

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN MEDICINA

**Implicaciones neurofisiológicas del
sistema RLN₃/RXFP en la corteza
entorrinal.**

Autora: Andrea Navarro Gil

Tutor: Francisco Eliseo Olucha Bordonau

Servicio: Departamento de Investigación del Grado de Medicina –
UJI



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG: Implicaciones neurofisiológicas del sistema RLN3/RXFP en la corteza entorrinal.

ALUMNO/A: Andrea Navarro Gil

DNI: 03153231 – T

PROFESOR/A TUTOR/A:

**FRANCISCO ELISEO |
OLUCHA | BORDONAU**

Firmado digitalmente por FRANCISCO
ELISEO|OLUCHA|BORDONAU
Fecha: 2018.07.04 09:30:41 +02'00'

Fdo (Tutor/a):

Fdo (Tutor/a): Francisco Olucha Bordonau

INDICE

I. RESUMEN p3

II. ABSTRACT p3

III. EXTENDED SUMMARY p4

IV. INTRODUCCIÓN p7

- Memoria y comportamiento p8

1. Nucleus incertus y conexiones p9

- 1.1 – Estructura anatómica y localización del Nucleus Incertus p9
- 1.2 – Funciones del Nucleus Incertus p9
- 1.3 – Aferencias y Eferencias del Nucleus Incertus p10

2. CIRCUITO PONTO – SEPTO – HIPOCAMPAL

- 2.1 – Introducción p11
- 2.2 – El circuito; sus componentes y las fibras que los conectan p11
- 2.3 – Las ondas theta p12

3. LA CORTEZA ENTORRINAL p13

4. CIRCUITO DE MEMORIA ESPACIAL p14

5. NEUROFISIOLOGÍA DE LA RELAXINA 3 Y SU RECEPTOR

6. LA RELAXINA EN EL CIRCUITO SEPTOHIPOCAMPAL - p19

- Un nuevo modulador telencefálico - p19

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS - p19

II MATERIALES Y MÉTODOS

p20

1. ANIMAL – p21
2. PREPARACIÓN DEL TEJIDO – p21
3. MICROSCOPIO CONFOCAL – p21
4. SOFTWARE FIJI IMAGE J – p21
5. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA – P22

III. RESULTADOS – P26

1. ´METODO – p 26
2. RESULTADOS – p 31
3. INTERPRETACIÓN – p36
4. CORRELACIÓN ENTRE OBJETIVOS Y DISCUSIÓN p38

IV. DISCUSIÓN – P39

V. BIBLIOGRAFÍA Y AGRADECIMIENTOS P 52

I. RESUMEN

El sistema relaxina – 3/RXFP constituye una corriente de investigación y experimentación desde hace pocas décadas en cuanto a su distribución en el cerebro de los animales y su correlación con diversas funciones neurofisiológicas, psíquicas, y metabólicas. La relaxina – 3, miembro de la superfamilia de las insulinas y relaxinas, ha sido detectada en numerosas estructuras anatómicas del cerebro de la rata. Junto con su receptor RXFP3 modulan la ingesta alimentaria, el sueño/vigilia, el comportamiento, la respuesta al estrés, y la memoria. Sin embargo, hasta ahora no había sido descrita en profundidad en la corteza entorrinal; el nexo entre el circuito septo – hipocampal theta dependiente y la corteza telencefálica. En este trabajo detectamos mediante inmunorreacciones con la sinaptofisina y las proteínas ligadoras del calcio de fibras gabaérgicas en esta zona cerebral, la positividad de la relaxina – 3 y numerosos contactos que demuestran sinapsis entre ambos tipos de neuronas. Cuantificamos mediante el microscopio confocal Leica DMi8 y el Software Fiji ImageJ 64. Contrastando nuestros resultados en la corteza entorrinal con la bibliografía llegamos a la conclusión de que el sistema relaxina – 3/RXFP podría ser una correlación entre el estrés y la ingesta de comida, así como un modulador del ritmo theta, un neurotransmisor en las emociones y el comportamiento y una diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

II. ABSTRACT

The relaxin-3 / RXFP system constitutes a current of research and experimentation for a few decades regarding its distribution in the brain of animals and its correlation with various neurophysiological, psychiatric, and metabolic functions. Relaxin - 3, a member of the insulins and relaxins superfamily, has been detected in numerous anatomical structures of the brain of the rat. Both this and its RXFP3 receptor are involved in functions such as dietary intake, sleep / wakefulness, behavior, stress response, and memory. However, a search in the entorhinal cortex, which is the access route between the septa-hippocampal theta dependent circuit and the telencephalic cortex, has not been carried out until now. In this work, we have demonstrated the positive immunoreactivity of the relaxin-3, and numerous contacts with synaptophysin and calcium - binding protein expressing putative GABAergic neurons. Using the Leica DMi8 confocal microscope (Leica Microsystems) and the Fiji ImageJ 64 Software, we

will quantify these contacts. Contrasting our results in the entorhinal cortex with the literature, we concluded that the relaxin-3 / RXFP system may be a source of correlation between stress and food intake, as well as a theta rhythm modulator, a neurotransmitter in the emotions and behavior and a therapeutic target in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's.

III. EXTENDED SUMMARY

It is known that many neurotransmitters and brain anatomical structures are involved in neurophysiological functions such as memory, behavior, learning, emotions, food intake, the waking / sleep cycle, and stress response, among others. To a large extent, most of these circuits are related to the ponto-septo-hippocampal theta dependent circuit that mainly regulates the incertus nucleus. Relaxin - 3, a new complex unit of the superfamily of insulins, is investigated for being a neurotransmitter in relation to it. Together with its RXFP3 receptor, it has been detected in the structures involved, especially in the incertus nucleus, and its ability to modulate these functions has been demonstrated experimentally. In this work, we also considered the hypothesis that it is also inscribed in the entorhinal cortex, a distinguished area that acts as a nexus between the limbic system and the telencephalic cortex. It is in the entorhinal cortex, the key intersection between the fibers obtained from the septo - hippocampal formation and the peripheral cortex, where the relaxin - 3 in the brain of the rat has not yet been detected, although it is in the macaque. The aim of this work is to detect a positive immunoreaction of the protein at this level with the aim of setting in motion a new correlation between the RLN3 – RXFP3 system and the theta system depending on the way in which the anatomical junction can respond to a hypothesis about its functionality and interest as a therapeutic target.

The materials and methods used in this study are fixed and fluorescence immunoreactions, using markers for relaxin - 3, synaptophysin (positive at synapses), and calcium - bound proteins such as parvalbumin and calbindin (expressed by GABAergic fibers).). We not only demonstrate an abundant presence of relaxation - 3 in the medial and lateral entorhinal cortex, but also have to make collisions between it and the GABAergic fibers that we quantify using the Leica DMI8 confocal microscope (Leica Microsystems) and the FJI ImageJ 64 Software We found as results 17 contacts between relaxin - 3 and synaptophysin, 65 and 51 contacts with parvalbumin (n=2) and 27 contacts with calbindin in captures of 34,225 μm^2 . Despite the limitations of our

methods, we can ensure the presence of relaxin - 3 fibers synapsing both interneurons and projection neurons inside the entorhinal cortex. It deserves to raise some questions regarding functions in this area of the brain as well as the molecule, but we also discussed the possibility of extending the study by making a mark from the nucleus in the body, thus reinforcing our theory that the RLN3- system RXFP is implicit in the ponto-septo-hippocampal circuit. In addition, we will begin to glimpse the idea that relaxin- 3 may be an interesting therapeutic target.

The nucleus incertus, a distinguished caudoventral cellular group of the periventricular gray substance pontine, is the main pacemaker that regulates the projections of the septo-hippocampal system. Among its most important functions is the one of the cerebral locations with the highest expression of mRNA for the CRH receptor, the corticotropin hormone, and therefore it is implicit in its relationship with the response to extrapituitary stress. In addition, it is the brain area with the highest density of relaxin - 3; it is abundantly positive in GABAergic neurons, the same ones that express the CRF and the others imply the system of norms and afferences with the structures involved in the theta dependent circuit. This nucleus is related in this way to diencephalic, mesencephalic and telencephalic structures. It is through the septo-hippocampal formation that it is related to the entorhinal cortex. Our results show contacts between calcium – binding proteins and relaxin - 3, which suggests that the origin of these GABAergic fibers from the nucleus incertus through a septo - hippocampal route. This would justify the link between relaxin - 3 with neurophysiological functions that has been shown to modulate.

All the areas just mentioned are involved in the ponto-septo-hippocampal circuit. The process begins in the pontine reticular substance (RPO), and transmits the information, passing through structures such as the supramammillary nucleus and the intergenic one, and also directly to the nucleus incertus. This regulates the information that will be transmitted to the medial septum, which will be projected with the hippocampus. At these levels the fibers that allow these connections are GABAergic and co-express relaxin-3 in the incertus nucleus and in the septum of its RXFP3 receptor in the case of the hippocampus. This is projected in turn with the entorhinal cortex giving rise to the flow of information between the limbic system and the cerebral cortex. This regulates the processing and storage of information for intrinsic memory, a more central level, and extrinsic memory, a more peripheral level. The circuit is EEG demonstrable because from the RPO a train of synchronous waves called theta oscillation is initiated, which unfolds as a relay system crossing the different structures

mentioned. It consists of a global encephalic phenomenon composed of the cooperation of a large number of cells of the septo-hippocampal formation and a large part of the anatomical structures that share projections with it, emitting afferences and reciprocal connections. In this way they give rise to a complex neural network, a closed and circular feedback loop, which interconnects all the structures under a directionality pattern from the RPO to the hippocampus, and vice versa. These waves can be altered by the infusion of relaxin-3, as several bibliographic references claim. Being in a relationship with functions such as spatial memory, behavior, and sleep rhythm, relaxin 3 is a neuromodulator of these processes and we suggest their study based on their probable therapeutic potential.

One of the first telencephalic stages of the circuit is the entorhinal cortex, the major structure of afferences and between the forms of access to the hippocampal formation and the peripheral cortex. The cells of the grid, the head address cells, and the border cells, which interact with the cells of the hippocampal CA1 zone. Our results make us consider to what extent we can be relaxin - 3 involved in it. In addition, several studies have shown the involvement of the cortex in the circadian rhythm so that its damage produces an abnormal increase in ACTH and morning cortisol, this being seen in patients with Alzheimer's disease. Therefore, we also consider relaxin 3 as the therapeutic slide of the disorders associated with neurodegenerative diseases. In addition, the GABAergic fibers present in this zone in contact with the relaxin - 3 also have a relationship with the nucleus, instead producing their CRF. It would be interesting to extend the study of relaxation - 3 as a neuromodulator of the stress response.

On the other hand relaxation - 3 has increased the dose of food in rats, as well as the increase of adipose tissue; It is characterized by its orexigenic power. In this work we also suggest that relaxation - 3 can be a link between stress and eating and visualize its therapeutic potential in psychiatry.

In short, the distribution of the RLN3 - RXFP system may modulate memory, behavior, emotions, stress response, food intake and therefore we suggest as an interesting therapeutic target. Relaxin-3 could be an effective clinical tool in the future and we are sure that science responds to the therapeutic advantages that are still hypothesized today.

In short, the topographic distribution of the system RLN₃ – RXFP₃ is closely related to the theta dependent circuit. It has been seen that relaxin - 3 is able to modulate memory, behavior, emotions, the response to stress, food intake and as much as those suggested as interesting in all these aspects. In addition, our work continues in that line of research and its presence in the entorhinal cortex, in contact with putative GABAergic neurons, is now demonstrated. We strongly suggest that its origin lies in the nucleus incertus, and consider it interesting to extend this search in the telencephalic cortex. Relaxin-3 could be an effective clinical tool in the future and we are sure that science will respond to the therapeutic advantages that are still hypothesized today.

IV. INTRODUCCIÓN

Los episodios de memoria quedan registrados en cambios a largo plazo dentro de la configuración de las redes neuronales del sistema nervioso central. Son las mismas estructuras las que se encargan de diversas funciones fisiológicas y metabólicas, pero también en otras relacionadas con el comportamiento, la respuesta al estrés y la orientación espacial.

Realizamos este trabajo con objetivo de integrar toda la información clave del funcionamiento de estos procesos para poner de manifiesto el papel del neuropéptido relaxina-3, miembro de la superfamilia de las insulinas y relaxinas. En la revisión bibliográfica se ha detallado la distribución específica del neuropéptido en diferentes regiones cerebrales como substrato de una amplia variedad de funciones. Sin embargo, todavía no ha sido hallada en una zona del sistema nervioso central clave en el desarrollo de memorias explícitas y memoria espacial: la corteza entorrinal. Es por ello que nos disponemos en este estudio a testar su inmunorreactividad en esta zona en base a la hipótesis de que el resultado será positivo. El objetivo de tal cuestión será entablar una relación más profunda entre esta molécula y las diversas funciones que se le asocian, de forma que se subrayaría a favor la sospecha de su implicación en los circuitos neuronales relacionados con funciones tanto fisiológicas como psicológicas.

• MEMORIA Y COMPORTAMIENTO

La memoria se produce mediante un sistema de almacenamiento que requiere un elevado grado de complejidad por dos motivos. Además, es necesario tanto para la supervivencia como para el aprendizaje otorgar a cada evento una relevancia suficiente como para que la información deba ser almacenada. Algunos aspectos de esta información quedarán en un circuito más centralizado durante un tiempo corto, mientras que otros llegarán a la corteza y serán almacenados a largo plazo. Es decir, los aprendizajes menos relevantes para el individuo se van olvidando; se estratifica el almacenamiento de los eventos con objetivo de optimizar el sistema. De esta forma el individuo es capaz de conservar en su memoria o no los eventos que van sucediendo en su vida.

Relaxina 3 es un neuropéptido de la superfamilia de las insulinas que ha sido relacionado con aspectos de la memoria y el estrés, se produce en el núcleo incertus u se libera en múltiples sitios del SNC incluyendo el hipocampo y la amígdala. Si bien existen algunas evidencias de que está presente también en el cortex entorrinal, la distribución de fibras en esta área no se ha estudiado con profundidad. Por lo tanto, en este trabajo trataremos de confirmar si la corteza entorrinal recibe proyecciones que contiene relaxina – 3 y en qué medida se ve implicada en su circuito. Empezaremos por hablar del nucleus incertus, clave en todos los procesos previamente mencionados, para después ir construyendo los circuitos importantes y sus distintas partes. A continuación se detallarán algunos aspectos del proceso de memoria y los circuitos septo hipocampal y entorrinal-hipocampo que intervienen en el proceso. Finalmente, se describirán los aspectos mas reseñables de la corteza entorrinal.

1. NUCLEUS INCERTUS Y CONEXIONES

1.1 – Estructura anatómica y localización del Nucleus Incertus

El Nucleus Incertus (NI) se encuentra en la región caudoventral de la sustancia gris periventricular pontina. Este núcleo se localiza en el suelo del cuarto ventrículo adyacente a la rodilla del nervio facial en el cerebro de la rata (*Olucha Bordonau et al 2018*). En rata Wistar el NI constituye un grupo celular compuesto por células de tamaño medio y multipolares que se encuentran caudales al núcleo dorsal del raphe y dorsales al fascículo longitudinal medial cuando (*Wyss et al, 1979*). Tienen a orientarse a lo largo del eje horizontal (mediolateral) del núcleo. Existe además un grupo de neuronas, menos organizada, que se extiende lateralmente desde el NI y consiste en una diferenciación que se denomina pars dissipata del núcleo (NId). Está cerca del borde ventromedial del extremo caudal del núcleo tegmental dorsal. La otra parte del NI consiste en la pars compacta, (NIc), que está yuxtapuesta a la sustancia gris caudoventral pontina central. En la dimensión rostrocaudal se extiende desde el polo caudal del núcleo dorsal del rafe al final caudal de la sustancia gris periventricular pontina.

1.2 – Funciones del Nucleus Incertus

El NI contiene una alta concentración del receptor de la hormona liberadora de corticotropina (CRH receptor). Este hecho lo relaciona con las acciones extrapituitarias del péptido en base a la respuesta al estrés y sus funciones autonómicas. Además, las conexiones amplias sobre diferentes regiones le permiten participar en la modulación de distintos comportamientos y ha sido relacionado con desórdenes psiquiátricos como por ejemplo síndromes depresivos.

En estudios de inmunorreactividad se ha descrito las neuronas del NI expresan la enzima sintetizadora de GABA, la glutamato descarboxilasa (*Olucha – Bordonau et al 2003*) y un alto porcentaje de ellas relaxina – 3 (*Ma et al, 2007*), además de otros múltiples péptidos como colecistoquinina y neurotensina.

Más allá de eso ha sido estudiado que las fibras gabaérgicas que contienen CRF-R1 coexpresan a su vez relaxina – 3, a pesar de que su distribución precisa no está clara (*Andrew L. Gundlach et al 2013*). En ese artículo por primera vez se usan métodos tanto in vivo como in Vitro que demuestran una población de relaxina – 3 del nucleus incertus que son activadas por CRF mediante el receptor postsináptico CRF-R1, y otra

población, que no produce relaxina 3, es inhibida por el mismo sistema. Es decir, el CRF tiene un efecto directo en las neuronas del nucleus incertus que contienen relaxina – 3 y expresan su receptor. De hecho, todas las neuronas de relaxina – 3 expresan el receptor del CRF (CRF-R1), pero sin embargo no todas las fibras que expresan ese receptor contienen relaxina – 3. En este artículo, además se subraya la función de la relaxina – 3 en el ritmo theta hipocampal que explicaremos en el siguiente apartado. Además, se ha visto que las ratas sometidas a estrés mostraban un incremento de la relaxina – 3 y que esto era reducido al inyectar el antagonista del CRF1, la antalarmina (*Olucha Bordonau 2018*).

1.3 – Aferencias y Eferencias del Nucleus Incertus

The Journal Of Comparative Neurology nos ofrece un artículo de Goto, Swanson y Canteras, (*M. Goto et al. Connections Of The Nucleus Incertus, 2001*), que mediante el uso de la toxina B del cólera como marcador retrógrado y leucoaglutinina de Phaseolus como trazador anterógrado en la rata Wistar, clarifica las aferencias y eferencias entre el Nucleus Incertus y el resto del cerebro.

En este trabajo se propone que el nucleus incertus trabaja como un centro de comunicación. Recibe y emite proyecciones de forma que participa en un gran número de circuitos cerebrales quedando así como un regulador de emisiones y recepciones dentro de varios sistemas. A nivel telencefálico se proyecta con el área prelímbica, el giro cingulado anterior, áreas orbitales de la corteza y también al septum. A nivel diencefálico, intercambia fibras tanto al tálamo como al hipotálamo. También existe una cápsula densa de fibras que proyecta al área pontina central gris del núcleo dorsal del rafe del cuál surge a su vez una extensa red de fibras que vuelven al nucleus incertus. Es, por tanto, un punto centralita en el cerebro por el que transcurren diversas proyecciones y se ha demostrado que conforman sistemas relacionados con el comportamiento y con desórdenes psiquiátricos.

2. CIRCUITO PONTO – SEPTO – HIPOCAMPAL

2.1 – Introducción

La funcionalidad de los circuitos que generan memoria en el hipocampo está determinada por la modulación de circuitos subcorticales con origen en el septum medial que determinan la generación del ritmo theta hipocámpico que posibilita el proceso de almacenamiento (Vertes y Kocsis 1979).

2.2 – El circuito; sus componentes y las fibras que los conectan

La generación del ritmo theta se inicia en la zona reticular oral pontina (RPO) (Nuñez et al. 2006). En este estudio se observó que la lesión del NI eliminaba el ritmo theta que se obtenía por estimulación eléctrica del RPO. La formación reticular es una estructura de la parte pontina del tronco del encéfalo cuya función consiste en controlar los ritmos circadianos de sueño y vigilia.

El circuito septo – hipocampal sirve de modulador del ritmo theta, lo cuál ha sido comprobado mediante experimentación; el bloqueo de las fibras gabaérgicas que emite hacia el septum medial suprimen la generación de theta por parte de la sustancia reticular pontina oral, mientras que la estimulación eléctrica del nucleus incertus induce el ritmo, (*Craig M. Smith 2011*). En definitiva, la estimulación eléctrica del nucleus incertus potencia las oscilaciones theta de la zona CA1 hipocampal. Lo cual sugiere que el septum medial constituye una especie de marcapasos del circuito; el que recibe aferencias desde el origen de la inducción del ritmo theta y el que filtra su paso hacia el sistema septum – hipocampal. Esto demuestra que el fenómeno se inicia en la zona pontina pero su transmisión es regulada por el nucleus incertus.

Las funciones del septum medial se encuentran ligadas al comportamiento, a la atención y a la memoria espacial (Givens and Olton 1990; Osborne 1994; Sweeney et al 1992). Está caracterizado por tener una estructura en forma de hojas de cebolla (*onion – like structure*) y se compone de cinco tipos de células según su inmunorreactividad; parvalbúmina, calretinina, calbindina, acetilcolina transferasa y óxido nítrico sintetasa. La parvalbúmina (PVB), calretinina (CR) y la calbindina (CB) son proteínas ligadoras de calcio que se expresan en neuronas gabaérgicas. El septum recibe del nucleus incertus fibras colinérgicas y gabaérgicas que lo estimulan y a su vez proyecta fibras en su mayoría gabaérgicas y también colinérgicas, hacia la zona CA1 del hipocampo. (*B. Wei et al Z Yang*).

2.3 – Las ondas theta

La oscilación theta en el hipocampo es una onda sincrónica de baja frecuencia (4-12 Hz) que aparece durante la exploración espacial indicando que el circuito podría generar información de memoria. Estas oscilaciones han sido detectadas en relación a múltiples funciones como la consolidación de la memoria, el comportamiento, el control de la ansiedad y de las emociones y la respuesta al estrés.

Estas ondas conforman trenes de ondas sincrónicas sinusoidales conocidas como los ritmos theta – límbicos y es una característica de primer orden de importancia respecto a las propiedades del hipocampo de los mamíferos. Se registra con macroelectrodos en un electroencefalograma y consiste en un fenómeno encefálico global compuesto por la cooperación de un gran número de células de la formación septo – hipocampal y gran parte de las estructuras anatómicas que comparten proyecciones con éste. El flujo de iones generado debido a las sinapsis sucesivas del circuito genera la actividad eléctrica resultante como estas ondas llamadas Ondas Theta. En cada pico de esta onda se puede registrar, a su vez, una oscilación de mayor frecuencia que denominamos ondas gamma.

Las ondas theta surgen de la región reticular pontina oral (RPO) y llegan al nucleus incertus. Mediante fibras gabaérgicas, el nucleus incertus reenvía la información al septum , el cuál yace intrínseco en una formación septohipocampal. Desde la capa de células granulares en la circunvolución dentada y desde la capa de células piramidales en la capa CA1 del hipocampo a raíz de las sinapsis con el septum se vuelve a lanzar el impulso. Estas células disparan en sincronía y se van activando unas a otras desde el nucleus incertus hasta la formación hipocampal, a raíz de la recibida por otros núcleos como el hipotálamo, el núcleo del rafe, la zona supramamilar y la interpeduncular. En definitiva, las ondas se originan en la RPO y llegan hasta el hipocampo pasando por diversidad de estructuras, que se proyectan entre sí de forma recíproca y reemiten a cada estación el disparo theta como si de un sistema de relevos se tratase.

3. CORTEZA ENTORRINAL

Es en el siglo XX cuando Ramón y Cajal describe por primera vez la corteza entorrinal, denominándola “el ganglio del cortex esfenoidal/angular”. Ya por aquel entonces se le consideró de gran importancia respecto a su relación con el hipocampo y hoy en día es considerado el punto nodal entre éste y la corteza cerebral: se le considera la mayor estructura de aferencias y eferencias de la formación hipocampal hacia el telencéfalo.

La corteza entorrinal se divide funcionalmente en dos componentes: la lateral, (LEC), y la medial (MEC) (*Menno P. Witter ... ad Shinya Ohara*). Se ha visto que cada una de ellas proyecta a diferentes partes de la corteza lo cuál sugiere una diferencia asimismo en sus funciones. Mientras que la corteza entorrinal lateral (LEC) se conecta con el área olfatoria, la insular, la medial y orbitofrontal, y la perirhinal, la corteza entorrinal medial (MEC) mantiene sus interacciones con el presubiculum, parasubiculum, corteza retrosplenial y postrhinal. Esto sugiere la posibilidad de que la corteza entorrinal sea algo más que una estructura de conexión con la formación hipocampal. Hace parte del ritmo theta hipocampal y contiene en su parte medial las grid cells, las head direction cells, y las border cells, que permiten el circuito de la memoria espacial que explicamos en el siguiente apartado.

Hoy en día es considerada el nodo entre el hipocampo y diferentes áreas corticales, tanto como para traspasar la información de la corteza hacia el sistema límbico como en sentido inverso. Además, se ve envuelta en numerosas funciones relacionadas con el metabolismo, el comportamiento y la memoria espacial. Pero además también resulta un lugar de interés clínico – experimental pues se ha detectado lesionada en la enfermedades neuropsiquiátricas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (*Umegaki et al., 2000a; Magri et al 2006*).

Sin embargo, lo que todavía no se había investigado hasta la fecha es si la corteza entorrinal de la rata recibe proyecciones que contienen relaxina – 3. Sin embargo, el sistema RLN3/RXFP3 (su receptor), sí había sido estudiado en el cerebro del Macaco Fascicularis (*Ma S, Sang Q, Lanciego JL, Gundlach AL*) inmunoreactividad frente a RLN3 en diversas zonas cerebrales que coinciden con las de rata, pero también en la corteza entorrinal. Existe una alta probabilidad de encontrar una inmunorreactividad positiva de esta sustancia en la corteza entorrinal de la rata, (en nuestro caso, Wistar) y esta será la cuestión fundamental de nuestro trabajo.

4. CIRCUITO DE MEMORIA ESPACIAL

Este ritmo theta está relacionado con varias funciones del sistema nervioso; entre ellas la generación de la orientación y de la memoria espacial. El circuito cortical para la representación espacial tiene varios componentes, cada uno programado para registrar una característica específica.

Por un lado, existen las place cells que se encuentran en la capa CA1 del hipocampo y almacenan las características de cada lugar. Se encargan de construir un plano ortogonal del entorno: conforme el animal avanza y el medio cambia, van disparando potenciales de forma que con un registro de cuáles se activan según en qué lugar se encuentre el animal se puede llegar a reconstruir un mapa del recorrido que éste ha realizado. Estas células emiten un impulso excitatorio a la corteza entorrinal medial (MEC), donde se encuentran las grid cells, las head direction cells, y las border cells. Si bien es cierto que existe controversia respecto a la especificidad de la relación célula – lugar, se ha visto que las neuronas del MEC sí tienen selectividad espacial mientras que las hipocámpales de CA1 responden tan sólo a una característica. Las neuronas del MEC son capaces de convertir el entorno en un mosaico en el que las diferentes estructuras quedarán de forma prácticamente perfecta en una rejilla hexagonal. Entre pocas grid cells, mediante coordenadas x e y, son capaces de reestructurar la concepción del entorno. Las grid cells se encuentran en toda la superficie de esta corteza pero son más abundantes conforme más nos acercamos a la zona medial y a su vez, vuelven a proyectar al hipocampo, generando una cohesión de la información recogida a lo largo del circuito. Es mediante estas células que un animal es capaz de reconocer un entorno, comprender sus límites, analizar sus características, y desplazarse por él.

5. NEUROFISIOLOGÍA DE LA RELAXINA 3 Y SU RECEPTOR

5.1 - Fisiología

La relaxina 3 es un neuropéptido abundante en el sistema nervioso central con una distribución topográfica distintiva. El cerebro es la zona anatómica dónde se ha encontrado la concentración más alta en la rata (*Burazin et al., 2002; Tanaka et al., 2005*) y en otras especies. Estudios de inmunoreactividad demuestran que relaxina 3 es conservada en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi del soma, y se almacena dentro de vesículas densas en la sinapsis de nervios terminales. De esta forma es capaz de proceder a realizar su acción como transmisor y modulador de los circuitos neuronales en los que se haya implicada. Los diferentes estudios anatómicos y farmacológicos mantienen que la relaxina 3 se ve implicada en la modulación del estrés, ansiedad, conductas motivacionales, apetito, homeostasis metabólica, sueño y ritmos circadianos, aprendizaje y memoria, (*Sherie Ma; Andrew L Gundlach*).

5.2 – Estructura.

Relaxina 3 es un péptido de 5kDa con dos cadenas, subunidades denominadas A y B, y tres puentes disulfuro. Esta molécula es miembro de una superfamilia de péptidos de insulinas y al igual que éstas, contiene un péptido C que es retirado mediante una proteólisis. Esta familia tiene en su estructura la cadena B, cuya secuencia es característica: “RXXXRXX(I/V)”, y codifica la zona de unión a los receptores afines. A nivel estructural la relaxina también difiere de las insulinas. A nivel metabólico, la relaxina se considera una hormona implicada en el crecimiento y en el remodelado de tejidos durante el embarazo. Es más, la relaxina fue identificada como un ligando de los receptores LGR7 y LGR8, los cuales guardan un parecido significativo con el receptor de la LH y con el de TSH, sistemas endocrinos directamente implicados en estos procesos, (*Timoty W. Lovenberg et al*).

5.3 – Distribución

La relaxina – 3 se sintetiza en el nucleus incertusaunque también hay pequeños acúmulos de células relaxin3 positivas en la parte lateral de la subxtantia nigra, parte ventral de la sustancia gris del acueducto y rafe pontino. (*M.Smith, Gundlach 2011*). Mediante estudios de inmunorreactividad se demostró un alto nivel de expresión en el septum medial dentro del cerebro anterior, en fibras que después proyectaban a la zona septohipocampal. Respecto al septum, en su parte más rostral, entre la segunda y

tercera capa de células se puede encontrar mRNA de RXFP3, siendo la segunda capa de acetil colina y la tercera de óxido nítrico. Pero sobre todo se encontró una coexpresión significativa de RXFP3 por neuronas GABA. En la parte media – dorsal del septum medial encontramos inmunorreactividad a parvalbúmina, lo cuál indica células gabaérgicas, y también un nivel importante de RXFP3 en la segunda capa (*Albert Gascó et al, 2018*).

5.4 – Neuroquímica

La distribución pontina de la relaxina – 3 guarda una notable similitud con la de las células GABAérgicas del nucleus incertus (Goto et al.,2001; Olucha – Bordonau et al., 2003), sugiriéndose así como un neuromarcador adecuado en este núcleo. Inmunohistoquímicas dobles confirmaron esta teoría; existe una co – expresión de relaxina – 3 y de la enzima sintetizadora de GABA en estas fibras (*Ford et al., 1995; Olucha – Bordonau et al., 2003*). Además, muchos otros neurotransmisores que se observan en el nucleus incertus como la neuromedina B, colecistoquinina, y acetilcolina también coinciden con esta distribución. Pero más allá de esto, la calbindina y calretinina (*Paxinos et al., 1999*), proteínas ligadoras de calcio específicas de las fibras gabaérgicas, así como la parvalbúmina, están en estas neuronas y servirán en nuestro estudio junto con la sinaptofisina para demostrar la existencia de la relaxina en la corteza entorrinal.

5.5 – Receptor

El receptor de relaxina 3 es el RXFP3, relaxina-family peptide 3 receptor, también conocido como GPCR135, (*Timoty W. Lovenberg et al*). Es un receptor acoplado a proteína Gi/o y su activación produce la inhibición de la acumulación de cAMP intracelular y la activación de ERK1/2. Por otro lado, existen diferentes tipos de este receptor pero es en el RXFP3 el que nos interesa. RXFP4 está ampliamente codificado en el tracto gastrointestinal y ausente en el cerebro. La distribución de RXFP1 en el cerebro es amplia pero no corresponde con las zonas dónde se expresa la relaxina. Sin embargo, sí existe una alta superposición entre la distribución de las fibras positivas para relaxina 3 y el RXFP3 tanto en el cerebro de la rata, del ratón y del macaco. Se ha demostrado que la relaxina 3 es el ligando de todos estos receptores en diferentes zonas anatómicas, pero es el único miembro de la superfamilia de las insulinas que puede activar al RXFP3 así que su especificidad con él se acepta como realidad biológica.

5.6 – Relación topográfica de la relaxina-3 y su receptor RXFP3

RXFP3 se encuentra de forma abundante en el hipotálamo, y también en el núcleo paraventricular, núcleo supraóptico, en el córtex, en septum y el área preóptica aunque en menos cantidad. En la literatura podemos encontrar experimentos que evidencian mediante hibridación in situ y radioligandos un patrón de distribución del RXFP3 que coincide significativamente con el de la relaxina 3 (*Timoty W. Lovenberg et al.*). Estas zonas son: preoptica, periventricular, hipotálamo lateral, hipocampo, y varios nodos importantes del circuito septohipocampal previamente explicado como el núcleo mediano del rafe, y los núcleos interpeduncular y supramamilar así como el culículo superior y la zona gris periacueductal hasta la amígdala. Pero por otro lado, hay zonas del cerebro donde no coincide la distribución como por ejemplo el giro cingulado cortical. Pero si el receptor está expresado tendrá que tener alguna utilidad que abre nuevas iniciativas en investigación, (*Craig M. Smith; Andrew L. Gundlach 2011*).

5.7 – Funciones biológicas

5.7.1 – Metabolismo e ingesta

Está comprobada la relación de relaxina 3/RXFP3 con funciones metabólicas como el aumento de apetito y de la ingesta. Esto fue sugerido por un estudio que demostró un aumento de ingesta y por consecuencia del peso de la rata al inyectar la relaxina en el hipotálamo (*McGowan et al 2005, 2006, 2007; Hida et al., 2006*). Se demostró mediante la infusión de un agonista del RXFP3 en el núcleo paraventricular del hipotálamo un aumento crónico de la ingesta, y sucedía lo opuesto al infundir un antagonista, (*McGowan et al., 2005; Juei et al., 2007*). Un experimento similar fue realizado al profundir el agonista del RXFP3 durante dos semanas en forma de infusión continua en el núcleo paraventricular, supraóptico y arqueado (*McGowan et al.x 2007*) demostrando no sólo un aumento de la ingesta sino también una elevación de insulina y leptina en plasma. Es por tanto una característica más de la relaxina-3: su poder orexígeno.

5.7.2 – Estrés y ansiedad

Las inyecciones de relaxina-3 en el núcleo paraventricular del hipotálamo revelaron un aumento significativo en plasma de ACTH, corticoesterona y prolactina (*Tanaka et al., 2005; Banerjee et al., 2010*), dando lugar a la conclusión de que la relaxina-3 es capaz de modular la respuesta al estrés. Es más, la inyección intraventricular de un agonista del RXFP3 tiene un efecto ansiolítico en base al estado emocional previo del

ratón (*Olucha Bordonau, et al 2018*), y varios experimentos demostraron que la ansiedad no está sujeta de forma contundente al sistema de la relaxina – 3.

5.7.3 – Ritmos circadianos

Se ha visto que la expresión de relaxina-3 varía según la hora de un ritmo circadiano; existe un pico al caer la noche y una bajada al comenzar la luz del día, lo cuál sugiere una correlación con la inducción al sueño. Se ha demostrado (*Dugovic et al., 2010*), mediante la infusión intraventricular de un antagonista del RXFP3 que se prolongaba la fase REM 6 horas después de la administración. Ya que una señalización aumentada de la relaxina – 3 en el septum medial provoca un ritmo theta, y que este dato nos hace pensar en que la relaxina – 3 puede estimular o impedir el ritmo theta del hipocampo que induce al sueño.

Además, quedan vistas sus funciones reguladoras en el eje hipotálamos – hipofisario – suprarrenal de las hormonas del estrés, las cuales también se ven implicadas en el despertar mediante el pico de cortisol matutino de las 8h00 de la mañana, (*Umegaki et al 2008*). Esto resulta interesante a nivel clínico, pues estas funciones se ven relacionadas con la corteza entorrinal y el hipocampo en la enfermedad del Alzheimer (*Magri et al 2006, Umegaki et al 2000a*).

5.7.4 – Motivación y recompensa

Existe una vía mesolímbica dopaminérgica entre el núcleo mamilar y el núcleo accumbens, mediada por la dopamina, que está relacionada con la motivación y la actitud (*Nestler and Carlezon 2006; Ikemoto 2010*). Estudios mediante la señalización de relaxina – 3 y RXFP3 demostraron que esta sustancia se ve implicada en el sistema por la reacción del animal (la rata) respecto a conseguir más o menos comida.

5.7.5 – Otros

Esta molécula también se relacionada con el tiroides, las gónadas, y los ejes hipotalámicos – hipofisarios que implican. Por último, la relaxina ha demostrado además de todo esto tener potencial terapéutico como anti – fibrótico y como protector cardiaco. Puede considerarse por tanto un factor protector cardiovascular.

6. LA RELAXINA 3 EN EL CIRCUITO SEPTOHIPOCAMPAL

- **Un nuevo modulador telencefálico**

La topografía de la relaxina – 3 coincidía con la distribución de las diferentes partes de estos circuitos y por ello se comenzó a plantear la posibilidad de su participación en estos. Fueron desde entonces muchos los estudios que demostraron la participación de la relaxina – 3 en la respuesta al estrés, el metabolismo y la alimentación, en el control de vigilia y sueño, la motivación, y lo que nos es más relevante todavía: el ritmo theta dependiente septo – hipocampal.

Sin embargo, lo que todavía no había sido determinado es la relación de la relaxina – 3 con la corteza entorrinal. Siendo la corteza entorrinal un componente clave que media información entre la corteza periférica y el sistema límbico, su inmunorreactividad con la relaxina – 3 reforzaría notablemente tanto la función de esta zona del cerebro como la implicación de nuestra proteína en este sistema cerebral.

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el presente estudio se plantea la hipótesis de que existe una importante inervación de relaxina 3 sobre la corteza entorrinal que podría modular el flujo de información entre el neocortex y el hipocampo y viceversa. La posible distribución diferencial de fibras en las distintas capas de la corteza entorrinal podría guardar relación con este flujo de información.

Se plantean los siguientes objetivos para resolver esta hipótesis.

- Determinar la existencia de fibras relaxin3 positivas en las distintas subregiones de la corteza entorrinal
- Determinar si estas fibras contienen sinaptofisina, lo que indicaría que no se trata meramente de fibras de paso sino que tienen su diana en el área entorrinal
- Determinar la posibilidad de contactos con tipos neuronales específicos de la corteza entorrinal como proteínas ligadoras de calcio, indicadoras de mecanismos interneuronales dentro de la corteza entorrinal. Mediante el microscopio confocal y el software Fiji buscaremos los contactos entre estas fibras. De ser así, nos acercáramos más a la idea de que la relaxina – 3 sea un modulador telencefálico del circuito de septo – hipocampal, además de subrayar la implicación de la corteza entorrinal en estos procesos.

II. MATERIALES Y METODOS

1) ANIMAL

El tipo de animal escogido fue la rata Wistar (Jackson Laboratory), obtenida desde el Servicio de Experimentación Animal de la Universitat Jaume I. Se usaron cortes de cerebros de este animal que yacían previamente almacenados como controles en los stocks del laboratorio. Fueron perfundidos con PFA y después sometidos al crioprotector compuesto de PBS con sacarosa al 30% y conservados a -80°C . Este animal había sido ya entonces tratado de acuerdo al European Community Council Directive (EEC/86/609) y estaban aprobados los protocolos respecto al Comité de Ética de la Universitat Jaume I, siendo prioritaria la minimización en daño y distrés hacia el animal. Se seleccionaron estos cerebros debido a su buen estado de conservación y por ser controles. Se extrajeron los cortes necesarios para realizar las pruebas pertinentes.

2) PREPARACIÓN DEL TEJIDO:

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de solución de nembutal 120 mgr/Kg (dolethal) y se perfundió rápidamente vía transcardiaca con una solución gélida de 150 ml de NaCl al 0'9%, seguido de 400 ml de PFA al 4% en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4. Los cerebros se extrajeron y se depositaron en sacarosa al 30% en tampón fosfato salino 0.01 M pH 7.4 durante 2-3 días a 4°C . Tras lo cual se cortaron en secciones coronales (40 μm) en micrótopo de congelación (Leica).

Se prepara una placa de Petri con PBS y se vierten los cortes para poder seleccionar los que nos interesan. Estos son aquellos en los que podamos apreciar a simple vista el final del hipocampo ventral, pues es lateralmente donde se encuentra la corteza entorrinal que es la que nos interesa. Con la ayuda de un instrumento flexible y de punta roma, por ejemplo un pincel, vamos apartando los cortes que nos interesan y los transpasamos a un vial de 5 mL con PBS.

3) MICROSCOPIO CONFOCAL

Para visualizar los cortes obtenidos procesados por las diferentes inmunohistoquímicas usamos el microscopio confocal Leica DMi8 con microscopio invertido (Leica Microsystems) a 0,3 μm de intervalo por stacks. El mapa de la distribución del antígeno se forma mediante la cámara lúcida la cual se conecta al microscopio. En un principio se obtienen imágenes al 40x y 60x de aumento para obtener diferentes grados de precisión, aunque para la cuantificación oficial se usará el de 60x con objetivo de ser más exactos, dejando el 40x únicamente a título informativo de forma cualitativa. Estas imágenes son escaneadas y reducidas a la talla necesaria para la reproducción en pantalla.

El mecanismo de esto consiste en la estimulación con fotones mediante un láser a diferentes longitudes de onda. De esta forma, la pérdida de electrones resultante provoca la emisión de fluorescencia. Cada molécula requiere una longitud diferente y por tanto se le distingue por el color asociado a esta. Utilizamos el láser confocal scan unit TCS-SP8 equipado con un emisor de helio-neon laser, conectado al microscopio invertido DMIRB (Leica Microsystems). Éste fue utilizado para analizar la inmunofluorescencia.

4) SOFTWARE FIJI IMAGE J

Para la cuantificación de los contactos se usó el software ImageJ (National Institutes of Health). Este programa fue el usado para la cuantificación de los contactos entre relaxina y sinaptofisina, parvalbúmina, calbindina y carretinina. Se usa un canal para la relaxina que se elige marcar en verde y otro para el segundo reactivo que se elige marcar en rojo. Una vez esto se ha prefijado, se unifican las dos imágenes y se comienza a buscar los contactos en cada stack, representados como z. Al encontrar los contactos se marcan con la opción Cell Counter, que a su vez permite dejarlos fijos aunque se cambie de z de forma que no sea varias veces contado un mismo contacto conforme se avanza en los stacks.

Se consideraron contactos para la sinaptofisina cuando la fusión del rojo y el verde quedaba en amarillo, y para las proteínas de calcio cuando el rojo y el verde quedaban objetivamente colindantes a lo largo de varios stacks.

5) INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

5.1) INFORMACIÓN GENERAL

Una vez tenemos los cortes preparados, vertimos el vial con las muestras elegidas en una cesta que luego se irá introduciendo en los pocillos para lavar.

El lavado (de forma general) siempre consiste en un proceso de 30 minutos dividido en tres periodos de 10 minutos en 0.01 PBS (Phosphate Buffer Saline), a un pH de 7.4 al 0.9% de NaCl. Para ello usamos un recipiente de plástico compuesto por seis pocillos (3x2) usando a cada tiempo uno diferente y cuidando que no queden gotas del pocillo anterior antes de pasar al siguiente. De esta forma, nos aseguramos que el tejido está sin partículas residuales de procesos anteriores que puedan alterar nuestro experimento. Lo dejamos en el shaker para conseguir que los cortes se laven bien al agitarse. Esto lo utilizaremos asimismo en cada incubación para permitir que los reactivos se repartan adecuadamente y penetren con seguridad en el tejido, y evitar que la diferencia de densidades los separe estáticamente de los cortes.

Los cortes previamente preparados y conservados en PBS deben ser primero procesados de forma que se elimine del campo de acción de los antígenos que nos interesan todos aquellos anticuerpos que sean inespecíficos, comunes entre varias especies, o que no supongan una relevancia para nuestro estudio.

El BSA es el suero de albúmina bovina. Al ser una proteína pequeña, estable y poco reactiva se usa como bloqueador. Sirve para ocupar sitios de unión inespecíficos de forma que aumente la posibilidad de que se unan los anticuerpos preparados se unan a los antígenos de interés. Es decir, el BSA cubrirá toda la superficie y se adherirá a todas las proteínas para que después los reactivos importantes puedan tener un anclaje a estas. De esta forma aumenta la sensibilidad y disminuye el ruido de fondo una vez se saca la imagen. El NGS, es Normal Goat Serum, un anticuerpo policlonal que se usa como agente bloqueante o control negativo para evitar una adhesión errónea de los reactivos que queremos usar a otros componentes celulares que no nos interesan. Consiste en un tampón de bloqueo común que se unirá a sitios inespecíficos. El PBS-Tx a su vez, (Phosphate Buffer Saline- tritón) consiste en el suero habitual de conservación junto con el tritón, el cuál es capaz de romper las membranas celulares lo cuál facilitará la penetración de los antígenos al citoplasma, donde se encuentran las moléculas que nos interesan. Entre el NGS, el BSA y el PBS-Tx, conseguiremos un tejido preparado para recibir los reactivos necesarios y así fijarlos a las sustancias de interés.

5.2) INMUNOHISTOQUÍMICA PARA RELAXINA

Se lava el tejido tres veces durante 10 minutos en tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M a pH 7,4 conteniendo tritón.

Se recogen los cortes y se incuban durante 30 minutos en un solución con PBS-Tx (PBS 0,3% y triton X-100) 2% de suero de albúmina bovina (BSA) y 4% de normal goat serum (NGS). Se lavarán las secciones con PBS-Tx durante 30 minutos en 3 lavados de 10 minutos. Se dejará a 4°C durante la noche con el primer anticuerpo: 1:8 mouse anti – relaxina 3.

Al día siguiente se lavará con PBS-Tx y se incubarán los cortes con anticuerpo biotinilado secundario (goat anti-mouse IgG) durante 2 horas a temperatura normal. Volverán a lavarse con PBS-Tx durante media hora y después se incubarán las secciones con el complejo ABC durante una hora y se volverá a lavar con PBS durante 30 minutos. El complejo ABC consiste en avidina – biotina – peroxidasa y es lo que lo hace visible al microscopio.

Tras esto, la inmunorreacción se lavará en Tris buffer solución de pH 8,2 y después se sumerge en 0,025% de 3,3' – diaminobenzidina. Los cortes serán posteriormente deshidratados, aclarados y pasados al porta – objetos.

5.2) INMUNOHISTOQUÍMICA DOBLE: RLN₃ Y PROTEÍNA LIGADORA DE CALCIO

Realizamos un lavado de 30 minutos en 0.01 PBS (Phosphate Buffer Saline), a un pH de 7.4 al 0.9% de NaCl y después lo lavamos 20 minutos en 0.01 M PBS-Tx(0.1%) a pH 7.4 (RT).

Durante este proceso prepararemos la incubación el suero de bloqueo de todo el tejido al 2% de BSA, 4% de NGS en 0.01 M de PBS-Tx con un pH de 7.4. Lo dejamos durante una hora en el RT. Con el tritón romperemos la membrana y con el BSA bloquearemos todas las proteínas para que sean detectables por los siguientes reactivos.

Mientras tanto habremos preparado una incubación en 1:10 mouse antiR₃ en 2% de BSA y 2% NGS en 0.01 M con PBS, antígeno que se unirá a la relaxina – 3.

Por otro lado, en 1:10000 rabbit anti-PLC (proteína ligadora de calcio: CBP (calbindina), Mouse anti-CBP (carretinina) o de mouse anti-PV (parvalbúmina)) que se unirá a las proteínas ligadoras de calcio. Lo dejaremos 24 h en el shaker a temperatura ambiente.

Al día siguiente empezaremos con un lavado en 0.01 M de PBS a pH 7.4 (RT). Después pondremos la muestra a incubar en 1:200 de goat anti Mouse (Jackson)

biotinilado en 0.01 M de PBS-Tx a pH 7.4 y lo dejaremos incubar una hora. Este se comportará como un anticuerpo que se una al Mouse anti R3 previamente incorporado a la reacción.

Después lavaremos durante 30 minutos a 0.01 M de PBS a pH 7.4 (RT) y e incubaremos en la solución ABC (Vector Labs) durante 90 minutos. Esta se compone de 60 yL de A (Avidina), 50 yL de B (biotina), y 2.5 mL de 0.01 M PBS-Tx y consiste en un método de amplificación de la señal para hacerla visible al microscopio. Consiste en un método muy sensible para detectar sustancias con anticuerpos secundarios biotinilados pues la avidina tiene gran avidez por la biotina.

Posteriormente pondremos el nickel – enhanced DAB (DAB-Ni; 10-15 min, RT). Esto es un cromógeno que permite su oxidación mediante la peroxidasa y da lugar a la coloración marrón del tejido. Está compuesto por 25 ml de Tris/HCl a pH de 8.0, 0.5 mL de 5% de sulfato de nickel de amonio, 6.25 mg de DAB (previamente disuelto y enfriado en dH₂O) y 4 yL de H₂O₂ al 30%.

Más tarde lavamos durante 10 minutos en 0.05 M del tampón Tris/HCl a pH 8.0 (RT), 10 minutos en 0.01 M de PBS a pH 7.4 (RT) y lo dejamos finalmente una hora lavándose en ese PBS sin cambiar la cesta del pocillo.

Al segundo día desde el inicio del proceso incubamos en 1:200 de biotina goat anti Rabbit en 0.01 M de PBS-Tx a pH 7.4 (1h, RT), que se unirá al reactivo de las proteínas ligadoras de calcio.

Lavamos durante media hora en 0.01 M de PBS a temperatura ambiente (RT) e incubamos con la solución ABC (Vector Labs, 60-90 min, RT) con 50 yL de A, 50 yL de B, y 2.5 mL de 0.01 M PBS-Tx. Se lava 20 minutos en 0.01 M de PBS y después otros 20 minutos en 0.05 M de Tris/HCl a pH de 7.6. Se incubará en el DAB con la mitad de las medidas de la reacción usadas para goat anti Mouse biotinilado, y volverá a lavarse en el tampón Tris/Hcl y en PBS.

5.3) INMUNOFLUORESCENCIAS DOBLES ENTRE RLN₃ Y PROTEÍNA LIGADORA DE CALCIO (CBP / CR / PVB) O SINAPTOFISINA:

Realizamos un lavado de 30 minutos en 0.01 PBS (Phosphate Buffer Saline), a un pH de 7.4 al 0.9% de NaCl. Durante este proceso prepararemos la incubación el suero de bloqueo de todo el tejido al 2% de BSA, 4% de NGS en 0.01 M de PBS-Tx con un pH de 7.4. Lo dejamos durante una hora en el RT.

Mientras tanto habremos preparado una incubación en 1:5 mouse antiR₃ en 3% de BSA y 3% NGS en 0.01 M con PBS, antígeno que se unirá a la relaxina – 3.

Por otro lado, preparamos la sustancia rabbit anti-PLC (proteína ligadora de calcio: CBP (calbindina), Mouse anti-CBP (carretinina) o de mouse anti-PV (parvalbúmina)), a 1:5000 para Rabbit anti PV-CB y a 1:2500 rabbit anti CR, que se unirá a las proteínas ligadoras de calcio. Lo dejaremos 24 h en el shaker a temperatura ambiente.

Al día siguiente nos encargaremos de los reactivos secundarios, una vez los primeros antígenos ya se han unido a la relaxina y a las proteínas ligadoras de calcio. Empezaremos con un lavado de 30 minutos (3 x 10 min en 0.01 PBS con un pH de 7.4) y añadimos los reactivos fluorescentes. En primer lugar, incubaremos en 1:200 Alexa488 Goat anti-Mouse (Jackson) en 0.01 M PBS-Tx pH 7.4 y lo dejaremos agitándose durante 90 minutos. Este reactivo se unirá al Mouse antiR₃ y permitirá de esta forma detectarla en el microscopio confocal porque emitirá una señal verde. Realizaremos un lavado de 30 minutos para eliminar los excesos.

La segunda incubación será en 1:200 Cy3 Goat Anti Rabbit (Jackson) en 0.01 M PBS.Tx pH 7.4 que dejaremos agitándose durante 90 minutos, para que se una a Rabbit Anti – PLC, para hacer las proteínas fijadoras de calcio detectables en el confocal porque emitirá una señal roja. Realizaremos un lavado de 30 minutos para eliminar los excesos.

En el caso de la sinaptofisina, consiste en el mismo proceso con una relación 1:200 y aparece en la muestra cuando hay un contacto sináptico entre dos fibras neuronales.

III. RESULTADOS

La doble reacción de inmunofluorescencia mediante sinaptofisina y relaxina 3 permite discriminar si el marcaje de fibras de relaxina 3 corresponde a fibras de paso o, efectivamente se trata de fibras que realizan contactos sinápticos en la región estudiada. Efectivamente se observó que algunas de las fibras de relaxina 3 contenían puntos que se correspondían con sinaptofisina. Indicando, por tanto la presencia de sinapsis.

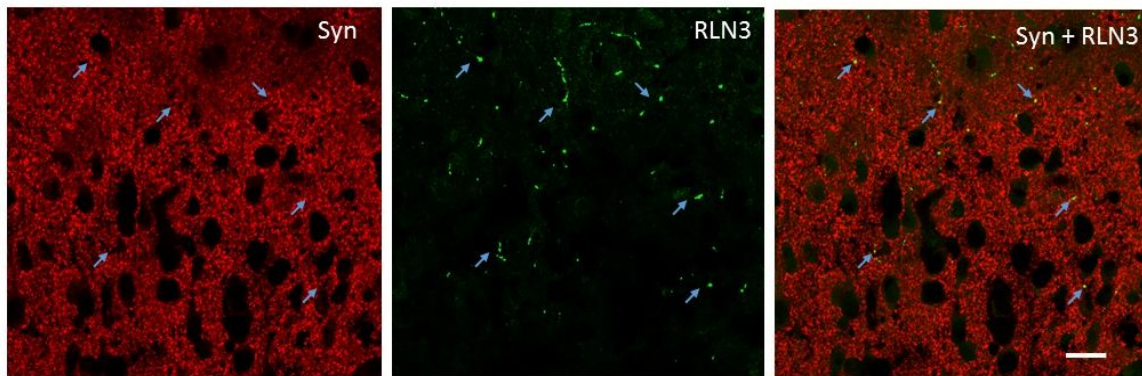
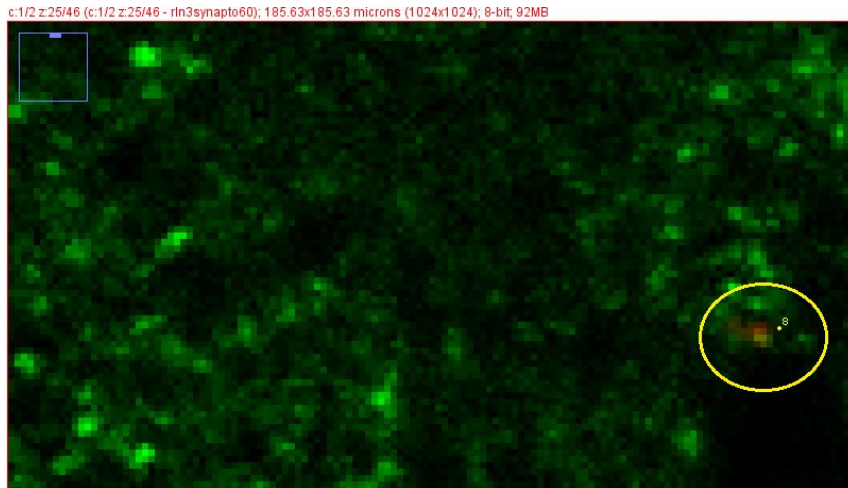


Figura 1.- Capturas de microscopía confocal donde se muestra la presencia de botones doblemente marcados para sinaptofisina (rojo) y para relaxina3 (verde). Las flechas indican los puntos en los que aparece esta co-localización indicando la presencia de sinapsis. Corteza entorrinal lateral. Barra de calibración 20 micras

1. MÉTODO

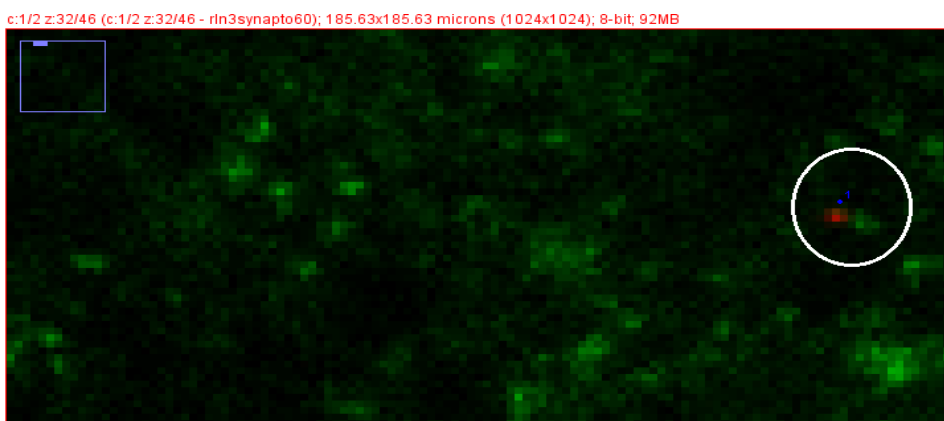
El software Fiji ImageJ es un programa bastante sensible pues en el momento que se aprecia un contacto, es irrefutable. Si aparece en amarillo, podemos estar seguros de que si se trata de sinaptofisina, habrá una sinapsis.

En este corte $Z=25$ en la parte más superior medial de la imagen obtenida del microscopio confocal, podemos apreciar sin duda un contacto: vemos una parte roja, una verde, y una amarilla central que nos indica claramente una sinapsis.



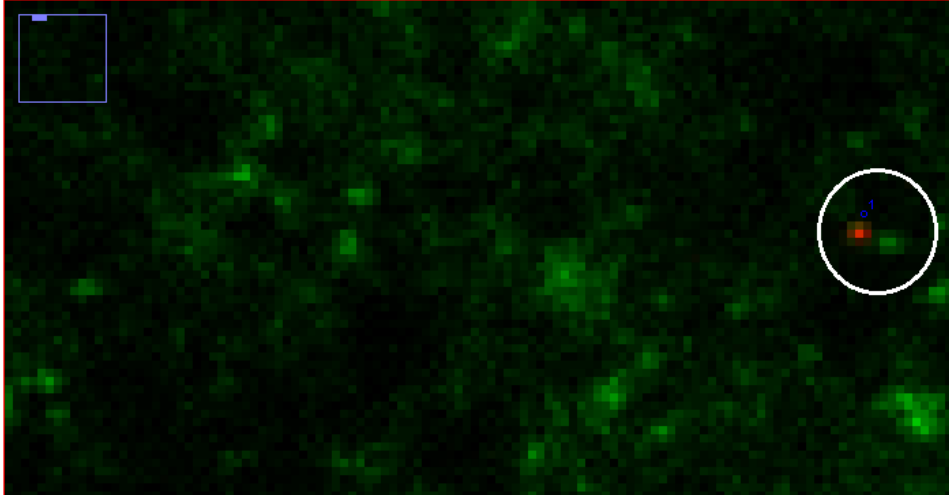
Sin embargo, su especificidad es baja pues a menudo pueden detectarse dos fibras muy cercanas pero no se puede decir con exactitud que formen o no un contacto. Es decir, a lo largo de una sección de Z podemos ver cómo se forma la fibra, pero en ningún momento, desde la proyección cogida, puede asegurarse que sea o no un contacto. Por ejemplo, en las siguientes imágenes tenemos una secuencia de Z

Z=32 – En esta sección podemos considerar que las fibras son independientes



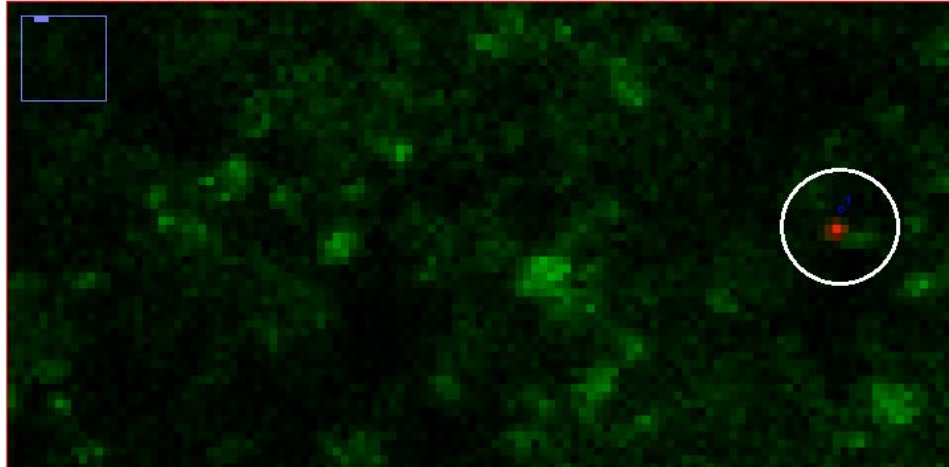
Z=31 – En esta sección sin ninguna duda nos parecerían independientes.

c:1/2 z:31/46 (c:1/2 z:31/46 - rin3synapto60); 185.63x185.63 microns (1024x1024); 8-bit; 92MB



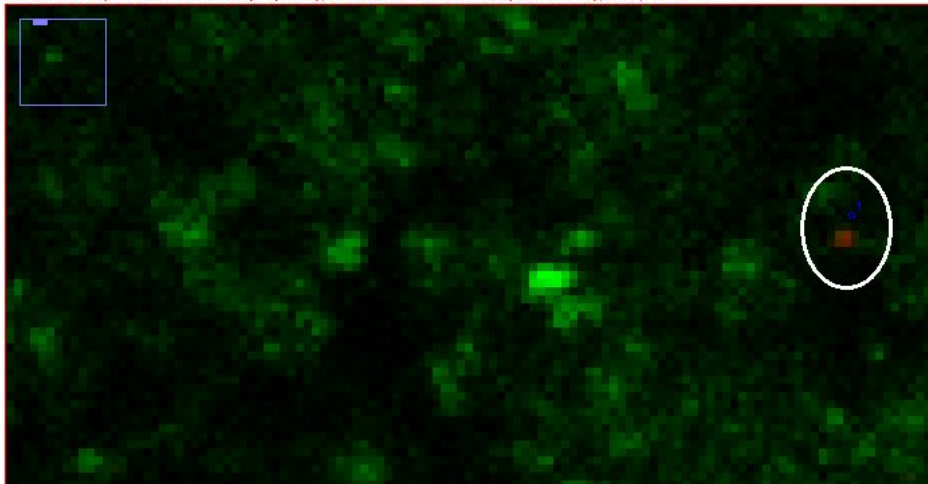
Z=30 – Sin embargo en esta sección surge la duda pues los dos marcajes se encuentran muy juntos

c:1/2 z:30/46 (c:1/2 z:30/46 - rin3synapto60); 185.63x185.63 microns (1024x1024); 8-bit; 92MB



Z=28 – En esta sección sí vemos un solapamiento de los colores, sin embargo no aparece el color amarillo.

c:1/2 z:28/46 (c:1/2 z:28/46 - rin3synapto60); 185.63x185.63 microns (1024x1024); 8-bit; 92MB



En este Z=46 encontramos una zona donde muy posiblemente exista un contacto. Sin embargo no podemos valorarlo pues se encuentra en el último nivel y necesitaríamos más Z para comprobar que en los siguientes las estructuras terminan dando lugar a un color amarillo. Por ello lo marcaremos en azul y no en amarillo y lo dejaremos como un “posible contacto”.

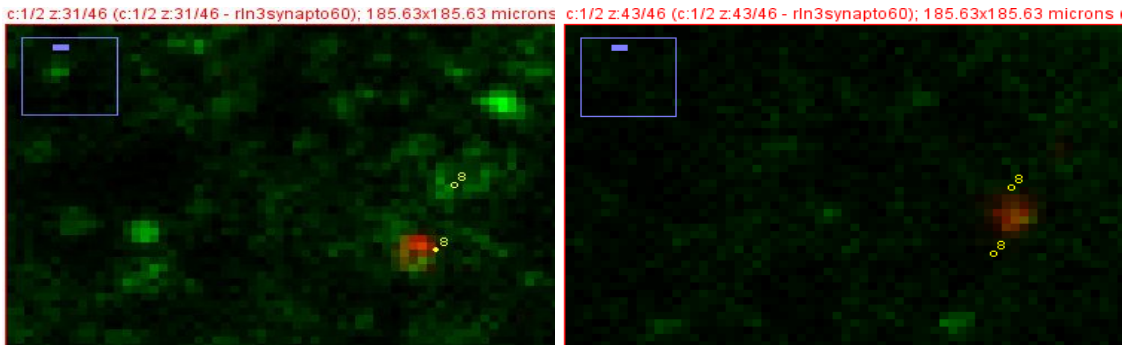


Al tratarse de la sinaptofisina, que indica las sinapsis, no podemos confiar en resultados como muestran estas imágenes pues lo que nos interesa es asegurar las que lo son seguro. Los métodos de experimentación a menudo tienen limitaciones, pero lo interesante de este apartado es que el simple hecho de encontrar una sinapsis ya demuestra la conexión entre estas fibras. Intentaremos dar entonces lugar a un estudio descriptivo, tratando de ser lo más estrictos en cuanto a la cuantificación, pero asegurando las características cualitativas del estudio.

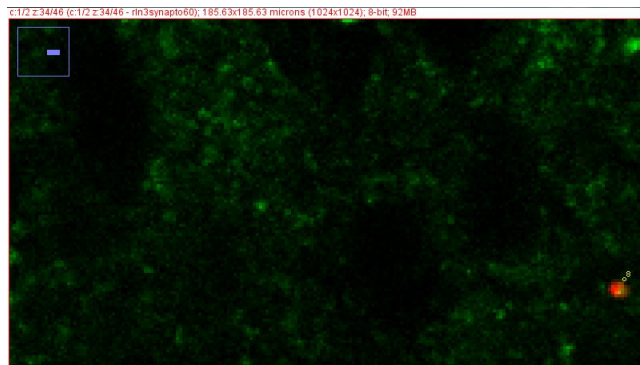
2. RESULTADOS

2.1 – Resultados de RLN3 – sinaptofisina x 60

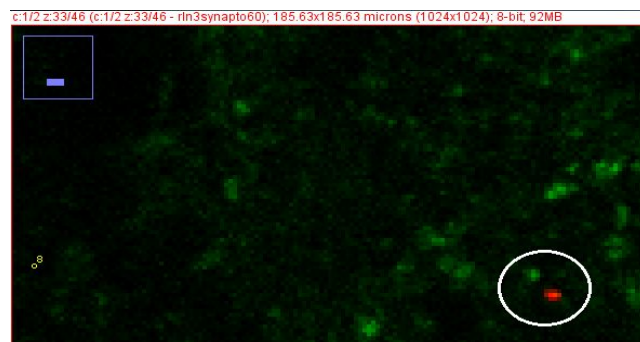
Encontramos en la sección 31 superior medial izquierda, una fibra de relaxina que posiblemente tenga dos contactos con la sinaptofisina, pues en su continuación vemos que vuelve a aparecer el color amarillo en Z=43.



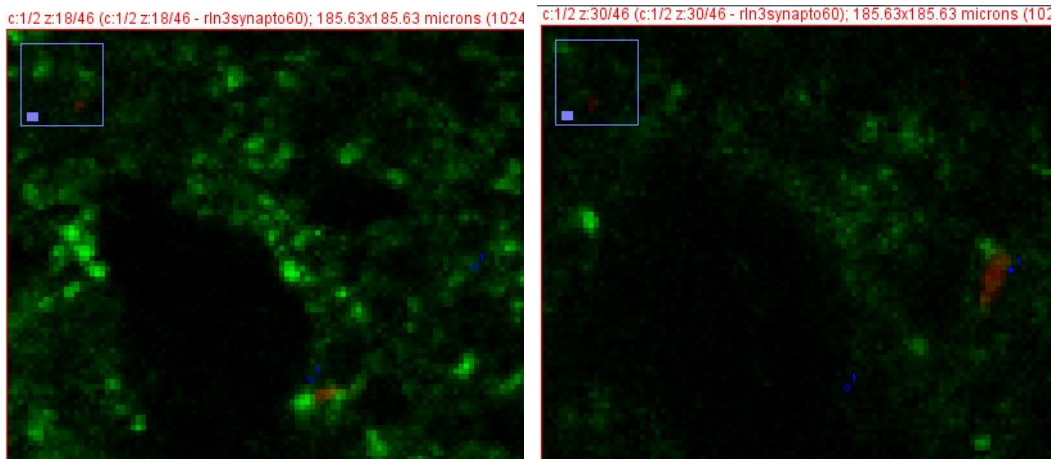
En Z=34 medial izquierda sí encontramos, por ejemplo, un contacto muy claro.



En este Z, por ejemplo, desestimamos ese marcaje como un contacto porque la lejanía entre el punto de densidad rojo y el verde es más que suficiente como para asumir que son fibras diferentes que no se cruzan en ese punto.



En el siguiente caso sí que surgen dudas. Entre Z=17 y Z=30 tenemos dos posibles contactos que no podemos asegurar de lo que parece una misma fibra de relaxina que se extiende entre estos Z. El marcaje rojo está claramente inmerso en el marcaje verde, pero no aparece el color amarillo. Por tanto no podemos asegurar que sea un contacto y por eso lo marcaremos en azul, para diferenciarlo de los reales que marcamos en amarillo. Por estas situaciones nos preguntamos si con otra técnica, o esta misma mejor realizada, sí hubieran sido claramente positivos.



Finalmente en esta muestra hemos encontrado 17 contactos que marcamos en amarillo (tipo 8, por defecto del software).

Estos nos aseguran que, al menos, existen 17 contactos que indican sinapsis de neuronas que expresan relaxina – 3 en la corteza entorrinal lateral y medial entre los bregmas -6 y -5,7 del cerebro de la rata Wistar.

Por otro lado existen 6 contactos que marcamos en azul y hacen que nos surjan dudas sobre su fiabilidad. Pero este hecho nos importa menos visto que la importancia del estudio es demostrar que en la corteza entorrinal existen sinapsis de las fibras de relaxina – 3 con otras neuronas, pues la sinaptofisina está producida por casi todas las células del cerebro y es inmunorreactiva cuando hay una sinapsis entre dos fibras.

Por todo esto quizás no podamos asegurar el número exacto de sinapsis que existen en la corteza entorrinal lateral y medial, sin embargo sí podemos asegurar que cualitativamente, éstas existen y a continuación mostraremos los resultados de la inmunorreactividad de la parvalbúmina y calbindina, bajo la hipótesis de que estas sinapsis sean precisamente con las fibras gabaérgicas que expresan las proteínas ligadoras de calcio.

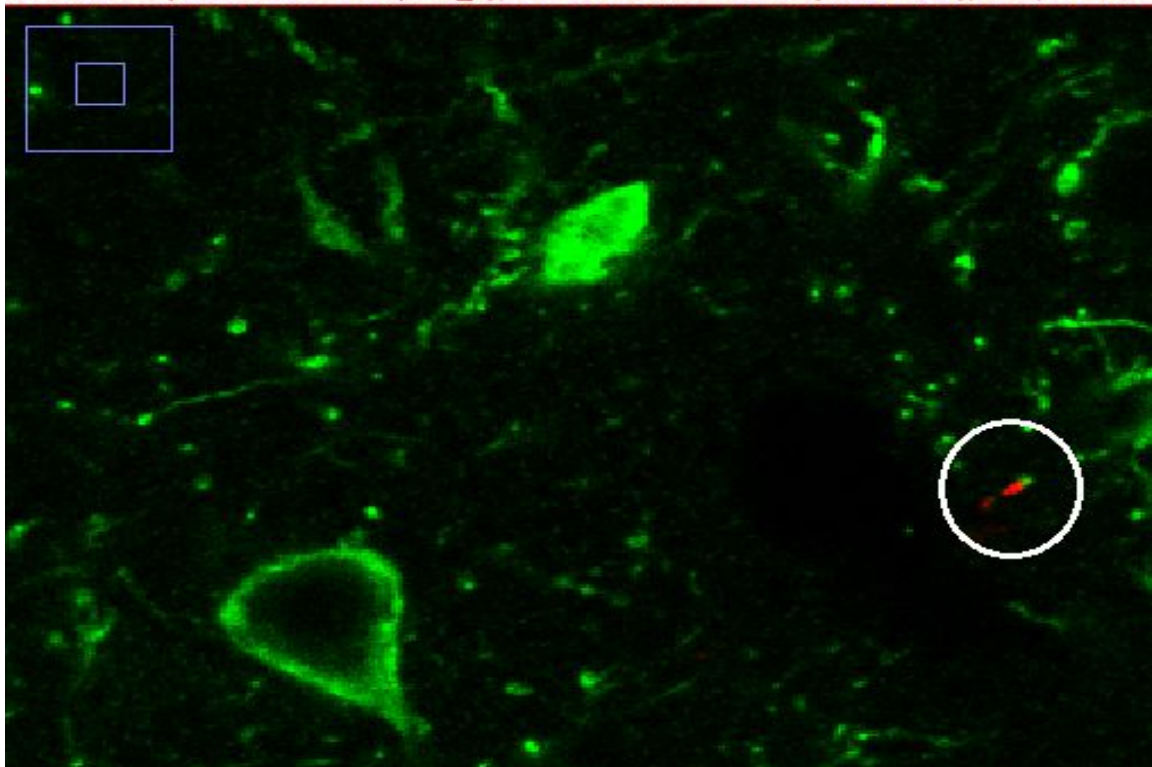
2.2 – Resultados de RLN3 – calbindina x 60

La calbindina al igual que la parvalbúmina es una proteína ligadora de calcio que es expresada por las neuronas gabaérgicas. La cuantificación de los contactos entre estas fibras y las de relaxina – 3 mediante el software Fiji ImageJ de la inmunofluorescencia realizada dio como resultado 27 contactos.

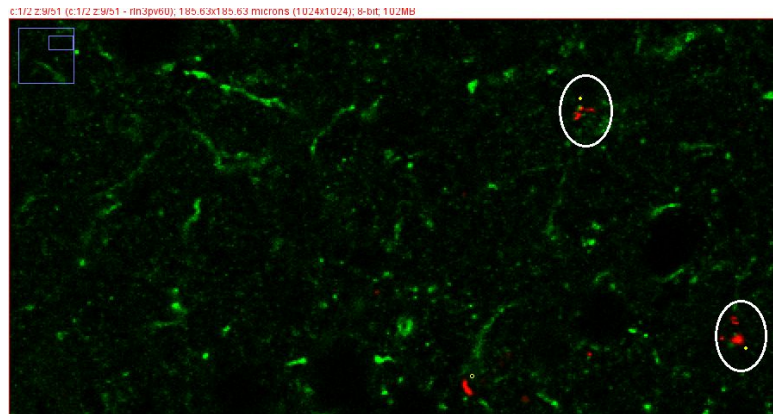
2.3 – Resultados de RLN3 – parvalbúmina x 60

Para las proteínas ligadoras de calcio consideramos contactos aquellos en los que el marcaje verde y rojo se aprecien adyacentes de forma estrecha. Contamos con un n=2 en cuanto a muestras de parvalbúmina, encontrando 65 contactos en una muestra y 51 en la otra.

c:1/2 z:23/58 (c:1/2 z:23/58 - rlN3pv60_2); 185.63x185.63 microns (1024x1024); 8-bit; 116MB



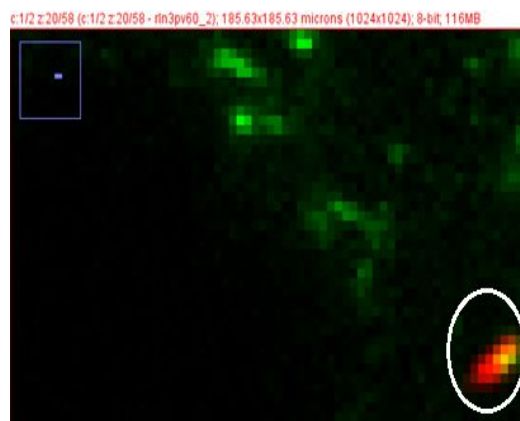
Por ejemplo en este corte $z=9$ contamos dos contactos siguiendo este patrón.



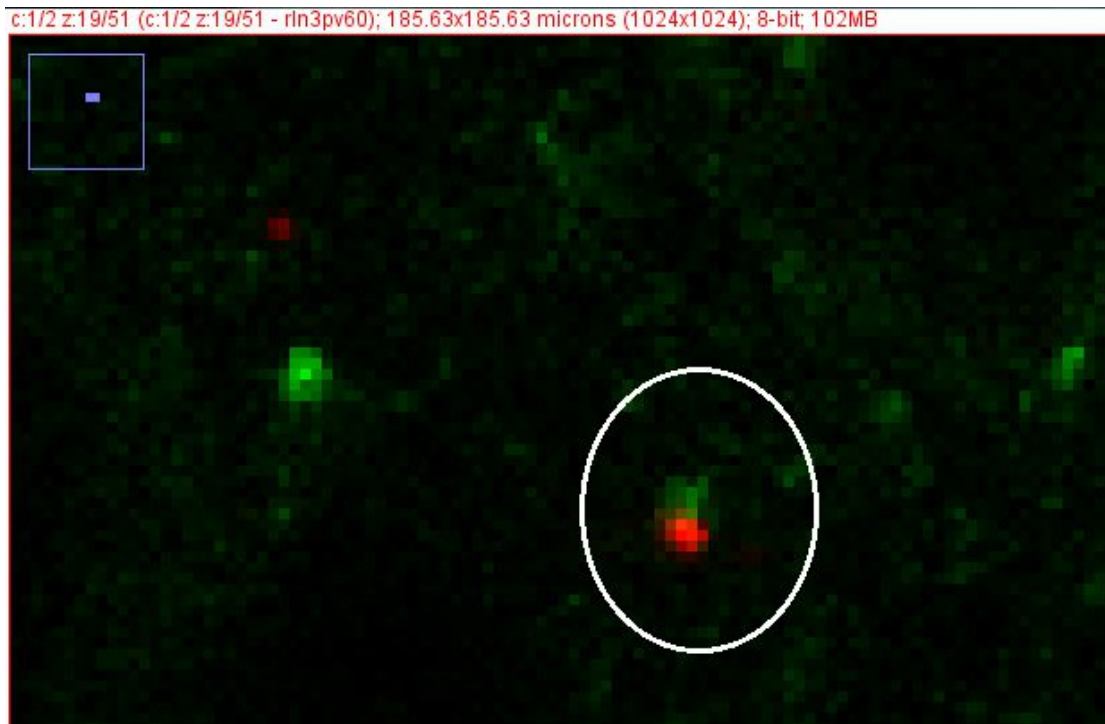
Y en este $Z=16$ contamos otros dos.



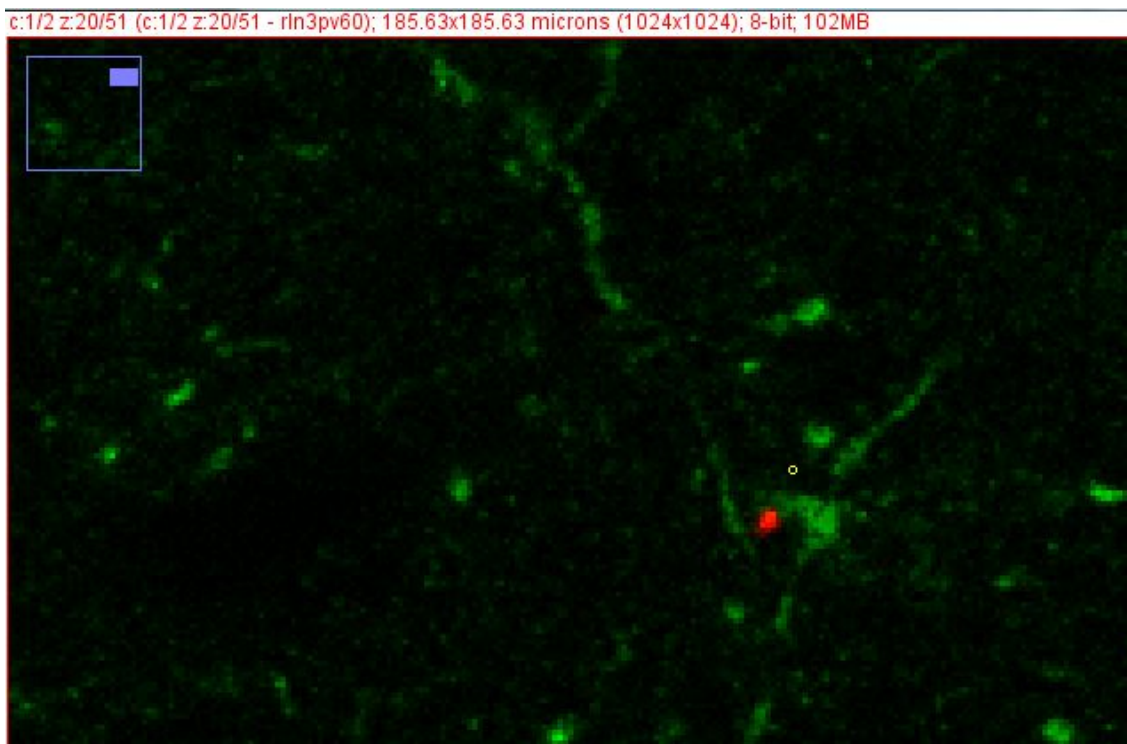
Sin embargo, tan sólo es en $Z=20$ donde encontramos un contacto amarillo, que no deja lugar a dudas y del cuál podemos estar seguros que es un contacto.



Sin embargo, los demás contactos en los que no aparece el amarillo no pueden ser descartados. Como por ejemplo en este Z=19, la estrechez rojo y verde nos hace interpretarlo como un contacto.



Aquí podemos apreciar una neurona de relaxina – 3 en contacto con un marcaje de parvalbúmina:



2.5 – Resultados de RLN3 – calretinina

En el caso de la calretinina se pudo realizar un estudio cualitativo más profundo aún cuando se dejó el estudio cuantitativo para más adelante. En este caso se pudo combinar la presencia de contactos entre fibras de relaxin3 y células marcadas mediante inmunofluorescencia frente a calretinina en ejemplares en los que se había realizado la inyección de fluorogold en el giro dentado.

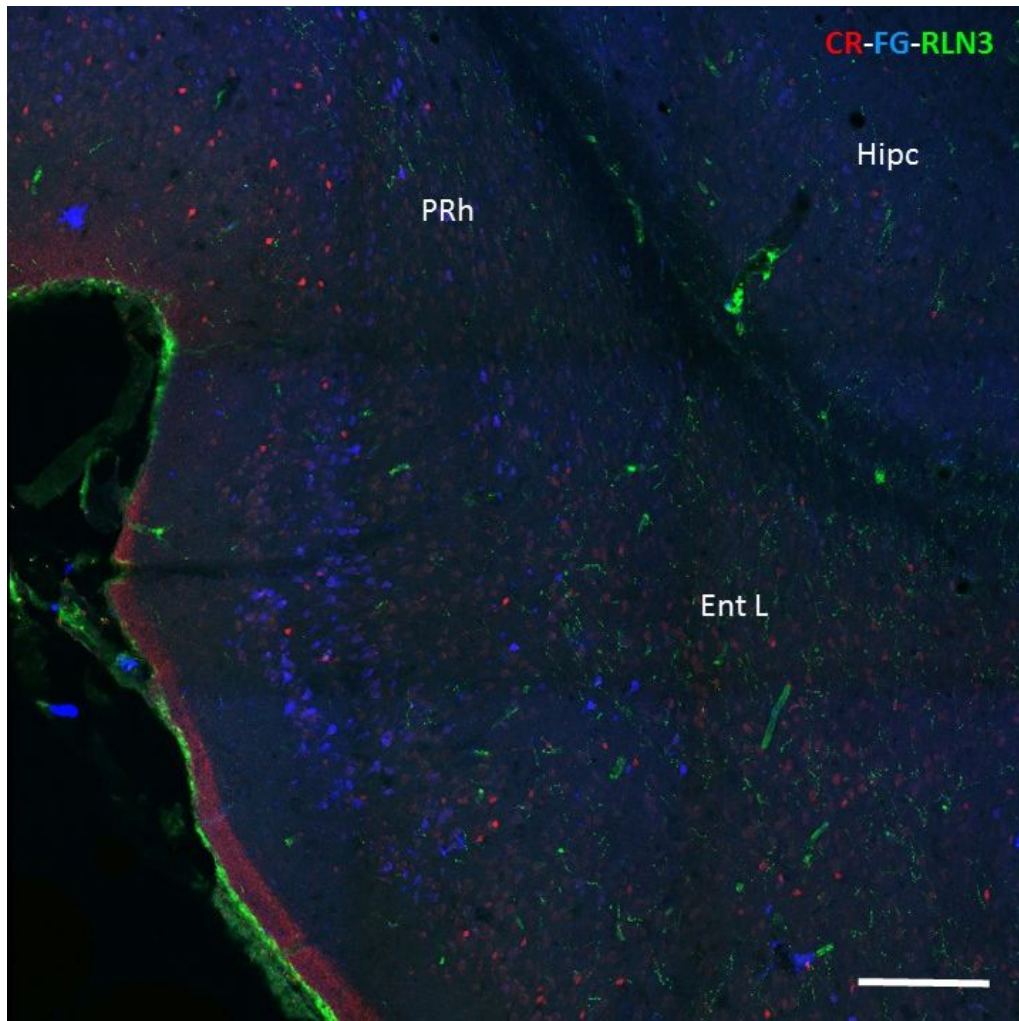


Figura X.- Composición realizada con el microscopio confocal en el que se muestra la distribución de fibras de relaxina 3 en el área entorrinal lateral (EntL) sobre el marcaje retrógrado tras inyección de fluorogold en el giro dentado y reacción de calretinina. Barra de calibración 200 micras. Prh, corteza perirhinal, Hipc, Hipocampo.

Las inyección de fluorogold en el giro dentado produjo marcaje retrógrado en las neuronas del entorrinal lateral que originan la vía perforante. Se observó que ninguna de estas neuronas expresaba calretinina y que tanto las neuronas de la vía perforante como las interneuronas de calretinina reciben contactos de relaxin 3.

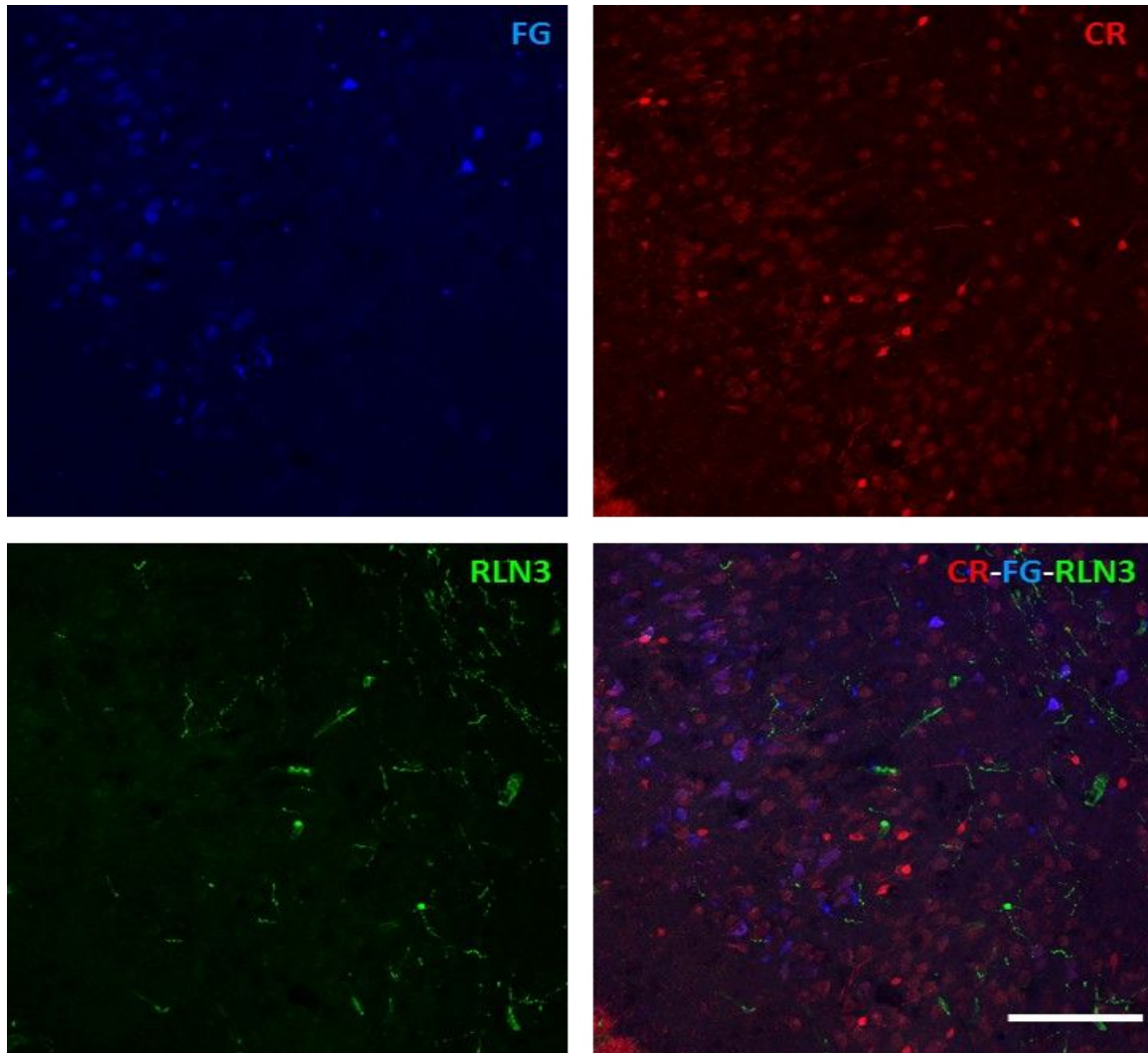


Figura xx. Presencia de contactos entre fibras de relaxina 3 y neuronas calcitonina positivas o marcadas retrógradamente con fluorogold tras inyección del trazador en el giro dentado. Barra de calibración 100 micras

3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A continuación analizaremos los resultados de los procesos de inmunorreactividad entre las fibras de relaxina – 3 y las neuronas gabaérgicas, marcadas con las proteínas ligadoras de calcio parvalbúmina y calbindina, así como las sinapsis existentes visualizables mediante el marcaje realizado con sinaptofisina. Los recuentos fueron realizados sobre imágenes de 185 x 185 micras, es decir 34.225 μm^2 . Contamos con 17 contactos entre RLN3 y sinaptofisina, X entre RLN3 y parvalbúmina, y 27 contactos entre RLN3 y calbindina. Como hemos explicado, los medios no son específicos, sin embargo sí podemos considerar su sensibilidad como fiable, de forma que la obtención de estos resultados es fiable en el sentido de que asegura la existencia de ello.

En primer lugar constatamos la inmunorreactividad de la corteza entorrinal lateral y medial para la RLN3, a un nivel de bregma alrededor del -6 en la rata Wistar. El tejido de esta zona del cerebro aparece marcado en verde en los tres experimentos y eso es lo que nos demuestra que está presente en el tejido. Por lo tanto la corteza entorrinal expresa esta proteína en sus neuronas, o quizás exprese el receptor RXFP3, que la recibe, y por eso la contiene entre sus neuronas. En todo caso indica que la corteza entorrinal y la relaxina – 3 mantienen una estrecha relación neurofisiológica y por tanto confirma la hipótesis de que esta zona del cerebro está implicada en los circuitos en los que la molécula participa. Es decir, nos llevará en la discusión a plantearnos la relación de la corteza entorrinal con el nucleus incertus y por ende la formación septo – hipocampal, con el circuito de memoria, con el estrés y la alimentación, con el ritmo circadiano, así como con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neuropsiquiátricas.

En segundo lugar tenemos 17 contactos de sinaptofisina con células de relaxina – 3. Esto nos demuestra que algunas sinapsis contienen relaxina – 3, y por tanto esta molécula está presente y media conexiones entre la corteza entorrinal y otras partes del cerebro. De entre las otras zonas cerebrales en dónde tenemos constancia de la presencia de RLN3, es el nucleus incertus. Nos hace pensar en la posibilidad de que la relaxina – 3 sea expresada por las células gabaérgicas del nucleus incertus y que éstas sean proyectadas a la corteza entorrinal, donde se encontraría el receptor, y hagan sinapsis para que la relaxina – 3 acceda a él. Otra hipótesis válida sería pensar que la relaxina – 3 es expresada en las células de la corteza entorrinal y hacen sinapsis con las fibras gabaérgicas procedentes del nucleus incertus. Estas teorías se confirmarán con las inmunorreacciones positivas de calbindina y parvalbúmina que explicamos a continuación, pero sin duda la inmunohistoquímica de la sinaptofisina deja en evidencia que las fibras de relaxina – 3 realizan sinapsis con otras células que existen en la corteza entorrinal, sean aferencias o eferencias.

Además, también es positiva la inmunorreactividad frente a las proteínas ligadoras de calcio parvalbúmina y calbindina; esto indica que hay fibras gabaérgicas en la corteza entorrinal. Pero no sólo eso, además de estar presentes también hemos hallado contactos de estas neuronas con las que contienen relaxina – 3. Contamos con 27 contactos con las fibras marcadas con calbindina, y con 65 y 59 CONTACTOS marcados con parvalbúmina. Estos contactos indican que existen sinapsis entre ambos tipos celulares, lo cuál nos recuerda a las relaciones entre las fibras gabaérgicas y la relaxina – 3 ya estudiadas en otros trabajos de experimentación en relación al nucleus incertus,

y los sistemas theta dependientes. Esto nos encaja con la información de que la corteza entorrinal es un nexo entre la corteza cerebral y la formación septo – hipocampal, y nos acerca más a la teoría de que la relaxina – 3 es un neurotransmisor que media en estos circuitos, ahora que sabemos de su presencia no sólo en nucleus incertus sino también en la corteza entorrinal.

4. CORRELACIÓN ENTRE OBJETIVOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados experimentales evidencian la presencia de la relaxina – 3 en la corteza entorrinal y su relación sináptica con fibras gabaérgicas. Por ello a continuación pensaremos en las relaciones y las funciones conocidas de la corteza entorrinal, y toda la información que disponemos sobre la relaxina – 3 y su receptor, y trataremos de contrastar los resultados con la bibliografía. Esto nos recuerda sobre todo, a que el nucleus incertus contiene células gabaérgicas que coexpresan relaxina – 3 como hemos explicado ampliamente en la introducción. Pero además, nos hace pensar en que septum e hipocampus reciben una densa inervación de relaxina – 3; fibras que efectúan contactos íntimos con las fibras gabaérgicas marcadas con proteínas ligadoras de calcio (*Olucha Bordonau et al 2012*).

Nos plantearemos en primer lugar en qué medida podría intervenir el sistema RLN3 – RXFP3 en el sistema septohipocampal, así como en el sistema de memoria entre las grid cells de la zona CA1 del hipocampo con las grid cells, las head direction cells, y las border cells de la corteza entorrinal, porque las fibras que relacionan todas estas estructuras podrían ser las de relaxina – 3. Además, abordaremos el tema del estrés y de la alimentación y el del ritmo circadiano, en donde también se veían hasta ahora implicados tanto la relaxina – 3 como la corteza entorrinal, sin saber hasta ahora de la presencia de esta molécula en esta zona cerebral, lo cuál reforzará nuestras teorías. También comentaremos la importancia de todo esto en las enfermedades neuropsiquiátricas, en concreto la del Alzheimer. Y después discutiremos los nuevos objetivos que se nos plantean a raíz de este trabajo, así como consideraciones sobre el interés de abrir nuevas líneas de investigación sobre la relaxina – 3 como una posible diana terapéutica, tema ya discutido por autores anteriores, pero aportando una novedosa información que su relación con la corteza entorrinal.

IV. DISCUSIÓN

1) LA RELAXINA 3 EN EL CIRCUITO SEPTOHIPOCAMPAL

1.1 – Papel significativo en circuitos neurobiológicos

Fueron dos artículos los que dieron a pensar que la relaxina – 3 es una protagonista poco conocida en las funciones cerebrales. Al ser producida en el nucleus incertus, participa en sus conexiones como el resto de neurotransmisores. Con objetivo de dilucidar de qué manera una conducta es activada en el circuito cerebral, se realizaron estudios con marcaje tanto anterógrado y retrógrado que demostraron proyecciones bidireccionales entre el nucleus incertus y el nucleo rafe mediante fibras que contenían relaxina – 3. Así quedó patente que desde el nucleus incertus mediante aferencias y eferencias esta proteína circulaba por el cerebro de la rata. (*Goto et al 2001, Olucha – Bordonau et al 2003*).

Es más, las células de relaxina – 3 positivas del nucleus incertus también expresan el receptor de serotonina y fue estudiado que la depleción de serotonina aumentaba de forma profusa la expresión de relaxina – 3 en este núcleo. Recientes estudios , demuestran que el péptido orexina es capaz de disparar neuronas en el nucleus incertus cuya distribución coincide estrechamente con las neuronas de relaxina. Además, los parecidos anatómicos en la localización de la relaxina – 3 respecto a otros neurotransmisores; serotonina en el rafe, histamina en el tuberomamilar, noradrenalina en el locus coeruleus, y el péptido orexígeno del hipotálamo lateral iban aumentando los motivos para pensar en la presencia activa de la relaxina – 3 en este sistema. (*Craig M Smith, Andrew L Gundlach 2011*). Estos datos han ido concluyendo un papel del sistema relaxina 3 con origen en el n´culeo incertus en el sistema de activación reticular ascendente (SARA/ARAS).

1.2 – Relaxina-3, neurotransmisor en el circuito septo – hipocampal theta dependiente

La relaxina – 3 ha sido detectada en neuronas del septum medial, en hipocampales, y ahora con nuestro trabajo en neuronas de la corteza entorrinal. Por tanto, su distribución nos hace, a nosotros y a muchos autores, apuntar a que las proyecciones de fibras entre estos núcleos están en parte mediadas por ella.

Por un lado, ha sido detectada en células del septum medial y del lateral, así como en el núcleo de la banda diagonal que proyecta también hacia hipocampo, pasando por la fimbria y la estría del cuerpo calloso. En el septum medial asimismo es positiva para RFXP3, (*Ma et al 2007*). Estas fibras que llegan al hipocampo, son colinérgicas (*Amaral y Kurz, 1985*) y se ocupan de funciones como el sueño/vigilia, atención y ansiedad. Entre estas fibras también las hay gabaérgicas – PV positivas, en las cuáles no se ha demostrado la presencia de relaxina – 3, que proyectan a las interneuronas del hipocampo, (*Freund and Antal, 1998; Freund and Gulyas 1997*). Pero sí se ha detectado la relaxina – 3 en estas neuronas gabaérgicas hipocámpales y la expresión de mRNA del RFXP3, (*Albert – Gascó, Olucha Bordonau; S. Ma et al 2007*) lo cuál indica una señalización importante del sistema RLN3/RFXP3. Desde el septum medial también se proyecta a la corteza cingulada y a la corteza entorrinal (*Bland BH¹, Oddie SD*), y en esta última según nuestros resultados sí hay inmunoreactividad de relaxina – 3 en fibras que hacen sinapsis con fibras gabaérgicas parvalbúmina – calretinina y calbindina positivas.

Por otro lado, como bien sabemos, el nucleus incertus contiene una alta densidad de este neurotransmisor. Pero no sólo eso; emite fibras gabaérgicas parvalbúmina positivas que también expresan relaxina – 3 hacia el septum medial (*Nunez et al 2006*). Se ha visto en un estudio en la rata Sprague Dawley que es anatómicamente muy similar a la nuestra, Wistar, (*Albert – Gascó, Olucha Bordonau*). Mediante una hibridación de RNA scope múltiple in situ, demostraron que el mRNA del RFXP3 está abundantemente expresado en la vesícula transportadora de GABA en el septum medial, mientras que estaba ausente en las colinérgicas. Las fibras gabaérgicas que coexpresan relaxina – 3 y parvalbúmina (*Ma et al 2007, Olucha Bordonau 2003*) son eferentes del nucleus incertus hacia el septum medial facilitando la proyección hacia el hipocampo y la corteza entorrinal, donde a su vez nosotros hemos comprobado la presencia de GABA, de proteínas ligadoras de calcio, y de relaxina – 3.

Experimentalmente ha sido demostrado, (*Albert – Gascó, Olucha Bordonau*), que la infusión de relaxina análoga en el septum medial incrementa este ritmo theta mientras que la infusión de un antagonista de esta molécula o disminuye. Esto sugiere que la relaxina – 3 tiene un rol fundamental en el sistema septohipocámpal y que se ve directamente implicada en la transmisión del ritmo theta. Por tanto las neuronas que van desde el nucleus incertus hasta el septum medial son gabaérgicas; lo que nos resulta interesante es que coexpresan relaxina – 3. Esta llega a su receptor, el RFXP3

que es una proteína G ligando, el cuál se encuentra en el septum medial. La información es retransmitida hacia las siguientes estructuras donde también han sido hallados, ya sea el receptor o nuestra sustancia.

Este conjunto de hallazgos demuestran la implicación del sistema RLN3/RXFP3 en el circuito septohipocampal, como un modulador. Esto añadido a nuestro estudio, adjuntando los nuevos resultados que demuestran la presencia de la relaxina – 3 en la corteza entorrinal, van completando la información necesaria para comprender el circuito, con todos los neurotransmisores que lo recorren, entre ellos la relaxina 3.

2) LA RELAXINA 3 Y LA CORTEZA ENTORRINAL EN EL SISTEMA DE MEMORIA

Recordamos el apartado 4 de la introducción donde explicábamos el circuito de memoria entre las las grid cells, las head direction cells, y las border cells de la corteza entorrinal y las place cells de la zona CA1 del hipocampo.

Con nuestros hallazgos podemos afirmar que la relaxina – 3 está presente en la corteza entorrinal y que hace sinapsis con células gabaérgicas; neuronas caracterizadas por proyectarse en el circuito theta dependiente de la formación septohipocampal que entre otras funciones preserva la capacidad de memoria en el entorno. Además, las place cells se encuentran en la corteza entorrinal medial, de la cuál ahora conocemos su inmunorreactividad para la relaxina – 3. Y por otro lado, tenemos a las demás células del sistema de memoria en el área CA1 del hipocampo, también implicada en los sistemas funcionales del circuito septohipocampal.

La similitud de la distribución de estas células desde nuestro enfoque de trabajo podría ser de relevancia neurofisiológica. Aunque podrían ser hallazgos que representen circuitos independientes, las coincidencias topográficas nos llevan como mínimo a elaborar preguntas sobre el tema. Podría ser ésta la relación entre estas estructuras, mediada por, entre otros neurotransmisores, la relaxina – 3. O la relaxina – 3 quizás sea capaz de modular este sistema. En todo caso, supone una línea de investigación interesante.

3) UN PUNTO DE CONVERGENCIA ENTRE ALIMENTACIÓN Y ESTRÉS

3.1 –Un modulador del estrés en el circuito septohipocampal

Es a día de hoy una certeza científica que la acción postsináptica del CRF tiene un efecto sobre las células del nucleus incertus que contienen relaxina – 3. El sistema relaxina – 3/RXFP tiene un rol en el estrés y en la ansiedad clarificado por la expresión de ARNm de CRF1 en la rata (*Olucha Bordonau et al 2018*). Como ya hemos visto existe una población de neuronas gabaérgicas que coexpresan relaxina – 3 y CRF-R1 en esta estructura, centralita por excelencia de diversidad de funciones intelectuales, entre ellas la memoria y el estrés. Es mediante la infusión intraventricular de CRF que se detectó una activación de las fibras inmunorreactivas para relaxina – 3 (*Gundlach et al 2013*).

Por otro lado sabemos que la relaxina – 3 es un neurotransmisor abundante en el nucleus incertus y que forma parte del circuito theta hipocampal relacionado con la memoria y el comportamiento del mamífero. El nucleus incertus, además de recibir aferencias de una amplia variedad de estructuras diencefálicas y mesencefálicas, también recibe una proyección desde el cortex prefrontal medial, lo que añade el aspecto reflexivo necesario para ejercer la función de memoria voluntaria. Pero es en este punto donde nos plantearemos que si todas las fibras gabaérgicas pueden ser moduladas por el CRF porque existe como mínimo un cruce topográfico entre el estrés, el comportamiento y memoria. Es más, podemos considerar que la intersección está demostrada a nivel neurofisiológico, pues serán las mismas fibras que hacen sinapsis con la corteza prefrontal, que coexpresan relaxina – 3 y reciben aferencias de CRF capaces de modularlas, las que después se encargarán de introducir la información en el circuito septohipocampal. Esto sugiere sin duda una explicación al comportamiento y la actitud del mamífero durante un periodo de estrés. Sería por tanto interesante abrir vías de investigación que profundicen sobre este hecho.

Respecto a la corteza entorrinal, se ha visto que expresa un nivel elevado de CRF y de receptor tipo 2 (CRF-R2), sin embargo no el CRF-R1. (*Kurada L, Yang C, Lei S*). Estos hallazgos han sido principalmente relacionados con la epilepsia. Pero esta estructura podría ser una de las que proyectan al nucleus incertus con CRF de forma que proceda una sinapsis con las fibras gabaérgicas que coexpresan relaxina 3 y el CRF-R1 y también supone complemento a la línea de investigación propuesta.

3.2 – Alimentación y metabolismo

A partir de una hora después de la infusión hipotalámica o intraventricular de relaxina – 3 se produce un aumento de la ingesta en las ratas, así como la infusión de un agonista de RXFP3. Esto se ha visto en numerosos estudios; *Olucha Bordonau et al 2018*, *Craig Smith et al 2011*, entre otros. También hay un aumento de la leptina plasmática, del peso corporal y de la materia grasa de la rata. Tal y como hemos visto en el apartado de la Introducción 5.7.1 – la relaxina – 3 tiene un poder orexígeno que encaja con su origen estructural insulínico, y además ha quedado demostrado que genera un aumento del apetito y de la ingesta.

3.3 – ¿Es la relaxina – 3 un nexo entre el estrés y la alimentación?

Existe psicológicamente una relación entre el estrés y la alimentación. La alimentación es un tema controvertido que se estudia desde hace décadas, en concreto desde el holocausto, al analizar las reacciones de las personas que fueron sometidas al hacinamiento y al hambre. Tiene una estrecha relación con el perfil psicológico y es un tema de primera importancia en psiquiatría respecto a enfermedades como la anorexia, la bulimia, y el trastorno obsesivo – compulsivo. Es sabido por ejemplo que las personas anoréxicas, tienen un nivel de cortisol más elevado que la media en sangre. Es por lógica la restricción alimenticia lo que provoca una necesidad más grande de la hormona del estrés pero también debe existir una retroalimentación positiva en el que de algún modo ese estrés modula la necesidad de alimentarse. Por norma general el estrés es un factor en la alimentación, provocando un aumento o una disminución de la ingesta. A corto plazo el estrés puede aumentar el apetito para suplir las necesidades biológicas, pero a largo plazo el estrés produce adelgazamiento. De hecho, en la literatura se indica la necesidad de profundizar sobre este tema y se afirma una relación con el hipotálamo mediante la oxitocina y la vasopresina, así como otros orexígenos (*Andrew L Gundlach et al 2016*). De esta manera, se debería investigar en otras especies para analizar el impacto del estrés en la dieta.

Ya hemos visto que la relaxina – 3 está caracterizada por su poder orexígeno y se implica en la función alimenticia del mamífero. También es de mención que al fin y al cabo pertenece a la familia de las super – insulinas y por tanto a nivel estructural las similitudes nos acercan a pensar en sus posibles funciones metabólicas. Por otro lado conocemos su relación con el CRF a nivel del nucleus incertus en relación con un sistema que dirige el comportamiento del individuo. Analizando estos hallazgos podríamos plantearnos que existe una modulación por parte del CRF en la relaxina – 3 que produzca variaciones en la ingesta o en la voluntad de ella. Supone un tema

controvertido del que se tiene poca información sólida pero sí han sido demostrados una gran variedad de detalles puntuales que sería interesante recoger y analizar de forma que nuevas investigaciones puedan aclarar las hipótesis aportando información más sólida.

Por otro lado, la corteza entorrinal es el nexo entre la corteza prefrontal y la formación septohipocampal, y es inmunorreactiva a la relaxina – 3 en sus fibras gabaérgicas. Además, se ha encontrado RNAm de CRF1 en sus neuronas y está por tanto ligada a este sistema que engloba estrés y alimentación, afirmándolo sin estar comprobado científicamente a día de hoy. Pero es quizás una función más de esta zona del cerebro; al fin y al cabo la voluntad de comer se manifiesta en la corteza telencefálica, pero esa necesidad surge de algún punto del sistema límbico y en cierta medida parece lógico pensar que esa información pasa por la corteza entorrinal. Con más razón si esta expresa un receptor de CRF. Por lo tanto nuevamente tenemos una relación entre la relaxina – 3 y la corteza entorrinal que podría ir más allá de un dato descriptivo de la topografía cerebral.

4. EL SISTEMA RLN₃/RXFP₃ EN EL RITMO CIRCADIANO

En la literatura científica sobre la neurofisiología relacionada con la relaxina – 3 existen numerosas evidencias de que este sistema está implicado en el ritmo circadiano cerebral de forma que actúa como un neuromodulador de esta función. Nuestros resultados indican además que está presente en la corteza entorrinal y sabemos que esta estructura a su vez también se encuentra relacionada con los estados de vigilia vista su relación con el sistema hipotálamo – hipofisario – suprarrenal. Por tanto nos plantearíamos en qué medida podrían estar relacionadas la relaxina – 3 y la corteza entorrinal con esta función.

4.1 – La relaxina – 3 actúa mediante el nucleus incertus

En primer lugar tenemos el nucleus incertus, que proyecta a diversas estructuras del encéfalo que están relacionadas con las fases del sueño SWS (ondas lentas) y REM. Entre el NI y el sistema RLN₃/RXFP₃ se ha visto una adaptación cognitiva y emocional al ritmo circadiano, de forma que favorece que el sujeto se encuentre despejado (*Olucha Bordonau et al 2018*); la inyección intraventricular del agonista del RXFP₃ provocaba un aumento de la actividad locomotora y un aumento de la capacidad de

exploración influyendo así en el comportamiento de la rata. Además, la microestimulación ipsilateral del nucleus incertus en la rata produce un incremento de la locomoción, al igual que la infusión intraventricular de agonista de la relaxina. Pero durante la noche se detecta una disminución de la actividad generalizada. Esto no sólo refuerza la teoría de que el nucleus incertus la proyecta a diferentes partes del cerebro, sino que probablemente entre ellas las encargadas de inducir el sueño REM convirtiendo a la relaxina – 3 en un neurotransmisor del proceso.

4.2 – Una distribución cerebral significativa

Otro motivo que incita a relacionar a la relaxina 3 con el ritmo circadiano es que su distribución topográfica cerebral está caracterizada por la presencia en las estructuras que se encargan de esta función (*Smith et al 2011*). En primera instancia contamos con su presencia en las fibras del hipotálamo lateral que sugieren una relación con el sistema de la orexina y de la melanina encargado del asentamiento de un ritmo de sueño y de vigilia, así como su presencia en los núcleos marcapasos de este sistema como lo son el intergeniculado y el supraquiasmático. Estos reciben impulsos sensoriales de la retina, (*Harrington 1997; Morin and Allen, 2006*), y a su vez se ha visto que la expresión de RNAm de relaxina- 3 varía durante las 24 horas del ciclo circadiano, teniendo un pico durante la noche (20h00) y un descenso al comenzar el día (8h00), (*Banerjee et al 2006*). Además, las neuronas del intergeniculado in Vitro ven su actividad sugestionada mediante la activación de RXFP3.

4.3 – La corteza entorrinal en la vigilia

Desde 1984 es sabido que el eje del cortisol es un regulador principal del ritmo circadiano, (*Munck et al 1984*). Un estudio demuestra la relación de la corteza entorrinal y el ritmo circadiano mediante un experimento en el que usando ácido iboténico se dañaron dos estructuras cerebrales: esta misma y el hipocampo. Esto tenía como resultado un aumento significativo y superior al esperado de la ACTH y del cortisol a las 8h00 de la mañana pero no por la tarde, (*Umegaki 2008*). Tanto el hipocampo, con un alto nivel de expresión de receptores de glucocorticoides, como el núcleo supraquiasmático proyectan al núcleo paraventricular del hipotálamo, controlándolo (*Jacobson and Sapolsky 1991, Sage et al 2011, Ritter et al 2003*). De esta forma ejerce un feedback negativo que lo regula. Entendemos que el hipotálamo producirá ese impulso para la liberación de cortisol a las 8h00 de la mañana, sin embargo es regulado por la formación hipocampal y en el caso de estar esta dañada, la regulación se pierde los valores en plasma se elevan más de lo normal.

La corteza entorrinal proyecta a hipocampo y en este estudio se demuestra que su daño influye en la regulación del eje del cortisol, insistiendo en la idea. Podría desde luego ser esta estructura la que envía el estímulo al hipocampo y regula el eje, pues como hemos visto anteriormente está implicada en la respuesta al estrés. Con nuestros resultados sabemos que la corteza entorrinal expresa relaxina – 3 y que entre sus proyecciones están las que alcanzan el hipocampo. Quizás sean estas fibras gabaérgicas las que median estas funciones y resultaría interesante un marcaje del CRF y de relaxina 3 y profundirlo en la corteza entorrinal para poder ver la distribución que adopta, así como estudios de inmunorreactividad para poder determinar si existen contactos entre estas fibras o si se coexpresan. Además, sabemos que la relaxina – 3 es un inductor al comportamiento y a la actividad que desde el nucleus incertus ha demostrado una regulación del ritmo circadiano.

4.4 – La relaxina 3 y la corteza entorrinal en las enfermedades neuropsiquiátricas.

Podemos considerar por tanto si la relaxina – 3 se ve implicada en el ritmo theta dependiente de la formación septohipocampal, activo también en las funciones circadianas, ya no sólo es por su alta producción en el nucleus incertus, o en su inmunorreactividad positiva en la corteza entorrinal como hemos demostrado. Está presente además en las proyecciones entre núcleos necesarios para el ritmo circadiano como el hipotálamo lateral, el intergeniculado o el supraquiasmático, y sus funciones se cruzan con las de la respuesta al estrés. El gran interés de todo esto es que en la elevación de ACTH y cortisol en plasma está clínicamente relacionada con los cambios neuroendocrinos que suceden en la enfermedad de Alzheimer, así como en esta enfermedad el hipocampo y la corteza entorrinal están severamente dañados. La relaxina – 3 comienza a ser estudiada como diana terapéutica en diversidad de enfermedades neuropsiquiátricas vista su íntima relación con el sistema septohipocampal, y su implicación en funciones como la memoria y el comportamiento. De esta forma, comenzamos a visualizar a esta molécula como un neurotransmisor capaz de dar explicación a algunas de las incógnitas que siguen en vigor respecto a estas enfermedades, y su relación con la corteza entorrinal podría alumbrar información en la enfermedad de Alzheimer.

5) COMPORTAMIENTO EN LA ANSIEDAD Y EMOCIONES

El receptor en cuestión, RXFP₃, está expresado en zonas de control de las emociones como es la corteza prefrontal, la amígdala o el hipocampo (Smith et al 2014b for review). Esto relaciona el sistema con los desórdenes de ansiedad, depresión, y enfermedades psiquiátricas. Numerosos estudios en ratas demuestran que las fibras de relaxina – 3 del nucleus incertus también expresan al receptor inhibidor de serotonina. Mediante la depleción farmacológica de 5HT₁ mediante la inhibición de triptófano hidroxilasa provocó el aumento de la relaxina – 3, llevándonos a la conclusión de que un nivel normal de serotonina suprime la expresión de relaxina – 3 (Miyamoto et al 2008). Además, la administración de antipsicóticos tanto atípicos (clozapina) como típicos (clorpromazina) en ratas activa el nucleus incertus, y esto sufre que las células de relaxina – 3 se ven implicadas en la respuesta a esta medicación (Rajkumar et al 2013). Por tanto, se abre toda una nueva vía de investigación psiquiátrica a estos efectos en beneficio del manejo clínico y terapéutico de enfermedades relacionadas con la serotonina como son la ansiedad y el estrés.

6) ALZHEIMER Y SISTEMA RLN₃ – RXFP

En el cerebro de los humanos se ha visto una inmunorreactividad disminuída del RXFP₁ en la corteza parietal de pacientes con Alzheimer sin depresión. Sin embargo el RXFP₃ sí estaba incrementado en aquellos que sí padecían depresión. Pero los niveles de ambos receptores no pueden correlacionarse con las placas de beta amiloide, (Mitchell K.P. Lai et al 2015). Por tanto los receptores de la relaxina podrían ser usados como marcadores en la depresión asociada al Alzheimer. Investigar sobre esto podría suponer un avance diagnóstico. Quizás se podría lograr mediante la relaxina – 3 un nuevo enfoque terapéutico, visto su involucramiento en los sistemas de memoria.

7. NUEVOS OBJETIVOS

7.1 – Ampliación del estudio: el nucleus incertus

La idea en un principio consistía en determinar la presencia o no de la relaxina en la corteza entorrinal, a modo de un estudio analítico, descriptivo y cuantificativo. Pero fue a través del estudio en la bibliografía cuando percibimos la falta de información sólida sobre las conexiones de esta zona del cerebro. Fue en este punto en el que el trabajo evolucionó; al no conformarnos con la simple descripción y cuantificación de las fibras de relaxina en la corteza entorrinal, quisimos demostrar su procedencia, colaborando así al conocimiento neurocientífico de los complicados circuitos que construyen la memoria y el comportamiento. Por tanto, ¿es la relaxina – 3 una mediadora de la conexión entre la corteza entorrinal y el nucleus incertus?

Sabemos que el nucleus incertus es una estructura principal en los sistemas neuronales de memoria aprendizaje estrés y ciclo de sueño/vigilia, compuesto por fibras en su mayoría gabaérgicas que coexpresan relaxina – 3. Siendo estas características comunes a las de la corteza entorrinal, surgió la hipótesis de que el nucleus incertus proyectase a la corteza entorrinal, fenómeno que todavía no había sido estudiado. Es sabido que por ejemplo, la formación septo – hipocampal sí proyecta a esta zona del cerebro, a pesar de serle independiente (*Takuya Sasaki and Jill Leutgeb, 2015*). Sin embargo, demostrar que el nucleus incertus, principal modulador conocido de estos procesos proyectase fibras a la corteza entorrinal explicaría en parte la existencia de neuronas gabaérgicas parvalbúmina, calretinina, y calbindina inmunorreactivas en esta zona. Además, el RXFP3 está presente en la zona medial de la corteza entorrinal. Nos hace pensar que la relaxina – 3 es proyectada desde alguna parte del cerebro mediante fibras que hacen sinapsis con las neuronas entorrinales y alcanzan el receptor.

Puesto que la teoría encajaba, usamos cortes cerebrales previamente profundos con fluorogold en el nucleus incertus, lo cual implicaría que de proyectar esta zona a la corteza entorrinal, el fluorogold sería detectable. En estas secciones realizamos una doble inmunofluorescencia para calretinina y para relaxina – 3, con la idea de posteriormente encontrar contactos entre estas fibras y las procedentes del nucleus incertus. De esta manera demostraríamos no sólo la existencia de una eferencia del nucleus incertus hacia la corteza entorrinal, sino una conexión sináptica que reforzaría nuestra teoría. Más allá de eso, se realizaría una cirugía en vivo para realizar una nueva perfusión de fluorogold en una rata Wistar para después realizar una doble

inmunohistoquímica con RXFP3, fluorogold y calretinina, y así realizar un RNAscope para poder cuantificar el ARN del receptor.

Estos experimentos fueron realizados y por motivos logísticos no fueron incluidos en este trabajo. Siguen su curso con objetivo de demostrar que el nucleus incertus no sólo proyecta a la corteza entorrinal, sino que hace sinapsis en ella mediante células gabaérgicas y de relaxina – 3 y así añadir una proyección nueva de la relaxina – 3 no estudiada hasta ahora.

7.2 - ¿La proyección telencéfalo – entorrinal podría estar mediada por relaxina – 3?

Nuestros resultados nos permiten afirmar que la relaxina – 3 se encuentra presente en la corteza entorrinal, siendo esta un nexo entre el telencéfalo y las estructuras diencefálicas y mesencefálicas. La línea de investigación respecto a sus proyecciones con el nucleus incertus está en proceso, siendo nuestra hipótesis que los resultados serán positivos y que podremos afirmarlo próximamente. Sin embargo, podría ser interesante en la misma línea investigar sobre las posibles relaciones mediadas por relaxina – 3 con el telencéfalo. Es de añadir que si el receptor de la relaxina – 3 está expresado en la corteza prefrontal (*Smith et al, 2014b for review*), y que por tanto este podría ser un comienzo para estudiar las conexiones de la corteza entorrinal con el resto del córtex cerebral.

El cerebro es una estructura globalmente interconectada por una amplia diversidad de circuitos cerrados de retroalimentación, tanto positiva como negativa, que permiten el desarrollo de funciones metabólicas y neuropsicológicas del mamífero. Por ello no sería de extrañar que si la relaxina – 3 se encuentra presente tanto en el nucleus incertus como en el septum, como en otros núcleos, como en la corteza entorrinal ya que desde ahora así podemos afirmarlo, también se encuentre presente en la corteza cerebral. Sería en un principio con la corteza entorrinal con quien el telencéfalo mantendría una relación.

7.3 – La relaxina – 3 como diana terapéutica

Hemos comentado la relación de la relaxina – 3 con la alimentación, y también su relación con el estrés, tanto fisiológicamente como anatómicamente por la relación de ambas funciones con la corteza entorrinal y el hipotálamo. Aquí yace por tanto un circuito modulado, en principio, por fibras que proyectan entre áreas mediadas por la relaxina – 3 y por el CRF. Por tanto el interés en este tema surge al resaltar la capacidad orexígena de la relaxina – 3 y relacionarla con el eje del cortisol que hipotalámicamente regula el CRF, pues la relaxina – 3 a su vez también se ha visto implicada en la respuesta al estrés. Una línea de investigación sobre el impacto del estrés en la dieta podría ampliar conocimientos para comprender la relación socialmente aceptada entre el estrés y la ingesta de comida y darle un soporte neurofisiológico. Además, abre las expectativas para los fármacos relacionados con los hábitos alimenticios. Por ejemplo, el topiramato potencia la actividad del GABA y es el tratamiento de enfermedades epilépticas como la de Lennox – Gastaut y como profilaxis de la migraña, pero también se usa en psiquiatría para reducir la gula y la ansiedad por comer en la bulimia nerviosa. Quizás esta potenciación del GABA esté mediada por la relaxina – 3 o quizás podría usarse como diana la relaxina – 3 antes que el GABA puesto que se trata de una sustancia mucho más abundante en el sistema nervioso central y los fármacos que lo usan cuentan con muchas reacciones adversas al medicamento. Este es un ejemplo que nos hace pensar en el posible interés clínico de la relaxina – 3 respecto a enfermedades psiquiátricas como la bulimia nerviosa, así como su poder orexígeno nos llevaría a atribuirle nuevas dianas terapéuticas. En cualquier caso, sería una hipótesis de interés médico a valorar.

Por otro lado, su relación con las emociones, el comportamiento y la inducción de actividad, así como su capacidad moduladora del ritmo circadiano y de nuevo las evidencias de su función como herramienta de respuesta al estrés, nos hacen plantearnos la utilidad de la relaxina – 3 para estudios que vayan más allá de un cuadro descriptivo y analítico. Si en definitiva supone un mediador del comportamiento del mamífero frente a estímulos exteriores, se pone de manifiesto la posibilidad de usarla como diana terapéutica en las patologías psiquiátricas relacionadas con estos temas.

Por último y no menos importante, la corteza entorrinal y el hipocampo así como la relaxina – 3 y el CRF, guardan una relación significativa con la enfermedad de Alzheimer.

Nos plantearémos asimismo la posibilidad de valorar otras líneas de investigación de cara a otras enfermedades neuropsiquiátricas.

8 – CONCLUSIONES

Este trabajo ha confirmado su presencia en la corteza entorrinal, un dato novedoso que suma información a las características generales del sistema RLN3 – RXFP3. Además, desde aquí se da lugar a más experimentos que dilucidarán la relación de la relaxina – 3 presente en la corteza con el nucleus incertus.

Los datos confirman que la proyección tiene como diana fundamentalmente las capas profundas de la corteza entorrinal que es la vía de salida de la información desde el hipocampo hacia la corteza.

La existencia de marcaje de sinaptofisina en las fibras de relaxin3 evidencia que existe una relación sináptica es decir, no se trata de fibras de paso.

El hecho de que tanto neuronas de proyección marcadas con fluorogold como interneuronas marcadas con proteínas ligadoras de calcio reciban contactos de fibras de relaxina 3 indica que relaxina 3 podría ejercer una acción de ponderación excitación/inhibición sobre la vía de paso entre el neocortex y el hipocampo a través de la corteza entorrinal.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. **GABAergic Neurons in the Rat Medial Septal Complex Express Relaxin-3 Receptor (RXFP3) mRNA.** Albert-Gascó H, Ma S, Ros-Bernal F, Sánchez-Pérez AM, Gundlach AL, Olucha-Bordonau
2. **Modulation of forebrain function by nucleus incertus and relaxin-3/RXFP3 signaling.** Olucha-Bordonau FE, Albert-Gascó H, Ros-Bernal F, Rytova V, Ong-Pålsson EKE, Ma S, Sánchez-Pérez AM, Gundlach AL. 2018
3. **Corticotropin-releasing factor facilitates epileptiform activity in the entorhinal cortex: roles of CRF2 receptors and PKA pathway.** (Kurada L1, Yang C1, Lei S1.)
4. **Effect of the entorhinal cortex on diurnal ACTH and corticosterone release in rats.** Zhu, Zhang, Umegaki, 2008.
5. **Relaxin the brain: A case for targeting the nucleus incertus network and relaxin-3/RXFP3 neuropeptide/receptor systems in neuropsychiatric disorders.** Gavin S Dawe 2016.
6. **Modulation of forebrain function by nucleus incertus and relaxin-3/RXFP3 signaling.** Francisco E Olucha Bordonau, Andrew L Gundlach, 2018.
7. **Behavioral effects of deep brain stimulation of the anterior nucleus of thalamus, entorhinal cortex and fornix in a rat model of Alzheimer's disease.** Zhang C, Hu WH, Wu DL, Zhang K, Zhang JG. 2015
8. **Postnatal development of the Relaxin-3 innervation of the rat medial septum.** Francisco Ros Bernal, Olucha-Bordonau. 2017.
9. **Neurotransmitter phenotype of relaxin-3 receptor (RXFP3) – expressing neurons in rat septal area. Implications for regulation of hippocampal theta rhythm.** Hector Albert-Gascó, Olucha-Bordonau
10. **Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory relaxin-3 neurons of the nucleus incertus.** M. Akhter Hossain et al 2009.
11. **Distribution and Targets of the Relaxin-3 Innervation of the Septal Area in the Rat,** Andrew L. Gundlach et al 2011.
12. **Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain,** Andrew L Gundlach 2016.
13. **Distribution of Relaxin-3 mRNA and Immunoreactivity and RXFP3-Binding Sites in the Brain of the Macaque,** Andrew L. Gundlach 2009.
14. **Distribution of Relaxin-3 and RXFP3 within Arousal, Stress Affective Cognitive Circuits of Mouse Brain,** Andrew L. Gundlach 2010.

15. **Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat.** Teruel-Martí V¹, Cervera-Ferri A, Nuñez A, Valverde-Navarro AA, Olucha-Bordonau FE, Ruiz-Torner A.
16. **Activation of immobility-related hippocampal theta by cholinergic septohippocampal neurons during vestibular stimulation.** Tai SK¹, Ma J, Ossenkopp KP, Leung LS
17. **Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand for the orphan G-protein coupled receptor GPCR135,** Timothy W Lovenberg 2003.
18. **Relaxin in gaba projection neurons of nucleus incertus suggest widespread influence on forebrain circuits via g-protein-coupled receptor-135 in the rat,** A. L . Gundlach 2006.
19. **Connections of the Nucleus Incertus,** Goto, Swanson, Canteras, 2001.
20. **Relaxin-3 systems in the brain – The first 10 years,** Craig M Smith, Andrew L Gundlach 2011.
21. **Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex,** Sasaki, S. Leutgeb, J K Leutgeb 2015.
22. **Architecture of the entorhinal cortex a review of entorhinal anatomy in rodents with some comparative notes.** Shinya Ohara 2017.
23. **Grid Cells and Spatial Maps in Entorhinal Cortex and Hippocampus,** Tor Stensola and Edvard I. Moser 2016.
24. **The onion skin – like organization of the septum arises from multiple embryonic origins to form multiple adult neuronal fates.** Wei, Juang, He, Sun, You, Liu, Yang 2012.
25. **Relaxin-3 receptor (Rxfp3) gene knockout mice display reduced running wheel activity: implications for role of relaxin-3/RXFP3 signalling in sustained arousal.** Hosken IT¹, Sutton SW², Smith CM¹, Gundlach AL³. 2014
26. **Relaxin-3/RXFP3 networks: an emerging target for the treatment of depression and other neuropsychiatric diseases?** Smith CM¹, Walker AW¹, Hosken IT¹, Chua BE², Zhang C¹, Haidar M¹, Gundlach AL³. 2014
27. **Heterogeneous responses of nucleus incertus neurons to corticotrophin-releasing factor and coherent activity with hippocampal theta rhythm in the rat.** Ma S¹, Blasiak A, Olucha-Bordonau FE, Verberne AJ, Gundlach AL. 2013
28. **Nucleus incertus--an emerging modulatory role in arousal, stress and memory.** Ryan PJ¹, Ma S, Olucha-Bordonau FE, Gundlach AL 2011.
29. **Relaxin-3/INSL7 regulates the stress-response system in the rat hypothalamus.** Watanabe Y¹, Miyamoto Y, Matsuda T, Tanaka M. 2010

- 30. Metabolic and neuroendocrine responses to RXFP3 modulation in the central nervous system.** Sutton SW¹, Shelton J, Smith C, Williams J, Yun S, Motley T, Kuei C, Bonaventure P, Gundlach A, Liu C, Lovenberg T. 2009
- 31. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress.** Tanaka M¹, Iijima N, Miyamoto Y, Fukusumi S, Itoh Y, Ozawa H, Iyata Y. 2005
- 32. Connections Of The Nucleus Incertus,** M. Goto et al. 2001
- 33. Altered relaxin family receptors RXFP1 and RXFP3 in the neocortex of depressed Alzheimer's disease patients.** Lee JH¹, Koh SQ¹, Guadagna S², Francis PT², Esiri MM³, Chen CP¹, Wong PT¹, Dawe GS^{1,4,5}, Lai MK^{6,7,8}.
- 34. Differential gene expression analysis of human entorhinal cortex support a possible role of some extracellular matrix proteins in the onset of Alzheimer disease.** Santa-Maria I1, Avila J, Rabano A.
- 35. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways.** Bland BH¹, Oddie SD.
- 36. Activation of immobility-related hippocampal theta by cholinergic septohippocampal neurons during vestibular stimulation.** Tai SK¹, Ma J, Ossenkopp KP, Leung LS.
- 37. Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequential implication of GABAergic and cholinergic neurons.** Lecourtier L¹, de Vasconcelos AP, Leroux E, Cosquer B, Geiger K, Lithfous S, Cassel JC.
- 38. Septo-hippocampal interaction.** Müller C¹, Remy S^{2,3}.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos de este trabajo van dirigidos a la Unidad Predepartamental de Medicina, en especial a Cristina García Díaz y a Héctor Albert-Gascó, sin los cuáles este trabajo no hubiera sido posible.