Andrew L Gundlach. 2013. «Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation decreases anxiety- and depressive-like behaviours in the rat». *Behavioural Brain Research* 244: 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.034>
- Ryan, Philip J., Sherie Ma, Francisco Eliseo Olucha Bordonau y Andrew L Gundlach. 2011. «Nucleus incertus-An emerging modulatory role in arousal, stress and memory». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35 (6): 1326-1341). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.004>
- 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): 262-275). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.013>
- Vertes, Robert y Bernat 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)