



---

**Papel del Núcleo Incertus en el reconocimiento  
social a través de sus conexiones en el cerebro  
de rata**

---

Doctoranda: Cristina García Díaz

Director de la tesis: Francisco Eliseo Olucha Bordonau

Febrero, 2021

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Salud

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

---

**Papel del Núcleo Incertus en el reconocimiento  
social a través de sus conexiones en el cerebro  
de rata**

---

Memoria presentada por Cristina García Díaz para optar al grado de  
doctor/a por la Universitat Jaume I

Cristina García Díaz



Francisco Eliseo Olucha Bordonau

FRANCISCO  
ELISEO|OLUCHA|  
BORDONAU

Firmado digitalmente por  
FRANCISCO ELISEO|OLUCHA|  
BORDONAU  
Fecha: 2021.01.12 19:27:59  
+01'00'

## **Financiación recibida**

Agencias financiadoras del doctorando

- Universitat Jaume I beca de investigación UJI-B2016-40
- Universitat Jaume I FPI-UJI beca de investigación predoctoral PREDOC/2014/35





Francisco Olucha Bordonau, profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universitat Jaume I, Castellón de la Plana, España.

### **CERTIFICA**

que la Sra. Cristina García Díaz ha realizado su proyecto de tesis e investigación en el laboratorio del grupo de 307 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universitat Jaume I bajo mi supervisión y ha llevado a término el correspondiente trabajo experimental que ha concluido con el escrito de la tesis doctoral “Papel del Núcleo Incertus en el reconocimiento social a través de sus conexiones en el cerebro de rata”

Después de revisar esta tesis doctoral autorizamos para la presentación y defensa para el grado de doctor por la Universitat Jaume I.

Con este propósito firmo este certificado

Francisco Eliseo Olucha Bordonau

Castellón de la Plana, 31 de Octubre de 2020

Por la presente declaro que esta tesis es mi trabajo original y ha sido escrita en su totalidad y desarrollada en el laboratorio de 307 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Jaume I. Esta tesis tampoco se ha presentado previamente para ningún título en ninguna universidad.



Cristina García Díaz

2020

# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin la colaboración y el apoyo de un largo listado de personas. Agradecer la oportunidad brindada por parte de mi director de tesis Francisco Eliseo Olucha de poder formar parte de este proyecto de investigación, durante este trayecto he adquirido una magnífica formación en el campo neurocientífico. Gracias por ser un gran ejemplo vocacional y transmitirme la necesidad de investigar. Como no, agradecer a mis compañeros y compañeras de laboratorio el apoyo que me han dado, los buenos momentos que hemos pasado durante estos años, el apoyo que nos hemos dado mutuamente durante los momentos de mayor frustración, junto con los éxitos celebrados, y los amigos que me llevo a través de esta vivencia.

Muchas gracias a Sandra y Héctor por transmitirme esas ganas de investigar, gracias por ayudarme y enseñarme tanto durante mi paso por el campo de las neurociencias. Sois un claro ejemplo de lo que es vocación y esfuerzo, hay mucho de vosotros en esta tesis. Gracias a todos los compañeros del laboratorio, para mi sois como mi segunda familia, gracias a Alberto, eres una magnífica persona y gran compañero, gracias a Álvaro que tanto ha aportado en este proyecto y por ayudarme tanto. Gracias a Mari que has sido mi compañera durante un largo trayecto en nuestra formación y de ahí me llevo una gran amiga, a Cinta por demostrarme que siempre hay humor en los momentos más difíciles. Gracias a Ernestina por haber formado parte de esta tesis, gracias a Verónica por animarme y ser una gran confidente. Muchas gracias a Paola, Aroa, Manoli, Bárbara, Isis y Nuno por conseguir que este trayecto sea más agradable y llevadero.

Muchas gracias José por demostrarme lo que es el apoyo incondicional, gracias por apoyarme y ayudarme a seguir cuando las fuerzas flaqueaban, eres mi pilar. Muchas gracias a mi madre por apoyarme en este camino y por supuesto a mi familia política por animarme en este proyecto. Gracias Sonia que a pesar de la distancia nos hemos apoyado mutuamente, siempre estás presente.

## RESUMEN

Este trabajo se centra en estudiar la función del núcleo incertus (NI) en la memoria de reconocimiento social y como su lesión afecta a dicho proceso en un modelo animal con ratas. Se ha visto que el NI presenta proyecciones ascendentes inhibitorias a los sustratos neuroanatómicos que subyacen a la conducta de interacción social y la memoria de reconocimiento social. La lesión excitotóxica del NI produce alteraciones en el test de reconocimiento social pero no en el test de interacción social del paradigma de las tres habitaciones.

A nivel neuroanatómico se han analizado los niveles de expresión de las proteínas de expresión reciente (C-fos y Egr-1) como marcadores de activación neuronal en las áreas prelimbicas, septum, hipocampo, amígdala, hipotálamo, y áreas parahipocampales. Se ha encontrado menores niveles de activación de Egr-1 en los diferentes núcleos de amígdala, septum, e hipotálamo de aquellas ratas con lesión en NI en comparación con el grupo control. Mayores niveles de expresión de Egr-1 en áreas hipocampales y áreas parahipocampales a diferencia de los niveles de expresión de C-fos que eran menores. Estos resultados indicarían diferentes vías de señalización por parte de C-fos y Egr-1, sobre todo la afectación de la vía de señalización Egr-1 ante los casos con lesión en NI.

Se ha reportado por primera vez la distribución anatómica de las fibras RLN3 que surgen desde el núcleo incierto y los receptores RXFP3 presentes en la corteza parahipocampal de la rata. En este estudio se ha encontrado que tanto receptores RXFP3 como fibras RLN3 siguen un patrón de distribución diferente. Se ha encontrado mayor innervación por parte de las fibras RLN3 en capas profundas de LEnt junto con presencia de receptores RXFP3 en capas profundas en MEnt. Esta diferencia en la distribución de fibras y receptores de relaxina-3 puede ser debido a que las sinapsis en las que participan requieran de liberación rápida o lenta.

En este trabajo se demuestra el papel relevante que tiene el NI en los procesos de reconocimiento e interacción social debido a sus innervaciones con el resto de áreas implicadas en dicho proceso. El sistema RXFP3/RLN3 actúa modulando diferentes procesos conductuales como son la ingesta, la regulación de los ritmos circadianos, el consumo de sustancias, y la conducta de vigilia. Para futuras investigaciones, sería investigar la participación del NI junto con el sistema RXFP3/RLN3 en la generación del ritmo theta junto con la memoria espacial.



## Índice

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>Índice.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>ABREVIACIONES.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>20</b>
1.1. Reconocimiento e interacción social.....	21
1.2. Sustrato anatómico del comportamiento social.....	21
1.2.1. Corteza prefrontal.....	22
1.2.2. Septum.....	25
1.2.3. Hipocampo.....	27
1.2.4. Áreas parahipocámpicas.....	31
1.2.5. Amígdala.....	34
1.2.6. Hipotálamo.....	36
1.2.7. Sinopsis de estructuras telencefálicas que modulan la conducta social.....	37
1.3. Sistemas moduladores de la conducta.....	38
1.3.1. Sistemas Monoaminérgicos.....	38
1.3.2. Sistemas Peptidérgicos.....	40
1.4. Relaxina-3.....	42
1.5. Núcleo Incertus y sus conexiones con el resto de áreas.....	44
1.6. Papel del sistema relaxina-3/RXFP3 en procesos afectivos y emocionales.....	49
<b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>52</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>54</b>
3.1. Animales.....	55
3.2. Lesión excitotóxica del núcleo incertus.....	55
3.3. Laberinto de 3 habitaciones.....	56
3.4. Fijación.....	57
3.5. Innervación del área entorrinal por el núcleo incertus.....	59
3.6. Inyecciones de Trazadores.....	59

3.7.	Fijación y microtomía.....	60
3.7.1.	Revelado de los trazadores .....	60
3.7.2.	Dextranamina biotinilada BDA .....	60
3.7.3.	Trazadores retrógrados .....	61
3.8.	Marcajes inmunofluorescentes múltiples .....	62
3.8.1.	Revelado de inmunofluorescencia Fluorogold-RLN3 proteínas ligadoras de calcio62	
3.8.2.	Revelado de inmunofluorescencia RLN3 y sinaptofisina.....	63
3.8.3.	Hibridación múltiple fluorescente <i>in situ</i> .....	63
3.9.	Análisis de imagen y cuantificación .....	64
3.10.	Análisis estadísticos.....	65
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>66</b>
4.1.	Efectos de la lesión del núcleo incertus sobre el reconocimiento social y la expresión de IEGs.....	67
4.1.1.	Efecto de la lesión excitotóxica del NI en el comportamiento social en ratas 67	
4.1.2.	Efecto de la lesión excitotóxica del NI en la distribución y los niveles de activación inmunoreactividad de Fos y Egr-1 .....	71
4.1.3.	Áreas Corticales .....	71
4.1.4.	Amígdala y amígdala extendida.....	74
4.1.5.	Hipocampo .....	77
4.1.6.	Área septal .....	80
4.1.7.	Hipotálamo anterior .....	81
4.1.8.	Áreas parahipocámpicas .....	84
4.2.	Innervación del núcleo incertus sobre la corteza entorrinal.....	86
4.2.1.	Proyección desde el núcleo incertus sobre la corteza entorrinal.....	89
4.2.2.	La corteza entorrinal lateral .....	90
4.2.3.	La corteza entorrinal medial.....	92
4.2.4.	Contactos entre las fibras RLN3 y las neuronas identificadas de la corteza parahipocampal .....	94

4.2.5. Aparición de RLN3 en marcadores sinápticos .....	96
4.2.6. Aparición de RXFP3 y RLN3 en la corteza entorrinal.....	96
<b>5. Discusión .....</b>	<b>99</b>
5.1. Efectos de la lesión del núcleo incertus sobre el reconocimiento social.....	100
5.2. Efectos sobre el comportamiento.....	100
5.3. Efectos sobre la expresión de genes de actividad inmediata .....	101
5.4. Inervación de la corteza parahipocámpica del sistema NI-RLN3-RXFP3....	106
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>109</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

<b>TABLA 1</b> PÉPTIDOS DE RELAXINA Y SIMILARES A LA INSULINA CON SUS RESPECTIVOS RECEPTORES A LOS QUE SON AFINES Y LA LOCALIZACIÓN DE LOS LIGANDOS. ....	43
<b>TABLA 2.</b> DENSIDADES DE INMUNOMARCAJE DE LAS PROTEÍNAS FOS Y EGR-1 EN ÁREAS DE LA CORTEZA PREFRONTAL. ....	72
<b>TABLA 3</b> DENSIDADES DE FOS Y EGR-1 EN LOS DIFERENTES NÚCLEOS DE LA AMÍGDALA. ....	77
<b>TABLA 4</b> DENSIDADES DE FOS Y EGR-1 EN HIPOCAMPO VENTRAL Y DORSAL. ....	78
<b>TABLA 5</b> DENSIDADES DE FOS Y EGR-1 EN SEPTUM. ....	81
<b>TABLA 6</b> DENSIDADES DE FOS Y EGR-1 EN HIPOTÁLAMO. ....	82
<b>TABLA 7</b> DENSIDADES DE FOS Y EGR-1 EN LOS DIFERENTES NÚCLEOS DE ENTORRINAL. ....	84
<b>FIGURA 1</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL RECEPTOR DE RELAXINA (RXFP3) JUNTO A SU LIGANDO (RLN3) DESENCADENANDO INTRACELULARMENTE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE RLN3. ESTA VÍA PRESENTA DOS DIRECCIONES, POR UNA PARTE PROVOCA LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE CAMP MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA ADENILATO CICLASA (AC), Y, POR OTRA PARTE, ES CAPAZ DE ACTIVAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE PERK. IMAGEN REALIZADA A TRAVÉS DE ILLUSTRATOR Y BIORENDER. ....	43
<b>FIGURA 2</b> ILUSTRACIÓN REALIZADA POR RAMÓN Y CAJAL DONDE SE REPRESENTAN LAS CONEXIONES DE LOS CUERPOS MAMILARES, HABÉNULA Y NÚCLEOS INTERPEDUNCULARES. EN “F” APARECE UN NÚCLEO SEGMENTAL DORSAL QUE ES EN REALIDAD EL NÚCLEO INCERTUS. TOMADO DE S RAMÓN Y CAJAL, 1931- RECUERDOS DE MI VIDA. 3ª EDICIÓN, MADRID 1923. ....	44
<b>FIGURA 3 A)</b> ESQUEMA QUE REPRESENTA LAS PROYECCIONES DEL NI SOBRE LAS ESTRUCTURAS TELEENCEFÁLICAS QUE CONTROLAN LOS PROCESOS COGNITIVOS Y EMOCIONALES. EN EL ESQUEMA SE DETALLA TAMBIÉN LA POSIBLE INTERFERENCIA DE ESTE SISTEMA DE PROYECCIONES CON EL SISTEMA QUE CONTROLA LOS PROCESOS MOTIVACIONALES Y ADICTIVOS DE LAS VÍAS MESO-CORTICO-LÍMBICA. TOMADO DE NOVA-MARQUÉS ET AL., 2018. <b>B)</b> SECCIONES CORONALES A NIVEL DEL PUENTE DONDE SE ILUSTRAN LA LOCALIZACIÓN DEL NÚCLEO INCERTUS MEDIANTE GIEMSA, MEDIANTE MARCAJE RETRÓGRADO CON UNA INYECCIÓN DE CRB EN EL SEPTUM MEDIAL, INMUNOCITOQUÍMICA FRENTE A RELAXIN3 E INMUNOCITOQUÍMICA FRENTE A CCK. ....	48
<b>FIGURA 4</b> LÍNEA DE TIEMPO DEL EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL. LOS MISMOS ANIMALES QUE SE UTILIZARON PARA LOS ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO SE ANALIZARON LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE IEG. ....	57
<b>FIGURA 5</b> LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL NI. <b>A)</b> UN CASO CONTROL EN EL QUE SE REPRESENTAN LAS PRINCIPALES DIVISIONES DEL NI. <b>B)</b> EXTENSIÓN DE LA LESIÓN EN LA RATA MJC16. BARRA DE ESCALA, 100 μM. <b>C-E)</b> DIBUJOS CON CÁMARA LÚCIDA DE LA EXTENSIÓN DE LAS LESIONES EN LOS CASOS MJC7, MJC9, MJC13 Y MJC16 EN LOS NIVELES DE BREGMA - 8.88MM <b>(C)</b> , -9.18 MM <b>(D)</b> Y -9.48 MM <b>(E)</b> . <b>F-H)</b> DIBUJOS CON CÁMARA LÚCIDA DE LA EXTENSIÓN DE LAS LESIONES EN LOS CASOS MJC17, MJC19, MJC 29 Y MJC34 EN LOS NIVELES DE BREGMA -8.88 MM <b>(F)</b> , -9.18 MM <b>(G)</b> Y -9.48 MM <b>(H)</b> . BARRA DE ESCALA, 100 μM. ....	69
<b>FIGURA 6</b> EFECTO DE LA LESIÓN EXCITOTÓXICA DEL NI DURANTE LOS TEST DE SOCIABILIDAD Y RECONOCIMIENTO SOCIAL. <b>(A-D)</b> EJEMPLOS DEL SEGUIMIENTO DE UN SUJETO EXPERIMENTAL DEL GRUPO CONTROL <b>(A, C)</b> Y DEL GRUPO CON LESIÓN EN	

NI **(B, D)** DURANTE LA EXPLORACIÓN EN LAS TRES HABITACIONES EN EL TEST DE INTERACCIÓN SOCIAL Y EN EL DE PREFERENCIA O RECONOCIMIENTO SOCIAL. **(E)** PORCENTAJE DEL TIEMPO TOTAL DEL TEST DEDICADO A EXPLORAR UN SUJETO CONESPECÍFICO Y UN OBJETO INANIMADO. LA LESIÓN DEL NI NO ALTERÓ LA PREFERENCIA POR EL SUJETO CONESPECÍFICO SOBRE EL OBJETO. **(F)** EN EL PRIMER TEST, TANTO LOS SUJETOS DEL GRUPO CONTROL COMO LOS DEL GRUPO DE LESIONADOS PASARON MÁS TIEMPO OLFATEANDO A LOS SUJETOS CONESPECÍFICOS QUE A LOS OBJETOS. **(G)** EN EL SEGUNDO TEST, LOS SUJETOS CONTROL PASAN MÁS TIEMPO EN LA HABITACIÓN QUE CONTIENE AL SUJETO NUEVO QUE EN AQUELLA HABITACIÓN EN LA QUE SE SITÚA EL CONESPECÍFICO YA CONOCIDO. MIENTRAS QUE EL GRUPO DE LESIÓN NO MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN CUANTO AL TIEMPO QUE PASARON EN AMBAS HABITACIONES. **(H)** TIEMPO DE OLFATEO ENTRE SUJETO CONESPECÍFICO FAMILIAR O NUEVO. LAS RATAS DEL GRUPO CONTROL GASTAN SIGNIFICATIVAMENTE MÁS TIEMPO OLFATEANDO LOS SUJETOS CONESPECÍFICOS NUEVOS QUE LOS FAMILIARES, A DIFERENCIA DEL GRUPO DE LESIONADOS EN LOS QUE NO SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN TIEMPOS DE OLFATEO ENTRE CONESPECÍFICOS NUEVOS O FAMILIARES (\*\* $p = 0.01$  Y \*\*\* $p < 0.001$ ,  $N = 13$  RATAS CONTROL Y  $N = 8$  RATAS CON LESIÓN EN NI). ..... 70

**FIGURA 7** ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE EXPRESIÓN TEMPRANA EN ÁREAS CORTICALES TRAS EL PARADIGMA SOCIAL EN RATAS CONTROL Y CON LESIÓN EN EL NI. **(A)** ILUSTRACIÓN DE LAS ÁREAS CORTICALES DEL PREFRONTAL A ESTUDIAR. **(B)** HISTOGRAMA QUE REPRESENTA DE LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS QUE CONTIENEN INMUNOREACTIVIDAD (IR) DE FOS EN ESAS ÁREAS CORTICALES. **(C-F)** IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS DE C-FOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL. **(G)** ILUSTRACIÓN DE LAS ZONAS NEUROANATÓMICAS A ESTUDIAR (ÁREAS ENCUADRADAS). **(H)** HISTOGRAMA QUE REPRESENTA LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS QUE CONTIENEN IR DE Egr-1 EN LAS ÁREAS A ESTUDIAR. LOS DATOS ESTÁN REPRESENTADOS COMO LA MEDIA  $\pm$  SEM Y REPRESENTAN EL ÁREA OCUPADA POR LOS NÚCLEOS INMUNOPOSITIVOS Egr-1, DIVIDIDA POR EL ÁREA TOTAL ANALIZADA. **(I-L)** IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS DE Egr-1 EN LA CORTEZA PIRIFORME (PIR) Y PERIRHINAL PRH. BARRA DE CALIBRACIÓN EN TODAS LAS MICROGRAFÍAS, 100  $\mu$ M. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , PRUEBA DE DOS COLAS PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIANA DE MANN-WHITNEY,  $N=13$  RATAS CONTROL Y  $N=8$  RATAS CON LESIÓN EN NI)..... 73

**FIGURA 8** ACTIVACIÓN DE IEGs EN NÚCLEOS DE LA AMÍGDALA TRAS LOS PARADIGMAS CONDUCTUALES. **(A, B)** ILUSTRACIÓN DE LAS ÁREAS DE LA AMÍGDALA A DIFERENTES NIVELES CORONALES (ZONAS ENCUADRADAS A ESTUDIO). **(C)** HISTOGRAMA DE LA DENSIDAD DE Egr-1 QUE CONTIENEN LAS NEURONAS EN LOS DIFERENTES NÚCLEOS DE LA AMÍGDALA. **(D-S)** IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE Egr-1 DE AMBOS GRUPOS EXPERIMENTALES (CONTROL Y LESIONADOS). **(D, E)** NÚCLEO ENDOPIRIFORME DORSAL; **(F,G)** NÚCLEO DE LA AMÍGDALA LATERAL; **(H, I)** NÚCLEO DE LA AMÍGDALA BASOMEDIAL; **(J, K)** NÚCLEO DE LA AMÍGDALA BASOLATERAL; **(L, M)** ÁREA DE LA AMÍGDALA DE TRANSICIÓN AMÍGDALAHIPOCAMPAL; **(N, O)** AMÍGDALA CENTRAL; **(P, Q)** AMÍGDALA MEDIAL PORSTERIODORSAL; **(R, S)** AMÍGDALA MEDIAL ANTERODORSAL. BARRA DE CALIBRACIÓN, 100  $\mu$ M. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , TEST DE DOS COLAS PARA COMPARACIONES DE MEDIAS; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  PARA MANN-WHITNEY COMPARACIÓN DE MEDIANAS,  $N = 13$  RATAS CONTROL Y  $N = 8$  RATAS CON LESIÓN EN NI). ..... 76

**FIGURA 9** ACTIVACIÓN DE IEGs EN EL HIPOCAMPO TRAS LOS PARADIGMAS CONDUCTUALES EN RATAS PERTENECIENTES AL GRUPO EXPERIMENTAL CONTROL Y LESIÓN. **(A, B)** ILUSTRACIÓN DE LAS ÁREAS DE HIPOCAMPO DORSAL Y VENTRAL A DIFERENTES NIVELES CORONALES (ZONAS ENCUADRADAS A **(I-P)** IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE Egr-1 DEL GRUPO

CONTROL Y DE LOS LESIONADOS, RESPECTIVAMENTE, EN (I, J) CA2; (K, L) CA1; (M, N) SUBICULUM; Y (O, P) CAPA POLIFORME DEL GIRO DENTADO. BARRA DE CALIBRACIÓN, 100  $\mu$ M. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, TEST DE DOS COLAS PARA COMPARACIONES DE MEDIAS; #P < 0.05, ##P < 0.01 PARA MANN-WHITNEY COMPARACIÓN DE MEDIANAS, N = 13 RATAS CONTROL Y N = 8 RATAS CON LESIÓN EN NI). ..... 79

**FIGURA 10** ACTIVACIÓN DE IEGs EN SEPTUM E HIPOTÁLAMO TRAS LOS PARADIGMAS CONDUCTUALES EN RATAS

PERTENECIENTES AL GRUPO EXPERIMENTAL CONTROL Y LESIÓN. (A) ILUSTRACIÓN DE LAS ÁREAS SEPTALES ANALIZADAS (ZONAS ENCUADRADAS A ESTUDIO). (B) HISTOGRAMA DE LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS (MEDIA  $\pm$  SEM) QUE CONTIENEN EGR-1 EN VARIAS ÁREAS DE SEPTUM. (C-J) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE EGR-1 DEL GRUPO CONTROL Y DE LOS LESIONADOS, RESPECTIVAMENTE, EN (C, D) BANDA DIAGONAL VERTICAL; (E, F) BANDA DIAGONAL HORIZONTAL; (G, H) DIVISIÓN INTERMEDIA DEL SEPTUM LATERAL; Y (I, J) DIVISIÓN VENTRAL DEL SEPTUM LATERAL. (K) ÁREA ANALIZADA DEL HIPOTÁLAMO. (L) HISTOGRAMA DE LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS (MEDIA  $\pm$  SEM) QUE CONTIENEN EGR-1 EN VARIAS ÁREAS DEL HIPOTÁLAMO. (M, P) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE EGR-1 DEL GRUPO CONTROL Y DE LOS LESIONADOS, RESPECTIVAMENTE, EN (M, N) ÁREA HIPOTALÁMICA ANTERIOR; Y (O, P) ÁREA HIPOTALÁMICA LATERAL. BARRA DE CALIBRACIÓN, 100  $\mu$ M. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, TEST DE DOS COLAS PARA COMPARACIONES DE MEDIAS; #P < 0.05, ##P < 0.01 PARA MANN-WHITNEY COMPARACIÓN DE MEDIANAS, N = 13 RATAS CONTROL Y N = 8 RATAS CON LESIÓN EN NI)..... 83

**FIGURA 11** ACTIVACIÓN DE IEGs EN LAS CAPAS CORTICALES Y PROFUNDAS DE ENTORRINAL TRAS LA REALIZACIÓN DE LOS TEST

EN RATAS PERTENECIENTES AL GRUPO EXPERIMENTAL CONTROL Y LESIÓN. (A) ILUSTRACIÓN DE LAS ÁREAS ENTORRINALES ANALIZADAS (ZONAS ENCUADRADAS A ESTUDIO). (B, C) HISTOGRAMA DE LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS (MEDIA  $\pm$  SEM) QUE CONTIENEN EGR-1 EN VARIAS ÁREAS DE ENTORRINAL EN CAPAS CORTICALES Y PROFUNDAS. (D-G) IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE EGR-1 DEL GRUPO CONTROL Y DE LOS LESIONADOS, RESPECTIVAMENTE, EN CAPAS CORTICALES DE (D, E) ENTORRINAL LATERAL; (F, G) CORTEZA PERIRRINAL; Y EN CAPAS PROFUNDAS (H, K), DE ENTORRINAL LATERAL (H, I); Y ENTORRINAL MEDIAL (J, K). (K) ÁREA ANALIZADA DEL HIPOTÁLAMO. (L) HISTOGRAMA DE LA DENSIDAD DE LAS NEURONAS (MEDIA  $\pm$  SEM) QUE CONTIENEN EGR-1 EN VARIAS ÁREAS DEL HIPOTÁLAMO. BARRA DE CALIBRACIÓN, 100  $\mu$ M. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, TEST DE DOS COLAS PARA COMPARACIONES DE MEDIAS. N = 13 RATAS CONTROL Y N = 8 RATAS CON LESIÓN EN NI). ..... 85

**FIGURA 12** REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES NIVELES DE LA CORTEZA PARAHIPOCAMPAL Y LAS REGIONES QUE LA

COMPONEN. A) NIVEL DEL ÁREA PARAHIPOCAMPAL MÁS ROSTRAL CORRESPONDIENTE AL NIVEL -5.6 MM CON RESPECTO A BREGMA. B) SEGUNDO NIVEL DE LA CORTEZA PARAHIPOCAMPAL A ESTUDIAR CORRESPONDIENTE AL NIVEL -5.9 MM CORRESPONDIENTE A BREGMA. C) TERCER NIVEL A ESTUDIO CORRESPONDIENTE AL NIVEL -6.3 MM CON RESPECTO A BREGMA. D) CUARTO NIVEL A ESTUDIO CORRESPONDIENTE AL NIVEL -6.7 MM CON REFERENCIA A BREGMA. E) QUINTO NIVEL DE ESTUDIO DE LA CORTEZA PARAHIPOCAMPAL CORRESPONDIENTE AL NIVEL -6.9 MM DE BREGMA. F) SEXTO NIVEL A ESTUDIAR DEL NIVEL -7.3 MM CON RESPECTO A BREGMA. G) SÉPTIMO NIVEL A ESTUDIO CORRESPONDIENTE AL NIVEL -7.6 MM DE BREGMA. .... 87

**FIGURA 13** MARCAJE RETRÓGRADO EN EL NI TRAS INYECCIÓN DE FLUOROGOLD EN LA CORTEZA ENTORRINAL MEDIAL. A.-

PUNTO DE INYECCIÓN EN EL NIVEL 7 DE LA CORTEZA ENTORRINAL MEDIAL. B) MARCAJE RETRÓGRADO EN LAS PARTES COMPACTA Y DISIPATA DEL NÚCLEO INCERTUS IPSILATERAL. EL MARCAJE EN EL LADO CONTRALATERAL ERA

APROXIMADAMENTE EL 20 % DEL TOTAL DEL MARCAJE RETRÓGRADO EN EL NÚCLEO INCERTUS. BARRAS DE CALIBRACIÓN EN A 1 MM, EN B 100µM. ....	89
<b>FIGURA 14</b> A, B) IMAGEN DE LA LÉNT CON TINCIÓN DE GIEMSA JUNTO CON LAS SEIS CAPAS CELULARES QUE LA COMPONEN. C) REPRESENTACIÓN DE FIBRAS RLN3 EN LÉNT. D) INMUNORREACTIVIDAD DE RLN3 JUNTO CON MARCAJE DE UN TRAZADOR RETRÓGRADO (FG). E) REPRESENTACIÓN DE FIBRAS RLN3 EN LÉNT JUNTO CON MARCAJE DE PARVALBUMINA (PV). F) INMUNORREACTIVIDAD DE CALBINDINA (CB) JUNTO CON MARCAJE DE UN TRAZADOR ANTERÓGRADO (BDA).....	91
<b>FIGURA 15</b> A, B) IMAGEN DE LA MÉNT CON TINCIÓN DE GIEMSA JUNTO CON LAS SEIS CAPAS CELULARES QUE LA COMPONEN. C) REPRESENTACIÓN DE FIBRAS RLN3 EN LÉNT. D) INMUNORREACTIVIDAD DE RLN3 JUNTO CON MARCAJE DE UN TRAZADOR RETRÓGRADO (FG). E) REPRESENTACIÓN DE FIBRAS RLN3 EN MÉNT JUNTO CON MARCAJE DE PARVALBUMINA (PV). F) INMUNORREACTIVIDAD DE CALBINDINA (CB) JUNTO CON MARCAJE DE UN TRAZADOR ANTERÓGRADO (BDA).....	93
<b>FIGURA 16</b> IMÁGENES DE MARCAJES DE INMUNOFLUORESCENCIA OBTENIDAS A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO CONFOCAL. A) MARCAJE DE FIBRAS DE RLN3, NEURONAS MARCADAS CON EL TRAZADOR DE FLUOROGOLD (FG), Y EXPRESIÓN DE CALRETININA (CR) EN CORTEZA PERIRRINAL. BARRA DE CALIBRACIÓN 200 µM. B-E) DOBLES MARCAJES EN NEURONAS CON FG Y CR EN UNA AMPLIA ZONA QUE CONTIENE GIRO DENTADO Y CA1. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 µM. F-I) MARCAJE DEL TRAZADOR FG Y CR EN NEURONAS LOCALIZADAS EN LÉNT JUNTO CON CONTACTO CON FIBRAS RLN3. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 µM. J-M) MARCAJE DEL TRAZADOR FG Y CR EN NEURONAS LOCALIZADAS EN CAPAS PROFUNDAS DE LÉNT Y DENT JUNTO CON CONTACTO CON FIBRAS RLN3. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 µM. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 µM.....	95
<b>FIGURA 17</b> A) MARCAJE DE SINAPTOFISINA (SYN) EN CORTEZA PERIRRINAL. B) INMUNOMARCAJE DE FIBRAS RLN3 EN CORTEZA PERIRRINAL. C) COLOCALIZACIÓN DE FIBRAS RLN3 Y MARCAJE DE SYN EN CORTEZA PERIRRINAL. D) MARCAJE DE SINAPTOFISINA (SYN) EN CAPAS SUPERFICIALES DE MÉNT. E) INMUNOMARCAJE DE FIBRAS RLN3 EN CAPAS SUPERFICIALES DE MÉNT. F) COLOCALIZACIÓN DE FIBRAS RLN3 Y MARCAJE DE SYN EN CAPAS SUPERFICIALES DE MÉNT. G) MARCAJE DE SINAPTOFISINA (SYN) EN CAPAS PROFUNDAS DE MÉNT. H) INMUNOMARCAJE DE FIBRAS RLN3 EN CAPAS PROFUNDAS DE MÉNT. I) COLOCALIZACIÓN DE FIBRAS RLN3 Y MARCAJE DE SYN EN CAPAS PROFUNDAS DE MÉNT. BARRA DE CALIBRACIÓN 10 µM J) IMÁGENES DE CONFOCAL DE RNASCOPE DE RLN3 JUNTO CON EL RECEPTOR RXFP3 EN LÉNT. K) IMÁGENES DE CONFOCAL DE RNASCOPE DE RLN3 JUNTO CON EL RECEPTOR RXFP3 EN MÉNT. BARRA DE CALIBRACIÓN 20 µM. ....	97
<b>FIGURA 18</b> A) IMAGEN DE UNA HIBRIDACIÓN MÚLTIPLE IN SITU FLUORESCENTE RNASCOPE ©, OBTENIDA A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO CONFOCAL. B) MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES RXFP3 Y FIBRAS DE RLN3 EN LAS DIFERENTES ÁREAS DE LA CORTEZA ENTORRINAL. REPRESENTADO EN CÍRCULOS ROJOS AQUELLOS SOMAS NEURONALES CON PRESENCIA DE RECEPTORES RXFP3, REPRESENTADO EN CÍRCULOS AMARILLOS AQUELLOS SOMAS NEURONALES CON PRESENCIA DE RECEPTORES RXFP3 JUNTO CON FIBRAS ADYACENTES A DICHS SOMAS. ....	98

## ABREVIACIONES

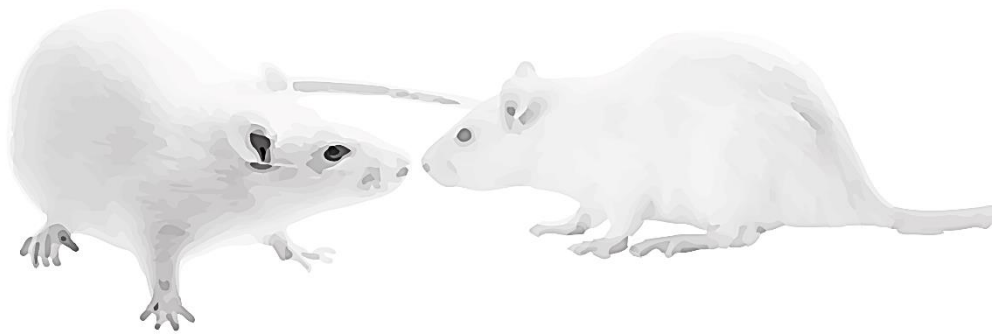
<b>5HT</b>	Serotonina
<b>AA</b>	Área Amigdaloides Anterior
<b>AHiAL</b>	Amígdala Anterolateral
<b>AHiPM</b>	Amígdala Posteromedial
<b>AHiTr</b>	Área de transición amígdalohipocámpal
<b>AOB</b>	Bulbo Accesorio Olfativo
<b>AP</b>	Antero-posterior
<b>BLA</b>	Amígdala Basolateral
<b>BMA</b>	Amígdala Basomedial Anterior
<b>BNST</b>	Núcleo de la <i>stria terminalis</i>
<b>CA1</b>	<i>Cornu Ammonis 1</i>
<b>CA2</b>	<i>Cornu Ammonis 2</i>
<b>CA3</b>	<i>Cornu Ammonis 3</i>
<b>CB</b>	Calbindina
<b>CeA</b>	Amígdala Central
<b>ChAT</b>	Acetiltransferasa Colina
<b>CR</b>	Calretinina
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de Corticotropina
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DEn</b>	Área Endopiriforme Dorsal
<b>DG</b>	Giro Dentado



<b>dHPC</b>	Hipocampo dorsal
<b>dIPFC</b>	Corteza Prefrontal Dorsolateral
<b>dPFC</b>	Corteza Prefrontal Dorsal
<b>DR</b>	Núcleo Dorsal de Rafe
<b>DTg</b>	Núcleo Tegmental Dorsal
<b>DV</b>	Dorso-ventral
<b>EC</b>	Corteza Entorrinal
<b>ERK</b>	Quinasas Reguladas Externamente
<b>FG</b>	Fluorogold
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAD</b>	Glutamato Descarboxilasa
<b>GC</b>	Liberación de Glucocorticoides
<b>HPA</b>	Eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal
<b>HPC</b>	Hipocampo
<b>icv</b>	Intracerebroventricular
<b>IEG</b>	Proteínas de expresión reciente
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Corteza Infralimbica
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LEC</b>	Corteza Entorrinal Lateral
<b>LS</b>	Septum Lateral
<b>ML</b>	Medial-lateral
<b>MeA</b>	Amígdala Medial
<b>MeAV</b>	Amígdala Medial Anterio-ventral

<b>MeAD</b>	Amígdala Medial Anterio-dorsal
<b>MEC</b>	Corteza Entorrinal Medial
<b>MOB</b>	Bulbo Olfativo Principal
<b>MePD</b>	Amígdala Medial Posterio-dorsal
<b>MePV</b>	Amígdala Medial Posterio-ventral
<b>mPFC</b>	Corteza Prefrontal Medial
<b>mR</b>	Minirubi
<b>MRS</b>	Memoria de Reconocimiento Social
<b>MS</b>	Séptum Medial
<b>NI</b>	Nucleus Incertus
<b>Nlc</b>	<i>Pars Compacta</i> del NI
<b>Nld</b>	<i>Pars Disipata</i> del NI
<b>OXT ó OTR</b>	Oxitocina
<b>PaS</b>	Parasubiculum
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pERK</b>	Fosforilación en ERK
<b>PER</b>	Región Peririnal
<b>PFC</b>	Corteza Prefrontal
<b>PHC</b>	Región Parahipocampal
<b>PL</b>	Corteza Prelimbica
<b>PMCo</b>	Amígdala Cortical Posteromedial
<b>PoDG</b>	Capa Polimórfica del Giro Dentado
<b>POR</b>	Región Postrinal
<b>prS</b>	Presubiculum

<b>PV</b>	Parvalbumina
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular
<b>RLX3</b>	Relaxina-3
<b>RXFP3</b>	Receptor de Relaxina-3
<b>SON</b>	Núcleo Supraóptico
<b>STIA</b>	Parte Intraamigdala
<b>STMA</b>	Amígdala Anterior
<b>STMV</b>	Amígdala Ventral
<b>STr</b>	Área de Transición Subicular
<b>TEA</b>	Trastorno del Espectro Autista
<b>TEPT</b>	Trastorno por Estrés Postraumático
<b>TS</b>	Triangular Septal
<b>VEn</b>	Área Endopiriforme Ventral
<b>VHM</b>	Hipotálamo Ventromedial
<b>VHMvl</b>	Subdivisión ventro-lateral del Hipotálamo Ventromedial
<b>vHPC</b>	Hipocampo Ventral
<b>VP</b>	Vasopresina
<b>vPFC</b>	Corteza Prefrontal Ventral
<b>vPoRh</b>	Corteza Ventral Postrinal
<b>dPoRh</b>	Postrinal Dorsal
<b>VTA</b>	Área Ventral Tegmental
<b>V1aR</b>	Receptor de Vasopresina 1



# 1. Introducción

## 1.1. Reconocimiento e interacción social

---

Las relaciones sociales se establecen sobre la base del reconocimiento de individuos de la misma especie. Este elemento constituye el eje central sobre la que se asignan distintos papeles, categorías y relaciones y en función de ello se desarrollan las interacciones adecuadas en cada momento. La capacidad para reconocer a conoespecíficos conocidos como sujetos familiares, ha facilitado la adaptación al entorno, y, por tanto, la supervivencia. Este proceso es conocido como memoria de reconocimiento social (MRS) (Albert-Gasco et al., 2019), y es fundamental para el desarrollo de todo individuo.

En humanos, el comportamiento social es el resultado complejo de la interacción entre procesos cognitivos y de reconocimiento social; importante para las relaciones interpersonales, aprendizaje, conducta sexual, toma de decisiones, agresividad, y colaboración. Estos procesos engloban desde la percepción, análisis, recolección y almacenamiento de información relevante del estímulo social hasta el olvido (Lopatina et al., 2018).

## 1.2. Sustrato anatómico del comportamiento social

---

A nivel neuroanatómico, existen diversas áreas cerebrales implicadas en el procesamiento cognitivo de información con contenido social, y el reconocimiento y/o interacción social. Tanto roedores como primates no humanos, se han utilizado como modelos experimentales para poder identificar los sustratos que subyacen a la conducta social (Cacioppo, 2002; Insel & Fernald, 2004; Silverman et al., 2010). Se han encontrado conductas prosociales en ratas similares al comportamiento en primates, como el vínculo y la interacción social con conoespecíficos (Bartal et al., 2014). En el caso de los ratones también se han reportado conductas sociales en forma de agresión territorial y apareamiento a través de las señales y la conducta olfativa (Rennie et al., 2013). En ambas especies de roedores se han encontrado respuestas empáticas, contagio emocional y aprendizaje vicario (Atsak et al., 2011; Jeon et al., 2010).

Se encuentran diferencias entre los procesos de aprendizaje y los diferentes tipos de memoria de diferentes especies animales, pero en general, se muestran mismos sustratos neuroanatómicos. En humanos, áreas como el lóbulo temporal

medial se encarga de la memoria episódica llevando a cabo procesos cognitivos asociados a la planificación y a la prospección, al igual que el lóbulo temporal anterior, que también participa en este último proceso, además de analizar procesos cognitivos de juicio y de procesamiento de expresión facial, esta área se encarga de la memoria semántica asociativa. La zona del estriado, encargada de la memoria instrumental, participa también en el procesamiento de los procesos cognitivos de juicio, afecto, y procesos de acción y decisión. La amígdala responsable de la memoria con contenido afectivo, participa en el procesamiento de estímulos afectivos (al igual que el estriado), expresión facial, y la respuesta conductual de evitación o de parálisis (Amodio, 2019).

Poder previamente reconocer a una persona que ya se conoce, permitirá poder comunicar e interactuar con ella. Varios trastornos neurológicos se han asociado con cambios dramáticos en el comportamiento social como los trastornos neurodegenerativos, trastornos del desarrollo, trastornos del espectro autista (TEA) y de la esquizofrenia (American Psychiatric Association. & American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force., 2013; Lopatina et al., 2018). Dichos trastornos se han caracterizado por una desconexión entre el individuo y su entorno sobretodo en lo referente al entorno humano. El TEA es un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por déficits en la cognición social, en el aprendizaje, memoria, emoción, en la teoría de la mente, en el lenguaje, la comunicación, y por patrones de conducta estereotipados; a los que subyacen conexiones con múltiples áreas disfuncionales (Bruining et al., 2010; Geschwind, 2009; R.-A. Müller, 2007).

En animales el reconocimiento social se reduce al interés que tiene el sujeto experimental por nuevos objetos sociales o una reducción de las conductas espontáneas de exploración ante otro sujeto conespecífico familiar (Lopatina et al., 2018). A nivel neuroanatómico, se ha estudiado que ciertas áreas como la amígdala, el hipocampo, el septum, y el hipotálamo se relacionan con el procesamiento del reconocimiento y la interacción social en ratas (Albert-Gasco et al., 2019; F. E. Olucha-Bordonau et al., 2012).

### 1.2.1. Corteza prefrontal

---

La corteza prefrontal (PFC) comienza a ser perceptible a partir de las semanas 25-26 de gestación (Stiles & Jernigan, 2010). Posteriormente, presenta un desarrollo temprano durante la infancia, PFC presenta una reducción de crecimiento durante la adolescencia y, finalmente, un leve aumento de crecimiento y estabilización durante la edad adulta.

Éste patrón de desarrollo estaría ligado a la maduración de los circuitos cortico-corticales de PFC (Casey et al., 2005; Caviness et al., 1996).

La PFC en humanos puede dividirse anatómicamente en corteza orbitofrontal (ofPFC), corteza prefrontal dorsal (dIPFC), corteza prefrontal ventral (vIPFC), y corteza prefrontal medial (mPFC) (Amodio & Frith, 2006; Raine, 2009). La PFC es el elemento central en el procesamiento cognitivo complejo considerado exclusivamente humano (Teffer & Semendeferi, 2012). Esos procesos cognitivos complejos son agrupados bajo el término de funciones ejecutivas, controladas principalmente, por áreas dorsolaterales (Baddeley, 1992; Fuster, 2000; Jurado & Rosselli, 2007). Las funciones ejecutivas se encargan de capacidades como el mantenimiento de atención, la monitorización de la información en *working memory*, el control inhibitorio, la coordinación de conductas dirigidas a objetivos y la organización de la entrada de información de estímulos procedentes de diferentes modalidades sensoriales (Jurado & Rosselli, 2007; Miller & Cohen, 2001; N. G. Müller et al., 2002). A parte de la función ejecutiva, la PFC, en concreto, la ofPFC, es responsable del procesamiento emocional, lenguaje, y la sociabilidad (Beer et al., 2003; Fellows, 2007). A nivel celular, la PFC está constituida por dos tipos principales de neuronas: neuronas piramidales excitatorias glutamatérgicas, e interneuronas inhibitorias GABAérgicas (B. R. Ferguson & Gao, 2018)

La PFC tiene conexiones con los ganglios basales, tálamo, tronco encéfalo, hipocampo, amígdala y otras regiones neocorticales (Ghashghaei & Barbas, 2002). Dichas conexiones han permitido a la PFC analizar, procesar y producir respuestas emocionales, somatosensoriales, visuales, y auditivas (Miller & Cohen, 2001). Otra conexión importante es el fascículo uncinado que conecta estructuras del sistema límbico con la corteza orbitofrontal, dicha corteza participa en el procesamiento emocional y de recompensa (Lebel et al., 2010).

La mPFC es un sustrato neurobiológico importante para la cognición social y el comportamiento en humanos (Dolan, 2002; Grossmann, 2013). En pacientes con lesión en mPFC se han hallado alteraciones de la conducta social (Eslinger et al., 2004). Existe cierta controversia con respecto a si hay áreas neuroanatómicas comparables con la mPFC en roedores, aunque en algunos estudios se ha demostrado cierta homología funcional entre la mPFC de ambas especies (Amodio & Frith, 2006; Dolan, 2002; Gross & Canteras, 2012; Grossmann, 2013). Por otro lado, se ha reportado que la región mPFC en roedores, es un homólogo a la región dIPFC de los humanos y primates no humanos (Seamans et al., 2008; Uylings et al., 2003). En roedores, la mPFC está

formada por las áreas corticales prelímbica (PreL) e infralímbica (IL). En éstas zonas se han encontrado conexiones con el estriado, hipocampo, amígdala y núcleo accumbens (Caroni, 2018). La mPFC regula la conducta social en roedores, a través de sus conexiones al resto de sistemas neurales, como el sistema olfativo, sistema hipotalámico/tronco encefálico, y amigdalina posterior (Gross & Canteras, 2012).

Se ha observado en humanos que la alteración del balance de excitación/inhibición en la mPFC, hace que sea muy probable que se desarrolle algún trastorno neuropsiquiátrico relacionado con la conducta social (Bicks, 2015; Yizhar, 2012). Se han descubierto reducciones en la respuesta conductual de sociabilidad en lesiones bilaterales de la mPFC (Murray et al., 2015). En otro estudio en el que se evalúa la cognición social mediante el paradigma de las tres habitaciones, se ha reportado una mayor actividad neuronal en el área mPFC ante interacciones olfativas con un conoespecífico nuevo, que ante un objeto o con una habitación vacía (Kaidanovich-beilin et al., 2011). Acorde con estos resultados, se ha encontrado en ratones que la actividad neuronal en la mPFC correlaciona con las conductas sociales de aproximación (E. Lee et al., 2016). En otro estudio se demuestra que la eliminación de la subunidad NR1 del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) en la mPFC de ratones, incrementa la conducta de aproximación social sin afectar a la preferencia por los estímulos sociales novedosos (Finlay et al., 2015).

En enfermedades como la esquizofrenia o el autismo, la PFC dorsolateral y la corteza del cíngulo anterior se muestran afectadas (Teffer & Semendeferi, 2012). Durante el desarrollo, se ha encontrado un menor crecimiento en la PFC dorsolateral en niños con autismo en comparación con los controles (Teffer & Semendeferi, 2012). En otro estudio (Araghi-Niknam & Fatemi, 2003), se ha encontrado altos niveles de moléculas proapoptóticas y bajos niveles de las moléculas apoptóticas en las PFCs de adultos con autismo. También se ha reportado que la materia gris es significativamente mayor en individuos con TEA en comparación con los controles (Billeci et al., 2016). Estudios de RM estructural han encontrado una reducción de la materia gris en el giro frontal inferior izquierdo en jóvenes adultos con TEA (Abell et al., 1999). Hay unos pocos estudios de RM estructural de pacientes con esquizofrenia, pero se ha encontrado anomalías volumétricas en el giro frontal inferior y en el giro frontomedial de la corteza prefrontal; también se ha reportado déficits en el volumen de estas regiones en el hemisferio izquierdo (Honea et al., 2005). La corteza cíngula anterior en pacientes con esquizofrenia se caracteriza por tener neuronas más espaciadas en la capa II, una reducción de densidad neuronal en el cíngulo anterior, y en la corteza prefrontal dorsolateral (dlPFC) (Teffer & Semendeferi, 2012). Aunque, en otros estudios se ha



observado un aumento en la densidad neuronal en la dIPFC (Benes, 1987a, 1987b; Rajkowska et al., 1998; Selemon, 2001).

## 1.2.2. Septum

---

En roedores, el septum está constituido por tres áreas: septum lateral (LS), el septum posterior (PS), y el septum medial (MS). Cada una de estas áreas tienen determinadas funciones. Conjuntamente, el LS y el PS regulan las respuestas conductuales dependientes de contexto como por ejemplo la ansiedad (Gray, J., & McNaughton, 2003), la adicción (Harasta et al., 2015), la regulación de la ingesta (Sweeney & Yang, 2016), la respuesta conductual de exploración (Trent & Menard, 2010), las conductas defensivas (Albert & Wong, 1978), la locomoción (Bender et al., 2015), y el comportamiento social (O'Connell & Hofmann, 2011). El septum medial se encarga de organizar la conducta exploratoria (Martin et al., 2007). Se ha encontrado que lesiones en el MS afecta la ejecución en varias pruebas o paradigmas que evalúan la memoria espacial y la conducta exploratoria (Hagan et al., 1988; M'Harzi & Jarrard, 1992; Mitchell et al., 1982).

El SM recibe proyecciones procedentes de BNST que utilizan vasopresina (VP) (Urban, 1999), mientras que el SL recibe mucha de las proyecciones de VP procedentes del núcleo de la *stria terminalis* (BNST) y de la amígdala medial (MeA) (Caffé et al., 1987; G. J. de Vries & Buijs, 1983). Del mismo modo, la administración de antagonistas para el receptor de VP en LS aumenta el tiempo de juego social en ratas jóvenes (Bredewold et al., 2014) y reduce el tiempo de exploración de nuevos conoespecíficos de ratas machos adolescentes durante los test de reconocimiento social (Veenema et al., 2012). Sin embargo, la administración de VP en LS incrementa el porcentaje de tiempo utilizado en investigar un conoespecífico nuevo en ratas adultas, pero no ocurre lo mismo en ratas macho adolescentes (Veenema et al., 2012). Por otro lado, se ha observado que la administración de antagonistas de oxitocina (OXTR-A) en LS afecta al proceso de reconocimiento social en ratas macho jóvenes (Lukas et al., 2013). No obstante, la administración de OTR en LS reduce el comportamiento de juego social en ratas hembras adolescentes pero ésta administración no afecta al juego social de los machos adolescentes (Bredewold et al., 2014).

En cuanto a sus proyecciones, el LS, que contiene en su mayoría neuronas GABAérgicas inhibitorias (Leroy et al., 2018), tiene múltiples conexiones con el área tegmental ventral (VTA) y la parte ventrolateral del núcleo hipotalámico ventromedial

(VHMvl) . Estas áreas han sido implicadas en la motivación y en la activación; a su vez, recibe proyecciones del tronco encéfalo y de todas las áreas hipocampales (Risold & Swanson, 1997).

Una de las mayores proyecciones neuronales GABAérgicas, glutamatérgicas, y colinérgicas procedentes del SM, se dirigen al hipocampo a través del fórnix (C. Müller & Remy, 2018). La mayoría de las proyecciones septales (~65%) hacia el hipocampo, se originan en neuronas colinérgicas hacia neuronas piramidales, constituyendo la principal fuente de liberación de acetilcolina en hipocampo (Y. Sun et al., 2014). Aproximadamente un 23% de las proyecciones neuronales glutamatérgicas del MS se dirigen al hipocampo, principalmente, a interneuronas hipocampales GABAérgicas (Colom et al., 2005; Y. Sun et al., 2014). Las neuronas GABAérgicas que se dirigen desde MS al hipocampo son, generalmente, parvalbuminas positivas. Sin embargo, las neuronas GABAérgicas hipocampales hacia septum son neuronas que expresan somatostatina (Jinno & Kosaka, 2002). Así mismo, neuronas GABAérgicas hipocampales con dirección al SM, se encuentran en contacto principalmente con neuronas GABAérgicas que expresan parvalbumina y, en menor medida, con neuronas colinérgicas (K. Toth et al., 1993). En un estudio estereológico (Gritti et al., 2006) en el que se cuantificaba las proporciones relativas de neuronas colinérgicas, glutaminérgicas, y GABAérgicas, presentes en el prosencéfalo basal; se encontraron una gran población neuronal compuesta por una pequeña parte de neuronas sintetizadoras de acetil colina (ACh), otra población sintetizadoras de GABA, y la mayoría restante de la población neuronal sintetizadoras de Glu. No obstante, se determina que existe solapamiento ente dichas neuronas, es decir, las neuronas sintetizadoras de ACh también producen GABA e, incluso, pueden producir Glu; del mismo modo, las neuronas glutamatérgicas pueden ser GABAérgicas.

Se ha hipotetizado que una de las funciones del LS es hacer de intermediario entre la información espacial (procedente del hipocampo) y las respuestas conductuales, con el propósito de dirigir la conducta a objetivos (Yadin et al., 1993). Estudios farmacológicos y de lesión han demostrado que las proyecciones del hipocampo hacia LS son necesarios para las respuestas conductuales dependientes de contexto durante las tareas de condicionamiento y navegación (Calandreau et al., 2010; Leutgeb & Mizumori, 1999; Rawlins & Olton, 1982; Taghzouti et al., 1986).

Se ha encontrado, a partir de estudios de electrofisiología, que el SM es un área crítica para la generación del ritmo theta en el hipocampo (Sainsbury & Bland, 1981). Debido a que se ha propuesto el septum como la zona de entrada de disparos

excitatorios rítmicos a células piramidales responsables de la producción del ritmo theta (Vertes & Kocsis, 1997). En concreto, se ha asociado las células de MS y las del núcleo de la banda diagonal ventral (DBv) con la generación del ritmo theta en la formación parahipocampal (Vertes & Kocsis, 1997). De hecho, lesiones o alteraciones en MS/BDv produce la eliminación o deterioro, respectivamente, del ritmo theta en la formación parahipocampal (Vertes & Kocsis, 1997).

En diferentes estudios en los que se han clasificado los tipos neuronales que componen la región MS/BDv, coinciden en que gran parte de su población neuronal se caracteriza por producir ráfagas de disparos rítmicos, otro pequeño porcentaje neuronal asociado a la generación del ritmo theta, pero sin caracterizarse por producir disparos rítmicos, y una parte muy reducida de la población neuronal de MS/BDv sin relación con el ritmo theta. Las proyecciones neuronales procedentes de la región MS/BDv hacia hipocampo son neuronas colinérgicas y GABAérgicas (Vertes & Kocsis, 1997).

En un estudio en el que estudian los tipos neuronales que componen la región MS/DB a partir de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Sotty et al., 2003), se detectan cuatro clases de neuronas. Un tipo neuronal caracterizado por un disparo lento y que expresa mRNA de acetil-colina transferasa (ChAT), un segundo tipo neuronal de disparo rápido y que expresa mRNA de ácido glutámico descarboxilasa 67 (GAD67), un tercer tipo neuronal caracterizado por ráfagas de disparos rápidos que expresa GAD67, y un cuarto tipo neuronal que expresa transcripciones para uno o dos de los transportadores de glutamato (VGLUT1 y VGLUT2). Aquellas neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que proyectan a la formación parahipocampal, son relevantes para la actividad del ritmo theta, a diferencia de las neuronas colinérgicas (Sotty et al., 2003).

Del mismo modo, se ha determinado proyecciones del NI a la región MS/DB importante para la generación de los ritmos circadianos y el ritmo theta (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003). La regulación de dichos ritmos es posible gracias a los dos circuitos interconectados entre si que presenta el NI. El primer circuito consta de proyecciones ascendentes con origen en NI hacia la formación parahipocampal. Mientras que el segundo circuito conecta los núcleos supraquiasmáticos, septum, habénula, cuerpos mamilares, núcleo interpeduncular, y el NI (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003).

### 1.2.3. Hipocampo

---

El hipocampo se asocia con la memoria a largo plazo, y es un área neuroanatómica relevante en cuanto a conducta social ya que tiene conexiones con el sistema límbico y con el resto de áreas implicadas en el procesamiento del reconocimiento e interacción social (Ota et al., 2017). Alteraciones en el hipocampo se relacionan con déficits en la memoria social, alteración común a enfermedades como Alzheimer, esquizofrenia, y autismo (Deacon et al., 2009; Higashida et al., 2012). El hipocampo se vincula a otros procesos no espaciales como los dependientes de las tareas olfativas, por ejemplo, la transmisión social de preferencia por alimentos y los emparejamientos de información con olores (Winocur, 1990). El hipocampo está subdividido en diferentes subcampos llamados *Cornu Ammonis* (CA) 1, CA2, CA3, cola hipocampal, subiculum, presubiculum, parasubiculum, fisura parahipocampal, capa molecular, células granulares y capas moleculares del giro dentado (DG), fimbria y área de transición amígdala-hipocampal (Ahmed-leitao et al., 2019). En la zona CA1 del hipocampo se han identificado más de 20 tipos diferentes de interneuronas (Klausberger & Somogyi, 2015), de las cuales, el 24% de ellas son GABAérgicas (Bezaire & Soltesz, 2013).

El hipocampo, sobretodo en la parte ventral, presenta una alta densidad de receptores de oxitocina (OXT), hormona asociada al vínculo afectivo (Opendak et al., 2016). Los receptores de oxitocina están presentes, fundamentalmente, en interneuronas inhibitorias, cuya activación desinhibe las neuronas de la zona CA1 (Owen et al., 2013). Estos receptores de OXT son necesarios para la discriminación de los estímulos sociales (Raam et al., 2017)

En casos de periodos largos de aislamiento social, de una semana, se ha descrito la afectación de la memoria social y olfativa en ratones, debido a la alteración hipocámpica (Gusmão et al., 2012; Monteiro et al., 2014). La capa CA2 es importante durante el procesamiento de la memoria de reconocimiento social (Hitti & Siegelbaum, 2014). No obstante, en un estudio se encontró que, a nivel celular y electrofisiológico, la actividad neuronal de la capa CA2 a través de oscilaciones gamma, interviene en el procesamiento de conductas sociales y de información contextual, siempre y cuando dicha actividad no esté coordinada con la capa CA1, en cuyo caso el estímulo social queda inexplorado (Brown et al., 2020). Se propuso que estos hallazgos se debían a que, la región dorsal de CA2 recibe proyecciones excitatorias procedentes de DG, CA3, y de la corteza entorrinal (Cui et al., 2013; Kohara et al., 2013), y por lo tanto, CA2 estaría implicada en el procesamiento de la memoria social. A su vez, la región CA3 del hipocampo también recibe proyecciones procedentes de DG y de la corteza entorrinal (Menno P Witter, 2007a). La región CA1 también influye en la memoria social, ya que sus principales aferencias procedían de las regiones CA3 y CA2 (Okuyama et al., 2016).

En un trabajo de optogenética en el que se producía una inhibición ventral de la región CA1 se observó un deterioro en la capacidad de reconocimiento social y, por lo tanto, se producían alteraciones en la conducta discriminatoria entre familiar y novel durante la realización de los test (Okuyama et al., 2016). También se ha hallado que las regiones CA1 del hipocampo y la amígdala basolateral (BLA) estarían interconectadas en cuanto a regulación de la conducta social se refiere, es decir, a través de estimulaciones e inhibiciones de las proyecciones entre ambas estructuras, se estaría procesando la conducta social (Felix-ortiz & Tye, 2014). La activación de los receptores AMPA en la zona CA1 del dHPC son esenciales para la memoria de reconocimiento social (Okuyama et al., 2016; Winslow & Camacho, 1995). Se ha reportado que la alteración de la subunidad NR1 de los receptores NMDA en la zona CA3, afecta a la conducta social de aproximación y a la memoria social de reconocimiento (Cilz & Young, 2018; Finlay et al., 2015).

Varios datos implican la participación del parasubiculum en el procesamiento de la información de contenido social al presentar conexiones con otras zonas como CA1 del hipocampo y la amígdala con la que presenta conexiones recíprocas (Canteras et al., 1992, 1995; van Groen & Wyss, 1990). La zona ventral del hipocampo contiene interneuronas positivas en parvalbumina (PV) y GAD65, en algunos estudios se ha encontrado respuestas conductuales parecidas a la esquizofrenia en ratones debido a la inhibición de éstas interneuronas (Nguyen et al., 2014). El deterioro de las interneuronas PV se ha asociado a alteraciones del comportamiento social (Holland et al., 2014), y a déficits en el aprendizaje espacial (Murray et al., 2011).

El vHPC recibe conexiones noradrenérgicas del *locus coeruleus* (Pickel et al., 1974), proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) (Gasbarri et al., 1997), y proyecciones serotoninérgicas procedentes del núcleo dorsal y medial de rafe (Aznar et al., 2004). Sin embargo, las aferencias moduladoras troncoencefálicas no se restringen a proyecciones monoaminérgicas. El hipocampo también recibe proyecciones procedentes de neuronas GABAérgicas del puente conocido como *nucleus incertus* (NI) (Goto et al., 2001; F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003). Las neuronas del NI expresan en su mayoría un neuropéptido conocido como relaxina-3, aspecto central en el presente trabajo. El vHPC recibe proyecciones de relaxina-3 y, a su vez, ésta región hipocampal expresa receptores para relaxina-3 (RXFP3) (Changlu Liu et al., 2003; S. Ma et al., 2007; Sherie Ma et al., 2009).

Se ha determinado que las lesiones en hipocampo ventral (vHPC) pueden reducir las respuestas conductuales asociadas a ansiedad en ratas, e incluso se ha

considerado ésta zona mediadora de la ansiedad (Lim et al., 1989; Mchugh et al., 2004). En otro estudio (Kjelstrup et al., 2002; Weeden et al., 2015) en el que practicaban lesiones en vHPC en ratas, se obtuvo una reducción en las respuestas de ansiedad, y un aumento del tiempo de exposición al estímulo aversivo, en este caso, el brazo abierto en el paradigma del laberinto elevado. Estos resultados serían debidos a las proyecciones que envía y recibe el vHPC del resto de áreas implicadas en la memoria de reconocimiento social, como por ejemplo, la amígdala (Maren & Fanselow, 1995), hipotálamo (Cenquizca & Swanson, 2007) y corteza prefrontal medial (Padilla-coreano et al., 2016). En roedores se ha asociado el vHPC con la conducta de interacción social, posiblemente debido a las conexiones que mantiene con BLA (Donnell & Grace, 1995; Pikkarainen & Ro, 1999). De hecho, estudios de lesión en vHPC han determinado que dicha área es importante para la interacción social, ya que si se lesiona se ve alterada dicha conducta (Mchugh et al., 2004).

Se ha encontrado que la exposición prolongada al estrés produce atrofia en DG del hipocampo (Czeh et al., 2001). En humanos con trastornos del estrés postraumático (TEPT) se han encontrado diferencias significativas en el volumen del hipocampo con respecto a los controles (Logue et al., 2018). En un estudio con veteranos de guerra y con diagnóstico TEPT, se reportaron reducciones significativas en la zona CA3, DG y una reducción total del hipocampo en comparación con el grupo control (Z. Wang et al., 2015). Estas reducciones en el volumen del hipocampo en personas con TEPT también se ha relacionado con casos severos de insomnio, en un estudio se encontró reducciones de volumen en el área CA3 y DG del hipocampo en casos con insomnio severo (Neylan et al., 2010). En otro estudio en el que se estudiaban sujetos con historial de maltrato infantil e individuos con trastorno bipolar, se encontró una reducción bilateral del subiculum, presubiculum y CA1 en personas con experiencias traumáticas durante la infancia en comparación con el grupo con trastorno bipolar (Teicher et al., 2011).

El subiculum juega un papel importante en la organización de la información que recibe el hipocampo (Mcnaughton, 2006). La información cortical llega al hipocampo desde la corteza entorrinal pasando por las regiones DG, CA3 y CA2 (Menno P Witter, 2007b). El subiculum recibe sinapsis procedentes de la región CA1 del hipocampo y proyecta a varias regiones corticales y subcorticales (N. Matsumoto et al., 2019). Estructuralmente el subiculum está constituido por tres capas: capa molecular, capa celular piramidal, y capa polimórfica (O'Mara, 2005). La capa molecular es la más superficial y cercana a la fisura hipocampal. La capa celular piramidal es una capa más gruesa que la capa del hipocampo que contiene neuronas piramidales, debido a su pobre empaquetamiento celular. La capa polimórfica es la capa más profunda y la más

cercana al *stratum oriens* de CA1. A nivel morfológico, el principal tipo celular presente en el subiculum son las células piramidales (Harris & Stewart, 2001). Al igual que el septum medial, el subiculum contiene fibras de vasopresina (VP) (Urban, 1999). Ésta área del hipocampo recibe, mayoritariamente, proyecciones de la región CA1 del hipocampo y de la corteza entorrinal (Amaral et al., 1991; Menno P Witter, 2007b). También recibe proyecciones, pero en menor medida, procedentes del núcleo anterior talámico (Shibata, 1993) y de la amígdala basal (Cembrowski et al., 2018). Por otro lado, el subiculum envía proyecciones al resto de áreas corticales y subcorticales como mPFC, corteza perirhinal, corteza postrhinal (Aggleton & Christiansen, 2015), núcleo hipotalámico (Kishi et al., 2006), núcleo accumbens (Groenewegen et al., 1987), septum lateral (Namura et al., 1994), y la región CA1 (Harris & Stewart, 2001). Lesiones del subiculum se han relacionado con alteraciones en la adquisición de la información durante la navegación espacial (Morris et al., 1990).

#### 1.2.4. Áreas parahipocámpicas

---

La corteza entorrinal (EC) se ha asociado, generalmente, a la memoria visuoespacial, a la localización y disposición de objetos en el espacio; constituyendo un complejo mapa cognitivo (Nilssen et al., 2019; Valero et al., 2018). Ramón y Cajal denominó por primera vez la corteza entorrinal como corteza esfenoidea o ganglio angular, debido al enorme haz de fibras entorrinales (Nilssen et al., 2019). La EC forma parte del lóbulo temporal en humanos, mientras que en roedores se alarga por la parte posterior de la corteza (Igarashi, 2016). En humanos, la EC es la principal interfaz que envía información sensorial al hipocampo y a la neocorteza (Canto et al., 2008); de éste modo, la EC podría participar en la integración y procesamiento de la información social (Leung et al., 2018).

La EC proyecta a diferentes regiones del hipocampo, pero principalmente, proyecta a la región CA1 del hipocampo y al subiculum (Menno P Witter et al., 2017). La EC está compuesta por seis capas estructurales. Al igual que el resto de corteza, la capa I es escasamente celular, las capas II y III son consideradas como capas superficiales y están separadas de las capas profundas V y VI por otra capa IV escasamente celular llamada *lamina dissecans*. A su vez, la EC se puede subdividir en dos regiones: la corteza entorrinal lateral (LEC) y corteza entorrinal medial (MEC). La LEC está posicionada anterolateralmente a EC, las capas celulares de LEC siguen una distribución poco estricta y con neuronas dispersas. Mientras que la MEC situada en el lado opuesto a LEC y posteriomedialmente a EC, presenta una distribución de capas más estricta y sigue una organización neuronal más estructurada (Nilssen et al., 2019).

A parte de las proyecciones de EC hacia la región CA1 de hipocampo, LEC también envía conexiones a CA1, pero a la parte más próxima al subiculum. Del mismo modo, MEC inerva con fibras la región CA1, pero por la parte adyacente a la región CA2. Se han encontrado patrones diferentes de conectividad entre las regiones MEC y LEC por parte de las proyecciones de retorno de la capa V de EC procedentes de CA1 y subiculum (Tamamaki & Nojyo, 1995).

A nivel celular, prácticamente, la gran mayoría de las neuronas que componen MEC codifican aspectos relacionados con la navegación o el espacio. La MEC contiene *grid cells*, (células rejilla) que muestran un patrón de organización hexagonal y tienen capacidad de realizar disparos neuronales a regiones cerebrales equidistantes (Fyhn, 2004; Rowland et al., 2018). Estas células se encuentran tanto en ratas (Hafting et al., 2005), ratones (Fyhn et al., 2008), como en humanos; pero para este último caso, las *grid cells* se han encontrado en EC (Jacobs & Lee, 2016). A parte de estas células, MEC presenta además células especializadas en la codificación para la dirección del sujeto (células para la dirección de la cabeza), células que codifican la velocidad, células que codifican los bordes físicos existentes en el entorno, o células que codifican el ángulo y la distancia a la que se sitúa un objeto (Moser et al., 2017).

MEC recibe proyecciones de presubiculum y parasubiculum (Caballero-Bleda & Witter, 1993). También recibe proyecciones de la región parahipocampal (PHC) y de la región postrinal (POR), dependiendo de la especie animal, en humanos ambas regiones proyectan a MEC (Maass et al., 2015); mientras que en roedores es la región POR la que proyecta a MEC (Naber et al., 1997).

El área LEC, por otro lado, presenta menor población celular en comparación con MEC. Además, en roedores no se han reportado la existencia de *grid cells* (Yoganarasimha et al., 2012). Esta escasa población neuronal se centra en el procesamiento de la información espacial (posición) de objetos presentes en un contexto determinado (Tsao et al., 2013). Se ha encontrado implicación por parte de las neuronas de LEC en el procesamiento de la información olfativa en ratas (Leitner et al., 2016), de hecho, la información olfativa del hipocampo es procesada por LEC (Biella & de Curtis, 2000). En cuanto a conexiones, LEC recibe proyecciones de la corteza piriforme, del bulbo olfativo (Kerr et al., 2007), y de la corteza peririnal (PER) (Burwell & Amaral, 1998). Además de recibir proyecciones de POR, MEC, y corteza piriforme olfativa en la capa celular II (Nilssen et al., 2019). PER está involucrado en la discriminación entre objetos novedosos y familiares, tanto en primates como en roedores (Naya, 2016).



Las proyecciones procedentes de POR/PHC y PER hacia EC en monos, constituyen el 60% de proyecciones corticales que recibe (Insausti & Amaral, 2008). Sin embargo, en el caso de los roedores, un 13% de las proyecciones corticales hacia EC proceden de las regiones PER y POR (Kerr et al., 2007). Tanto en ratas como en primates las regiones POR y PHC son relevantes para el procesamiento de asociaciones contextuales (Furtak et al., 2012). Se asocia la región PHC, junto con EC, con la codificación de estímulos asociados a individuos (por ejemplo, olfativos) (Eichenbaum, 1998).

Estudios de neuroimagen en humanos han demostrado que la alteración en las proyecciones de EC hacia giro dentado (DG) se asocia a un deterioro cognitivo propio de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, y la esquizofrenia (J. L. Robinson et al., 2014). Se ha observado que la interrupción de las fibras procedentes de EC hacia hipocampo deteriora la memoria social (Lemaire et al., 1994). Una lesión citotóxica selectiva retrohipocampal que afecta a áreas como EC, PER y el complejo subicular; produciendo un deterioro leve de la memoria de reconocimiento social en ratas (Bannerman et al., 2001). En un estudio de optogenética con ratones en el que se inhibe la ruta neuronal EC-DG se veía afectado el proceso de recuperación de la memoria social pero no la sociabilidad durante el test de interacción social en el paradigma de las tres habitaciones (Leung et al., 2018). Además, la alteración de la vía de señalización de la proteína kinasa A (PAKA) en el circuito EC-DG deteriora la memoria de reconocimiento social en ratones, pero a través de la activación optogenética de los terminales de la ruta EC-DG se revertía el deterioro en la memoria de reconocimiento social en aquellos sujetos transgénicos para PAK (Leung et al., 2018). Por tanto, las proyecciones existentes entre EC-DG constituyen un elemento relevante en el proceso de memoria de reconocimiento social junto con las vías de señalización pertenecientes a esta ruta neural. Lesiones en corteza perirhinal-entorrinal en roedores produce deterioro en la capacidad de retención de olores tanto a corto como a largo plazo (Petrulis & Eichenbaum, 2003). En otro estudio (Petrulis et al., 2005), se realizan diferentes asociaciones entre olores pertenecientes a sujetos conoespecíficos y reforzadores naturales; se demuestra que las zonas de subiculum ventral y LEC son necesarios para el procesamiento de información olfativa, en cuanto a los procesos de identificación y diferenciación entre olores de conoespecíficos.

### 1.2.5. Amígdala

---

La amígdala es el componente principal de los circuitos neurales cognitivos que subyacen a la conducta social tanto en humanos como en animales (Phelps & LeDoux, 2005). Es relevante en la evaluación emocional de estímulos, de hecho, se ha observado que es necesaria durante la respuesta a estímulos condicionados e incondicionados, la adquisición, y la extinción de memorias emocionales (LeDoux, 2000). En primates, la amígdala tiene un papel central en la evaluación emocional de estímulos sociales como son las expresiones faciales (Gothard et al., 2007), interacción social (Kennedy et al., 2009), juicios sociales (Winston et al., 2002), toma de decisiones (Brand et al., 2007), o el reconocimiento de voces (Kuraoka & Nakamura, 2007). Además de procesar los estímulos emocionales, la amígdala evalúa la saliencia o relevancia de los estímulos. Ésta función es posible debido a las conexiones que mantiene la amígdala con el sistema dopaminérgico (Laviolette, 2007; Ochsner, 2008).

Ante algunos trastornos como el autismo (Amaral et al., 2008; Baron-Cohen et al., 2000), ansiedad, depresión (Weniger et al., 2006) o TEPT (Parsons & Ressler, 2013), la amígdala se ve afectada, deteriorando así las habilidades de reconocimiento y/o interacción social. Esta área está compuesta por diferentes núcleos cada uno de ellos con funciones específicas independientes pero interconectados entre sí. Así, por ejemplo, en humanos con calcinación selectiva bilateral en amígdala basolateral (BLA), se encontraron dificultades para adaptarse a los cambios del entorno durante tareas de confianza con reforzamiento monetario; a diferencia de los controles que mostraban una rápida adaptación (Rosenberger et al., 2019). Por lo tanto, BLA está asociada al aprendizaje social, es decir, actúa modulando la conducta ante diferentes estímulos del entorno, mostrando una conducta adaptativa según los estímulos que percibe el sujeto (Wassum & Izquierdo, 2015). Del mismo modo, también está implicada en otros procesos cognitivos como, por ejemplo, la conducta social. Se ha demostrado en estudios de electrofisiología *in vivo*, cambios en la actividad neuronal en la amígdala basolateral (BLA) durante conductas de interacción social, como por ejemplo, aumentos de disparos neuronales en BLA asociados a la conducta social (Katayama et al., 2009).

BLA presenta proyecciones neuronales ipsilaterales en la corteza prefrontal medial (mPFC), corteza auditiva, amígdala central (CeA), corteza insular, corteza entorrinal (EC), núcleo accumbens, e hipocampo ventral (vHPC) (Guzma et al., 2016; Huang et al., 2019). En un estudio de optogenética en el que se inhiben las proyecciones bilaterales de BLA a vHPC, se observa un incremento de la conducta de interacción

social durante el test del residente intruso, pero se reducía la conducta exploratoria. No obstante, la activación de los terminales bilaterales de BLA reducen la interacción social durante el test del residente intruso y el test de sociabilidad del paradigma de las tres habitaciones; y paradójicamente, aumenta las conductas de autocuidado (Gur et al., 2014). La inhibición optogenética de BLA en uno de los lados produce una alteración en la conducta de interacción social y en la memoria asociativa. Para que dichos procesos cognitivos no se vean afectados, ambas áreas BLA no deben verse alterada, ya que, mutuamente facilitan y mejoran la sincronización y comunicación entre ellas, junto con el resto de áreas cerebrales implicadas en la conducta social (Huang et al., 2019).

La amígdala también ha sido implicada en la respuesta de ansiedad, tanto en humanos como en roedores, la hiperactividad o hipertrofia de BLA se ha asociado a trastornos o conductas de ansiedad (Katayama et al., 2009). Se ha encontrado menores respuestas conductuales relacionadas con la ansiedad durante la prueba de campo abierto, el brazo elevado, y el test de luz-oscuridad, en casos con lesiones bilaterales en BLA y amígdala medial en ratones; pero dichas lesiones no afectaba a la conducta de interacción social (Y. Wang et al., 2014). La fotoestimulación en BLA de los terminales en mPFC aumenta las respuestas conductuales ansiosas durante el test del laberinto elevado, y reduce la respuesta de interacción social, pero incrementa la conducta exploratoria durante el test del residente intruso en ratones. Mientras que la fotoinhibición de los terminales de BLA en mPFC reduce las respuestas conductuales asociadas a la ansiedad durante el test del campo abierto, y aumenta la conducta de interacción social durante el test del residente intruso (Felix-Ortiz et al., 2016).

Otro núcleo de importante interés es la amígdala medial (MeA), éste núcleo es relevante para el reconocimiento social (Lymer et al., 2018) y las conductas prosociales (Cushing et al., 2008). MeA recibe información del principal bulbo olfativo (MOB) y del bulbo accesorio olfativo (AOB), dicha información la transfiere MeA al hipocampo a través del septum lateral (Bielsky & Young, 2004; Risold & Swanson, 1997). Al igual que el septum lateral, MeA participa en el procesamiento de las conductas agresivas, la exploración social, el comportamiento sexual, y el reconocimiento social (Sheehan et al., 2004). Se han asociado alteraciones en el reconocimiento social en ratones con lesiones en MeA (Y. Wang et al., 2014). También se han observado elevados niveles de activación de c-fos en MeA tras la exposición a un estímulo social (J. N. Ferguson et al., 2001).

Se ha comprobado que ciertas hormonas como el estradiol tendría un efecto en la memoria de reconocimiento social; la administración directa de estradiol en MeA

facilita el proceso de reconocimiento social en ratones hembras ovariectomizadas (Lymer et al., 2018). Estos mismos resultados se han detallado con oxitocina (OXT), debido a la gran densidad de receptores para OXT que tiene MeA (Gimpl & Fahrenholz, 2001). La infusión de OXT en MeA restaura la alteración en la memoria de reconocimiento social en ratones transgénicos que no expresan OXT (J. N. Ferguson et al., 2001). La memoria de reconocimiento social también se ha visto afectada, pero solamente a largo plazo, tras administrar bilateralmente en MeA anisomicina (un inhibidor de síntesis de proteínas) en ratas. Se encontró un aumento en la conducta exploratoria de preferencia por los conespecíficos familiares que por los nuevos, pero a corto plazo no se vio alteración en la preferencia social. No obstante, se encontró menor conducta exploratoria por parte de los sujetos experimentales con anisomicina en MeA bilateral (Gur et al., 2014). Otras áreas de MeA como la amígdala medial anterodorsal (MeAD) se han asociado con la excitación o activación más que con la conducta social (NEWMAN, 1999). La amígdala medial posterodorsal (MePD) se ha asociado a los olores, se ha encontrado mayor activación neuronal (mediados por expresión de c-fos) en MePD ante olores masculinos y femeninos, no obstante, únicamente se ha encontrado actividad neuronal en MeAD ante un estímulo olfativo femenino por parte de los machos (Donato et al., 2010). En un estudio con ratas hembras transgénicas sin expresión para los receptores de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) en MeAD y ovariectomizadas, la conducta de reconocimiento social se encontraba suprimida a diferencia del grupo control; además de verse reducidas las respuestas de ansiedad durante el test de luz-oscuridad (Spiteri et al., 2010).

## 1.2.6. Hipotálamo

---

Esta zona tan versátil a nivel funcional, recibe tanto información visceral como activación sensorial. Según las conexiones y las vías de activación, presentará diferentes funciones de regulación homeostática. En situaciones en las que hay demasiado estrés, el hipotálamo participa en la liberación de glucocorticoides (GC), mediante la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) y tras la activación del sistema nervioso simpático. Los GC son hormonas lipofílicas que pueden traspasar la barrera hematoencefálica, y por tanto, incidir en diferentes regiones cerebrales afectando a múltiples procesos cognitivos (Wolf, 2019). El hipotálamo contiene, entre otros, el núcleo paraventricular (PVN), y el núcleo supraóptico (SON), éstas regiones son las encargadas de producir las hormonas vasopresina y oxitocina (Gómez-gómez et al., 2019). La liberación central de estos péptidos produce modulación de la conducta social

(van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996). En un estudio en el que se aislaban los sujetos experimentales durante un periodo de 30 días, se encontró mayores niveles de c-fos en PVN de ratas, tras interactuar socialmente después del periodo de aislamiento (Gómez-gómez et al., 2019).

Otro núcleo de interés del hipotálamo es la región hipotálamo ventromedial (VHM) implicada en procesamiento de la conducta agresiva. La activación optogenética de las neuronas de VHM facilita respuestas conductuales agresivas ante sujetos desconocidos (D. Lin et al., 2011). En un estudio con ratones transgénicos que expresaban neuronas PR+ en la subdivisión ventrolateral de VHM (VHMvl), se obtenía mayores conductas agresivas durante el test del residente intruso (T. Yang et al., 2017), no obstante, la eliminación de las neuronas con receptores de progesterona (PR+) en VHMvl reduce la conducta agresiva en ratones machos (C. F. Yang et al., 2013). En un estudio en el que se silenciaba los genes para eliminar la expresión de receptores de estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) en VHM de ratas hembras ovariectomizadas, no se vio alteración en la conducta de interacción social pero sí se observó un aumento de las conductas agresivas ante ratas jóvenes que eran introducidas en sus cajas (Spiteri et al., 2010).

### 1.2.7. Sinopsis de estructuras telencefálicas que modulan la conducta social

---

De lo expuesto en los apartados anteriores, la conducta social depende de mutuas interacciones entre distintos elementos anatómicos que reciben informaciones de elementos identificadores de sujetos conespecíficos e información del contexto de la relación social. Estructuras anatómicas individuales desarrollan procesos particulares en la adquisición de memoria social y en la ejecución de conductas sociales. El desarrollo de una conducta social consecuente y organizada depende de la integridad del sistema.

En principio se parte de la asunción de que la corteza prefrontal desarrolla un sistema integrador de funciones ejecutivas englobaría capacidades como el mantenimiento de la atención y la monitorización de la información en *working memory*, y la coordinación de conductas dirigidas a objetivos (Jurado & Rosselli, 2007; Miller & Cohen, 2001; N. G. Müller et al., 2002). También se asume que estos procedimientos estarían más perfilados en primates (incluyendo humanos) que en roedores.

La amígdala presentaría una doble faceta, por una parte, podría almacenar memoria de reconocimiento social y por otra parte inducir respuestas sociales a través de proyecciones de amígdala medial y amígdala central sobre el hipotálamo (F. Olucha-Bordonau et al., 2014).

El hipotálamo, a través de los sistemas peptidérgicos de oxitocina y vasopresina podría desarrollar conductas de adherencia social sobre el hipotálamo (van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996).

El septum tendría una doble función, las proyecciones septohipocámpicas podrían modular la actividad del sistema entorrinal-hipocampo (Szőnyi et al., 2019), mientras que la secuencia asta de amón-septum lateral-hipotálamo podría mediar respuestas viscerales relacionadas con la conducta social (Yadin et al., 1993).

Finalmente, el eje Hipocampo-entorrinal podría jugar un papel especial en el proceso de contextualizar las conductas de contenido social enmarcándolas en los procedimientos de aprendizaje y memoria (Petrulis & Eichenbaum, 2003).

### 1.3. Sistemas moduladores de la conducta

---

El proceso de reconocimiento social puede considerarse otro proceso de memoria y aprendizaje, ya que alguno de los mecanismos moleculares implicados en los procesos cognitivos sociales son los mismos que los implicados en los procesos de consolidación de memoria (Lopatina et al., 2018). En este apartado se va a analizar algunos elementos neuronales que actúan modulando los procesos cognitivos implicados en la memoria de reconocimiento social.

#### 1.3.1. Sistemas Monoaminérgicos

---

Las monoaminas son los neurotransmisores que han sido clásicamente asociados a la modulación de las conductas sociales. El aumento o reducción farmacológico de norepinefrina en el sistema nervioso central produce una mejora o un deterioro, respectivamente, en el proceso de reconocimiento social en ratas (Griffin & Taylor, 1995). Se ha visto que la administración de norepinefrina en el bulbo olfativo mejora la capacidad para identificar individuos conespecíficos en ratas (Shang & Dluzen, 2001).

El área tegmental ventral (VTA) proporciona una inervación difusa y extensa sobre el núcleo accumbens, hipocampo, amígdala, y corteza prefrontal (Love, 2014).

Debido a sus proyecciones al resto de áreas, la dopamina (DA) es relevante en la modulación de procesos cognitivos, emocionales, y motivacionales (Parashar et al., 2017). Se han encontrado elevados niveles de dopamina durante el proceso de interacción social en núcleo accumbens de ratas (Gonzalez et al., 2000). Del mismo modo, ratones transgénicos que no expresan dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, mostraban un deterioro en la memoria de reconocimiento social (Marino et al., 2005). Por otra parte, la administración de DA o antagonistas para su receptor en el núcleo accumbens o en la corteza prefrontal, mejora la memoria de reconocimiento social; mientras que si se administra antagonistas se altera el proceso de aprendizaje social (Cara et al., 2007). Por lo tanto, el receptor de DA tipo 1 tiene un papel relevante en el proceso de interacción social y en la memoria de reconocimiento social (R Okada et al., 2015). A su vez, estas catecolaminas se han interrelacionado, es decir, a partir de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa se sintetiza norepinefrina.

Serotonina (5-HT) tiene un papel regulador en diferentes comportamientos sociales. 5-HT es producida y liberada por los núcleos del rafe medial y dorsal (Imai et al., 1986). Alteraciones en los niveles de serotonina se han asociado a trastornos de ansiedad, depresión, del espectro autista, o con trastornos neurodegenerativos (Geldenhuis & Van der Schyf, 2011; Jacobsen et al., 2012). Se ha relacionado una disminución en la eficacia transportadora de serotonina con una reducción del alelo del polimorfismo en la región promotora para el gen transportador de serotonina (5-HTTLPR). La alteración en la transportación de serotonina, aumenta la vulnerabilidad al estrés y a desarrollar trastornos mentales (Li et al., 2019). En un estudio con humanos se ha encontrado mayores niveles de estrés durante la realización de una tarea de reconocimiento emocional de caras, junto con menor actividad en hipocampo izquierdo y desactivación de la corteza prefrontal dorsomedial (dmPFC) en sujetos con el alelo corto para el gen 5-HTTLPR. Este patrón de actividad cerebral se asocia al proceso cognitivo de recuperación de la memoria para la realización de la tarea bajo condiciones de estrés (Li et al., 2019).

La histamina es otra monoamina implicada en la memoria social. Los receptores de histamina H1, H2, y H3 son importantes para la memoria de reconocimiento de objetos (Garrido et al., 2016). También se ha encontrado que la administración de histamina icv o de agonistas para el receptor H3 mejora la memoria de reconocimiento social; mientras que la administración de antagonistas para el receptor H3 o el bloqueo de la síntesis de histamina, produce un deterioro en la memoria de reconocimiento social (Prast et al., 1996).

### 1.3.2. Sistemas Peptidérgicos

---

La oxitocina (OXT) y la vasopresina (VP) son neuropéptidos producidos en el núcleo paraventricular (PVN) y supraóptico (SON), y liberados en la neurohipófisis ejerciendo una función hormonal (Brownstein et al., 1980; SWAAB et al., 1975). Fuera del cerebro, la OXT y la VP ejercen acciones endocrinas como la inducción a la retención de agua (Boone & Deen, 2008), la contracción uterina (Blanks & Thornton, 2003), y la expulsión de leche (Hatton & Wang, 2008). Como neuropéptidos liberados en el SNC, están implicados en muchos procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (H.-J. Lee et al., 2010), ansiedad (Neumann & Landgraf, 2012), adicción (Bowen & Neumann, 2017), nocicepción (Koshimizu & Tsujimoto, 2009), conductas de ingesta (Sabatier et al., 2013), y procesamiento de información o estímulos sociales (Cilz & Young, 2018).

La oxitocina (OXT) está implicada en el vínculo afectivo y el apareamiento en diferentes especies (Mooney et al., 2014; Numan & Young, 2016). En roedores, la OXT está presente en el bulbo olfatorio (OB), corteza piriforme, neocórtex, hipocampo, subíctulum ventral, núcleo accumbens, amígdala central y lateral, estriado, septum lateral, BNST, y núcleo hipotalámico ventromedial y ventricular (Ostrowski, 1998). Las interacciones sociales aumentan la producción de OXT en las neuronas del PVN en ratones, facilitando su liberación y distribución al resto de áreas, modulando los circuitos neuronales implicados en la conducta social (Hung et al., 2017). Se ha observado que la administración de oxitocina aumenta las conductas prosociales en algunas especies (K. J. Robinson et al., 2017; Simpson et al., 2014). En otro estudio de neuroimagen y administración intranasal de OXT, se observó un aumento de la activación del hipocampo dorsal (Galbusera et al., 2017). La administración subcutánea de OXT en ratas macho altera el proceso de reconocimiento social (P Popik & Vetulani, 1991), aunque a bajas dosis facilita el reconocimiento social en ratas macho (Piotr Popik & Vetulani, 1991). En otro estudio también se obtenía una mejora en el reconocimiento social a dosis bajas de OXT pero administrado icv y produciendo sensibilidad a los antagonistas de OXT (Benelli et al., 1995). En un estudio con ratones transgénicos machos que no expresaban OXT, se reportó un aumento en la conducta agresiva, y una reducción de la sociabilidad (Sala et al., 2010). Sin embargo, ratones transgénicos que no expresaban OXT en CA2/CA3 del hipocampo mostraban un deterioro en el reconocimiento social durante el paradigma de las tres habitaciones (X. Y. Lin et al., 2018). La administración de OXT en vHPC mejora el reconocimiento social a largo plazo en ratas macho (van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996).



El neuropéptido arginina vasopresina o vasopresina (VP), es una hormona que facilita el reconocimiento social mediante la acción del receptor V1a (V1aR) en septum lateral (LS). La hormona VP se origina en BNST y en amígdala medial, a su vez, se han localizado proyecciones de estas áreas hacia el hipocampo, septum lateral y bulbo olfativo (Caffé et al., 1987). Así pues, la administración de VP en septum mejora el reconocimiento social, mientras que la administración de antagonistas de V1aR lo deterioran (Dantzer et al., 1988; Engelmann & Landgraf, 1994; Everts & Koolhaas, 1999). La administración de VP en vHPC o dHPC empeora el reconocimiento social en ratas macho (van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996). La inyección intracerebroventricular (icv), en septum o en el bulbo olfatorio de VP ayuda a mantenerla duración de la memoria social tanto en ratas como ratones independientemente de la condición sexual (Dantzer et al., 1988; Le Moal et al., 1987). La sobreexpresión de V1aR en LS, mediante el uso de vectores virales, mejora el reconocimiento social (Landgraf et al., 2003).

Existe dimorfismo sexual en cuanto a la inervación de las fibras VP en LS, incluso diferencias entre etapas vitales, por ejemplo, las fibras de VP son más profundas en ratas jóvenes en comparación con las adultas (Bielsky et al., 2005; Geert J. De Vries et al., 1981). De hecho, en un estudio tras administrar antagonistas V1aR en LS se producía un deterioro en la preferencia social en ratas jóvenes machos y no en las hembras (Veenema et al., 2012). En un estudio con ratones a los que se les eliminaba los genes que expresan V1aR presentaban menores respuestas conductuales relacionadas con ansiedad en machos pero no en hembras (Bielsky et al., 2005). También se ha observado que la administración de antagonistas VP en septum lateral deteriora el reconocimiento social solamente en el caso de ratas macho (Bluthé & Dantzer, 1993; Dantzer et al., 1988; Engelmann & Landgraf, 1994; Everts & Koolhaas, 1999). Se ha encontrado mayor número de células que sobreexpresan VP en BNST y MeA, además de mayor densidad de fibras neuronales de VP en LS en ratas macho (Geert J. De Vries et al., 1981; van Leeuwen et al., 1985). En otro estudio se ha encontrado niveles más bajos de densidad de fibras de VP en LS y de mRNA VP en BNST y MeA en ratas jóvenes en comparación con las adultas (Szot & Dorsa, 1993).

Se ha demostrado que la administración icv de corticotropina (CRF) incrementa la ansiedad (Adamec & McKay, 1993), y reduce el comportamiento de interacción social (Dunn, 1987). Mientras que la administración local de CRF en el *globus pallidus* se ha asociado con efectos ansiolíticos (Sztainberg et al., 2011). La administración de CRF en vHPC aumenta las respuestas conductuales de ansiedad y defensivas a través de la activación de los receptores CRF1 (Pentkowski et al., 2010; Radulovic et al., 1999).

## 1.4. Relaxina-3

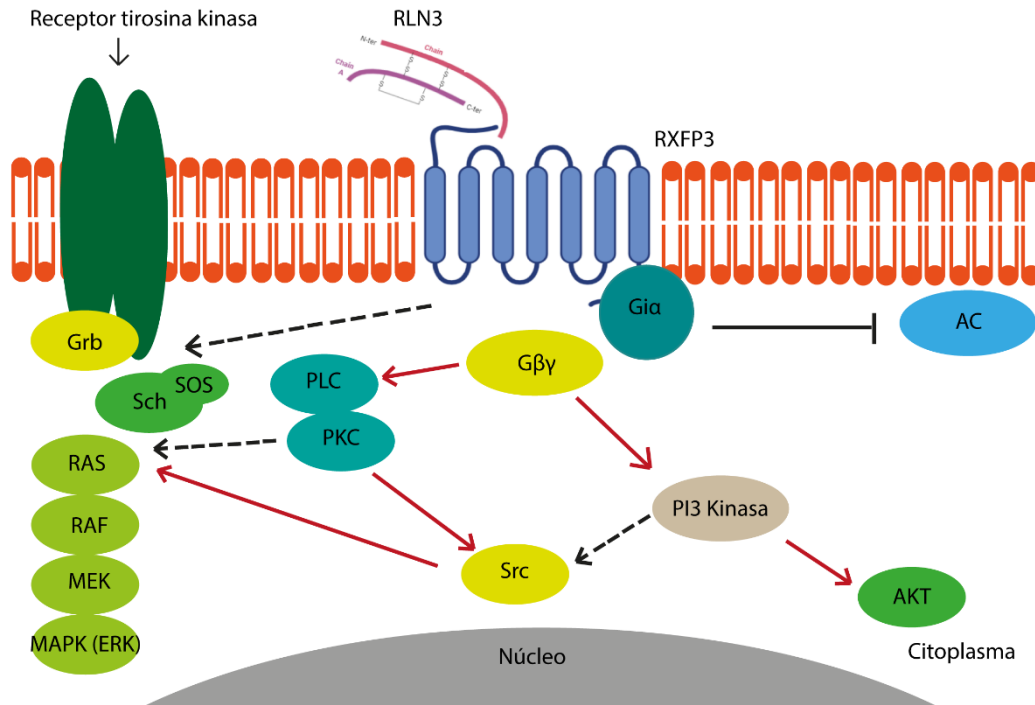
---

Las relaxinas son un grupo de péptidos que tienen como motivo común la secuencia RXXRXX(I/V). Al igual que las insulinas están formadas por dos cadenas peptídicas unidas por tres enlaces disulfuro (Gundlach et al., 2013). Las relaxinas son de seis tipos de péptidos: relaxina, relaxina-3, y péptidos similares a la insulina 3-6. Estudios filogenéticos han indicado que relaxina-3 (RLN3) surgió antes que el resto de péptidos pertenecientes a la superfamilia de relaxinas e insulinas, evolucionando de un péptido ancestral similar a la relaxina-3. No obstante, relaxina-3 es el último de los péptidos identificados dentro de la familia de las relaxinas. El péptido presenta una secuencia genética conservada a lo largo de la evolución entre los vertebrados (Wilkinson & Bathgate, 2007). En mamíferos, relaxina 3 se expresa en varios órganos, pero especialmente, en el núcleo incertus del tegmento pontino (Bathgate et al., 2002).

El precursor de relaxina-3 (preprorelaxina-3) sigue una secuencia estructural B-C-A, de la cual, relaxina-3 surge de la escisión de la cadena C y la formación de tres puentes disulfuro entre los residuos de cisteína presentes en las cadenas A y B. Estructuralmente, la cadena A esta formada por dos cadenas de  $\alpha$ -hélice separadas entre sí y antiparalelas formando una U; mientras la cadena B consta de una tercera  $\alpha$ -hélice que cruza la superficie de la estructura proteica en forma de U, con núcleo hidrofóbico estabilizado por una matriz de disulfuro. La  $\alpha$ -hélice de la cadena B presenta el lugar activo de unión al receptor.

Las estructuras de las relaxinas se caracterizan por tener una cadena B que ha sido esencial para el estudio de posibles receptores y su afinidad con las diferentes relaxinas. Al ser similares estructuralmente insulinas y relaxinas, inicialmente, se buscaban receptores tirosina kinasas, pero con el tiempo se descubrió que los receptores con mayor afinidad a los péptidos de relaxina eran los receptores con proteína G inhibitoria acoplada. Se han identificado cuatro receptores con proteína G inhibitoria acoplada afines a las relaxinas: LGR7 (actualmente RXFP1) para relaxina, LGR8 (RXFP2) para INSL3, GPCR135 (RXFP3) para relaxina-3, y GPCR142 (RXFP4) para INSL5. Estudios *in vitro* (C. Liu et al., 2003) han demostrado que RLN-3 se une a un receptor que lleva acoplado una proteína G inhibitoria (GPCR135 o SALPR), también conocido como RXFP3 (Bathgate et al., 2006; M. Matsumoto et al., 2000). Cuando dicho receptor se activa tras unirse a su ligando, se produce una inhibición del adenilato ciclasa (cAMP) (Changlu Liu et al., 2003) y se activan las quinasas reguladas externamente (ERK) (Kocan et al., 2014; van der Westhuizen et al., 2010; Van Der

Westhuizen et al., 2007) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).



**Figura 1** Representación gráfica del receptor de relaxina (RXFP3) junto a su ligando (RLN3) desencadenando intracelularmente la vía de señalización celular de RLN3. Esta vía presenta dos direcciones, por una parte provoca la inhibición de la síntesis de cAMP mediante la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), y por otra parte, es capaz de activar las vías de señalización de pERK. Imagen realizada a través de Illustrator y biorender.

**Tabla 1** Péptidos de relaxina y similares a la insulina con sus respectivos receptores a los que son afines y la localización de los ligandos.

Péptido	Receptor	Localización	
RLN1	RXFP1	Decidua, placenta, próstata, corteza piriforme	
RLN-3	RXFP3	mRNA	Fibras
		NI ( <i>pars compacta</i> y <i>disipata</i> ), Sustancia gris central del núcleo pontino, Núcleo de rafe, Sustancia gris periacueductal (PAG), región dorsal de la sustancia negra.	Proyección septo-hipocampal (rafe medio, núcleo interpeduncular, núcleo supramamilar, septum medial, núcleo de la banda diagonal, hipocampo), hipotálamo, amígdala parahipocampal

<b>INSL3</b>	RXFP2	Hipotálamo, núcleo olfativo anterior, corteza piriforme, tenia tecta, corteza orbital, giro dentado, regiones CA1-3 de hipocampo (mRNA)
<b>INSL5</b>	RXFP4	Tracto gastrointestinal

En cuanto a distribución, RLN-3 está altamente concentrado en el núcleo incertus (NI) y a través de las conexiones de NI con el resto de áreas, podemos encontrar fibras de RLN3 por prácticamente todo el encéfalo (**Tabla 1**).

## 1.5. Núcleo Incertus y sus conexiones con el resto de áreas

El Nucleus Incertus (NI), también conocido como núcleo dorsal tegmental pars ventromedialis (Morest, 1961), núcleo del receso del puente medial (Jennes et al., 1982), o núcleo "O" (Meessen & Olszewski, 1950), se localiza en la línea media del tegmental dorsal, caudalmente al núcleo dorsal de rafe (DR) y a nivel del suelo del cuarto ventrículo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Este núcleo está compuesto por d

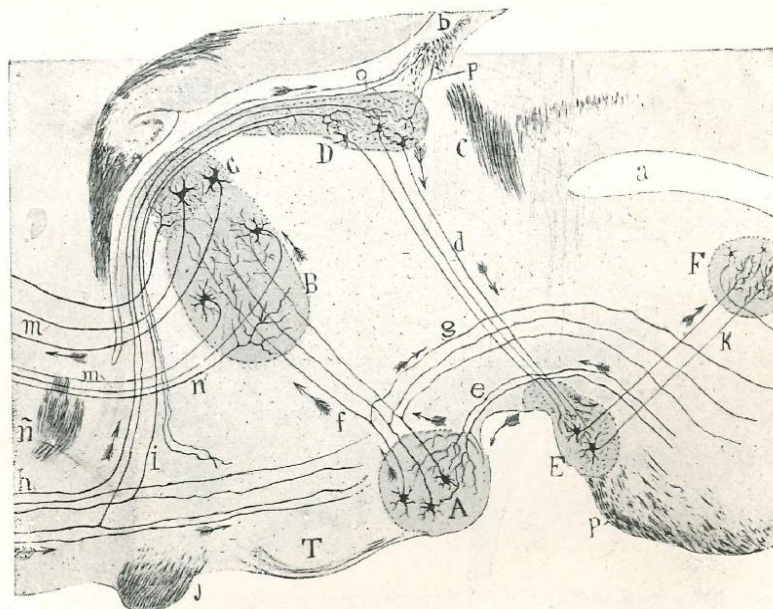


Fig. 102 — Esquema destinado a mostrar, en dirección sagital, las conexiones de algunos focos del tálamo. — A, foco mamilar externo; B, núcleo dorsal del tálamo; D, ganglio de la habénula E, cuerpo interpeduncular; f, haz de Vica d'Azyr; g, fascículo de Meynert; e, pedúnculo; del cuerpo mamilar; h, fascículo de la calota de Gudden; i, *stria thalami*; F, núcleo segmental dorsal.

**Figura 2** Ilustración realizada por Ramón y Cajal donde se representan las conexiones de los cuerpos mamilares, habénula y núcleos interpedunculares. En "F" aparece un núcleo segmental dorsal que es en realidad el Núcleo incertus. Tomado de S Ramón y Cajal, 1931- Recuerdos de mi vida. 3ª edición, Madrid 1923

os zonas: la pars compacta del NI (Nlc) y la pars disipata del NI (Nld). El Nlc se localiza en la línea media, caudal al núcleo DR y dorsal al fascículo longitudinal medial, además, presenta un grupo de neuronas característico y diferente al resto de zonas, son neuronas grandes y densamente empaquetadas. Por otra parte, la zona que se extiende lateralmente, se conoce como Nld. Esta zona presenta neuronas más pequeñas, generalmente bipolares y más laxamente empaquetadas (Goto et al., 2001; Meessen & Olszewski, 1950; F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003; Wyss et al., 1979).

La mayoría de las neuronas que conforman el NI son GABAérgicas (Bathgate et al., 2002; C. Liu et al., 2003). Una tercera parte de dichas neuronas, a su vez, producen un neuropéptido llamado relaxina-3 (RLX3). Esta población neuronal también produce otro tipo de neuropéptidos como glutamato descarboxilasa (GAD) (M. Matsumoto et al., 2000), colecistoquinina (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003), neuromedina B (Bathgate et al., 2006), neurotensina (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003), y proteínas de unión al calcio como calretinina (CR) y calbindina (CB) (Changlu Liu et al., 2003). Otra característica notable del NI es la alta concentración del receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina CRH-R1 (Bittencourt & Sawchenko, 2000), y la alta concentración del neuropéptido relaxina-3. La amígdala recibe una importante inervación por parte del núcleo incertus (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003). Se han encontrado abundantes fibras de RLX3 en MeA en concreto, en los núcleos anterior ventral (MeAV) y dorsal (MeAD). Al igual que en zonas de la amígdala posteromedial (AHiPM) y anterolateral (AHiAL). Del mismo modo, se encontraron fibras, pero un poco menos abundantes en el área endopiriforme dorsal (DEn) y ventral (VEn); basomedial anterior (BMA); área amigdaloides anterior (AA), parte intraamigdalina (STIA); y amígdala ventral (STMV) y anterior (STMA). A partir de inmunohistoquímicas (IHC) de sinaptofisina y observando la presencia de botones sinápticos, se ha determinado conexiones entre las fibras procedentes del NI y las neuronas amigdalinas, en concreto, en las áreas BNST, DEn, MeAD, y amígdala medial posterior-ventral (MePV) (Santos et al., 2016).

El NI presenta proyecciones ascendentes inhibitorias sobre los núcleos del rafe, hipotálamo (incluyendo los núcleos supramamilares), el septum medial, hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Goto et al., 2001; F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003) (**Figura 3A, B**). Algunas de estas proyecciones se dirigen hacia otras zonas neuroanatómicas asociadas a la generación del ritmo theta hipocámpico (Kocsis & Vertes, 1997), a partir de las cuales, es capaz de modular el ritmo theta (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003). También se ha observado un papel sobre conductas motivacionales y de adicción al alcohol (Nova-Marques et al., 2018). Se ha observado que la infusión de un agonista de relaxina (R3/I5) en septum medial (MS) produce un

incremento del ritmo theta en ratas anestesiadas con uretano. Del mismo modo, la infusión previa del antagonista del (R3/15) antes de la inyección del agonista impide el incremento en la potencia de theta. También la infusión del antagonista deteriora significativamente la alternancia espontánea como la memoria de trabajo espacial (Sherie Ma et al., 2009).

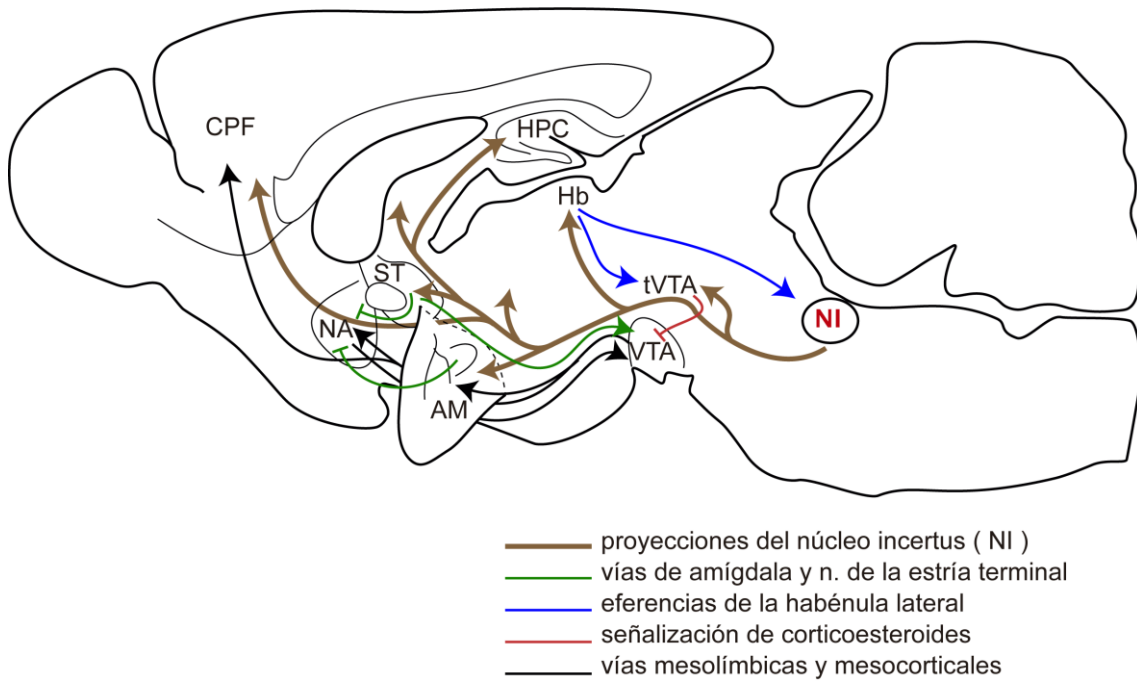
El sustrato anatómico de la generación y/o modulación del ritmo theta se ha postulado que son las proyecciones del NI sobre el MS. En efecto, se ha observado que la inyección de trazadores anterógrados en el NI, produce fibras que rodean las neuronas colinérgicas, PV, CB y CR positivas del SM. Este mismo marcaje se obtiene cuando se estudian los contactos de fibras RLN3 positivas sobre esos mismos tipos neuronales, en concreto, en septum lateral y medial, a través de proyecciones anterógradas procedentes del NI (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2012). En el mismo estudio, se encontraron conexiones retrógradas entre la zona anterior del hipotálamo y el septum lateral (SL); al igual que proyecciones retrógradas desde hipocampo hacia SM. Del mismo modo, se localizaron colocalizaciones entre fibras de RLN3 y marcaje de sinaptofisina en SM y SL, es decir, contactos con los huecos propios del marcaje granulado característico de la sinaptofisina, indicando posibles somas neuronales. Mediante electromicroscopia se observaron gran densidad de vesículas sinápticas en SM procedentes de las fibras de RLN3.

Por otra parte, se ha observado que las proyecciones entre el SM y el NI son bidireccionales. La inyección de trazadores en NI produce marcaje retrógrado en SM, y del mismo modo, trazadores anterógrados inyectados en SM produce marcaje de terminales en NI (Sánchez-Pérez et al., 2015). Debido a las proyecciones del NI hacia el hipocampo, el NI es capaz de regular la actividad del hipocampo a través de sus proyecciones GABAérgicas, inhibiendo las neuronas positivas en somatostatina del hipocampo e inhibiendo la actividad del hipocampo, reduciendo de este modo el ritmo theta. Además, de la afectación de la actividad del ritmo theta, la ausencia de proyecciones del NI hacia el hipocampo puede dificultar la formación de memorias dependientes de contexto. En ratones transgénicos con alteraciones en la población de neuronas GABAérgicas del NI, se ha encontrado menores respuestas de paralización ante estímulos incondicionados a diferencia del grupo control que con pocas asociaciones entre estímulo incondicionado y señal ya mostraban respuestas condicionadas. Del mismo modo, se encontró menores respuestas ansiosas durante el paradigma del laberinto elevado por parte de los sujetos transgénicos a diferencia del grupo control (Szőnyi et al., 2019).

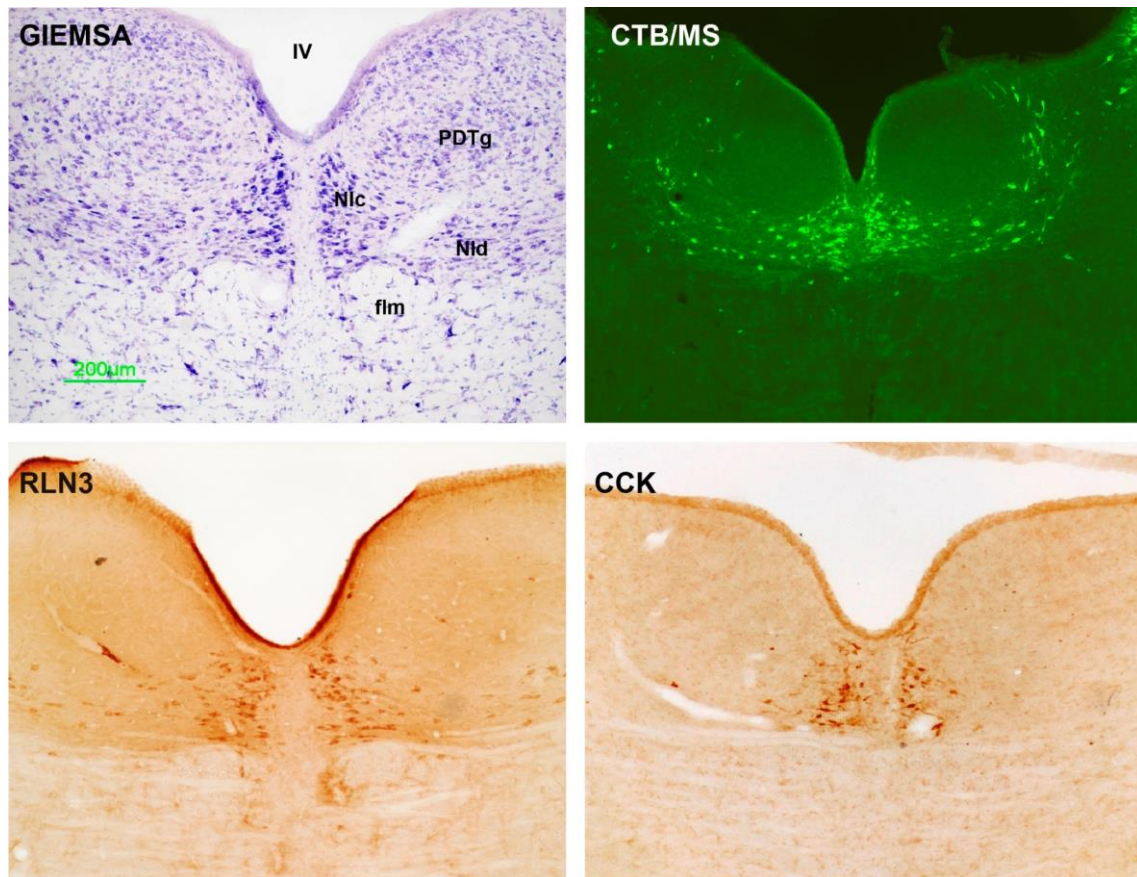
Las neuronas con marcadores de neuromedina B en NI son relevantes en cuanto al mantenimiento de la actividad, la locomoción, y el ritmo theta. En ratones transgénicos con desactivación de las neuronas positivas en neuromedina mediante optogenética, se alteraba la velocidad de movimiento. Por otro lado, la actividad de estas neuronas mediante optogenética produce un aumento en la velocidad locomotora, aumentan el ritmo theta, y aumenta la agitación (Lu et al., 2020).



A



B



**Figura 3 A)** Esquema que representa las proyecciones del NI sobre las estructuras telencefálicas que controlan los procesos cognitivos y emocionales. En el esquema se detalla también la posible interferencia de este sistema de proyecciones con el sistema que controla los procesos motivacionales y adictivos de las vías meso-cortico-límbica. Tomado de Nova-Marqués et al., 2018. **B)** Secciones coronales a nivel del puente donde se ilustra la localización del núcleo incertus mediante Giemsa, mediante marcaje retrógrado con una inyección de CRB en el septum medial, inmunocitoquímica frente a relaxin3 e inmunocitoquímica frente a CCK.



## 1.6. Papel del sistema relaxina-3/RXFP3 en procesos afectivos y emocionales

---

El NI junto con el sistema RLX3/RXFP3 ha sido relacionado con diferentes procesos cognitivos. La señalización de este sistema está implicado en la regulación del sistema septohipocampal, el ritmo theta, y la memoria espacial, a través de sus proyecciones hacia septum medial y al hipocampo dorsal (Albert-Gascó et al., 2017; Sherie Ma et al., 2009). Existen proyecciones procedentes de NI con otras áreas, en concreto, fibras de RLN3 en zonas septales, entre otras áreas. La presencia de fibras RLX3 en septum medial puede reflejar la acción moduladora del NI en diferentes procesos como son el ritmo theta septo-hipocámpico o conductas motivadas (ingesta o defensa). Esto sería posible, ya que las neuronas positivas en RLN3 del NI también presentan receptores de la hormona liberadora de corticotropina (CRH-R1) (Bittencourt & Sawchenko, 2000) y por tanto, ante estímulos estresores, dichas neuronas se activarían iniciando el circuito (Banerjee et al., 2010). Se ha observado modificaciones en la expresión de RLN3 en NI en ratas sometidas a un estrés continuo, además, la administración icv de CRF activaba las neuronas RLN3 en NI (Banerjee et al., 2010). En este sentido también, la administración icv del agonista de RXFP3 R3/15 tiene un efecto ansiolítico en ratas durante la realización de los paradigmas de la caja de luz-oscuridad y el laberinto elevado (Philip J. Ryan, Büchler, et al., 2013). Aunque algunos estudios se ha determinado que los niveles endógenos del sistema de señalización RLX3/RXFP3 no son primordiales para el control de los niveles basales de ansiedad (Zhang et al., 2015). Los ratones knockout (ko) para el gen que expresa RXFP3, presentan menores niveles de ansiedad tras realizar el test de laberinto elevado (Hosken et al., 2015).

Se ha observado que el papel del sistema RLN3/RXFP3 sobre la conducta alimentaría está ligado al sexo (Ganella et al., 2013; Lenglos et al., 2013). Las ratas sometidas a un estrés crónico y con restricción de comida muestran un incremento en la ganancia de peso en el caso de las hembras, a diferencia de los machos (Lenglos et al., 2013). A su vez, en el caso de las hembras, se identificaron elevados niveles del mRNA de RLX3 en el NI. Al igual que en ratas, este proceso también se ha visto en ratones. Se ha observado que la administración icv de antagonistas de RXFP3 resulta en una reducción de la conducta motora anticipada en búsqueda de comida y de la ingesta (Craig M. Smith et al., 2014). También la administración de un agonista selectivo para el receptor RXFP3 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) produce un aumento significativo de la ingesta diaria de comida y la ganancia de peso. Estos

cambios estarían ligados a un incremento de los niveles mRNA de oxitocina y vasopresina en PVN (Ganella et al., 2013).

El sistema RLN3/RXFP3 también tiene un papel relevante en procesos de búsqueda de sustancias adictivas y su consumo. La administración icv de antagonistas de RXFP3 produce una reducción de la conducta de búsqueda y consumo de alcohol en un modelo de autoconsumo y recaída en ratas (Philip J. Ryan, Kastman, et al., 2013). Del mismo modo, existe una correlación positiva entre altos niveles de mRNA de RLN3 en NI y consumo de alcohol (P. J. Ryan et al., 2014). El restablecimiento de la búsqueda de alcohol se puede interrumpir tras la administración de un antagonista de CRF1 (pero no de CRF2) en NI, no se obtenían los mismos resultados si se administraba un antagonista de CRF2 (Walker et al., 2017). También la infusión de antagonistas de orexin-2 (OX2) en NI produce una reducción en la búsqueda de alcohol (Kastman et al., 2016).

No se han encontrado evidencias directas entre la señalización del sistema RLX3/RXFP3 y el cambio entre los estados de vigilia/sueño y el ritmo circadiano (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2018). No obstante, sí se han detallado aspectos indirectos que indicarían una relación del sistema con la actividad general (arousal). La infusión icv agonistas de RXFP3 produce un incremento en la actividad y exploración locomotora, y aumento del estado de vigilia (Albert-Gascó et al., 2017; Sutton et al., 2009). Del mismo modo, los ratones transgénicos ko para RXFP3 y RLX3 presentan una reducción de la actividad circadiana que se reflejaba en un descenso de actividad motora, e incremento del sueño (Hosken et al., 2015; C. M. Smith et al., 2012). Del mismo modo, la microestimulación del NI, produce un aumento en la actividad motora (Farooq et al., 2016). Por lo tanto, el NI junto con el sistema de señalización RXFP3/RLX3 tiene un papel importante en la modulación de la actividad motora y la ritmicidad de los estados de sueño/vigilia.

Dada las conexiones del NI con el resto de áreas telencefálicas, el sistema de señalización RXFP3/RLX3 también esté modulando procesos cognitivos tales como la memoria. La estimulación eléctrica en ratas anestesiadas con uretano del NI produce un aumento de la actividad theta en el potencial de campo del hipocampo (Nuñez et al., 2006). En este sentido, la infusión de R3/I5 en el SM produce el mismo efecto mientras que la administración previa del antagonista elimina el efecto. También la administración del antagonista produce un deterioro en la memoria de trabajo espacial durante la ejecución del test de alternancia espontánea (Sherie Ma et al., 2009). Por otra parte, la inyección icv de agonistas para RXFP3 dio como resultado un deterioro de la memoria

a corto plazo durante la ejecución del test de laberinto en forma de T (Albert-Gascó et al., 2017).

El sistema RXFP3/RLN3 también está implicado en la memoria de reconocimiento social (MRS). Áreas neuroanatómicas diana para el NI como la amígdala medial, BNST y amígdala extendida, participan en dicho proceso. La administración icv de A2, agonista de RXFP3, produjo un deterioro en el MRS en ratas. En estos casos, se produce un incremento de los niveles de fosforilación en ERK (pERK) en la amígdala. Del mismo modo, aquellas neuronas en amígdala medial que expresaban el receptor RXFP3, también coexpresaban oxitocina (Albert-Gasco et al., 2019). La oxitocina es conocida por facilitar el vínculo entre individuos, reduce los niveles de estrés, ansiedad, y participa en procesos maternos de cuidado (Bale et al., 2001; J. N. Ferguson et al., 2000; Huber, 2005; Inoue, 1997; Windle et al., 1997) En otros estudios se ha encontrado que la activación del receptor RXFP3 en el PVN del hipotálamo, produce la hiperpolarización de neuronas positivas en oxitocina (Kastman et al., 2016).

La conducta afectiva es otro constructo de suma importancia, dada las conexiones del NI con amígdala medial y BNST. Lesiones del NI han dado como resultado un deterioro en el proceso de extinción en ratas (Pereira et al., 2013). Del mismo modo, la activación quimiogénica del NI induce una conducta de vigilancia con escaneo de la cabeza después de un proceso de condicionamiento pavloviano (Sherie Ma et al., 2017).

## **2. Hipótesis y Objetivos**

El presente trabajo descansa en una hipótesis central según la cual el núcleo incertus es un agente modulador de la conducta social a través de proyecciones específicas sobre centros telencefálicos que organizan la percepción y organización de la conducta social. La interferencia sobre el sistema de señalización que tiene su origen en las proyecciones del núcleo incertus debe generar un cambio amplio en la actividad telencefálica que repercute en la formación de memorias de contenido social.

Para resolver esta hipótesis se plantea un primer objetivo. **Objetivo 1:** Se pretende estudiar si la lesión específica del NI es capaz de provocar un cambio en la memoria de reconocimiento social. Este objetivo presenta dos vertientes: **Objetivo 1a).** La lesión del núcleo incertus induce cambios en la capacidad para reconocer sujetos con los que se ha interactuado previamente. **Objetivo 1b).** La lesión del núcleo incertus produce una alteración en el patrón de expresión de IEGs en las regiones telencefálicas que procesan el comportamiento social.

Por otra parte, dado que las estructuras corticales se encuentran en la región temporal y la proyección del núcleo incertus sobre la corteza entorrinal no se ha estudiado en profundidad, se plantea un **Objetivo 2.** Estudiar en profundidad la inervación de fibras de fibras de RLN3 procedentes del núcleo incertus sobre las principales divisiones de la corteza entorrinal y la distribución de receptores RXFP3.

Para el objetivo 1 se utilizará la lesión mediante ácido quinolénico del núcleo incertus y tras una semana de supervivencia se pasarán los animales a un test de comportamiento del laberinto de 3 habitaciones (objetivo 1a) una hora después del último test, los animales serán sacrificados para el estudio de las expresiones de dos IEGs, egr-1 y c-fos (objetivo 1b).

Para el objetivo 2 se utilizarán 3 secuencias de experimentos. En la primera secuencia se inyectarán trazadores retrógrados en la corteza entorrinal para estudiar la distribución de neuronas marcadas en el núcleo incertus. En la segunda secuencia se inyectarán trazadores anterógrados en el núcleo incertus para estudiar la presencia de marcaje anterógrado en el área entorrinal. En la tercera secuencia se estudiarán la distribución de fibras RLN3 respecto a otros marcadores del área entorrinal y, la distribución de receptores RXFP3.

### **3. Materiales y métodos**

### 3.1. Animales

---

El presente trabajo está basado en el estudio de 34 ratas macho Wistar con pesos de entre 300-350 gr. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universitat Jaume I y por Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, y estaban de acuerdo con la directiva 86/609/EEC de la Comunidad Europea en la protección de animales para uso experimental y otros propósitos científicos.

### 3.2. Lesión excitotóxica del núcleo incertus

---

Para llevar a cabo la investigación el primer objetivo 1, se ha hecho uso de 21 ratas macho adultas Wistar con pesos de entre 300-350 gr. Los animales eran agrupados en grupos de 3 en sus respectivas jaulas con ciclos de luz/oscuridad de 12:00h. Seguidamente, distribuimos aleatoriamente a los animales en dos grupos, control (n=13) y lesión (n=8). Pasado un periodo de 7-10 días de recuperación, las ratas pasaban a realizar los paradigmas conductuales que tenían lugar entre las 10:00 y 12:00 a.m.

Previo a las intervenciones quirúrgicas, los animales fueron profundamente anestesiados con isoflurano (3% para inducción, 2% para cirugía). A continuación, se rasuró la cabeza y se colocó en un marco estereotáxico David Kopf para ratas sujetándose mediante dos barras para los oídos y una pinza nasal. Una vez sujeta, se desinfectó la superficie de la piel con povidona yodada y se practicó una incisión longitudinal para descubrir la sutura interparietal y los puntos bregma y lambda. Tras la toma de medidas se practicó un trépano en las coordenadas AP -9.4/-9.6/-9.8 mm, ML 0 mm, y DV -7.8 mm en relación a bregma. Para acceder al núcleo incertus se realizó un trépano a través del cual se introdujo la aguja de 33 gauges de una jeringa tipo Hamilton de 2,5 µl.

Por esta vía se administró ácido quinolénico (inyección de 0,3 µl de 1,5% de ácido quinolénico en PBS). Se hicieron tres inyecciones acordes a las coordenadas AP, la ratio de infusión fue de 0.1 µl/min. Tras la inyección se la jeringa Hamilton durante 10 minutos, tras lo cual se retiró para proceder a la sutura. Tras la cirugía se inyectó buprenorfina (0.05mg/kg i.p.) como analgésico. Los animales fueron devueltos a sus jaulas en grupos de tres ratas tras haber estado 24h separadas para la recuperación post-cirugía.

### 3.3. Laberinto de 3 habitaciones

---

El paradigma de las tres habitaciones constaba de tres compartimentos de 22x39x49 cm conectados entre sí. La parte superior de esta caja está abierta y sus paredes transparentes de metacrilato tenían una altura de 50 cm. El compartimento central comunicaba con las habitaciones de los extremos a través de dos puertas. En cada una de las habitaciones de los extremos se disponía de un recipiente de plástico con perforaciones para facilitar el olfateo y la exploración del sujeto experimental. Dicho recipiente, a su vez, consta de ventosas como agarre firme a la superficie e impedir que el sujeto experimental o el señuelo puedan liberarse. En los test se utilizaron como señuelos ratas macho de la misma edad y peso o un objeto inanimado, en este caso, ladrillos de plástico de juguetería.

Encima de la jaula se dispuso de una cámara analógica SONY CCD para poder grabar los experimentos comportamentales. La cámara está conectada al programa Smart (Panlab, S.A., Barcelona, España) para el análisis de las grabaciones.

Tras haber pasado dos días de la operación, se procedió a la habituación de los animales al contexto el que se van a realizar los tests de comportamiento y el experimentador que lo va a llevar a cabo. Para ello se manosearon los animales durante 10 min los dos días anteriores al día del test, facilitándoles la exploración y la olfacción.

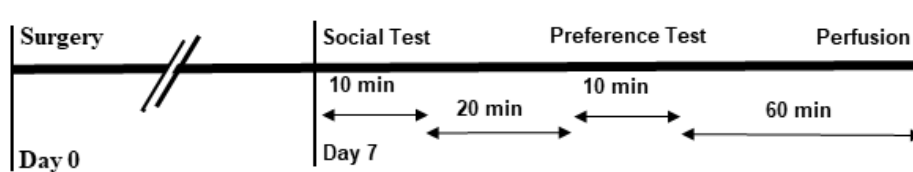
Una semana después de la operación se procedió a la realización de los test de conducta. Antes de iniciar el primer test, las ratas son reubicadas durante 15 min en una de las habitaciones a las que se les había habituado. El test de reconocimiento social de las tres habitaciones constaba de dos fases: test de interacción social y test de reconocimiento social. En el test de interacción social, se mide el tiempo que pasa el sujeto experimental en cada una de las habitaciones y el tiempo de *sniffing* (tiempo que el sujeto experimental olfatea al objeto inanimado o a los sujetos conespecíficos).

El sujeto experimental fue posicionado en la habitación central al inicio del test, en una de las habitaciones situada en un extremo se situó un objeto inanimado, mientras que en la habitación del otro extremo se situó un sujeto conespecífico. Al igual que el segundo test, el primer test tiene una duración de 10 minutos tras su realización se limpiaron todas las habitaciones con el fin de que no quedaran estímulos olfativos que pudieran afectar a los resultados experimentales durante la realización de los test restantes. Entre el primer test y el segundo dejamos un tiempo de 20 minutos.



En el segundo test, el test de reconocimiento social, se situó en uno de los extremos al mismo sujeto conespecífico utilizado en el test anterior como señuelo al que se considerará sujeto familiar. A su vez, en el otro extremo se colocó a un conespecífico nuevo (novel). Al igual que en el test anterior, se registró el tiempo que pasa el sujeto experimental en cada una de las habitaciones, junto con el tiempo que está olfateando a los estímulos (**Figura 4**).

En condiciones normales, se espera que los sujetos experimentales durante el test de interacción social pasen más tiempo en la habitación donde está situado el conespecífico en lugar de donde está el objeto. En el test de reconocimiento social se espera que los sujetos experimentales pasen más tiempo en la habitación donde está el familiar. Esto es debido a que el modelo animal con el que se está trabajando, tienen una tendencia innata a explorar lo novedoso, para ellos es más adaptativo explorar los estímulos novedosos que los ya conocidos.



**Figura 4** Línea de tiempo del experimento comportamental. Los mismos animales que se utilizaron para los ensayos de comportamiento se analizaron los niveles de activación de IEG.

### 3.4. Fijación

Al finalizar el paradigma comportamental, se devolvieron a los animales a su jaula durante 60 minutos antes de proceder a su sacrificio. Para ello, los animales fueron anestesiados mediante una sobredosis de Nembutal (150 mg/kg, i.p., Euthalender, Normon, Barcelona, España). Tras la pérdida de todos los reflejos se procedió a abrir la cavidad torácica e introducir una cánula roima de 18 gauges a través del ventrículo izquierdo hasta llegar a la salida de la aorta ascendente. En este punto se pinzaba y se pinzaba también la aorta descendente y la cava inferior permitiendo sólo el flujo a través de las carótidas y las subclavias. A continuación, se practicaba un corte en la aurícula derecha y se bombeaban los líquidos de perfusión a unos caudales de 25 ml/min. La perfusión transcardíaca se inició con la infusión de salino (250 ml) y continuó con la

infusión del fijador (4% formaldehído en 0.1 M PB, Ph 7.4) los dos líquidos estaban a temperatura ambiente.

Tras la perfusión se extrajeron los cerebros y se dejaron en la misma solución fijadora a 4°C durante 4 horas. Seguidamente se sustituyó el fijador por una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en PBS 0.01M pH 7.4 durante 2-3 días a 4°C hasta que los cerebros se sumergían hasta el fondo del vial.

Se cortan los cerebros en secciones coronales (40  $\mu$ m) usando un microtomo de congelación (Leica SM2010R, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Por cada cerebro, se obtienen 6 series de cortes que se almacenan en *ependorfs* con una solución crioprotectora (glicerol, etilenglicol y PBS). Las primeras series fueron usadas para localizar las zonas de lesión mediante la tinción Giemsa siguiendo un protocolo estándar (Iñiguez et al., 1985), el resto de series se utilizaron para la detección inmunocitoquímica de *egr-1* y *c-fos*.

Para la tinción de Giemsa, los cortes se montaron en portaobjetos recubiertos en gelatina y alumbre de cromo, y se dejaron secar al aire durante 12-24 horas. A continuación, se rehidrataron en agua destilada y se lavaron 2 x 5 min en 0.06 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 60°C. La tinción se realizó mediante inmersión en una solución 1/10 de solución madre Giemsa (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA, cat # GS-500) a 60°C durante 12 min. A continuación, se volvieron a lavar los cortes en 0.06 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a temperatura ambiente en una mesa agitadora durante 3 x 5 min para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se deshidrataron los cortes en etanol, se aclararon en xileno y se cubrieron con DPX (Sigma-Aldrich).

Para la reacción inmunocitoquímica de *c-fos* y *egr-1* se utilizaron secciones flotantes en bandejas de pocillos con rejilla y viales de vidrio de 5 ml. Las secciones se lavaron 3 x 10 min en en PBS 0.01M Ph 7.4. A continuación se pasaron a viales que contenían medio de bloqueo consistente en suero normal de cabra al 4% (NGS, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EE. UU.), albúmina de suero bovino al 2% (BSA, Sigma-Aldrich) (PBST) y Triton X-100 al 0,1 % en PBS 0.01M pH 7.4 (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirieron las secciones a la solución de los anticuerpos primarios durante 12-24 h a temperatura ambiente. La solución del anticuerpo primario contenía anti-Fos 1:1000 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania, cat # 226 003), o anti-Egr-1 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, EE.UU., cat # sc189) NGS al 4%, BSA al 2% en PBS.

Tras la incubación, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en una dilución 1:200 de anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo (Jackson

Immunoresearch) en PBST durante 1h. Los cortes fueron nuevamente lavados 3x10 min en PBS y transferidos a una solución 1:50 del complejo ABC (Vectastain-Elite, cat # PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en PBST.

Para pasar al revelado, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS y 2 x 10 min de lavado en tampón Tris 0.05 M, pH 8.0 (TB), la actividad de la peroxidasa fue revelada con una reacción de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencina (DAB) mejorada con níquel (0.025% DAB (Sigma-Aldrich), 0.08% Ni(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> y 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disuelto en TB 0.05 M pH 8.0) durante 15 min. La reacción cromogénica se detuvo mediante lavados sucesivos de cortes en TB seguido de 3 x 10 min en PBS 0.01 M.

A continuación, los cortes se montaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina y alumbre de cromo, y se secaron al aire durante la noche. Posteriormente, los cortes se rehidrataron, se aclararon con etanol gradualmente y xileno. Finalmente fueron empapados en DPX y cubiertos.

### 3.5. Innervación del área entorrinal por el núcleo incertus

---

Para el objetivo 2 se utilizaron también ratas macho Wistar con pesos de entre 300-350 gr. De ellas n=6 ratas recibieron inyecciones de trazadores retrógrados en distintas áreas de la corteza entorrinal. Otras n= 5 ratas fueron directamente sacrificadas para el estudio de la distribución de fibras RLN3 y otros marcadores. Finalmente, n=2 ejemplares fueron utilizados para el estudio de la distribución de receptores RXFP3.

### 3.6. Inyecciones de Trazadores

---

Para la inyección estereotáxica de trazadores los animales fueron profundamente anestesiados con isoflurano (3% para inducción, 2% para cirugía). Para acceder al núcleo incertus se realizó un trépano a través del cual se introdujo la aguja de 33 gauges de una jeringa tipo Hamilton de 2,5 µl. Por esta vía se administró ácido quinolénico (inyección de 0,2 µl de 10% BDA70kD en PB 0.1M pH 7,4 en las coordenadas AP -9.4/-9.6/-9.8 mm, ML 0 mm, y DV -7.8 mm en relación a bregma. Las inyecciones de trazadores retrógrados se realizó siguiendo el mismo patrón, pero las coordenadas fueron para entorrinal AP -7, ML -5 y DV -5,5. Aunque alguna de las inyecciones se desplazaron hacia zonas laterales o mediales de la corteza entorrinal. Se utilizaron dos

tipos de trazadores retrógrados Fluorogold al 4% en agua destilada y la subunidad B de la toxina colérica (cat # D1956, Molecular Probes, Eugene, OR) al 2% en agua destilada.

En cada caso se realizó una inyección de 0.2 µl a una ratio de infusión fue de 0.1 µl/min. Tras la inyección se dejó la jeringa Hamilton durante 10 minutos, tras lo cual se retiró para proceder a la sutura. Tras la cirugía se inyectó buprenorfina (0.05mg/kg i.p.) como analgésico. Los animales fueron devueltos a sus jaulas en grupos de tres ratas tras haber estado 24h separadas para la recuperación post-cirugía.

### 3.7. Fijación y microtomía

---

Entre 7 y 9 días después de la cirugía estereotáxica los animales fueron anestesiados, y perfundidos transcardialmente siguiendo el mismo protocolo que el referido en el apartado 3.4. Del mismo modo, los cerebros fueron extraídos, postfijados y crioprotegidos siguiendo el mismo protocolo. También la microtomía se realizó siguiendo el mismo procedimiento obteniéndose 6 series de secciones de 40 µm de cada cerebro mediante microtomía de congelación.

#### 3.7.1. Revelado de los trazadores

---

Los trazadores fueron revelados en bandejas de pocillos con rejilla y viales de vidrio de 5 ml. El tevelado de BDA se hizo sola y en combinación con otros marcadores de proteínas ligadoras de calcio en reacción cromogénica. El revelado de marcadores retrógrados se realizó en inmunofluorescencia. Los trazadores fueron revelados en bandejas de pocillos con rejilla y viales de vidrio de 5 ml.

#### 3.7.2. Dextranamina biotinilada BDA

---

Las secciones se lavaron 3 x 10 min en PBS 0.01M Ph 7.4. A continuación se pasaron a viales que contenían una solución 1:50 del complejo ABC (Vectastain-Elite, cat # PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en PBST. A continuación, en el revelado, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS y 2 x 10 min de lavado en tampón Tris 0.05 M, pH 8.0 (TB). La actividad de la peroxidasa fue revelada con una reacción de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencina (DAB) mejorada con níquel (0.025% DAB (Sigma-Aldrich), 0.08% Ni(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> y 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disuelto en TB 0.05 M pH 8.0) durante 15 min.

Tras 3x 10 min lavados en TBS y 3x10 min lavados en PBS en algunos casos se inició una segunda reacción para detectar células que expresan proteínas ligadoras de calcio. Para ello, se transfirieron los cortes a un medio de bloqueo consistente en suero normal de cabra al 4% (NGS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.), albúmina de suero bovino al 2% (BSA, Sigma-Aldrich) y Triton X-100 al 0,1 % en PBS 0.01M pH 7.4 (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirieron las secciones a la solución de los anticuerpos primarios durante 12-24h a temperatura ambiente. La solución del anticuerpo primario contenía mouse anti-PV 1:10000 (Swant, cat # PV27, Suiza), mouse anti CR (Swant, cat # CR 7697, Suiza) o mouse anti CB28kD (Swant, cat # CB-38a, Suiza) en NGS al 4%, BSA al 2% en PBS-T.

A continuación, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en una dilución 1:200 de anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-mouse (Jackson ImmunoResearch) en PBST durante 1h. Los cortes fueron nuevamente lavados 3x10 min en PBS y transferidos a una solución 1:50 del complejo ABC (Vectastain-Elite, cat # PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) en PBST.

Para pasar al revelado, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS y 2 x 10 min de lavado en tampón Tris 0.05 M, pH 7,4 (TB). La actividad de la peroxidasa fue revelada con una reacción de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencina (DAB) (0.025% DAB (Sigma-Aldrich), La reacción cromogénica se detuvo mediante lavados sucesivos de cortes en TB seguido de 3 x 10 min en PBS 0.01 M.

A continuación, los cortes se montaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina-alumbre de cromo y se secaron al aire durante la noche. Posteriormente, los cortes se rehidrataron, se aclararon con etanol gradualmente y xileno. Finalmente fueron empapados en DPX y cubiertos. Se realizaron dos tipos de revelado.

### 3.7.3. Trazadores retrógrados

---

Las preparaciones obtenidas de fluorogold fueron montadas directamente sobre portaobjetos y cubiertos con Fluorosave. Los cortes de ejemplares con inyección de CTB fueron revelados mediante inmunofluorescencia. Los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en solución de bloqueo consistente en suero normal de burro al 4% (NDS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.), albúmina de suero bovino al 2% (BSA, Sigma-Aldrich) y Triton X-100 al 0,1 % en PBS 0.01M pH 7.4 (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirieron las secciones a la solución de anticuerpo primario durante 12-24h a temperatura ambiente. La solución

del anticuerpo primario contenía goat anti-CTB 1:5000 (227040, Calbiochem en NGS al 4%, BSA al 2% en PBS-T.

A continuación, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en una dilución 1:200 de Alexa 488-Donkey anti goat (Jackson ImmunoResearch) en PBST durante 1h. A continuación, los cortes se montaron sobre portaobjetos y recubiertos de Fluorosafe y cubreobjetos.

### 3.8. Marcajes inmunofluorescentes múltiples

---

Para estudiar la relación de la inervación de relaxin3 con otros marcadores algunas secciones con inyección de Fluorogold en el giro dentado fueron procesados para estudiar si existe una relación de las fibras de RLN3 con las neuronas que originan la vía perforante y marcadores neuronales de proteínas ligadoras de calcio. También se estudiaron si las fibras de RLN3 contenían marcadores sinápticos indicando con ello si efectivamente realizaban contacto sináptico con neuronas entorrinales.

#### 3.8.1. Revelado de inmunofluorescencia Fluorogold-RLN3 proteínas ligadoras de calcio

---

Para ello se utilizaron ejemplares con inyección de Fluorogold en el giro dentado tal como se señala en el apartado N.N.N. Estos ejemplares fueron anestesiados y perfundidos transcardíacamente según se detalla en el apartado O.O.O. y de ellos se obtuvieron 6 series según lo descrito en P.P.P. Los cortes de estos ejemplares fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en solución de bloqueo consistente en suero normal de burro al 4% (NDS, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.), albúmina de suero bovino al 2% (BSA, Sigma-Aldrich) y Triton X-100 al 0,1 % en PBS 0.01M pH 7.4 (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirieron las secciones a la solución de los anticuerpos primarios durante 12-24h a temperatura ambiente. La solución de anticuerpos primarios contenía mouse anti-RLN3 1:5 y uno de los siguientes anticuerpos primarios rabbit anti parvalbumin 1:5000, rabbit anti calbindin 28kD o 1:5000 rabbit anti calretinin en NGS al 4%, BSA al 2% en PBS-T.

A continuación, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en una dilución 1:200 de Alexa 488-Donkey anti mouse (Jackson ImmunoResearch) y 1:200 Cy5-Donkey

anti rabbit en PBST durante 1h. A continuación, los cortes se lavaron 3 x 10 minutos y se montaron sobre portaobjetos y recubiertos de Fluorosafe y cubreobjetos.

### 3.8.2. Revelado de inmunofluorescencia RLN3 y sinaptofisina

---

Para ello se utilizaron ejemplares que fueron directamente anestesiados y perfundidos transcardíacamente según se detalla en el apartado O.O.O. y de ellos se obtuvieron 6 series según lo descrito en P.P.P. Los cortes de estos ejemplares fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en solución de bloqueo consistente en suero normal de burro al 4% (NDS, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EE. UU.), albúmina de suero bovino al 2% (BSA, Sigma-Aldrich) y Triton X-100 al 0,1 % en PBS 0.01M pH 7.4 (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirieron las secciones a la solución de los anticuerpos primarios durante 12-24h a temperatura ambiente. La solución de anticuerpos primarios contenía mouse anti-RLN3 1:5 y ginea pig anti uno de los siguientes anticuerpos primarios rabbit anti parvalbumin 1:5000, rabbit anti calbindin 28kD o 1:5000 rabbit anti calretinin en NGS al 4%, BSA al 2% en PBS-T.

A continuación, los cortes fueron lavados 3 x 10 min en PBS e incubados en una dilución 1:200 de Alexa 488-Donkey anti mouse (Jackson Immunoresearch) y 1:200 Cy5-Donkey anti rabbit en PBST durante 1h. A continuación, los cortes se lavaron 3 x 10 minutos y se montaron sobre portaobjetos y recubiertos de Fluorosafe y cubreobjetos.

### 3.8.3. Hibridación múltiple fluorescente *in situ*

---

Para poder estudiar la distribución de fibras de RLN3 y localización de los receptores RXFP3 se utilizó la hibridación múltiple *in situ* RNAscope. RNAscope® es una técnica de estudio histológico comercial de la compañía Advanced Cell Diagnostics (ACD, Newark, CA, EE.UU.), que permite incubar cortes de cerebro recién congelados y fijados. Permite incubar con hasta tres sondas personalizadas, las sondas estándar contienen hasta 20 pares ZZ (25 pares de bases/Z) que cubren un total de ~1000 pares de bases del objetivo ARNm. Se realiza una verificación de las sondas para seleccionar oligonucleótidos con temperaturas compatibles para que la hibridación sea lo más óptima posible. Hay un procedimiento para asegurar la precisión de la sonda durante su diseño y se lleva a cabo después de cada paso importante (F. Wang et al., 2012).

Para iniciar el protocolo de hibridación in situ, se realizan cortes de los cerebros con un grosor de 30 µm tras 18h de post-fijación a 4°C usando un vibratomo (Leica VT 1200S, Wetzlar, Germany). Los cortes se almacenan en eppendors con medio crioprotector (30% etilenglicol, 30% glicerol en tampón de fosfato (PB) pH 7.4) y son almacenamos a -20° C.

La detección de los ARNm de RXFP3 se realizó con sondas estándar con una cobertura de ~1000 pares de bases del objetivo ARNm. Los cortes de cerebro se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Fisher Thermo Scientific, Hampton, NH, EE.UU., Cat#12-550-15) y se dejaron secar al aire. Al día siguiente, los cortes se fijaron en paraformaldehído al 4% y se enjuagaron en PBS. Una vez están secos los cortes, dibujamos una barrera hidrófoba alrededor de las secciones (ImmEdge PAP rotulador hidrófobo, Vector Laboratories, #310018). Seguidamente, los cortes se incubaron con el tratamiento número 4 de proteasa (ACD, Cat #322340) durante 30 min a 40°C. Después de enjuagar los cortes con agua destilada (ACD, Cat #310091), se incubaron durante 2h a 40°C con una sonda de mRNA de RXFP3 (ACD, #316181). Se enjuagaron los cortes con tampón de lavado (ACD, #310091) y ampliamos la señal de la sonda con reactivos amplificadores ACD. Tras varios lavados con el tampón de lavado y PBS, incubamos los cortes para inmunofluorescencia ant-RLN3 (1:5; (Tanaka et al., 2005)) durante 90 min a temperatura ambiente.

El fenotipo neuroquímico de las neuronas que expresan el mRNA de RXFP3 se estudió utilizando la múltiple ISH (RNAscope, ACD) usando sondas dirigidas a los ARNm de RXFP3 (ACD, #316181) como se describe en este estudio (Albert-Gascó et al., 2018).

### 3.9. Análisis de imagen y cuantificación

---

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Leica (DM750) (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), equipado con una cámara Leica (DFC450C) conectada a un PC con el software de adquisición Leica Camera (Leica Application Suite X). Utilizamos la serie de Nissl y el atlas de ratas esterotáxicas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2014) para delinear los límites de los núcleos analizados. Para la cuantificación de Fos y Egr-1, se utilizó el objetivo de 20x y se midieron los niveles de IEG (Proteínas de expresión reciente), como se describe (Perez-Villalba et al., 2005). Utilizando el software Image J, el fondo de las imágenes se eliminó automáticamente con un radio de bola de 50 píxeles. Luego, la imagen resultante se “binarizó” automáticamente. Dos observadores ciegos a las condiciones experimentales realizaron



todos los análisis. Los datos se expresan como el porcentaje de núcleos inmunorreactivos de Fos o Egr-1 en el área total analizada.

### 3.10. Análisis estadísticos

---

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa informático GraphPad Prism 5. Para analizar los test comportamentales, se probaron que los datos siguieran una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. A partir de entonces, se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Tukey para comparar los tiempos medios en cada habitación para cada condición experimental. Para la comparación de los niveles de IEG, se compararon las áreas porcentuales en cada núcleo positivo para la inmunotinción en ratas lesionadas y simuladas usando una prueba t para datos no apareados o una prueba de Mann-Whitney. El nivel de significancia utilizado fue  $\alpha=0,05$ .

## **4. Resultados**

## 4.1. Efectos de la lesión del núcleo incertus sobre el reconocimiento social y la expresión de IEGs

---

En 8 de las 21 ratas tratadas, las inyecciones de ácido quinolénico produjeron una lesión centrada en el NI (**Figura 5**). El tejido de cerebral perteneciente al grupo control tenía una tinción celular bien organizada, incluso eran distinguibles la *pars compacta* y la *pars disipata* del NI (**Figura 5A**). Sin embargo, el área lesionada presentaba un aspecto granular en aquellos cortes teñidos con Nissl (**Figura 5B**). En 3 casos (MJC7, MJC17 y MJC19) de las 8 ratas tratadas con ácido quinolénico, las lesiones se extendieron a áreas circundantes incluyendo el puente y zona dorsal de rafe, y/o el tegmento dorsal (**Figura 5C-H**).

### 4.1.1. Efecto de la lesión excitotóxica del NI en el comportamiento social en ratas

---

Siete días después de la cirugía estereotáxica, se realizó el paradigma de interacción social de las tres habitaciones. En el test de interacción social, se evaluaba si la lesión de las neuronas del NI afectaba a la habilidad normal de los sujetos experimentales en la discriminación entre un sujeto conespecífico o un objeto inanimado. Los resultados obtenidos mostraban una distribución normal (kolmogorov-Smirnov), y se pudieron realizar múltiples comparaciones de casos a través de una ANOVA.

En el test de interacción social, el tiempo que pasaban en las diferentes habitaciones fue significativamente diferente entre los grupos (one-way ANOVA,  $F_{5,24} = 43.15$ ,  $p < 0.0001$ ). Un análisis de Tukey post-hoc reveló que las ratas del grupo control permanecían más tiempo en la habitación donde estaba el otro sujeto conespecífico que en aquella habitación donde se encontraba el objeto inanimado ( $p < 0.0001$ ).

Del mismo modo, las ratas con lesiones en el NI estaban más tiempo en la habitación donde se encontraba el sujeto conespecífico que donde se encontraban el objeto ( $p < 0.01$ ). También se encontraron diferencias entre ambos grupos, control y lesionados, con respecto al tiempo que permanecían en las habitaciones donde se encontraba el conespecífico, el objeto o en la habitación central (**Figura 6A, B, E**).

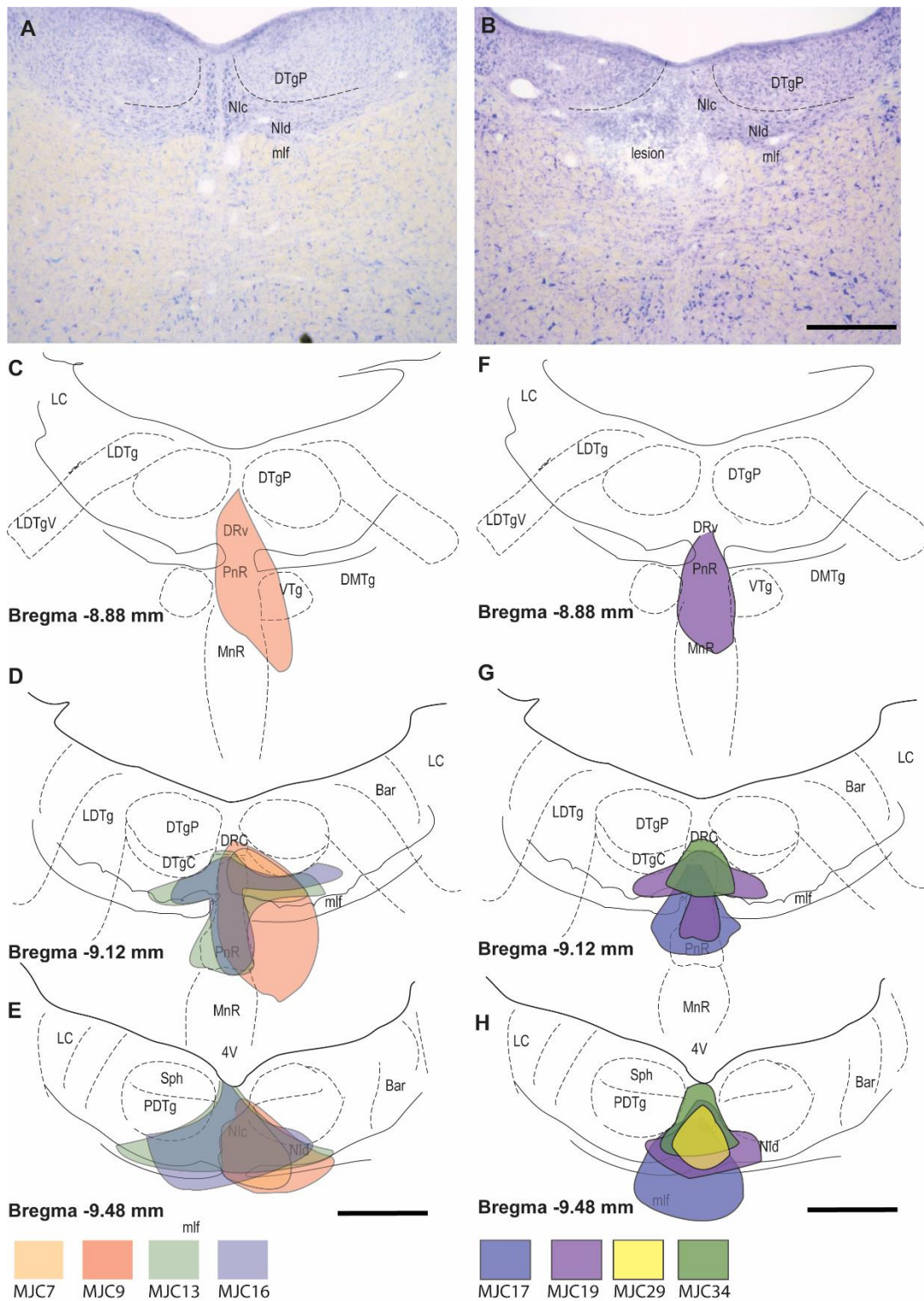
Los análisis del tiempo de olfacción al sujeto conespecífico y al objeto inanimado durante el primer test también revelaron significativas diferencias entre grupos (one-way

ANOVA,  $F_{3,24} = 17.03$ ,  $p < 0.0001$ ). Los análisis post-hoc de Tukey muestran que el grupo control estaban significativamente más tiempo olfateando al conespecífico que al objeto ( $p < 0.0001$ ). Lo mismo se encontró con el grupo de lesionados, permanecían más tiempo olfateando al sujeto conespecífico que al objeto inanimado ( $p < 0.01$ , **Figura 6F**), pero no encontramos diferencias entre ambos grupos en cuanto al tiempo gastado olfateando al conespecífico o al objeto.

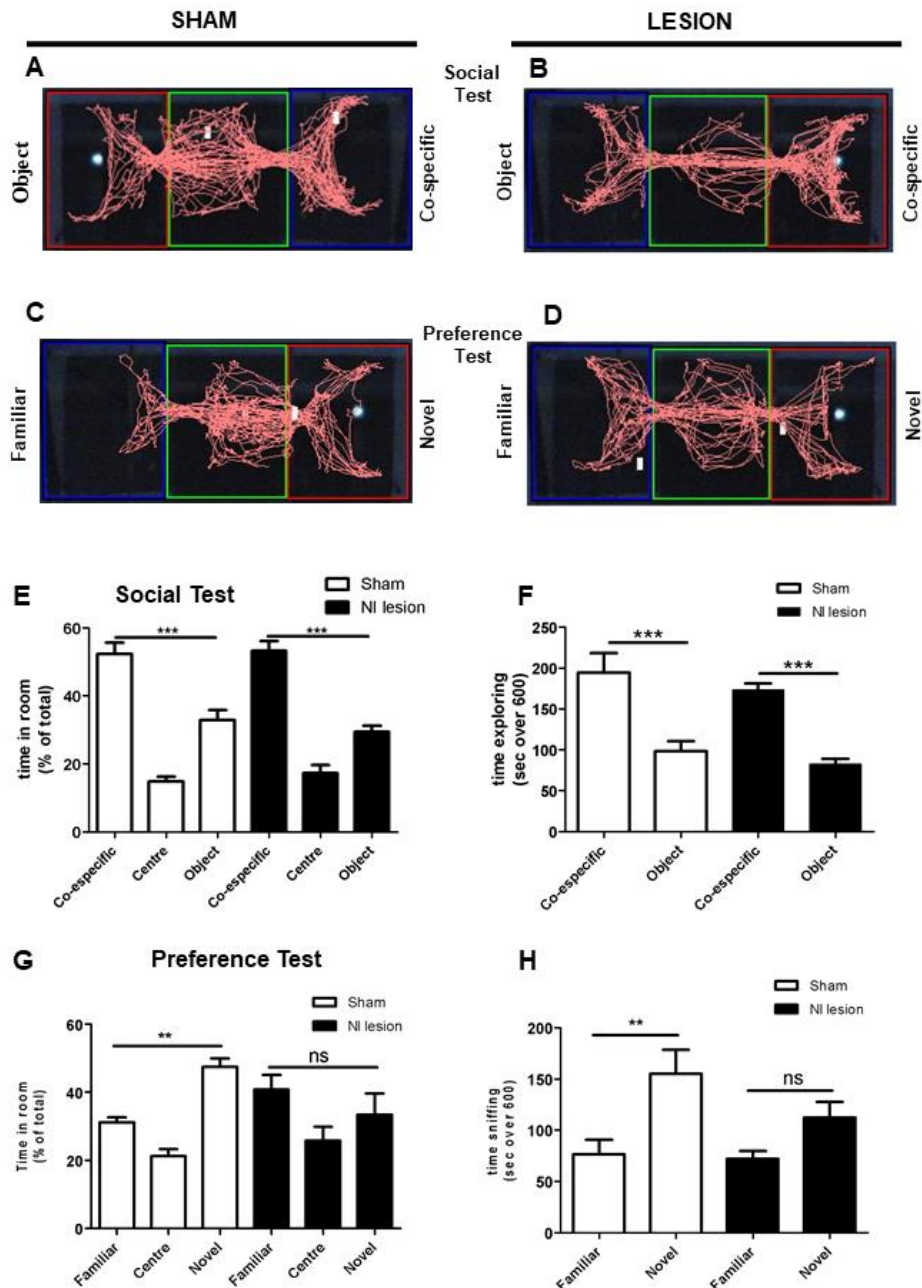
En el test de reconocimiento social, el tiempo de permanencia en las diferentes habitaciones fue significativamente diferentes entre los grupos (one-way ANOVA,  $F_{5,24} = 11.28$ ,  $P < 0.0001$ ). Un análisis post-hoc de los datos Tukey revela que el grupo control permanecía más tiempo en la habitación que contenía al sujeto conespecífico novel que en el que estaba el familiar ( $p < 0.01$ , **Figura 6C, D, G**).

N obstante, no se encontraron diferencias significativas entre el tiempo de permanencia del grupo lesión en la habitación que contenía el conespecífico familiar y el novel. Los análisis del tiempo de olfateo a los sujetos conespecíficos familiares y novel revelaban significativas diferencias entre grupos (one-way ANOVA,  $F_{3,24} = 6.195$ ,  $p < 0.01$ ).

Un análisis post-hoc de Tukey reveló que las ratas control estaban más tiempo olfateando a los sujetos conespecíficos nuevos que a los que ya conocía ( $p < 0.01$ , **Figura 6H**). Aunque no se observaron diferencias significativas en el tiempo que el grupo de lesionados olfateaba a los sujetos conespecíficos familiares y nuevos.



**Figura 5** Lesión excitotóxica del NI. **A)** Un caso control en el que se representan las principales divisiones del NI. **B)** Extensión de la lesión en la rata MJC16. Barra de escala, 100 μm. **C-E)** Dibujos con cámara lúcida de la extensión de las lesiones en los casos MJC7, MJC9, MJC13 y MJC16 en los niveles de bregma -8.88mm (**C**), -9.18 mm (**D**) y -9.48 mm (**E**). **F-H)** Dibujos con cámara lúcida de la extensión de las lesiones en los casos MJC17, MJC19, MJC29 y MJC34 en los niveles de bregma -8.88 mm (**F**), -9.18 mm (**G**) y -9.48 mm (**H**). Barra de escala, 100 μm.



**Figura 6** Efecto de la lesión excitotóxica del NI durante los test de sociabilidad y reconocimiento social. **(A-D)** Ejemplos del seguimiento de un sujeto experimental del grupo control **(A, C)** y del grupo con lesión en NI **(B, D)** durante la exploración en las tres habitaciones en el test de interacción social y en el de preferencia o reconocimiento social. **(E)** Porcentaje del tiempo total del test dedicado a explorar un sujeto conespecífico y un objeto inanimado. La lesión del NI no alteró la preferencia por el sujeto conespecífico sobre el objeto. **(F)** En el primer test, tanto los sujetos del grupo control como los del grupo de lesionados pasaron más tiempo olfateando a los sujetos conespecíficos que a los objetos. **(G)** En el segundo test, los sujetos control pasan más tiempo en la habitación que contiene al sujeto nuevo que en aquella habitación en la que se sitúa el conespecífico ya conocido. Mientras que el grupo de lesión no muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo que pasaron en ambas habitaciones. **(H)** Tiempo de olfateo entre sujeto conespecífico familiar o nuevo. Las ratas del grupo control gastan significativamente más tiempo olfateando los sujetos conespecíficos nuevos que los familiares, a diferencia del grupo de lesionados en los que no se encuentran diferencias significativas en tiempos de olfateo entre conespecíficos nuevos o familiares (\*\* $p = 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión en NI).

### 4.1.2. Efecto de la lesión excitotóxica del NI en la distribución y los niveles de activación inmunoreactividad de Fos y Egr-1

---

Para estudiar los niveles de las proteínas c-Fos y Egr-1 se hizo uso de la técnica de inmunohistoquímica, como reflejo de la activación neuronal alterada en las diferentes áreas relacionadas con el comportamiento social después del paradigma de las tres habitaciones, y para evaluar el efecto de las lesiones excitotóxicas de NI sobre estos niveles. Para comparar el efecto de la lesión del NI con los niveles de c-Fos y Egr-1 tras los test comportamentales, se utilizó una serie de cortes cerebrales con tinción Giemsa para identificar la organización celular en cada región.

El inmunomarcaje de c-Fos y Egr-1 se expresó como la proporción de núcleos neuronales teñidos dentro del área del cerebro delineada. El marcate oscilaba entre 0.001 y 0.2, lo que representa del 0.1 al 20% del área delineada en las diferentes regiones en condiciones de control o lesión. La tinción basal de las proteínas c-Fos y Egr-1 correspondían al patrón general de la actividad de las IEG en condiciones basales para hipocampo y amígdala (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2017; Seema Malkani & Rosen, 2000; Singewald et al., 2003).

### 4.1.3. Áreas Corticales

---

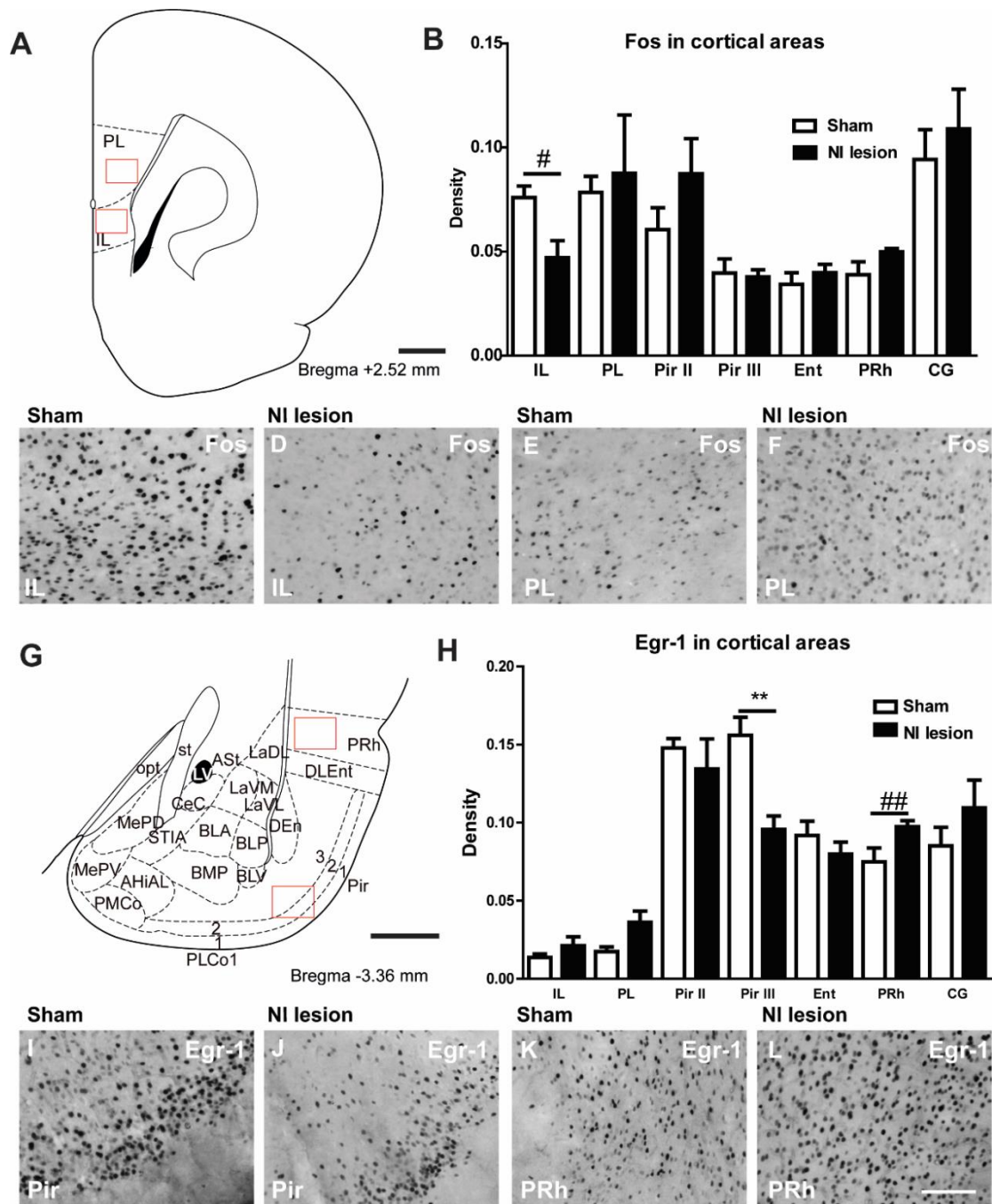
Se han estudiado los niveles de inmunomarcaje de las proteínas c-Fos y Egr-1 en áreas corticales implicadas en el procesamiento del comportamiento social, incluyendo el área prefrontal, perirhinal, piriforme, cingulado y ectorhinal (**Tabla 2**). La corteza prefrontal ventromedial a los niveles +2.52 y +3 mm con respecto a bregma, está compuesto dorsalmente de la corteza prelimbica (PL) y ventralmente de la corteza infralimbica (IL) (**Figura 7A**). El resto de áreas corticales fueron tomadas en los niveles -3.36 mm con respecto a bregma (**Figura 7B**). Tras la realización del paradigma de las tres habitaciones, los niveles de inmunoreactividad (IR) de Fos en la corteza IL fueron significativamente bajos en el grupo con lesión en NI con respecto al grupo control (**Figura 7B-D**) ( $p = 0.018$ ; Mann-Whitney  $U = 9.000$ ). Aunque no encontramos diferencias significativas en la corteza PL (**Figura 7B, E, F**).

**Tabla 2.** Densidades de inmunomarcaje de las proteínas Fos y Egr-1 en áreas de la corteza prefrontal.

Prefron cortex	c-fos			egr-1		
	Mean $\pm$ SEM (or median)		Sign t- test or MW	Mean $\pm$ SEM (or median)		Sign t- test or MW
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
<b>PirIII</b>	(0.030)	(0.040)	ns	0.156 $\pm$ 0.011	0.096 $\pm$ 0.009	**
<b>PirII</b>	0.061 $\pm$ 0.010	0.087 $\pm$ 0.016	ns	0.148 $\pm$ 0.006	0.134 $\pm$ 0.019	ns
<b>Ect</b>	0.050 $\pm$ 0.004	0.046 $\pm$ 0.018	ns	0.074 $\pm$ 0.013	0.086 $\pm$ 0.007	ns
<b>CG</b>	0,094 $\pm$ 0.014	0,109 $\pm$ 0,019	ns	0.085 $\pm$ 0.012	0.109 $\pm$ 0.018	ns
<b>PL</b>	0.078 $\pm$ 0.008	0.087 $\pm$ 0.028	ns	(0.013)	(0.040)	ns
<b>IL</b>	(0.078)	(0.041)	#	0.013 $\pm$ 0.002	0.023 $\pm$ 0.005	ns

Los datos presentados como media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \*p < 0.05 y \*\*p < 0.01 para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S. #p < 0.05 y ##p < 0.01 para la comparación de la mediana usamos la prueba nparametrica Mann-Whitney (M-W) cuando los datos no siguen una distribución normal según la prueba de K-S, n = 13 ratas control y n = 8 ratas con lesión.





**Figura 7** Activación de las proteínas de expresión temprana en áreas corticales tras el paradigma social en ratas control y con lesión en el NI. (A) Ilustración de las áreas corticales del prefrontal a estudiar. (B) Histograma que representa de la densidad de las neuronas que contienen inmunoreactividad (IR) de Fos en esas áreas corticales. (C-F) Imágenes representativas de los niveles de activación de las neuronas de c-fos en la corteza prefrontal. (G) Ilustración de las zonas neuroanatómicas a estudiar (áreas encuadradas). (H) Histograma que representa la densidad de las neuronas que contienen IR de Egr-1 en las áreas a estudiar. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por los núcleos inmunopositivos Egr-1, dividida por el área total analizada. (I-L) Imágenes representativas de los niveles de activación de las neuronas de Egr-1 en la corteza piriforme (Pir) y perirhinal PRh. Barra de calibración en todas las micrografías, 100  $\mu$ m. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , prueba de dos colas para comparación de medias; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  para la comparación de la mediana de Mann-Whitney,  $n=13$  ratas control y  $n=8$  ratas con lesión en NI)

En la corteza piriforme no se encontraron diferencias significativas en cuanto a c-fos, mientras que para los niveles de activación de Egr-1 sí que se encontraron diferencias. Los niveles de expresión neuronal de Egr-1 en la capa II no se vieron prácticamente alterados, pero sí fueron significativamente bajos en la capa III de los sujetos con lesión en NI con respecto a los controles ( $p = 0.002$ ,  $t_{14} = 3.716$ ) (**Figura 7H-J**). En la corteza perirhinal, los niveles de expresión neuronal de Egr-1 fueron más altos en el grupo con lesión que con respecto al grupo control ( $p = 0.007$ , M-W U = 6.000) (**Figura 7H, K, L**), aunque no se encontraron diferencias en la zona del cíngulo en cuanto a niveles de expresión de ambas proteínas.

#### 4.1.4. Amígdala y amígdala extendida

---

Se estudió la densidad IR de las proteínas Fos y Egr-1 de la amígdala la amígdala extendida a los niveles -2.1, -3.36 y -3.48 mm respecto a bregma (**Figura 8A, B**) (Paxinos & Watson, 2014). A pesar de que la mayoría de los núcleos de la amígdala mostraban niveles más bajos de c-fos en el grupo con lesión que los controles (**Tabla 3**), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Aunque, algunos núcleos de la amígdala mostraban niveles significativamente más bajos de Egr-1 en el grupo con lesión en comparación con el grupo control (**Figura 8C**).

Se analizaron los tres núcleos laterales de la amígdala independientemente. Mientras que los datos de los núcleos de la amígdala dorsolateral (LaDL) y la ventrolateral (LaVL) pasaron los test de normalidad de KS, el núcleo de la amígdala medial no lo pasó. No obstante, la prueba t-test revelaba un descenso significativo de los niveles de activación de Egr-1 en el núcleo LaDL ( $p = 0.033$ ,  $t = 2.391$ ,  $df 13$ ) y LaVL ( $p = 0.027$ ,  $t = 2.477$ ,  $df 13$ ) en el grupo con lesión en comparación con el control. Del mismo modo, el núcleo LaVL mostraba un descenso significativo de los niveles de activación de Egr-1 en el grupo con lesión en comparación con los controles ( $p = 0.036$ , M-W, U = 9.000) (**Figura 8C, F, G**).

También se encontraron niveles bajos de Egr-1 en todos los núcleos basales, incluyendo el núcleo basomedial anterior ( $p = 0.0106$ ,  $t = 3.024$ ,  $df 14$ ), basomedial posterior ( $p = 0.020$ ,  $t = 2.611$ ,  $df 13$ ), basolateral posterior ( $p = 0.047$ ,  $t = 0.047$ ,  $df 12$ ), basolateral ventral ( $p = 0.002$ ,  $t = 3.865$ ,  $df 12$ ) y basolateral medial ( $p = 0.0040$ ,  $t = 3.440$ ,  $df 14$ ) (**Figura 8C, H-K**).

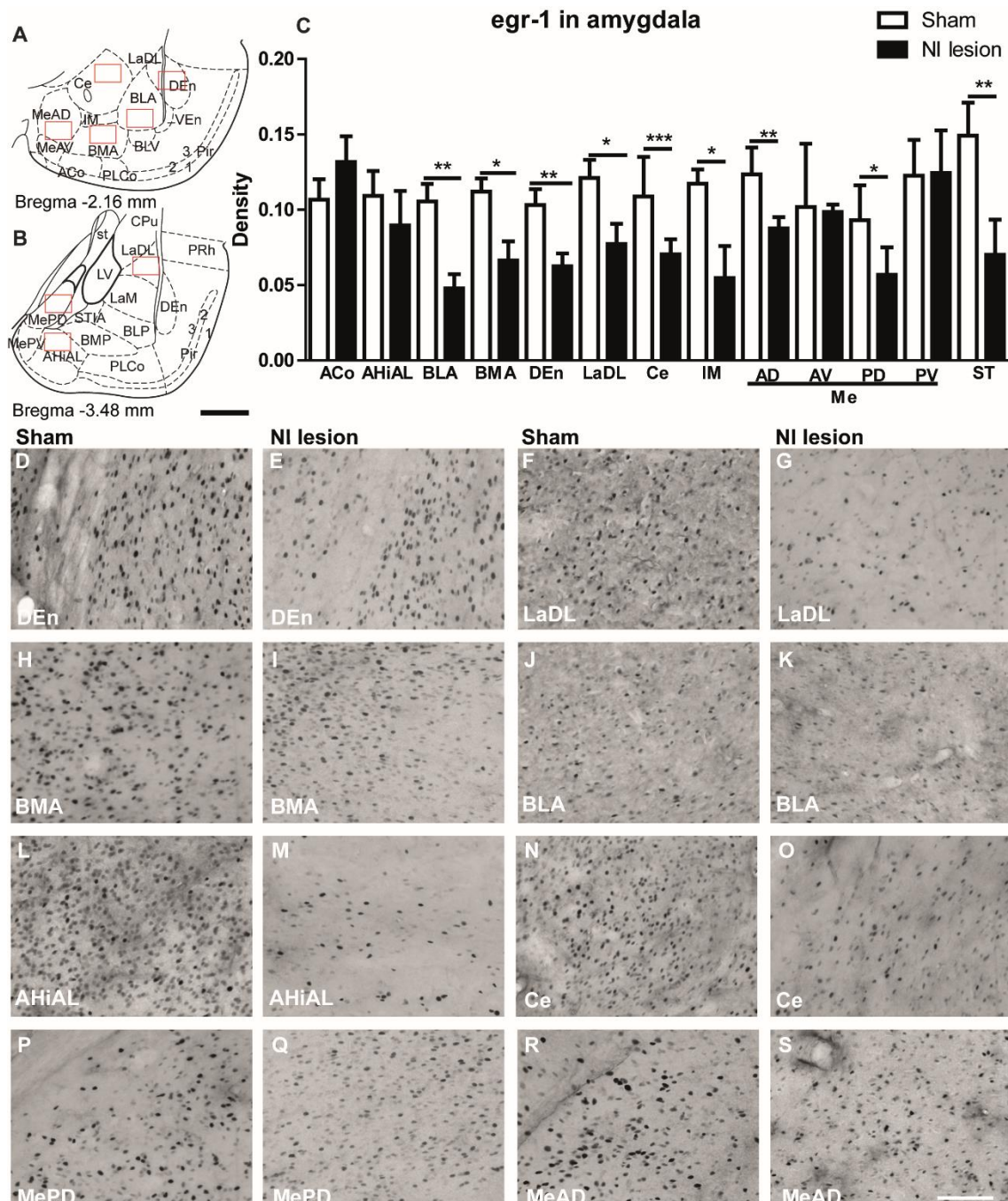
Para la amígdala cortical, se encontró un significativo descenso en los niveles de activación de Egr-1 en el núcleo de la amígdala de transición ( $p = 0.0009$ ,  $t = 4.408$ ,  $df$  12).

El núcleo endopiriforme, el cual recibe una fuerte inervación procedente del NI (Santos et al., 2016), presentó un significativo descenso de los niveles de activación de Egr-1 en aquellas ratas con lesión en el NI en comparación con el grupo control, en el núcleo dorsal (DEn) ( $p = 0.017$ ,  $t = 4.408$ ,  $df$  14) y ventral (VEn) ( $p = 0.002$ ,  $t = 3.694$ ,  $df$  14) (**Figura 8C-E**).

Alguno de los núcleos intercalados, especialmente el grupo medial también mostraban una significativa reducción de los niveles de activación de Egr-1 en el caso del grupo con lesión en comparación con los controles ( $p = 0.008$ ,  $t = 252$ ,  $df$  10). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos experimentales para los niveles de activación en el área de transición amigdalahipocampal (**Figura 8C, L, M**).

En el caso de la amígdala y la amígdala extendida con origen subpallial, se observó un significativo descenso de Egr-1 en varios núcleos en el grupo con lesión en comparación con el grupo control. Este efecto fue observado en el núcleo central de la amígdala (Ce) (**Figura 8C, N, O**) ( $p = 0.0005$ ,  $t = 4.592$ ,  $df$  13), núcleo posterodorsal medial (PDMe) (**Figura 8C, P, Q**) ( $p = 0.0031$ ,  $t = 3.619$ ,  $df$  13) y núcleo anterodorsal medial (MeAD) (**Figura 8C, R, S**) ( $p = 0.0112$  M-W,  $U = 2.000$ ).

Se encontraron diferencias significativas en Egr-1 en el núcleo del lecho de la *stria terminalis* (BNST) ( $p = 0.030$ ,  $t = 2.693$ ,  $df$  11) y en la división intraamígdala (IAST) ( $p = 0.013$ ,  $t = 3.694$ ,  $df$  14) (**Tabla 3**).



**Figura 8** Activación de IEGs en núcleos de la amígdala tras los paradigmas conductuales. **(A, B)** Ilustración de las áreas de la amígdala a diferentes niveles coronales (zonas encuadradas a estudio). **(C)** Histograma de la densidad de Egr-1 que contienen las neuronas en los diferentes núcleos de la amígdala. **(D-S)** Imágenes representativas de Egr-1 de ambos grupos experimentales (control y lesionados). **(D, E)** Núcleo endopiriforme dorsal; **(F, G)** núcleo de la amígdala lateral; **(H, I)** núcleo de la amígdala basomedial; **(J, K)** núcleo de la amígdala basolateral; **(L, M)** área de la amígdala de transición amígdalahipocampal; **(N, O)** amígdala central; **(P, Q)** amígdala medial porsteriodorsal; **(R, S)** amígdala medial anterodorsal. Barra de calibración, 100  $\mu$ m. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test de dos colas para comparaciones de medias; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  para Mann-Whitney comparación de medianas,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión en NI).

**Tabla 3** Densidades de Fos y Egr-1 en los diferentes núcleos de la amígdala.

Amygdala	c-fos		Sign t-test or MW	egr-1		Sign t- test or MW
	Mean $\pm$ SEM (or median)			Mean $\pm$ SEM (or median)		
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
CxA	0,023 $\pm$ 0,005	0,023 $\pm$ 0,002	ns	0,109 $\pm$ 0,009	0,040 $\pm$ 0,010	***
DEn	0,026 $\pm$ 0,003	0,019 $\pm$ 0,001	ns	0,103 $\pm$ 0,010	0,064 $\pm$ 0,007	*
VEEn	0,021 $\pm$ 0,003	0,018 $\pm$ 0,002	ns	0,092 $\pm$ 0,009	0,042 $\pm$ 0,008	**
ASt	(0,019)	(0,016)	ns	0,098 $\pm$ 0,006	0,089 $\pm$ 0,014	ns
ACo	(0,410)	(0,062)	ns	0,106 $\pm$ 0,013	0,132 $\pm$ 0,022	ns
PLCo	0,032 $\pm$ 0,005	0,042 $\pm$ 0,004	ns	0,091 $\pm$ 0,010	0,091 $\pm$ 0,014	ns
PMCo	0,033 $\pm$ 0,003	0,032 $\pm$ 0,004	ns	0,115 $\pm$ 0,014	0,083 $\pm$ 0,014	ns
BLA	0,021 $\pm$ 0,003	0,024 $\pm$ 0,001	ns	0,106 $\pm$ 0,012	0,048 $\pm$ 0,010	**
BLP	(0,012)	(0,016)	ns	0,096 $\pm$ 0,014	0,053 $\pm$ 0,009	*
BLV	(0,018)	(0,014)	ns	0,096 $\pm$ 0,010	0,040 $\pm$ 0,006	**
BMA	0,023 $\pm$ 0,004	0,025 $\pm$ 0,002	ns	0,112 $\pm$ 0,009	0,066 $\pm$ 0,013	*
BMP	0,017 $\pm$ 0,003	0,023 $\pm$ 0,003	ns	0,107 $\pm$ 0,014	0,058 $\pm$ 0,009	*
LaDL	0,027 $\pm$ 0,005	0,021 $\pm$ 0,003	ns	0,121 $\pm$ 0,012	0,077 $\pm$ 0,013	*
LaVL	0,026 $\pm$ 0,004	0,017 $\pm$ 0,002	ns	0,094 $\pm$ 0,010	0,061 $\pm$ 0,004	*
LaM	0,026 $\pm$ 0,004	0,019 $\pm$ 0,003	ns	(0,119)	(0,052)	#
AHiAL	(0,021)	(0,020)	ns	0,109 $\pm$ 0,017	0,046 $\pm$ 0,021	ns
MeAD	0,030 $\pm$ 0,006	0,035 $\pm$ 0,006	ns	(0,123)	(0,088)	#
MeAV	0,037 $\pm$ 0,005	0,036 $\pm$ 0,004	ns	(0,102)	(0,099)	ns
MePD	0,033 $\pm$ 0,006	0,031 $\pm$ 0,007	ns	0,097 $\pm$ 0,007	0,062 $\pm$ 0,004	**
MePV	0,042 $\pm$ 0,005	0,055 $\pm$ 0,006	ns	0,122 $\pm$ 0,008	0,124 $\pm$ 0,014	ns
CeA	(0,017)	(0,025)	ns	0,115 $\pm$ 0,006	0,064 $\pm$ 0,010	***
STIA	0,018 $\pm$ 0,002	0,018 $\pm$ 0,002	ns	0,099 $\pm$ 0,013	0,048 $\pm$ 0,011	*
IM	0,016	0,019 $\pm$ 0,009	ns	0,105 $\pm$ 0,009	0,054 $\pm$ 0,011	**
ST	0,036 $\pm$ 0,007	0,034 $\pm$ 0,007	ns	0,136 $\pm$ 0,021	0,069 $\pm$ 0,014	*
SIB	0,029 $\pm$ 0,004	0,035 $\pm$ 0,009	ns	0,107 $\pm$ 0,018	0,080 $\pm$ 0,024	ns
IC	(0,038)	(0,025)	ns	0,098 $\pm$ 0,009	0,081 $\pm$ 0,011	ns

Los datos presentados como media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \*p < 0.05 y \*\*p < 0.01 para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S. #p < 0.05 y ##p < 0.01 para la comparación de la mediana usamos la prueba no paramétrica Mann-Whitney (M-W) cuando los datos no siguen una distribución normal según la prueba de K-S, n = 13 ratas control y n = 8 ratas con lesión.

#### 4.1.5. Hipocampo

La densidad de Fos y Egr-1 en el hipocampo dorsal y ventral fue analizado en los niveles -3.36 y -6 mm con respecto a bregma (Paxinos & Watson, 2014); (**Figura 9A y B; Tabla 4**). Se observaron niveles más bajos c-fos en la mayoría de las áreas del hipocampo en el grupo de ratas con lesión con respecto a las control (**Figura 9C**), mientras que los

niveles de Egr-1 aumentaron significativamente en las lesionadas que en los controles (**Figura 9D**).

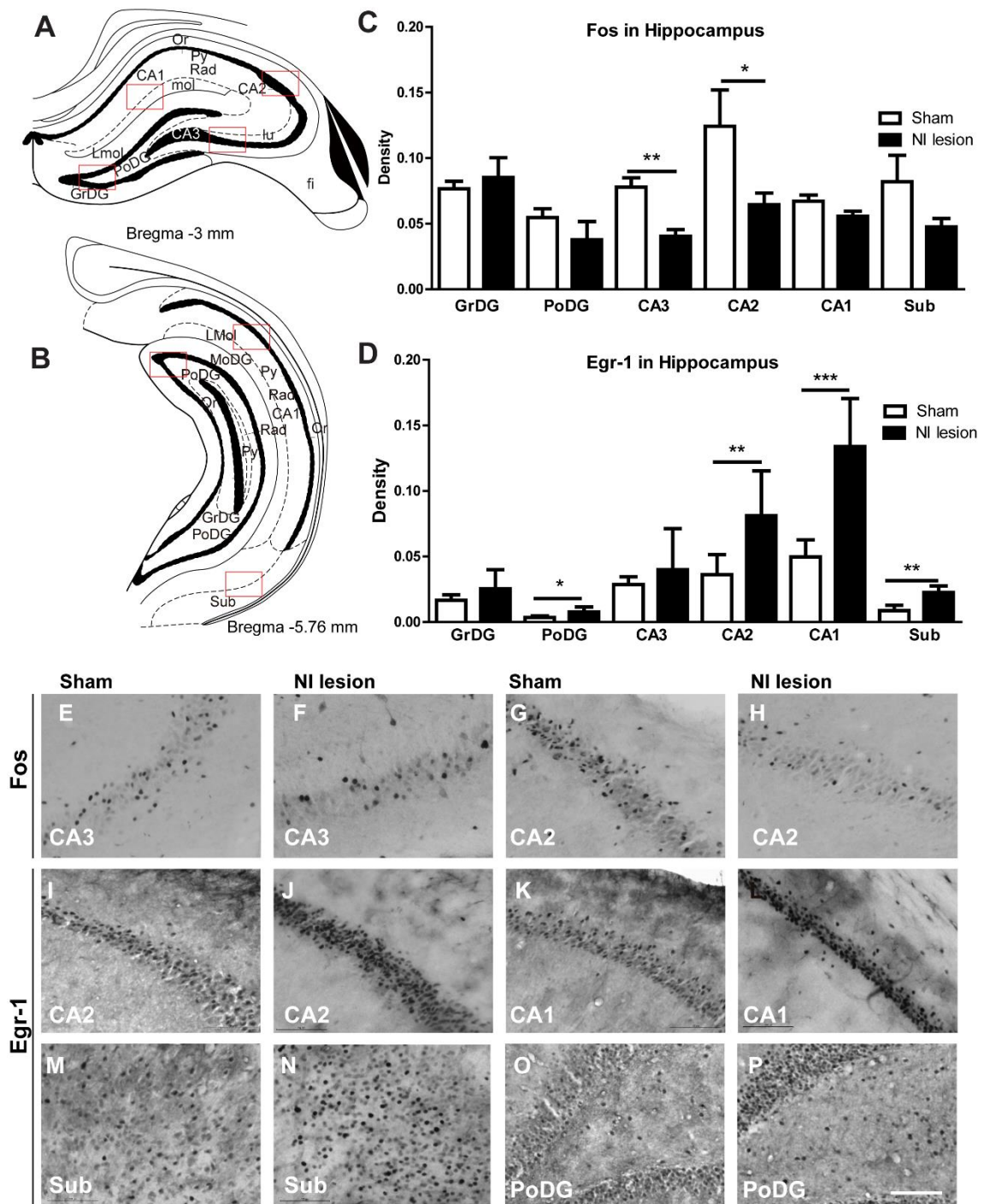
La reducción en los niveles de activación de Fos-IR en el grupo con lesión en comparación con el grupo control fue significativo en el área CA3 ( $p = 0.008$ ,  $t = 3.069$ ,  $df 14$ ) (**Figura 9C, E, F**) y en CA2 ( $p = 0.0431$ , M-W,  $U = 8.000$ ) (**Figura 9C, G, H**). Sin embargo, en contraste con el patrón de activación de c-fos, el grupo de lesionados mostró un aumento significativo en los niveles de activación de Egr-1 en la capa polimórfica del giro dentado ( $p = 0.013$ ,  $t = 2.794$ ,  $df 16$ ) (**Figura 9D, I, J**) y CA1 ( $p = 0.0001$ ,  $t = 4.937$ ,  $df 16$ ) (**Figura 9D, K, L**) y en el subíulum ( $p = 0.0023$ ,  $t = 3.57$ ,  $df 16$ ) (**Figura 9D, M, N**)

**Tabla 4** Densidades de Fos y Egr-1 en hipocampo ventral y dorsal.

Dorsal Hippocampus	c-fos		Sign, t-test or MW	egr-1		Sign, t-test or MW
	Mean $\pm$ SEM (or median)			Mean $\pm$ SEM (or median)		
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
GrDG	0,077 $\pm$ 0,006	0,085 $\pm$ 0,015	ns	0,019 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,007	ns
PoDG	0,054 $\pm$ 0,007	0,038 $\pm$ 0,014	ns	0,004 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,001	*
CA 3 Ori	0,047	0,030	ns	0,002	0,002	ns
CA 3 Rad	0,036	0,016	ns	0,001	0,001	ns
CA 3 Py	0,106 $\pm$ 0,011	0,054 $\pm$ 0,020	*	0,029	0,039	ns
CA 2	0,092	0,060	#	0,040 $\pm$ 0,005	0,080 $\pm$ 0,010	**
CA 1 Ori	0,045	0,021	ns	0,004 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001	ns
CA 1 Py	0,119 $\pm$ 0,009	0,127 $\pm$ 0,011	ns	0,053 $\pm$ 0,004	0,173 $\pm$ 0,032	***
CA 1 Rad	0,023	0,013	ns	0,001	0,001	ns
VSub	0,051	0,051	ns	0,009 $\pm$ 0,001	0,021 $\pm$ 0,005	**

Los datos presentados como media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , y p\*\*\*  $< 0.001$  para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S. # $p < 0.05$  y ## $p < 0.01$  para la comparación de la mediana usamos la prueba noparametrica Mann-Whitney (M-W) cuando los datos no siguen una distribución normal según la prueba de K-S,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión.





**Figura 9** Activación de IEGs en el hipocampo tras los paradigmas conductuales en ratas pertenecientes al grupo experimental control y lesión. (A, B) Ilustración de las áreas de hipocampo dorsal y ventral a diferentes niveles coronales (zonas encuadradas a (I-P) Imágenes representativas de Egr-1 del grupo control y de los lesionados, respectivamente, en (I, J) CA2; (K, L) CA1; (M, N) subiculum; y (O, P) capa poliforme del giro dentado. Barra de calibración, 100  $\mu$ m. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test de dos colas para comparaciones de medias; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  para Mann-Whitney comparación de medianas,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión en NI).

#### 4.1.6. Área septal

---

Se estudiaron densidades de Fos y Egr-1 en septum medial y lateral en los niveles +1.6 y +0.60 mm de bregma, mientras que el septum posterior fue estudiado en los niveles -0.12, -0.70 y -1.36 mm de bregma (Paxinos & Watson, 2014).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de activación de c-fos entre las áreas de septum tras la lesión del NI (**Tabla 5**). Por el contrario, sí que se observaron una reducción de los niveles de Egr-1 tras la lesión en comparación con el grupo control (**Figura 10B**).

Los niveles de Egr-1 disminuían en las áreas de la banda diagonal vertical de septum (VDB) (**Figura 10B, C, D**) ( $p = 0.0056$ ,  $t = 3.316$ ,  $df 13$ ), medial septum (MS) (**Figura 10B, E, F**) ( $p = 0.0242$ ,  $t = 2.549$ ,  $df 13$ ) y la zona para-diagonal (PDZ) ( $p = 0.0312$ ,  $t = 2.469$ ,  $df 11$ ).

En el septum lateral, se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de Egr-1 en el núcleo ventral (LSV) (**Figura 10B, I, J**) ( $p = 0.0360$ , M-W,  $U = 9.000$ ) y el núcleo intermedio (LSI) (**Figura 10B, G, H**;  $p = 0.0048$ , M-W,  $U = 4.000$ ).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Egr-1 en la división dorsal del septum lateral o en el núcleo accumbens entre el grupo control y el grupo con lesión (**Tabla 5**).



**Tabla 5** Densidades de Fos y Egr-1 en septum.

Medial septum	c-fos		Sign t-test or MW	egr-1		Sign t-test or MW
	Mean $\pm$ SEM (or median)			Mean $\pm$ SEM (or median)		
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
VDB	0,041 $\pm$ 0,004	0,042 $\pm$ 0,006	ns	0,112 $\pm$ 0,014	0,047 $\pm$ 0,010	**
HDB	(0,034)	(0,047)	ns	0,112 $\pm$ 0,020	0,054 $\pm$ 0,015	ns
MS	(0,034)	(0,055)	ns	0,091 $\pm$ 0,009	0,057 $\pm$ 0,009	*
PDZ	0,039 $\pm$ 0,006	0,034 $\pm$ 0,005	ns	0,121 $\pm$ 0,020	0,056 $\pm$ 0,016	*
ICj	0,043 $\pm$ 0,008	0,044 $\pm$ 0,008	ns	0,085 $\pm$ 0,007	0,090 $\pm$ 0,019	ns
LSD	0,036 $\pm$ 0,008	0,045 $\pm$ 0,008	ns	0,120 $\pm$ 0,013	0,082 $\pm$ 0,008	ns
LSI	0,037 $\pm$ 0,008	0,040 $\pm$ 0,004	ns	(0,112)	(0,073)	##
LSV	0,036 $\pm$ 0,006	0,038 $\pm$ 0,008	ns	(0,089)	(0,065)	#
TS	(0,042)	(0,028)	ns	(0,076)	(0,060)	ns
SFi	(0,036)	(0,017)	ns	(0,136)	(0,052)	ns
Acc	0,062 $\pm$ 0,012	0,045 $\pm$ 0,011	ns	0,159 $\pm$ 0,027	0,102 $\pm$ 0,022	ns

Los datos presentados como media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S. # $p < 0.05$  y ## $p < 0.01$  para la comparación de la mediana usamos la prueba nparametrica Mann-Whitney (M-W) cuando los datos no siguen una distribución normal según la prueba de K-S,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión.

#### 4.1.7. Hipotálamo anterior

La inmunoreactividad de Fos y Egr-1 en hipotálamo se estudió en los niveles -1.36 y -1.56 mm con respecto a bregma (Paxinos & Watson, 2014) (**Figura 10K**).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de activación de c-fos entre los grupos experimentales tras la realización de los test conductuales. No obstante, encontramos reducidos los niveles de expresión de Egr-1 en algunos núcleos del hipotálamo en aquellas ratas con lesión en NI en contraste con el grupo control (**Figura 10L**).

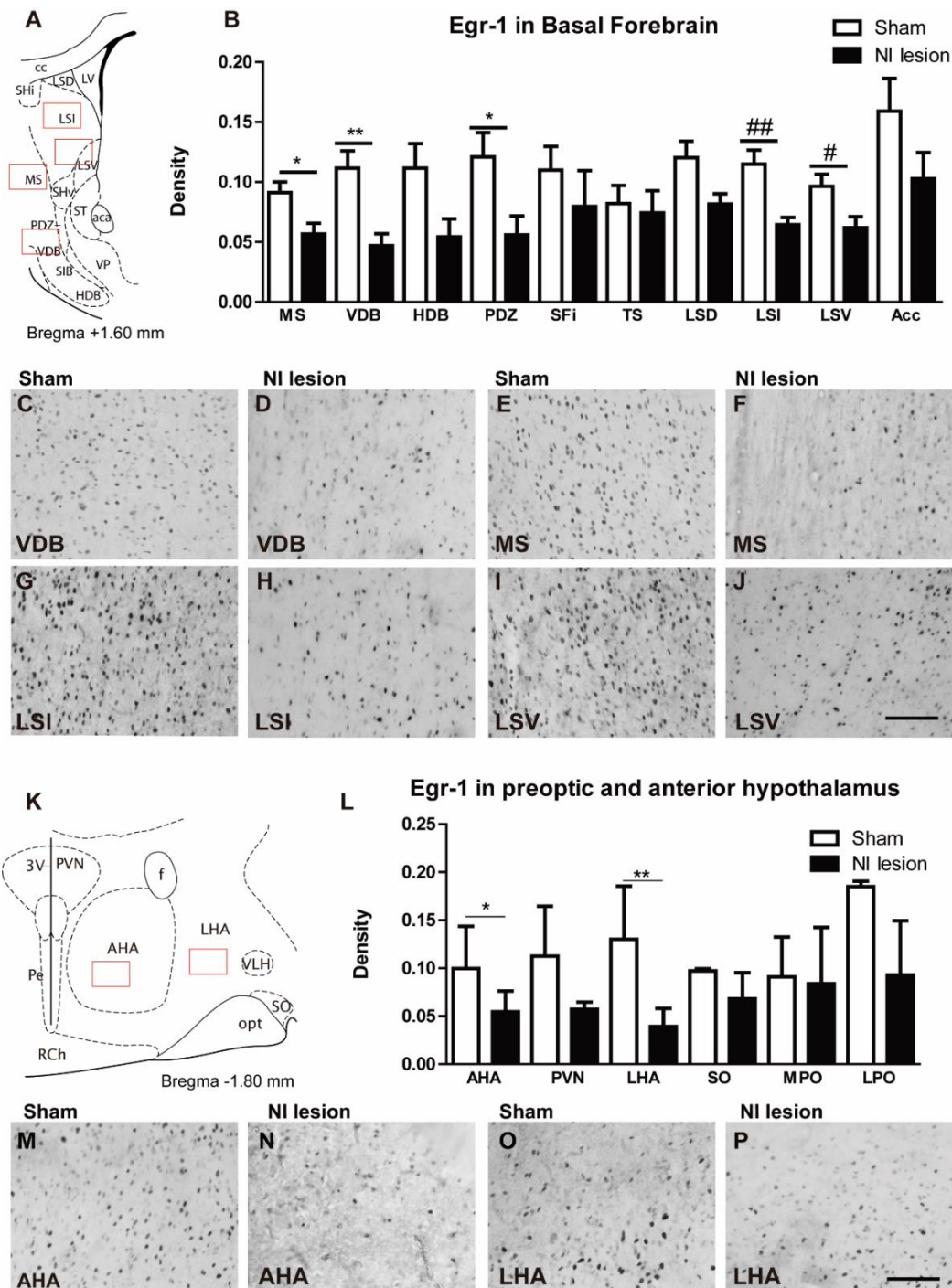
Una de esas áreas con disminución en los niveles de expresión de Egr-1 eran el área hipotalámica anterior (AHA) (**Figura 10L-N**) ( $p = 0.0374$ ,  $t = 2.318$ ,  $df 13$ ), y el área hipotalámica lateral (LHA) (**Figura 10L, O, P**) ( $p = 0.0024$ ,  $t = 3.824$ ,  $df 13$ ). No se

encontraron diferencias significativas en el resto de áreas del hipotálamo, incluyendo el núcleo preóptico lateral y medial, los núcleos supraópticos y paraventricular (**Tabla 6**).

**Tabla 6** Densidades de Fos y Egr-1 en hipotálamo.

Preoptic hypothal amus	c-fos		Sign t- test or MW	egr-1		Sign t- test or MW
	Mean ± SEM (or median)			Mean ± SEM (or median)		
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
MPO	(0,039)	(0,029)	ns	0,091 ± 0,018	0,083 ± 0,033	ns
LPO	(0,052)	(0,059)	ns	0,104 ± 0,020	0,092 ± 0,025	ns
AHA	0,060 ± 0,008	0,064 ± 0,019	ns	0,100 ± 0,015	0,055 ± 0,009	*
PVN	(0,069)	(0,050)	ns	(0,139)	(0,059)	ns
LHA	(0,030)	(0,045)	ns	0,130 ± 0,020	0,039 ± 0,008	**
SO	0,121 ± 0,020	0,093 ± 0,027	ns	(0,097)	(0,078)	ns

Los datos presentados como media ± SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \*p < 0.05 y \*\*p < 0.01 para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S. n = 13 ratas control y n = 8 ratas con lesión.



**Figura 10** Activación de IEGs en septum e hipotálamo tras los paradigmas conductuales en ratas pertenecientes al grupo experimental control y lesión. (A) Ilustración de las áreas septales analizadas (zonas encuadradas a estudio). (B) Histograma de la densidad de las neuronas (media  $\pm$  SEM) que contienen Egr-1 en varias áreas de septum. (C-J) Imágenes representativas de Egr-1 del grupo control y de los lesionados, respectivamente, en (C, D) banda diagonal vertical; (E, F) banda diagonal horizontal; (G, H) división intermedia del septum lateral; y (I, J) división ventral del septum lateral. (K) Área analizada del hipotálamo. (L) Histograma de la densidad de las neuronas (media  $\pm$  SEM) que contienen Egr-1 en varias áreas del hipotálamo. (M, P) Imágenes representativas de Egr-1 del grupo control y de los lesionados, respectivamente, en (M, N) área hipotalámica anterior; y (O, P) área hipotalámica lateral. Barra de calibración, 100  $\mu$ m. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test de dos colas para comparaciones de medias; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  para Mann-Whitney comparación de medianas,  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión en NI).

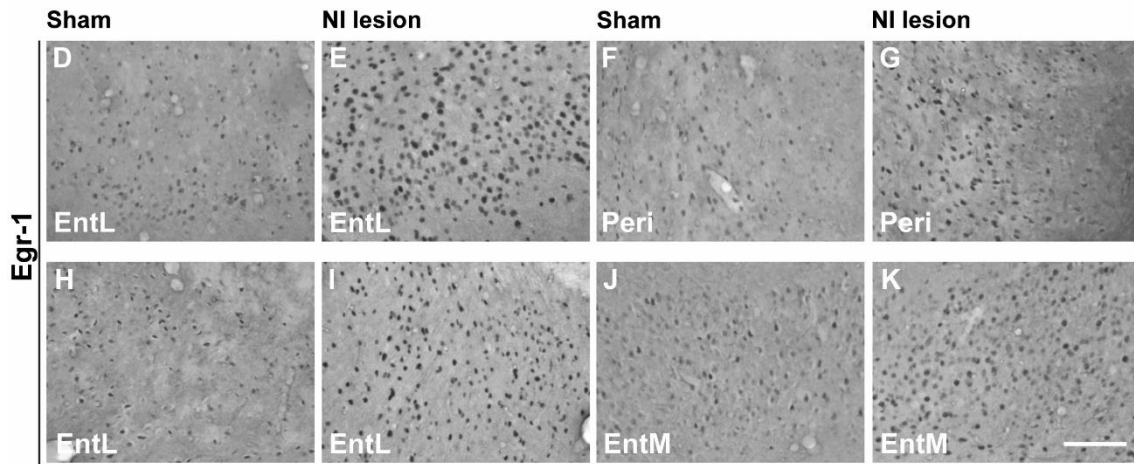
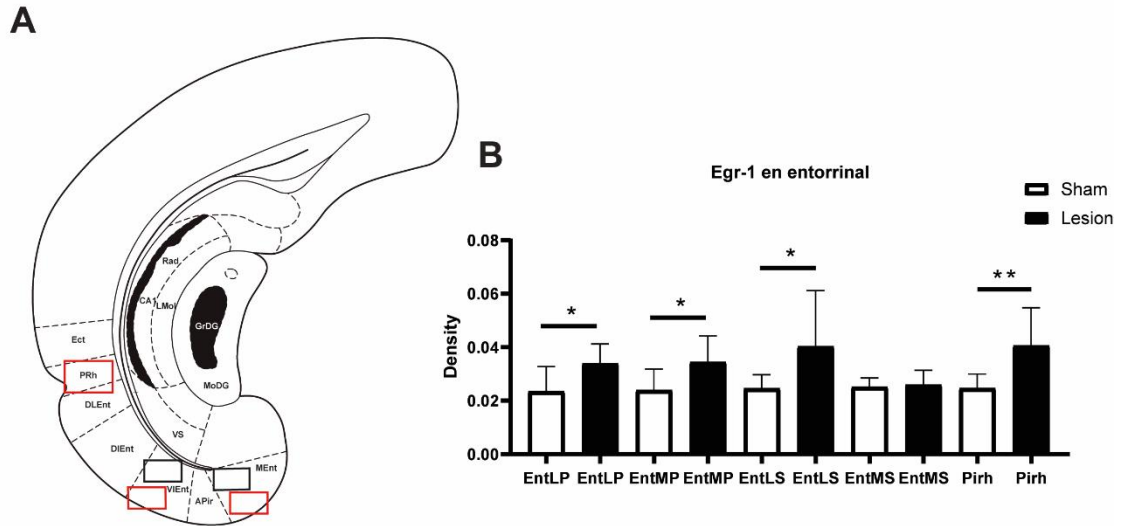
#### 4.1.8. Áreas parahipocámpicas

La inmunoreactividad de Fos y Egr-1 en áreas hipocámpicas se estudió en los niveles -6.24 y -6.60 mm con respecto a bregma (Paxinos & Watson, 2014). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de activación de c-fos entre los grupos experimentales tras la realización de los test conductuales. No obstante, se encontraron un aumento significativo de los niveles de expresión de Egr-1 en áreas corticales de entorrinal lateral en comparación con los sujetos control (EntL,  $p = 0.0353$ ,  $t = 2.314$ ,  $df = 15$ ) y corteza perirrinal ( $p = 0.0052$ ,  $t = 3.271$ ,  $df = 15$ ) (**Figura 11B, E-G**). En cuanto a las capas profundas de entorrinal, se encontraron aumentos significativos de los niveles de activación de Egr-1 en EntL ( $t=2.418$ ,  $df=14$   $P=0.0298$ ) y EntM ( $t = 2.384$ ,  $df = 14$   $P = 0.0318$ ) (**Figura 11C, H-K**) (**Tabla 7**).

**Tabla 7** Densidades de Fos y Egr-1 en los diferentes núcleos de entorrinal.

Entorrinal	c-fos		Sign t-test or MW	egr-1		Sign t-testor MW
	Mean $\pm$ SEM (or median)			Mean $\pm$ SEM (or median)		
	Sham	Lesion		Sham	Lesion	
<b>EntL (sup)</b>	0.056 $\pm$ 0.004	0.042 $\pm$ 0.007	ns	0.025 $\pm$ 0.002	0.040 $\pm$ 0.008	*
<b>EntM (sup)</b>	0.051 $\pm$ 0.004	0.056 $\pm$ 0.006	ns	0.025 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.002	ns
<b>Perirrinal</b>	0.042 $\pm$ 0.002	0.046 $\pm$ 0.006	ns	0.025 $\pm$ 0.002	0.041 $\pm$ 0.005	**
<b>EntL (prof)</b>	0.038 $\pm$ 0.004	0.036 $\pm$ 0.006	ns	0.023 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.003	*
<b>EntM(prof)</b>	0.049 $\pm$ 0.004	0.063 $\pm$ 0.007	ns	0.024 $\pm$ 0.003	0.034 $\pm$ 0.004	*

Los datos presentados como media  $\pm$  SEM y representan el área ocupada por núcleos inmunopositivos para Fos y Egr-1 dividido por el área de la región analizada. Ns, no significativo, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  para la prueba t-test para datos no apareados cuando siguen una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad K-S.  $n = 13$  ratas control y  $n = 8$  ratas con lesión.



**Figura 11** Activación de IEGs en las capas corticales y profundas de entorrinal tras la realización de los test en ratas pertenecientes al grupo experimental control y lesión. (A) Ilustración de las áreas entorrinales analizadas (zonas encuadradas a estudio). (B, C) Histograma de la densidad de las neuronas (media  $\pm$  SEM) que contienen Egr-1 en varias áreas de entorrinal en capas corticales y profundas. (D-G) Imágenes representativas de Egr-1 del grupo control y de los lesionados, respectivamente, en capas corticales de (D, E) entorrinal lateral; (F, G) corteza perirrinal; y en capas profundas (H, K), de entorrinal lateral (H, I); y entorrinal medial (J, K). (K) Área analizada del hipotálamo. (L) Histograma de la densidad de las neuronas (media  $\pm$  SEM) que contienen Egr-1 en varias áreas del hipotálamo. Barra de calibración, 100  $\mu$ m. (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, test de dos colas para comparaciones de medias.  $n$  = 13 ratas control y  $n$  = 8 ratas con lesión en NI).

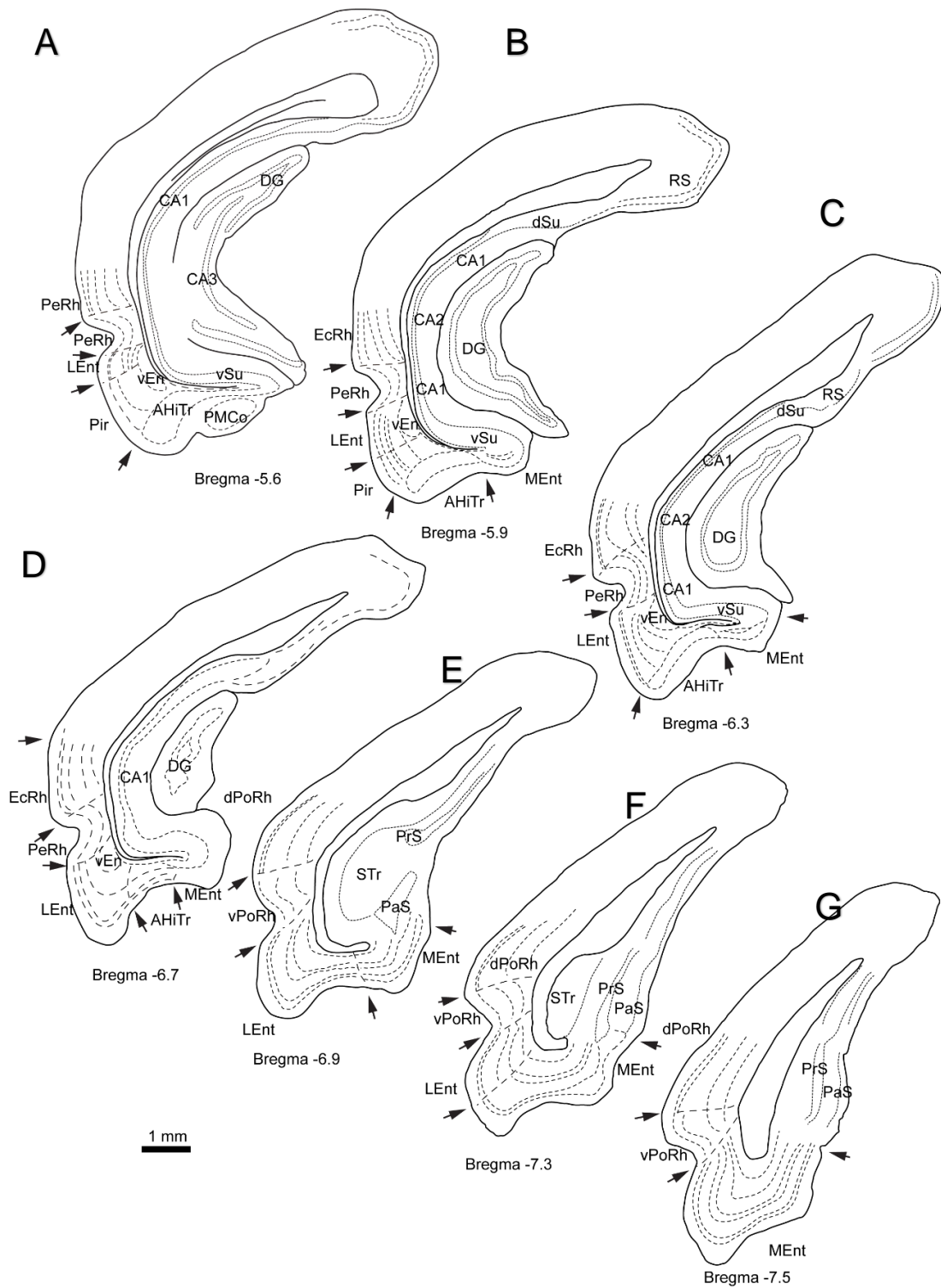
## 4.2. Innervación del núcleo incertus sobre la corteza entorrinal

---

Para la descripción general respecto a la innervación del giro parahipocampal por RLN3/NI se ha tomado los límites generales y específicos en el atlas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2014). El giro parahipocampal ocupaba la región ventral entre la fisura rinal lateral y una indentación medial. Además, también se ha considerado un área de transición un área de transición justo dorsal a la fisura rinal, la corteza entorrinal, como parte del giro parahipocampal. En la presente descripción, se ha considerado el giro parahipocampal que está compuesto de las cortezas perirrinal y postrinal alrededor de la fisura rinal, las dos principales divisiones de la corteza entorrinal llamadas, entorrinal medial (MEnt) y entorrinal lateral (LEnt), y también el área de transición amígdalohipocampal (AHiTr). En este estudio, se han considerado los niveles -5.6 mm respecto a bregma del atlas Paxinos como los más rostrales (**Figura 12A**). A este nivel la amígdala cortical posteromedial (PMCo) apareció ventralmente como un accidente ovoide en la superficie ventral de la corteza. La PMCo estaba cubierta profundamente rodeada por el AHiTr que se extendía medialmente para convertirse en el complejo subicular continuo. Lateralmente, el AHiTr terminó abruptamente delimitando el límite ventral del LEnt. El LEnt se extendía a lo largo de la parte lateral del giro parahipocampal, justo ventral a la fisura rinal. En las capas más profundas de LEnt, apareció un núcleo pobre en células triangulares que pareció ser continuo con el núcleo endoperiforme ventral (VEn) más rostral.

El segundo nivel correspondió al nivel -5.9 mm con respecto a bregma del atlas Paxinos como la más rostral (**Figura 12B**). A este nivel la PMCo no estaba presente y el AHiTr ocupaba la región ventral del giro parahipocampal. Justo en la esquina del giro parahipocampal, se ha identificado que la punta rostral de la MEnt presenta un área pobre en células en las capas profundas II/III densamente empaquetadas. La corteza Pir no estaba presente en este nivel.

El tercer nivel corresponde al nivel -6.3 mm correspondiente a bregma (**Figura 12C**). En este nivel, la pared medial del giro parahipocampal fue ocupado por la MEnt, el cual se hizo más ancho. El AHiTr ocupó la región ventral central del giro parahipocampal el cual presentaba una muesca poco profunda. La pared lateral fue ocupada por la LEnt. Se produjo un límite claro entre el AHiTr y la LEnt. El Ven todavía persistía en las regiones más profundas de LEnt.



**Figura 12** Representación de los diferentes niveles de la corteza parahipocampal y las regiones que la componen. A) Nivel del área parahipocampal más rostral correspondiente al nivel -5.6 mm con respecto a bregma. B) Segundo nivel de la corteza parahipocampal a estudiar correspondiente al nivel -5.9 mm correspondiente a bregma. C) Tercer nivel a estudio correspondiente al nivel -6.3 mm con respecto a bregma. D) Cuarto nivel a estudio correspondiente al nivel -6.7 mm con referencia a bregma. E) Quinto nivel de estudio de la corteza parahipocampal correspondiente al nivel -6.9 mm de bregma. F) Sexto nivel a estudiar del nivel -7.3 mm con respecto a bregma. G) Séptimo nivel a estudio correspondiente al nivel -7.6 mm de bregma.

El cuarto nivel correspondiente al nivel -6.7 mm de bregma (**Figura 12D**), fue el último nivel que contenía el giro dentado perteneciente a una de las regiones del hipocampo ventral. En este nivel, la MEnt ocupó la pared medial del giro parahipocampal. En una sección coronal estaba compuesta por una hoja vertical y horizontal. La parte central del giro contenía del AHITr el cual fue altamente reducida. La Ent ocupó las regiones ventrolaterales del giro parahipocampal.

El quinto nivel correspondió a los niveles -6.9 mm con respecto a bregma (**Figura 12E**). A este nivel el hipocampo solamente estaba representado por el área de transición subicular (STr). Las regiones ventrales dependientes de las áreas subiculares fueron claramente visibles, el parasubiculum (PaS) el cual contenía pequeñas neuronas densamente empaquetadas y el presubiculum (prS) el cual apareció dorsalmente. Todo el giro parahipocampal podría dividirse en una región ventromedial para la MEnt y en una región lateroventral para el LEnt. A este nivel, la muesca de la fisura rinal apareció con un ángulo abierto y la organización celular fue diferente conteniendo un área ventral identificada como corteza ventral postrinal (vPoRh) y un área dorsal que fue identificada como postrinal dorsal (dPoRh).

El sexto nivel correspondiente al nivel de bregma -7.3 mm (**Figura 12F**). La región lateral de la corteza, se identificaron claramente dos áreas como el PaS el cual ocupó el área superficial y el prS un poco más profundo. La MEnt y la LEnt también aparecieron claramente diferenciadas ya que la LEnt contenía una capa II de células casi unicelulares mientras que la MEnt contiene una capa II más ancha y multicelular.

El séptimo nivel correspondía a bregma -7.6 mm (**Figura 12G**). En este nivel una pequeña edentadura separaba la formación subicular del giro parahipocampal. El STri no estaba presente en este nivel. La MEnt ocupaba la región ventromedial del giro parahipocampal y fue caracterizado por una amplia capa II. En la parte lateral, la LEnt ocupaba la región ventromedial y se caracterizaba por una fina capa II. Alrededor de la fisura rinal la vPsRh y dPoRh ocupaban la pared lateral de la corteza temporal.

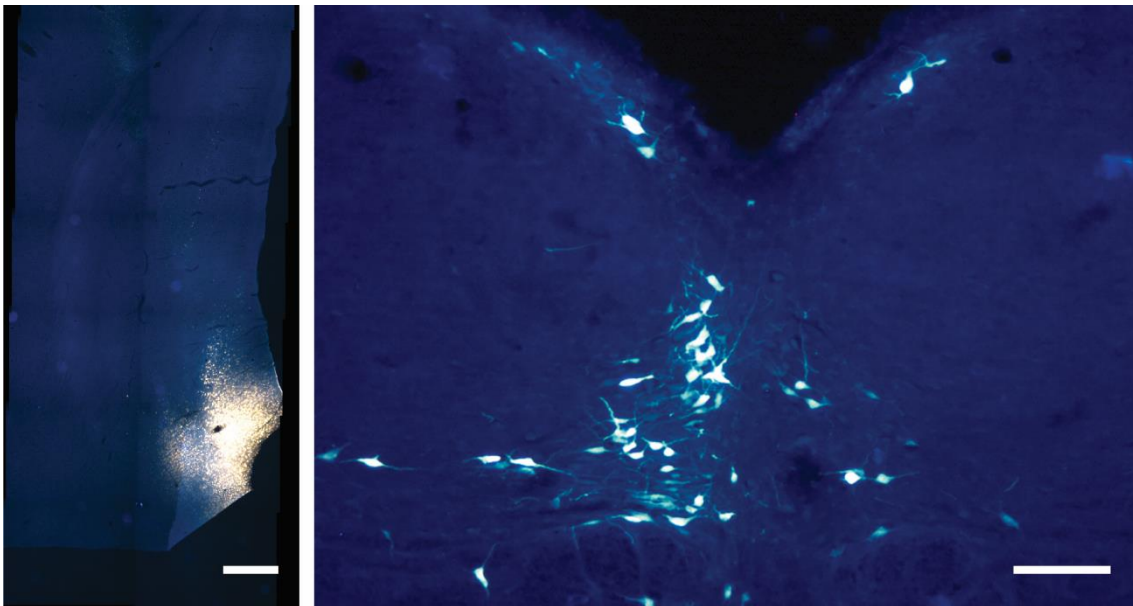


### 4.2.1. Proyección desde el núcleo incertus sobre la corteza entorrinal

---

Con objeto de comprobar la existencia de una proyección desde el NI a la corteza entorrinal, en 3 ejemplares se efectuaron inyecciones del trazador retrógrado en la corteza entorrinal.

Las inyecciones se restringieron a la corteza entorrinal medial (**Figura 12A**). Estas inyecciones dieron como resultado transporte retrógrado en el rafe mediano y en el rafe pontino, sin embargo, se hizo mucho más prominente a nivel del núcleo incertus donde se localizaba tanto en la pars compacta como en la pars dissipata. El marcaje se localizaba fundamentalmente en el lado ipsilateral, pero alrededor del 20 % del total de neuronas marcadas se localizaban en el lado contralateral (**Figura 12B**).



**Figura 13** Marcaje retrógrado en el NI tras inyección de fluorogold en la corteza entorrinal medial. A.- Punto de inyección en el nivel 7 de la corteza entorrinal medial. B) Marcaje retrógrado en las partes compacta y dissipata del núcleo incertus ipsilateral. El marcaje en el lado contralateral era aproximadamente el 20 % del total del marcaje retrógrado en el núcleo incertus. Barras de calibración en A 1 mm, en B 100 $\mu$ m.

## 4.2.2. La corteza entorrinal lateral

---

La LEnt ocupaba la región anterolateral de la corteza parahipocámpica temporal justamente caudal a la corteza piriforme (**Figura 14**).

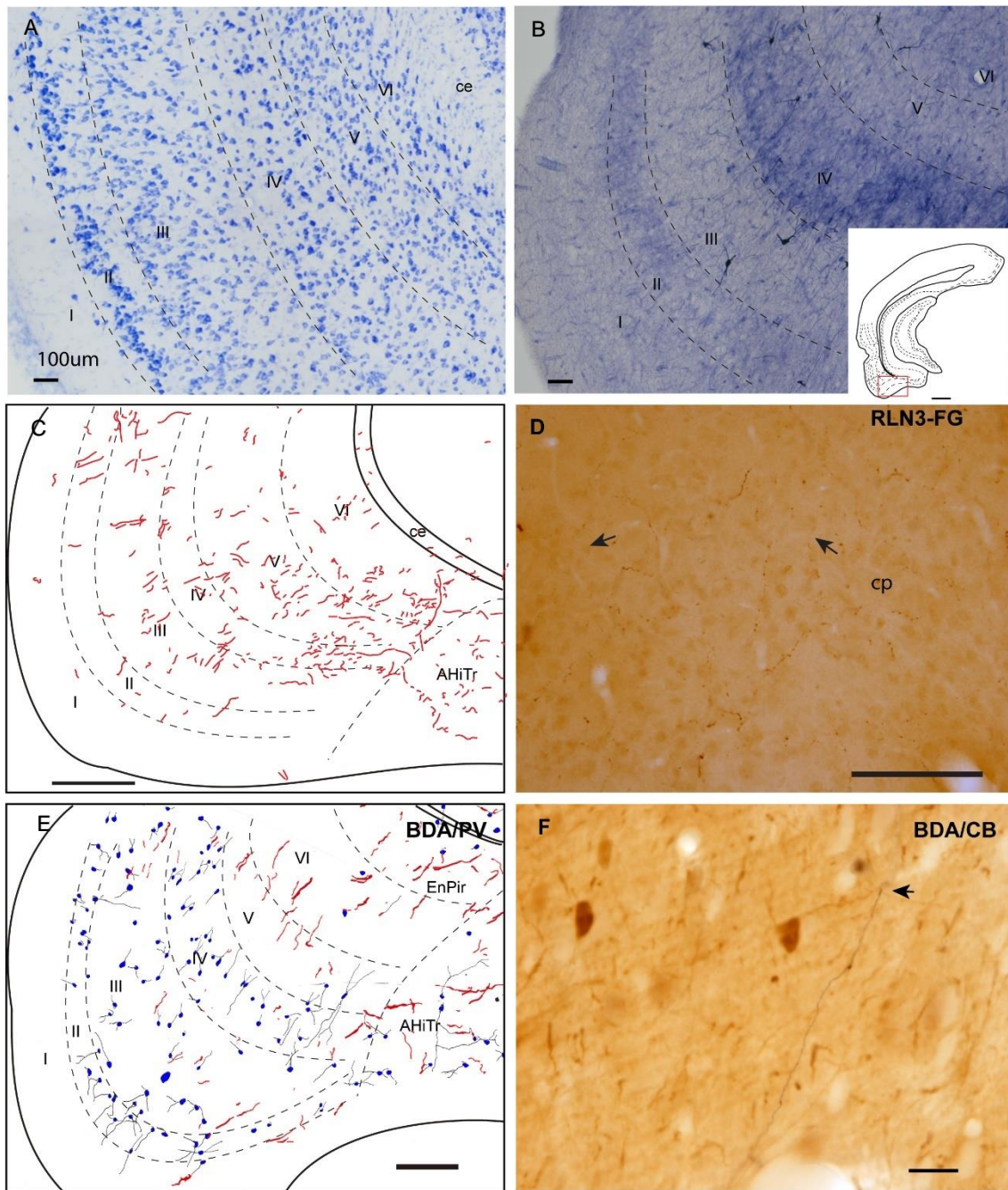
Esta región cortical estaba compuesta de seis capas corticales regulares. En las secciones teñidas con Giemsa, la capa II era una capa delgada (casi unicelular compuesta por neuronas grandes densamente empaquetadas. La capa III contenía neuronas pequeñas dispersas y sueltas.

La capa IV también se consideraba como lámina *dissecans* y era una capa delgada y con poca población celular. Las neuronas en la capa V eran de gran tamaño y poco empaquetadas. Finalmente, la capa VI contenía neuronas de pequeño tamaño densamente empaquetadas (**Figura 14A**). En las secciones que reaccionaron con NADPHd, las capas II y V mostraron una señal intensa (**Figura 14B**).

No hubo una concentración particular de fibras positivas en RLN3 en la capa de LEnt y, a veces, parecía mostrar una distribución irregular entre las regiones dorsal y ventral (**Figura 14C-D**).

En la capa VI se pueden encontrar diferentes capas de LEnt, pero solo células positivas dispersas. En estos casos, las inyecciones del trazador anterógrado BDA en el NI dieron lugar cierto marcaje anterógrado en esta capa (**Figura 14E**).

Cuando se aplicó la reacción doble CB-BDA, fue posible encontrar contactos entre las fibras marcadas anterógradamente y los procesos neuronales CB (**Figura 14F**).



**Figura 14** A, B) Imagen de la LEnt con tinción de Giemsa junto con las seis capas celulares que la componen. C) Representación de fibras RLN3 en LEnt. D) Inmunorreactividad de RLN3 junto con marcaje de un trazador retrógrado (FG). E) Representación de fibras RLN3 en LEnt junto con marcaje de parvalbumina (PV). F) Inmunorreactividad de calbindina (CB) junto con marcaje de un trazador anterógrado (BDA).

### 4.2.3. La corteza entorrinal medial

---

El MEnt ocupaba las regiones posteromediales de la corteza parahipocampal temporal y se extendió desde las áreas mediales a laterales a medida que se avanzaba hacia los niveles caudales - 6.3 a -7.5 con respecto Bregma (**Figura 15**).

La corteza de MEnt estaba compuesta por las seis capas corticales regulares. En las secciones teñidas con Giemsa, las capas II y III se fusionaban para formar una ancha capa. La fusión de estas dos capas parecía estar en continuidad con el parasubículo.

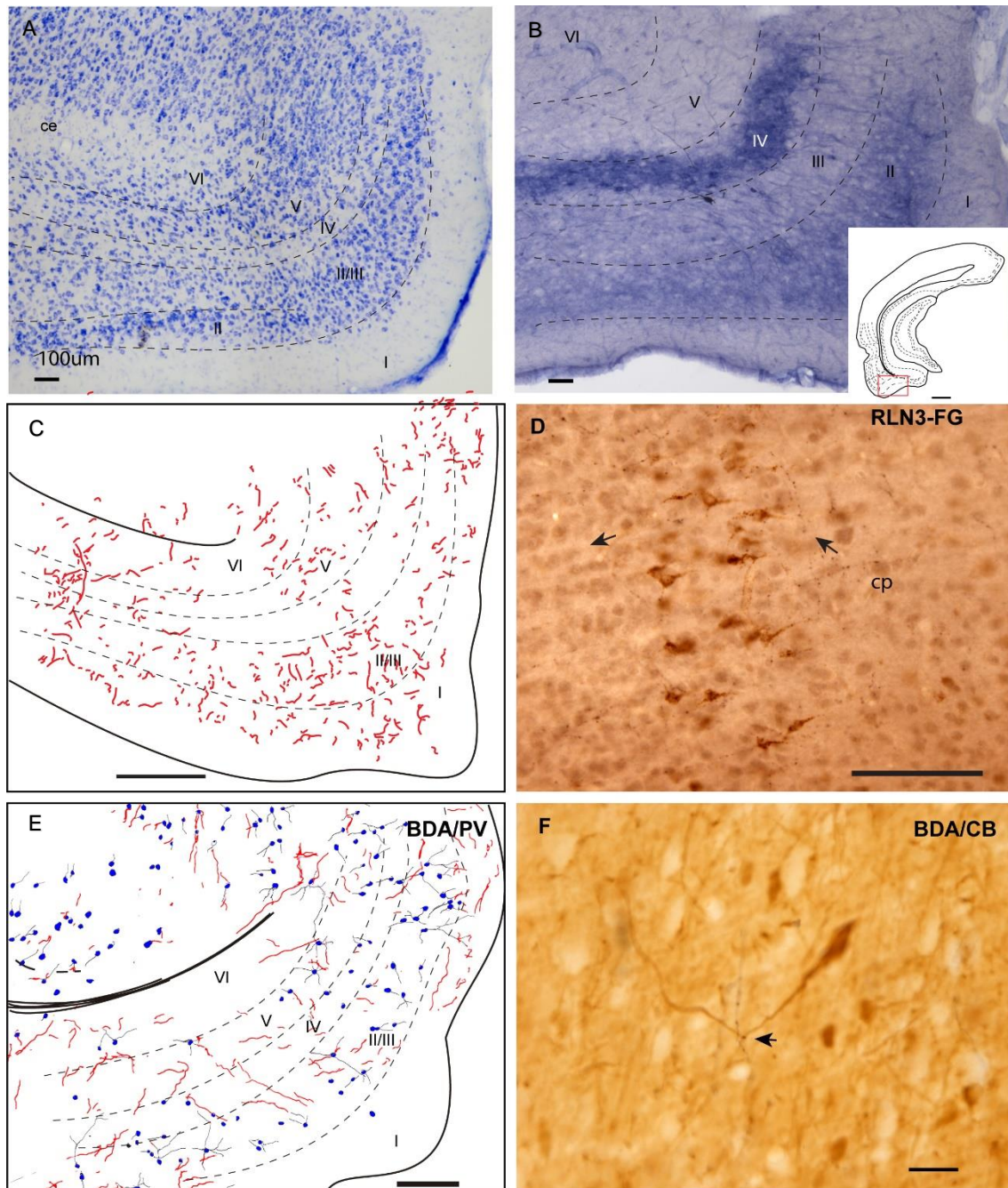
La capa IV también fue considerada como lámina *dissecans* y era una capa delgada, con poca población celular. Además, las capas V y VI parecían estar fusionadas y contenían neuronas densamente empaquetadas que parecían estar en continuidad con el presubículo (**Figura 15A**).

Por otro lado, era evidente la fuerte reacción de la capa IV en las secciones que reaccionaron con NADPHd. Más superficialmente, aunque no era tan clara en la tinción de Giemsa, la reacción de NADPHd era más fuerte en la capa II que en la capa III. Por el contrario, las capas V y VI mostraron una reacción de NADPHd similar (**Figura 15B**).

A la diferencia de LEnt, en MEnt RLN3 el marcaje fue más fuerte en las capas superficiales, incluida la capa I (**Figura 15C**). Algunas de estas fibras parecían tener contacto con las dendritas apicales de las neuronas marcadas retrógradamente con FG en el giro dentado (**Figura 15D**).

También las fibras positivas en BDA marcadas anterógramente con inyecciones en el núcleo incierto mostraron una distribución similar a las fibras RLN3 (**Figura 15E**). Además, fue posible encontrar contactos entre las fibras de BDA y los procesos dendríticos de las neuronas positivas para PV (**Figura 15F**).





**Figura 15** A, B) Imagen de la MEnt con tinción de Giemsa junto con las seis capas celulares que la componen. C) Representación de fibras RLN3 en LEnt. D) Inmunorreactividad de RLN3 junto con marcaje de un trazador retrógrado (FG). E) Representación de fibras RLN3 en MEnt junto con marcaje de parvalbumina (PV). F) Inmunorreactividad de calbindina (CB) junto con marcaje de un trazador anterógrado (BDA).

#### 4.2.4. Contactos entre las fibras RLN3 y las neuronas identificadas de la corteza parahipocampal

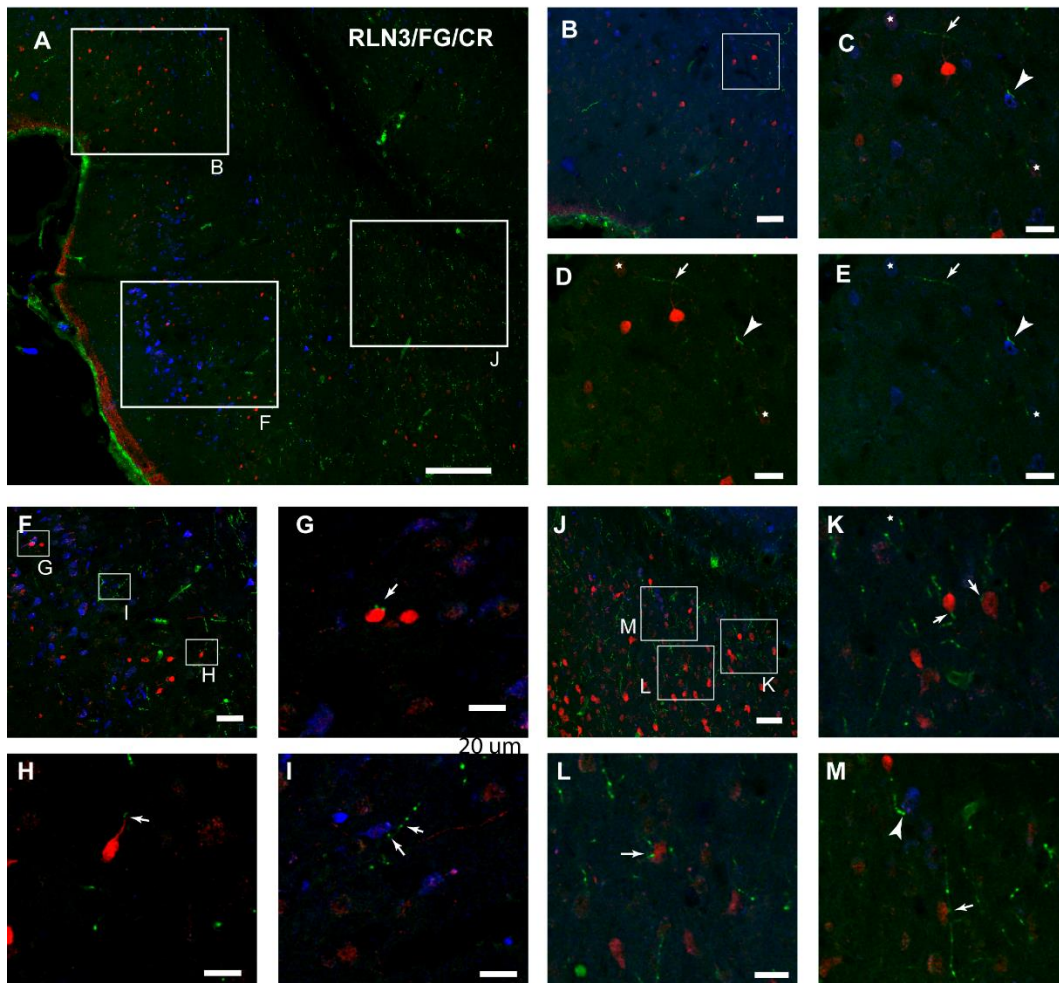
---

Hemos estudiado en el microscopio confocal la posibilidad de contactos cercanos entre los tipos neuronales identificados y las fibras RLN3 (**Figura 16**). En las capas profundas de la corteza perirrinal fue posible encontrar contactos positivos entre las fibras RLN3 y las neuronas positivas en CR.

En estas mismas muestras, también fue posible encontrar neuronas con doble marcaje de CR y de FG tras la inyección del trazador en una amplia área que contiene el giro dentado y CA1 (**Figura 16B-E**).

En la LEnt, también fue posible encontrar contactos entre las neuronas RLN3 y las neuronas CR o neuronas positivas en FG trazadas retrógradamente a partir de inyecciones en el hipocampo (**Figura 16F-I**).

No se pudo encontrar en esta área dobles marcajes para FG y CR. En las capas profundas de la LEnt, en la DEnd, también fue posible encontrar contactos entre las fibras positivas en RLN3 y las neuronas positivas en FG o CR (**Figura 16J-M**).



**Figura 16** Imágenes de marcajes de inmunofluorescencia obtenidas a través de un microscopio confocal. A) Marcaje de fibras de RLN3, neuronas marcadas con el trazador de fluorogold (FG), y expresión de calretinina (CR) en corteza perirrhinal. Barra de calibración 200  $\mu\text{m}$ . B-E) Dobles marcajes en neuronas con FG y CR en una amplia zona que contiene giro dentado y CA1. Barra de calibración 20  $\mu\text{m}$ . F-I) Marcaje del trazador FG y CR en neuronas localizadas en LEnt junto con contacto con fibras RLN3. Barra de calibración 20  $\mu\text{m}$ . J-M) Marcaje del trazador FG y CR en neuronas localizadas en capas profundas de LEnt y DEnt junto con contacto con fibras RLN3. Barra de calibración 20  $\mu\text{m}$ . Barra de calibración 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5. Aparición de RLN3 en marcadores sinápticos

---

El análisis del marcaje de sinaptofisina (syn) como marcadores presinápticos dentro de las fibras positivas de RLN3 reveló que solo se produjo colocalización en las 5-10 micras superficiales de ambas superficies en cada sección. IF de sinaptofisina produce un marcado granular de 0,5-1  $\mu\text{m}$  de diámetro que refleja el perfil de procesos neuronales putativos y somas sin marcar (**Figura 17A**).

En algunas partes, como en la corteza perirrinal, era inusual encontrar fibras RLN3 que contuvieran marcaje granular de syn (**Figura 17A-C**). Por el contrario, en ambas, la capa superficial (**Figura 17D-F**) y profunda (**Figura 17G-I**) de la MEnt, la mayoría de las fibras marcadas con RLN3 también contenían marcaje de syn.

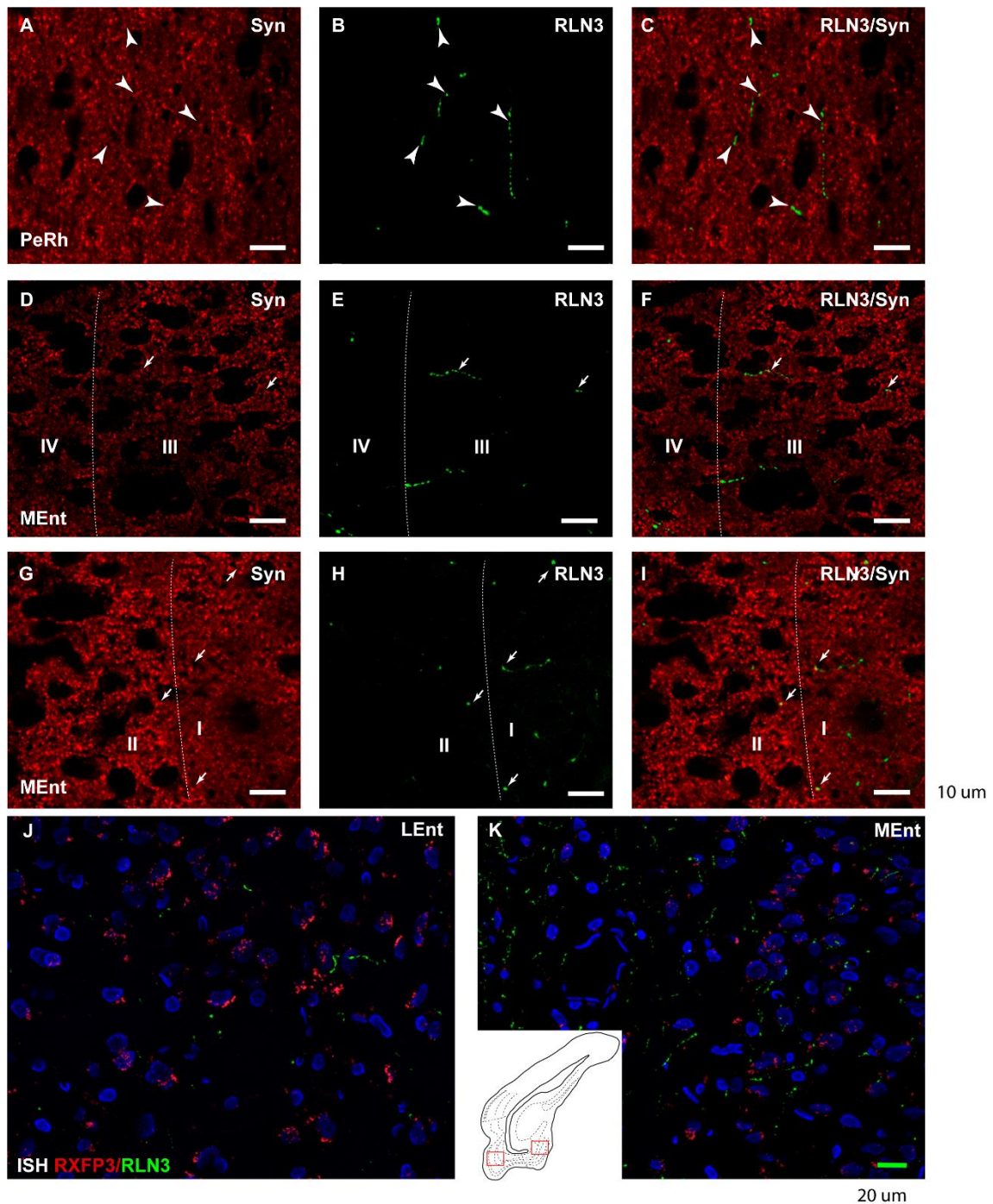
#### 4.2.6. Aparición de RXFP3 y RLN3 en la corteza entorrinal

---

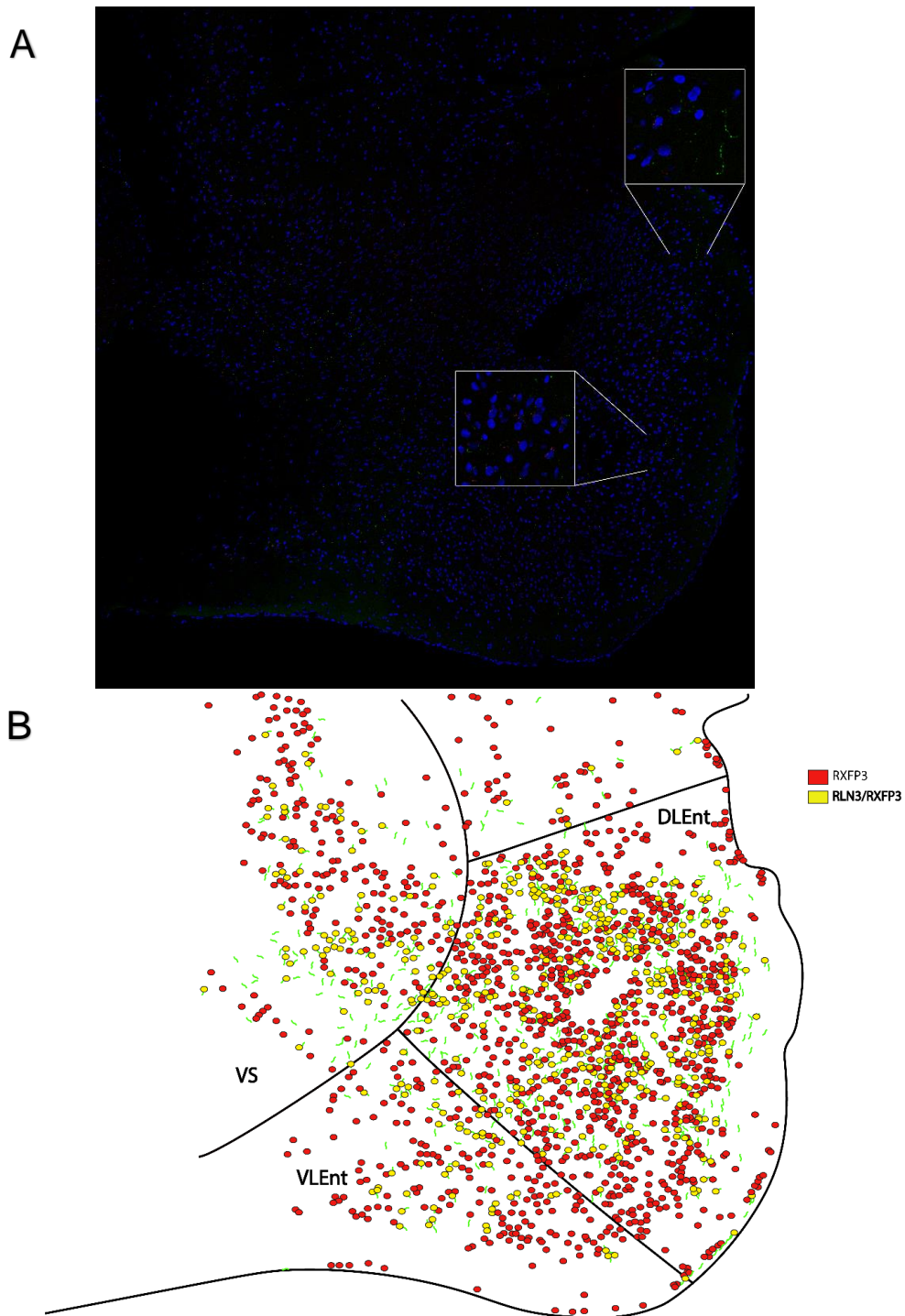
Se ha optimizado un método para la co-detección de receptores RXFP3 a través de la hibridación *in situ* de RNAScope © e IF de RLN3. En estas muestras pudimos encontrar una alta concentración de células positivas en RXFP3 en las capas superficiales II y III de ambos, LEnt (**Figura 17J**) y MEnt (**Figura 17K**). Por el contrario, las fibras RLN3 están densamente distribuidas en las capas profundas V y VI (**Figura 17J-K**).

Para el estudio de distribución del sistema RXFP3/RLN3 en la corteza entorrinal se hizo una hibridación múltiple fluorescente *in situ* de RNAScope ©. Se analizó un único caso en el que, a través de realizar una representación del mapa de distribución de los receptores y las fibras, se encontró una distribución prácticamente uniforme de fibras RLN3 por las diferentes zonas de entorrinal. Sin embargo, se ha observado que los receptores RXFP3 son más abundantes en la región dorsolateral de la corteza entorrinal (**Figura 18**).





**Figura 17** A) Marcaje de sinaptofisina (syn) en corteza perirrinal. B) Inmunomarcaje de fibras RLN3 en corteza perirrinal. C) Colocalización de fibras RLN3 y marcaje de syn en corteza perirrinal. D) Marcaje de sinaptofisina (syn) en capas superficiales de MEnt. E) Inmunomarcaje de fibras RLN3 en capas superficiales de MEnt. F) Colocalización de fibras RLN3 y marcaje de syn en capas superficiales de MEnt. G) Marcaje de sinaptofisina (syn) en capas profundas de MEnt. H) Inmunomarcaje de fibras RLN3 en capas profundas de MEnt. I) Colocalización de fibras RLN3 y marcaje de syn en capas profundas de MEnt. Barra de calibración 10  $\mu\text{m}$  J) Imágenes de confocal de RNAScope de RLN3 junto con el receptor RXFP3 en LEnt. K) Imágenes de confocal de RNAScope de RLN3 junto con el receptor RXFP3 en MEnt. Barra de calibración 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18** A) Imagen de una hibridación múltiple *in situ* fluorescente RNAscope ©, obtenida a través de un microscopio confocal. B) Mapa de distribución de receptores RXFP3 y fibras de RLN3 en las diferentes áreas de la corteza entorrinal. Representado en círculos rojos aquellos somas neuronales con presencia de receptores RXFP3, representado en círculos amarillos aquellos somas neuronales con presencia de receptores RXFP3 junto con fibras adyacentes a dichos somas.

## **5. Discusión**

Los resultados anatómicos y de comportamiento obtenidos en el presente estudio indican un papel relevante del núcleo incertus en el proceso de reconocimiento social en ratas macho. Este papel se desarrolla a través de un amplio sistema de conexiones sobre el hipocampo, la amígdala, el septum, la corteza prefrontal y la corteza entorrinal.

## 5.1. Efectos de la lesión del núcleo incertus sobre el reconocimiento social

---

Para determinar el papel del núcleo incertus sobre la conducta social se ha utilizado ácido quinolénico como agente excitotóxico. El ácido quinolénico comparte las mismas propiedades que el ácido iboténico actúa a través de la vía de los receptores GluR5 (kainate) (Schwarcz et al., 1983) o los receptores NMDA (Guillemin, 2012) para provocar muerte neuronal. De hecho, el NI presenta una gran concentración de receptores GluR5 alrededor del núcleo tegmental dorsal, como se ilustró en el atlas Allen cerebral de ratón para esos receptores (Science, 2004) y en estudios de hibridación in situ de cerebros de rata (Wisden & Seeburg, 1993).

## 5.2. Efectos sobre el comportamiento

---

Específicamente, las lesiones excitotóxicas de las neuronas del NI, y sus áreas circundantes junto con las proyecciones, deterioran la preferencia social hacia un conoespecífico nuevo, pero no altera la discriminación entre un conoespecífico y un objeto inanimado.

El efecto comportamental de la lesión del NI se ha visto reflejada en una disminución en el tiempo de exploración de un conoespecífico novedoso, en el caso de los lesionados en comparación con las ratas del grupo control; mientras que esta diferencia fue significativa en el grupo control. Estos resultados obtenidos son algo diferentes a los obtenidos en otros trabajos en los que se utiliza el paradigma de las tres habitaciones, obteniendo un aumento en el tiempo de exploración de conoespecíficos familiares por parte del grupo experimental (Manfré et al., 2018).

### 5.3. Efectos sobre la expresión de genes de actividad inmediata

---

El cambio en el patrón de comportamiento es consecuencia del patrón de expresión de genes de actividad inmediata en los centros que ejecutan las conductas sociales. En este estudio, la lesión del NI produce una reducción de los niveles de expresión de Egr-1 tras la exposición al paradigma social de las tres habitaciones, en amígdala, septum e hipotálamo, pero se produce un incremento de los niveles de expresión en hipocampo (con todas esas regiones asociadas con la regulación neural del comportamiento social).

Estudios previos han abordado la contribución de las diferentes regiones del encéfalo en el comportamiento social con considerable atención en la actividad neural del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Fernández et al., 2018). Sin embargo, el tronco del encéfalo puede modular la actividad encefálica durante el comportamiento social (Carmichael & Lockhart, 2012). Los resultados de este trabajo sugieren que la actividad neuronal del NI es necesaria para un reconocimiento social óptimo, el cual es consistente con la contribución del NI con otros aspectos de funcionalidad óptima del encéfalo. En este sentido, la inactivación del NI inducida por lidocaína provoca una alteración en la memoria espacial (Nategh et al., 2015), lesiones selectivas de las neuronas del NI responsables de la respuesta de estrés con CRF-saporina altera el condicionamiento de miedo (L. C. Lee et al., 2014). Se ha demostrado que las lesiones electrolíticas del NI alteran la extinción del miedo (Pereira et al., 2013), y la activación quimiogénica de las neuronas del NI producen un incremento en la conducta de vigilancia durante el recuerdo y la memoria de miedo (Sherie Ma et al., 2017).

En este trabajo se ha observado efectos no significativos en los niveles de expresión de cfos tras la realización del paradigma de interacción social en el grupo con lesión en NI en todas las áreas encefálicas, excepto, para la región cortical IL, y el hipocampo. Aunque, la reducción de la inmunoreactividad de cfos en IL inducida por la lesión en NI, sugiere la activación normal del NI en esta área cortical. Se ha reportado una influencia directa del NI en el circuito de la corteza prefrontal-hipocámpal (Farooq et al., 2013), con activación del NI disrumpe la potenciación a largo plazo inducida por la estimulación hipocámpal.

En contraste con relación al menor impacto de las lesiones en NI asociados al patrón de expresión de cfos tras los encuentros sociales en el test de las tres

habitaciones, los niveles de expresión de Egr-1 fueron de mayor efecto, se observaron cambios consistentes en múltiples núcleos encefálicos.

Se ha observado un aumento en los niveles de expresión de Egr-1 en áreas del hipocampo de ratas con lesión en NI en comparación con el grupo control después de los test de interacción social. Mientras que, en la amígdala, corteza prefrontal, septum, e hipotálamo, los niveles de expresión de Egr-1, tras la realización de los paradigmas, fueron bajos en los sujetos con lesión en NI en comparación con el grupo control.

En general, la reducción en los niveles de expresión de Egr-1 debido a las lesiones del NI es consistente con una reducción de la activación conductual que normalmente es producida por las neuronas del NI. Por lo tanto, se ha visto que la estimulación eléctrica de NI aumenta la actividad locomotora en ratas (Farooq et al., 2016), y la activación quimiogénica sostenida de la red neuronal del NI produce una desincronización cortical, aumento de la excitación, aumento de la conducta exploratoria, y un aumento de la conducta de vigilancia (Sherie Ma et al., 2017).

Los efectos de la lesión del NI en la conducta social relacionado con la actividad de la corteza prefrontal fue opuesta en las áreas corticales PL e IL (Levin et al., 2017). Existen evidencias que apoyan el efecto moderador del NI en la función la corteza prefrontal medial, a través de una innervación directa (Goto et al., 2001; F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003), y a su vez, la corteza prefrontal envía proyecciones descendentes al NI (Goto et al., 2001). Mientras que la lesión del NI produce un aumento en los niveles de activación de Egr-1 en la corteza PL después de la realización de los test sociales, junto con una disminución de los niveles de activación de Egr-1 en la corteza IL.

Estos resultados son consistentes con las diferentes funciones que implican estas áreas en la ejecución de paradigmas que evalúan emociones, incluyendo la extinción y el miedo condicionado (Sierra-Mercado et al., 2011; W. Sun et al., 2018). Se ha observado el efecto de las lesiones electrolíticas de las neuronas de NI en los procesos de extinción del miedo (Pereira et al., 2013), y siendo consistente con la función del NI en las memorias de extinción, las lesiones del Ni inducen una disminución de los niveles de activación de Egr-1 en la corteza IL inducida por los test de interacción social. Se han reportado diferentes patrones de activación electrolítica en las neuronas de las cortezas PL e IL durante el proceso de interacción social, las neuronas de la corteza PL incrementan la duración del disparo durante el acercamiento, mientras que las neuronas de la corteza IL incrementan su actividad durante el alejamiento, estos

patrones de actividad se han visto modificados en ratas socialmente aisladas (Minami et al., 2017).

En este trabajo se ha identificado una reducción en los niveles de activación en la amígdala de ratas con lesión en NI tras la realización de los test sociales, junto con una alteración en la preferencia social. Consecuente con este resultado, se ha observado una reducción en los niveles de activación de Egr-1 en la amígdala tras los paradigmas sociales en ratones jóvenes (Ferri et al., 2016), en ese mismo estudio también se ha encontrado activación de c-fos en amígdala. De acuerdo con estas observaciones, el aislamiento social produce una reducción en los niveles de expresión de Egr-1, y esto ha sido asociado a un déficit en la memoria de miedo (Ryo Okada et al., 2014). Además, el condicionamiento al contexto induce un aumento en los niveles de mRNA de Egr-1 en el núcleo lateral de la amígdala pero no ocurre lo mismo con los niveles de c-fos mRNA (S. Malkani & Rosen, 2000; Rosen et al., 1998). La infusión de mRNA de Egr-1 anti sentido en amígdala produce un déficit en el condicionamiento de miedo (Seema Malkani et al., 2004). Estos datos son consistentes con la idea de que la activación de la amígdala inducida por la red neuronal del NI puede activar Egr-1 que, a su vez, facilitará los procesos neurales relacionados con el reconocimiento social.

Los cambios en los niveles de activación de Egr-1 en la amígdala son generalizados y afectan a los núcleos corticales, mediales, basales, laterales, y centrales, sugiriendo un efecto generalizado de la innervación del NI a través de la amígdala. Las principales dianas amigdalinas del NI estudiadas mediante inyección de trazadores y métodos inmunológicos frente a RLN3, son la amígdala medial, la basolateral, y la región BNST (Santos et al., 2016). Aunque, otras áreas como el núcleo central de la amígdala, no recibe fuertes innervaciones GABAérgicas directas del NI (Santos et al., 2016) o fibras que contengan el neuropéptido RLN3, la amígdala central presenta una alta concentración de receptores RXFP3 (S. Ma et al., 2007), por tanto, el NI es potencialmente influyente en esta región a través de las neuronas GABAérgicas positivas para proteínas de unión con calcio (Santos et al., 2016).

En un modelo in vitro sobre secciones del hipotálamo que contienen el núcleo paraventricular se ha observado que la activación de los receptores RXFP3 produce una inhibición de las neuronas que expresan el receptor (Kania et al., 2017). Por lo tanto, la reducción en los niveles de activación de Egr-1 en amígdala asociado a la lesión del NI, podría deberse a la eliminación del NI relacionada con la inhibición de la amígdala a través de las fibras RLN3.

En otros sistemas neurales, se ha detallado que la fosforilación de ERK-1/2 produce una activación de Egr-1 y este proceso inicia un proceso de diferenciación (Simó et al., 2007). En el hipocampo, la potenciación a largo plazo conduce a un aumento paralelo en fosforilación de ERK1/2 y activación de Egr-1 (Racaniello et al., 2010). La activación de Egr-1 puede regular las memorias asociadas a eventos a través de la regulación de las subunidades de los receptores de NMDA, como son la subunidad épsilon 3 que contiene una secuencia para la unión con Egr-1 (Nagasawa et al., 1996).

En contraste a los efectos en la amígdala tras los paradigmas conductuales, los niveles de activación de Egr-1 en las áreas hipocampales, incluyendo PoDG, CA1, CA2, y subiculum, fueron elevados en las ratas con lesión en NI en comparación con las ratas del grupo control. Estas áreas del hipocampo son los principales objetivos de innervación de las fibras de RLN3 procedentes del NI (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2003), a las cuales principalmente se dirigen interneuronas inhibitorias (Haidar et al., 2017), por lo tanto, la modulación de la inhibición a través de estas neuronas en el giro dentado podría activar las vías de señalización de la vía tri-sináptica (Hashimoto et al., 2017).

Se ha propuesto que el hipocampo y la amígdala tienen funciones distintas en el comportamiento social. Por ejemplo, lesiones del hipocampo o la amígdala en monos neonatales producen un incremento o una disminución, respectivamente, en las interacciones con un nuevo conespecífico durante la edad adulta con respecto a los controles (Moadab et al., 2015).

En este trabajo se ha observado una reducción en los niveles de expresión de Egr-1 en la banda diagonal y en la zona para-diagonal tras la lesión en el NI y la realización de los test de reconocimiento social, en comparación con los niveles de activación del grupo control. Ambas zonas, la banda diagonal y la zona para-diagonal, reciben proyecciones procedentes del NI, y a su vez, estas neuronas proyectan al hipocampo y al hipotálamo anterior, respectivamente (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2012).

La parte vertical de la banda diagonal está asociada con el sistema septohipocámpico, el cual es responsable, en parte, de la generación del ritmo theta (Vertes, 2005; Vertes & Kocsis, 1997). En este sentido, el NI tiene un papel importante en la generación del ritmo theta (Nuñez et al., 2006), el cual es mediado por los efectos en septum medial, a través la vía de señalización RLN3/RXFP3 (Sherie Ma et al., 2009).

Se ha demostrado que la infusión icv de A2, agonista de RXFP3, induce la activación de Erk en neuronas colinérgicas del septum medial en paralelo con la



interrupción de la alternancia espontánea en el laberinto en forma de T (Albert-Gascó et al., 2017). Resulta necesario constatar que las neuronas colinérgicas del septum medial no presentan receptores RXFP3 (Albert-Gascó et al., 2018). Por lo tanto, la activación de ERK en este centro debe realizarse de un modo indirecto.

Por otra parte, hay una relación entre el disparo de las neuronas RLN3 y la fase ascendente del ritmo theta. La activación del septum medial por el NI puede producir una activación general de los mecanismos de atención facilitado por el septum medial durante la ejecución del paradigma social de las tres habitaciones. Los efectos del NI en la actividad del septum medial podrían facilitar la elevada concentración de los receptores RXFP3 en las neuronas GABAérgicas de esa área (Albert-Gascó et al., 2018). Del mismo modo, se ha observado una disminución en los niveles de activación de Egr-1 en el septum lateral intermedio y ventral, áreas a las que las neuronas del NI proyectan (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2012). No se observaron cambios en los niveles de activación de Egr-1 en la división lateral del septum lateral, la cual no recibe proyecciones de neuronas positivas en RLN3 procedentes del NI (F. E. Olucha-Bordonau et al., 2012).

En este estudio se ha observado un descenso en los niveles de activación de Egr-1 en algunas áreas hipotalámicas, como consecuencia de la lesión en el NI, en comparación con el grupo control, tras la realización de los test de interacción social. Se ha observado esta reducción en el núcleo hipotalámico anterior y en el hipotálamo lateral. Estas áreas que están directamente inervadas por el NI, aunque algunas de las fibras presentes en el área hipotalámica lateral podrían no ser fibras sinápticas que pasan a través del haz del prosencéfalo medial. El hipotálamo anterior se ha implicado en el control del comportamiento social relacionado con mecanismos de agresión (Haller et al., 2006; Pan et al., 2010; M. Toth et al., 2010).

Al igual que en algunas áreas del hipocampo y algunas áreas corticales de la amígdala, se ha observado una reducción de los niveles de expresión de Egr-1 en la corteza entorrinal en los casos con lesión en NI en comparación con el grupo control tras los test de interacción social. Por otra parte, no se han observado diferencias significativas en los niveles de expresión de cfos entre grupos experimentales tras los encuentros sociales.

Se han detectado elevados niveles de expresión de Egr-1 tanto en las superficiales de la corteza entorrinal lateral. Esta región cortical participa en el procesamiento de los estímulos olfativos, facilitando la identificación y diferenciación de los sujetos conespecíficos (Biella & de Curtis, 2000; Leitner et al., 2016). De este modo,

las ratas con lesión en NI durante el test de preferencia social, no son capaces de diferenciar entre conespecíficos novedosos y familiares, explorando ambas habitaciones donde están presentes los conespecíficos sin mostrar preferencia alguna.

Del mismo modo, las lesiones en NI producen un aumento en los niveles de activación de Egr-1 en la corteza perirrinal en comparación con los controles. Se ha identificado que la corteza perirrinal está implicada en la identificación de objetos novedosos o familiares (Naya, 2016), al igual que entorrinal lateral, las lesiones de NI estarían alterando la activación de estas áreas implicadas en la identificación de los sujetos conespecíficos.

En las capas profundas de la corteza entorrinal medial se han observado mayores niveles de activación de Egr-1 en el caso de las ratas con lesión en NI. La corteza entorrinal medial se ha asociado al procesamiento de otros estímulos espaciales (Moser et al., 2017), su alteración estaría afectando también al proceso de identificación de los sujetos conespecíficos durante los encuentros sociales.

Acorde a los resultados encontrados respecto a los elevados niveles de expresión de Egr-1 en la corteza entorrinal lateral, se ha encontrado abundantes receptores de RXFP3 junto con presencia de fibras RLN3 en la corteza entorrinal lateral mediante hibridación in situ RNAScope ©. También se ha visto presencia de receptores RXFP3 por la corteza perirrinal y en la corteza entorrinal ventral, pero en ambas áreas se ha observado escasa presencia de fibras RLN3.

#### 5.4. Inervación de la corteza parahipocámpica del sistema NI-RLN3-RXFP3

---

El hecho de que la lesión del núcleo incertus produce una alteración en el patrón de expresión de egr-1 en las áreas corticales y paralelamente se altere la conducta social permite concluir que la inervación RLN3 de esta región participa en la conducta social. Por lo tanto, resulta pertinente el estudio de cómo es esta inervación.

El primer aspecto que se ha estudiado es precisamente la existencia de esta proyección mediante trazado retrógrado y se ha observado que esta proyección es fundamentalmente ipsilateral. Además, se han estudiado la distribución de fibras y la colocalización de receptores.

Los resultados muestran claramente una proyección densa desde el NI a todas las áreas de la corteza parahipocámpica. Esta proyección se vuelve más densa en el polo

caudal y las áreas mediales. La mayoría de las fibras en las regiones laterales se localizan principalmente en capas profundas mientras que a medida que se avanza hacia regiones mediales y caudales, las fibras de RLN3 se localizan en capas más superficiales de MEnt. La mayoría de las fibras, aunque no todas, también presentan sinaptofisina Lo que indicaría una liberación sináptica de RLN3. Además, existe un desajuste entre las áreas que contienen una alta densidad de fibras RLN3 y las áreas con un número denso de células que expresan el receptor RXFP3. Una posible explicación de los mecanismos que subyace esta falta de coincidencia podría deberse a una activación de las neuronas que expresan RXFP3 a través de la transmisión de volumen de RLN3.

Estudios previos en roedores mostraron una densidad moderada de fibras RLN3 y células positivas en RXFP3 en la región parahipocampal sin una concentración específica en áreas particulares (S. Ma et al., 2007; Craig M. Smith et al., 2010; Tanaka et al., 2005). Además, se describió una expresión de RXFP3 en varias áreas de la corteza parahipocampal como el área de transición amigdalohipocampal y el núcleo endopiriforme dorsal (S. Ma et al., 2007; Craig M. Smith et al., 2010).

En este trabajo, se ha observado que las fibras RLN3 se concentran en capas profundas de la corteza entorrinal lateral. En cambio, la mayor concentración de fibras RLN3 positivas en la corteza entorrinal medial se concentran en capas superficiales.

Por otra parte, las neuronas RXFP3 se concentran principalmente en las capas externas de MEnt y LEnt. Existe un desajuste general entre la ubicación de las fibras RLN3 y las células que expresan RXFP3. En muchos casos, las fibras están muy próximas, pero ligeramente separadas. Por ejemplo, en la amígdala, las fibras RLN3 se concentran en la amígdala medial (Santos et al., 2016) donde también se encuentran RXFP3 (Albert-Gascó et al., 2017), pero la concentración más alta de RXFP3 se localiza en el núcleo central vecino que salvó de fibras RLN3 (Albert-Gascó et al., 2017; S. Ma et al., 2007; Craig M. Smith et al., 2010). Estas diferentes localizaciones de fibras y receptores pueden favorecer acciones rápidas y lentas de la liberación de ligandos. Es el caso de la acción de la colecistoquinina (CCK) en la amígdala. Las fibras de CCK se concentran en la amígdala central, pero en la basolateral se encontró una alta concentración de receptores CCK2 (Pérez De La Mora et al., 2007). En ausencia de peligro, la liberación continua de CCK en la amígdala central puede llegar a los receptores de la amígdala basolateral y mantener un cierto nivel de excitación (Pérez De La Mora et al., 2007). No se ha estudiado tal efecto tónico para el RLN3 en la amígdala o el hipocampo.

En general, se supone que las capas superficiales transmiten las proyecciones de la corteza asociativa al hipocampo, mientras que las capas profundas transmiten las proyecciones del hipocampo de vuelta a la corteza (Cappaert et al., 2014; M.P. Witter et al., 1989; Menno P Witter et al., 2017). De este modo, la mayor concentración de fibras en las capas superficiales del MEnt sugeriría una implicación máxima en un efecto directo del NI en la vía hacia el hipocampo lo cual implicaría un impacto sobre la formación del mapa cognitivo. A este respecto, es importante notar el efecto del NI en la conducción del ritmo theta del hipocampo (Sherie Ma et al., 2009; Martínez-Bellver et al., 2017; Nuñez et al., 2006). Una característica relevante en la formación de este mapa cognitivo es la precesión theta que consiste en hacer avanzar el disparo en una fase previa del ciclo theta mientras el animal pasa por el campo theta (O'Keefe & Recce, 1993). No se ha analizado si el núcleo incierto y el sistema RLN3/RXFP3 asociado participa en la generación y/o modulación de estos mapas cognitivos.

Por otro lado, estudios tanto en humanos como en primates han demostrado la implicación de la corteza entorrinal en funciones cognitivas relacionadas con la conducta social incluyendo el reconocimiento y la evaluación contextual de la actividad social (Ross & Olson, 2010; Sandi & Haller, 2015).

En roedores, aunque se han realizado extensos estudios sobre la vía entorrinal-giro dentado en la generación de memorias espaciales y contextuales (Sasaki et al., 2015), las aportaciones referidas a su intervención en procesos de contenido social es más escasa (Petruilis & Eichenbaum, 2003).

En el presente trabajo se ha destacado que la inervación por parte del NI del área entorrinal se produce tanto sobre neuronas de proyección como sobre interneuronas, lo que implicaría una importante complejidad al papel concreto que la inervación entorrinal del NI sobre el procesamiento social. De este modo se ha señalado que una función concreta podría ser la eliminación selectiva de algunos aspectos de la información contextual que realzarían aspectos concretos de la percepción (Szőnyi et al., 2019). Estudios cuantitativos serían necesarios para abordar el papel concreto de esta inervación sobre los sistemas activadores e inhibidores que configuran los "engrams" (Ramirez et al., 2013).

## **6. Conclusiones**

1. El núcleo incertus tiene un papel específico en el reconocimiento social en rata que se traduce en una capacidad de discriminación entre sujeto familiar y sujeto novel.
2. La eliminación selectiva del núcleo incertus no altera la capacidad discriminativa de ratas macho entre objetos inanimados y sujetos conespecíficos.
3. La eliminación selectiva del núcleo incertus produce una alteración del patrón de activación de los genes de actividad inmediata c-fos y egr-1 cuando los sujetos son sometidos a un test de reconocimiento social en el laberinto de las 3 habitaciones. La actividad más afectada es la de egr-1.
4. La eliminación selectiva del núcleo incertus produce una variación aumento de la activación de c-fos. Únicamente se produce una disminución de la activación en la corteza infralímbica y en las áreas corticales de CA2 y CA3.
5. La eliminación selectiva del núcleo incertus produce un aumento de la activación de egr-1 en el hipocampo y en el área entorrinal mientras que provoca una disminución de la activación en algunas áreas de la corteza como la corteza cingular anterior, la corteza prelímbica e infralímbica, septum, hipotálamo y amígdala.
6. El núcleo incertus inerva el área entorrinal en una proyección restringida al lado ipsilateral.
7. Las fibras relaxin3 del núcleo incertus que proyectan sobre el área entorrinal se localizan preferentemente en las capas profundas del entorrinal lateral y superficiales del entorrinal medial.
8. Las fibras relaxin3 del núcleo incertus contactan tanto neuronas de proyección como interneuronas en el área entorrinal. Algunas de estas fibras también presentan reacción positiva a sinaptofisina, lo que indica una liberación sináptica del neuropéptido.
9. Las neuronas de la corteza entorrinal expresan el receptor RXFP3 indicando que son sensibles a la presencia del neuropéptido. Existe una mayor densidad de neuronas que expresan RXFP3 en las capas superficiales que en las profundas.

## Bibliografía

- Abell, F., Krams, M., Ashburner, J., Passingham, R., Friston, K., Frackowiak, R., Happé, F., Frith, C., & Frith, U. (1999). The neuroanatomy of autism. *NeuroReport*, *10*(8), 1647–1651. <https://doi.org/10.1097/00001756-199906030-00005>
- Adamec, R. E., & McKay, D. (1993). The effects of CRF and  $\alpha$ -helical CRF on anxiety in normal and hypophysectomized rats. *Journal of Psychopharmacology*, *7*(4), 346–354. <https://doi.org/10.1177/026988119300700406>
- Aggleton, J. P., & Christiansen, K. (2015). The subiculum: the heart of the extended hippocampal system. In *The Connected Hippocampus* (1st ed., Vol. 219). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.003>
- Ahmed-leitao, F., Rosenstein, D., Marx, M., Young, S., & Korte, K. (2019). Psychiatry Research : Neuroimaging Posttraumatic stress disorder , social anxiety disorder and childhood trauma : Differences in hippocampal subfield volume. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, *284*(December 2018), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2018.12.015>
- Albert-Gascó, H., García-Avilés, Á., Moustafa, S., Sánchez-Sarasua, S., Gundlach, A. L., Olucha-Bordonau, F. E., & Sánchez-Pérez, A. M. (2017). Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation increases ERK phosphorylation in septal cholinergic neurons and impairs spatial working memory. *Brain Structure and Function*, *222*(1), 449–463. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1227-8>
- Albert-Gascó, H., Ma, S., Ros-Bernal, F., Sánchez-Pérez, A. M., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2018). GABAergic neurons in the rat medial septal complex express relaxin-3 receptor (RXFP3) mRNA. *Frontiers in Neuroanatomy*, *11*(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00133>
- Albert-Gasco, H., Sanchez-Sarasua, S., Ma, S., García-Díaz, C., Gundlach, A. L., Sanchez-Perez, A. M., & Olucha-Bordonau, F. E. (2019). Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation impairs social recognition and modulates ERK-phosphorylation in specific GABAergic amygdala neurons. *Brain Structure and Function*, *224*(1), 453–469. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1763-5>
- Albert, D. J., & Wong, R. C. (1978). Hyperreactivity, muricide, and intraspecific aggression in the rat produced by infusion of local anesthetic into the lateral septum or surrounding areas. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *92*(6), 1062–1073. <https://doi.org/10.1037/h0077524>
- Amaral, D. G., Dolorfo, C., & Alvarez-Royo, P. (1991). Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, *1*(4), 415–435. <https://doi.org/10.1002/hipo.450010410>
- Amaral, D. G., Schumann, C. M., & Nordahl, C. W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in Neurosciences*, *31*(3), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.005>
- American Psychiatric Association., & American Psychiatric Association. DSM-5 Task Force. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5*.
- Amodio, D. M. (2019). Social Cognition 2.0: An Interactive Memory Systems Account. *Trends in Cognitive Sciences*, *23*(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.10.002>
- Amodio, & Frith, C. D. (2006). Meeting of minds : the medial frontal cortex and social cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*, 268–277.

<https://doi.org/10.1038/nrn1884>

- Araghi-Niknam, M., & Fatemi, S. H. (2003). Levels of Bcl-2 and P53 Are Altered in Superior Frontal and Cerebellar Cortices of Autistic Subjects. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(6), 945–952. <https://doi.org/10.1023/B:CEMN.0000005322.27203.73>
- Atsak, P., Orre, M., Bakker, P., Cerliani, L., Rooszendaal, B., Gazzola, V., Moita, M., & Keysers, C. (2011). Experience Modulates Vicarious Freezing in Rats : A Model for Empathy. *PLoS ONE*, 6(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021855>
- Aznar, S., Qian, Z., & Knudsen, G. M. (2004). Non-serotonergic dorsal and median raphe projection onto parvalbumin- and calbindin-containing neurons in hippocampus and septum. *Neuroscience*, 124(1999), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.12.020>
- Baddeley, A. (1992). Working memory. *Science*, 255(5044), 556–559. <https://doi.org/10.1126/science.1736359>
- Bale, T. L., Davis, A. M., Auger, A. P., Dorsa, D. M., & McCarthy, M. M. (2001). CNS region-specific oxytocin receptor expression: Importance in regulation of anxiety and sex behavior. *Journal of Neuroscience*, 21(7), 2546–2552. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-07-02546.2001>
- Banerjee, A., Shen, P.-J. J., Ma, S., Bathgate, R. A. D., & Gundlach, A. L. (2010). Swim stress excitation of nucleus incertus and rapid induction of relaxin-3 expression via CRF1 activation. *Neuropharmacology*, 58(1), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.019>
- Bannerman, Lemaire, Yee, Iversen, Oswald, Good, & Rawlins. (2001). Selective cytotoxic lesions of the retrohippocampal region produce a mild deficit in social recognition memory. *Experimental Brain Research*, 142, 395–401. <https://doi.org/10.1007/s00221-001-0938-z>
- Baron-Cohen, S., Ring, H. A., Bullmore, E. T., Wheelwright, S., Ashwin, C., & Williams, S. C. R. (2000). The amygdala theory of autism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(3), 355–364. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00011-7)
- Bartal, I. B., Rodgers, D. A., Sol, M., & Sarria, B. (2014). Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. *ELIFE*, 3, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.01385>
- Bathgate, R. A., Ivell, R., Sanborn, B. M., Sherwood, O. D., & Summers, R. J. (2006). International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacological Reviews*, 58(1), 7–31. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.9>
- Bathgate, R. A., Samuel, C. S., Burazin, T. C., Layfield, S., Claasz, A. A., Reytomas, I. G., Dawson, N. F., Zhao, C., Bond, C., Summers, R. J., Parry, L. J., Wade, J. D., & Tregear, G. W. (2002). Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1148–1157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107882200>
- Beer, J. S., Heerey, E. A., Keltner, D., Scabini, D., & Knight, R. T. (2003). The Regulatory Function of Self-Conscious Emotion: Insights from Patients with Orbitofrontal Damage. *Journal of Personality and Social Psychology*, 85(4), 594–604. <https://doi.org/10.1037/0022-3514.85.4.594>
- Bender, F., Gorbati, M., Cadavienco, M. C., Denisova, N., Gao, X., Holman, C., Korotkova, T., & Ponomarenko, A. (2015). Theta oscillations regulate the speed of locomotion



via a hippocampus to lateral septum pathway. *Nature Communications*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms9521>

- Benelli, A., Bertolini, A., Poggioli, R., Menozzi, B., Basaglia, R., & Arletti, R. (1995). Polymodal dose-response curve for oxytocin in the social recognition test. *Neuropeptides*, 28(4), 251–255. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(95\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0143-4179(95)90029-2)
- Benes, F. M. (1987a). An Analysis of the Arrangement of Neurons in the Cingulate Cortex of Schizophrenic Patients. *Archives of General Psychiatry*, 44(7), 608. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800190024004>
- Benes, F. M. (1987b). Increased Vertical Axon Numbers in Cingulate Cortex of Schizophrenics. *Archives of General Psychiatry*, 44(11), 1017. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1987.01800230097015>
- Bezaire, M. J., & Soltesz, I. (2013). Quantitative Assessment of CA1 Local Circuits : Knowledge Base for Interneuron-Pyramidal Cell Connectivity. *Hippocampus*, 23(7), 751–785. <https://doi.org/10.1002/hipo.22141>
- Bicks, L. K. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Frontiers in Psychology*, 6(1805), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>
- Biella, G., & de Curtis, M. (2000). Olfactory Inputs Activate the Medial Entorhinal Cortex Via the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 83(4), 1924–1931. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.4.1924>
- Bielsky, I. F., Hu, S. B., & Young, L. J. (2005). Sexual dimorphism in the vasopressin system: Lack of an altered behavioral phenotype in female V1a receptor knockout mice. *Behavioural Brain Research*, 164(1), 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.005>
- Bielsky, I. F., & Young, L. J. (2004). Oxytocin , vasopressin , and social recognition in mammals. *Elsevier Peptides*, 25, 1565–1574. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.05.019>
- Billeci, L., Calderoni, S., Conti, E., Gesi, C., Carmassi, C., Osso, L. D., Cioni, G., Muratori, F., & Guzzetta, A. (2016). The Broad Autism ( Endo ) Phenotype : Neurostructural and Neurofunctional Correlates in Parents of Individuals with Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 10(346), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00346>
- Bittencourt, J. C., & Sawchenko, P. E. (2000). Do Centrally Administered Neuropeptides Access Cognate Receptors?: An Analysis in the Central Corticotropin-Releasing Factor System. *The Journal of Neuroscience*, 20(3), 1142–1156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-03-01142.2000>
- Blanks, A. M., & Thornton, S. (2003). The role of oxytocin in parturition. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 110(20), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S1470-0328\(03\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S1470-0328(03)00024-7)
- Bluthé, R. M., & Dantzer, R. (1993). Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. *Brain Research*, 604(1–2), 205–210. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90370-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90370-3)
- Boone, M., & Deen, P. M. T. (2008). Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Eur J Physiol*, 456, 1005–1024. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0498-1>
- Bowen, M. T., & Neumann, I. D. (2017). Rebalancing the Addicted Brain : Oxytocin Interference with the Neural Substrates of Addiction. *Trends in Neurosciences*,

40(12), 691–708. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.10.003>

- Brand, M., Grabenhorst, F., Starcke, K., Vandekerckhove, M. M. P., & Markowitsch, H. J. (2007). Role of the amygdala in decisions under ambiguity and decisions under risk: Evidence from patients with Urbach-Wiethe disease. *Neuropsychologia*, *45*(6), 1305–1317. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.09.021>
- Bredewold, R., Smith, C. J. W., Dumais, K. M., Veenema, A. H., Sullivan, R. M., & Kline, N. (2014). Sex-specific modulation of juvenile social play behavior by vasopressin and oxytocin depends on social context. *Behavioral Neuroscience*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00216>
- Brown, L. Y., Alexander, G. M., Cushman, J., & Dudek, S. M. (2020). Hippocampal CA2 Organizes CA1 Slow and Fast Gamma Oscillations during Novel Social and Object Interaction. *Eneuro*, *7*(2), 1–36. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0084-20.2020>
- Brownstein, M. J., Russell, J. T., & Gainer, H. (1980). Synthesis, Transport, and Release of Posterior Pituitary Hormones. *Science*, *207*(4429), 373–378. <https://doi.org/doi:10.1126/science.6153132>
- Bruining, H., Sonnevile, L. De, Swaab, H., Jonge, M. De, Kas, M., Van, H., & Vorstman, J. (2010). Dissecting the Clinical Heterogeneity of Autism Spectrum Disorders through Defined Genotypes. *PLoS ONE*, *5*(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010887>
- Burwell, R. D., & Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *398*(2), 179–205. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980824\)398:2<179::AID-CNE3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980824)398:2<179::AID-CNE3>3.0.CO;2-Y)
- Caballero-Bleda, M., & Witter, M. P. (1993). Regional and laminar organization of projections from the presubiculum and parasubiculum to the entorhinal cortex: An anterograde tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *328*(1), 115–129. <https://doi.org/10.1002/cne.903280109>
- Cacioppo, J. (2002). Social Neuroscience: Understanding the Pieces Fosters Understanding the Whole and Vice Versa. *American Psychologist*, *57*(11), 819–831. <https://doi.org/doi:10.1037/0003-066x.57.11.819>
- Caffé, A. R., van Leeuwen, F. W., & Luiten, P. G. M. (1987). Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, *261*(2), 237–252. <https://doi.org/10.1002/cne.902610206>
- Calandreau, L., Desgranges, B., Jaffard, R., & Desmedt, A. (2010). Switching from contextual to tone fear conditioning and vice versa: The key role of the glutamatergic hippocampal-lateral septal neurotransmission. *Learning & Memory*, *17*(9), 440–443. <https://doi.org/10.1101/lm.1859810>
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *The Journal of Comparative Neurology*, *324*(2), 143–179. <https://doi.org/10.1002/cne.903240203>
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *360*(2), 213–245. <https://doi.org/10.1002/cne.903600203>
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us? *Neural Plasticity*, *2008*(38), 1–18. <https://doi.org/10.1155/2008/381243>

- Cappaert, Strien, V., & Witter. (2014). Hippocampal formation. In *The Rat Nervous System* (ed. Paxino, pp. 511–573). Amsterdam: Elsevier.
- Cara, B. Di, Panayi, F., Gobert, A., Dekeyne, A., Groote, L. De, & Millan, M. J. (2007). Activation of dopamine D 1 receptors enhances cholinergic transmission and social cognition : a parallel dialysis and behavioural study in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *10*, 383–399. <https://doi.org/10.1017/S1461145706007103>
- Carmichael, O., & Lockhart, S. (2012). Behavioral and Pharmacogenetics of Aggressive Behavior. *Brain Imaging in Behavioral Neuroscience*, November 2011, 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>
- Caroni, A. M. & P. (2018). Inframimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. *Nature Communications*, *9*(2727), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05318-x>
- Casey, B., Galvan, A., & Hare, T. A. (2005). Changes in cerebral functional organization during cognitive development. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.012>
- Caviness, V. S., Kennedy, D. N., Richelme, C., Rademacher, J., & Filipek, P. A. (1996). The Human Brain Age 7–11 Years: A Volumetric Analysis Based on Magnetic Resonance Images. *Cerebral Cortex*, *6*(5), 726–736. <https://doi.org/10.1093/cercor/6.5.726>
- Cembrowski, M. S., Phillips, M. G., Dilisio, S. F., Chandrashekar, J., Bas, E., Spruston, N., Cembrowski, M. S., Phillips, M. G., Dilisio, S. F., Shields, B. C., & Winnubst, J. (2018). Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes Article Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes. *Cell*, *173*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.031>
- Canquiza, L. A., & Swanson, L. W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, *56*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.002>
- Cilz, N. I., & Young, A. C. W. S. (2018). Oxytocin and vasopressin in the rodent hippocampus. *Genes, Brain and Behavior*, *18*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/gbb.12535>
- Colom, L. V, Castaneda, M. T., Reyna, T., Hernandez, S., & Garrido-Sanabria, E. (2005). Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse*, *58*(3), 151–164. <https://doi.org/10.1002/syn.20184>
- Cui, Z., Gerfen, C. R., & Rd, W. S. Y. (2013). Hypothalamic and Other Connections With Dorsal CA2 Area of the Mouse Hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, *521*, 1844–1866. <https://doi.org/10.1002/cne.23263>
- Cushing, B. S., Perry, A., Musatov, S., Ogawa, S., & Papademetriou, E. (2008). Estrogen receptors in the medial amygdala inhibit the expression of male prosocial behavior. *Journal of Neuroscience*, *28*(41), 10399–10403. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1928-08.2008>
- Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., & Fuchs, E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(22), 12796–12801. <https://doi.org/10.1073/pnas.211427898>

- Dantzer, R., Koob, G. F., Bluthé, R.-M., & Le Moal, M. (1988). Septal vasopressin modulates social memory in male rats. *Brain Research*, *457*(1), 143–147. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90066-2)
- de Vries, G. J., & Buijs, R. M. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Research*, *273*(2), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90855-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90855-7)
- De Vries, Geert J., Buijs, R. M., & Swaab, D. F. (1981). Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain—presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Research*, *218*(1–2), 67–78. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90989-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90989-6)
- Deacon, R. M. J., Koros, E., Bornemann, K. D., & Rawlins, J. N. P. (2009). Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Elsevier*, *197*, 466–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.042>
- Dolan, R. J. (2002). Emotion, Cognition, and Behavior. *Science*, *1191*(2002). <https://doi.org/10.1126/science.1076358>
- Donato, J., Cley, J., Juliana, R., Stavin, A., Cioni, J., & Fuzeti, C. (2010). Male and female odors induce Fos expression in chemically defined neuronal population. *Physiology & Behavior*, *99*(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.10.012>
- Donnell, O., & Grace, A. (1995). Synaptic Interactions Accumbens Neurons: Input among Excitatory Afferents to Nucleus Hippocampal Gating of Prefrontal Cortical. *The Journal of Neuroscience*, *15*(5), 3622–3639. <https://doi.org/https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03622>
- Dunn, A. (1987). Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action in the social interaction test. *Hormones and Behavior*, *21*(2), 193–202. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(87\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0018-506X(87)90044-4)
- Eichenbaum, H. (1998). Using Olfaction to Study Memory. *Annals New York Academy of Sciences*, *855*, 657–669. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb10642.x>
- Engelmann, M., & Landgraf, R. (1994). Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiology & Behavior*, *55*(1), 145–149. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90022-1)
- Eslinger, P. J., Flaherty-craig, C. V., & Benton, A. L. (2004). Developmental outcomes after early prefrontal cortex damage. *Elsevier Brain & Cognition*, *55*, 84–103. [https://doi.org/10.1016/S0278-2626\(03\)00281-1](https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00281-1)
- Everts, H. G. ., & Koolhaas, J. . (1999). Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behavioural Brain Research*, *99*(1), 7–16. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00004-7)
- Farooq, U., Kumar, J. R., Rajkumar, R., & Dawe, G. S. (2016). Electrical microstimulation of the nucleus incertus induces forward locomotion and rotation in rats. *Physiology and Behavior*, *160*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.03.033>
- Farooq, U., Rajkumar, R., Sukumaran, S., Wu, Y., Tan, W. H., & Dawe, G. S. (2013). Corticotropin-releasing factor infusion into nucleus incertus suppresses medial prefrontal cortical activity and hippocampo-medial prefrontal cortical long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, *38*(4), 2516–2525. <https://doi.org/10.1111/ejn.12242>

- Felix-Ortiz, A. C., Burgos-Robles, A., Bhagat, N. D., Leppla, C. A., & Tye, K. M. (2016). Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, *321*, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.041>
- Felix-ortiz, A. C., & Tye, K. M. (2014). *Amygdala Inputs to the Ventral Hippocampus Bidirectionally Modulate Social Behavior*. *34*(2), 586–595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4257-13.2014>
- Fellows, L. K. (2007). The role of orbitofrontal cortex in decision making. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1121*, 421–430. <https://doi.org/10.1196/annals.1401.023>
- Ferguson, B. R., & Gao, W. J. (2018). Pv interneurons: critical regulators of E/I balance for prefrontal cortex-dependent behavior and psychiatric disorders. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>
- Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, *21*(20), 8278–8285. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08278.2001>
- Ferguson, J. N., Young, L. J., Hearn, E. F., Matzuk, M. M., Insel, T. R., & Winslow, J. T. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics*, *25*(3), 284–288. <https://doi.org/10.1038/77040>
- Fernández, M., Mollinedo-Gajate, I., & Peñagarikano, O. (2018). Neural Circuits for Social Cognition: Implications for Autism. *Neuroscience*, *370*, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.013>
- Ferri, S. L., Kreibich, A. S., Torre, M., Piccoli, C. T., Dow, H., Pallathra, A. A., Li, H., Bilker, W. B., Gur, R. C., Abel, T., & Brodtkin, E. S. (2016). Activation of basolateral amygdala in juvenile C57BL/6J mice during social approach behavior. *Neuroscience*, *335*, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.006>
- Finlay, J. M., Dunham, G. A., Isherwood, A. M., Newton, C. J., Nguyen, T. V., Reppar, P. C., Snitkovski, I., Paschall, S. A., & Greene, R. W. (2015). Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. *Brain Research*, *1600*, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.037>
- Furtak, S. C., Ahmed, O. J., & Burwell, R. D. (2012). Article Single Neuron Activity and Theta Modulation in Postrhinal Cortex during Visual Object Discrimination. *Neuron*, *76*(5), 976–988. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.039>
- Fuster, J. M. (2000). Executive frontal functions. *Experimental Brain Research*, *133*(1), 66–70. <https://doi.org/10.1007/s002210000401>
- Fyhn, M. (2004). Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, *305*(5688), 1258–1264. <https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Fyhn, M., Hafting, T., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M. (2008). Grid Cells in Mice. *Hippocampus*, *18*, 1230–1238. <https://doi.org/10.1002/hipo.20472>
- Galbusera, A., Felice, A. De, Girardi, S., Bassetto, G., Maschietto, M., Nishimori, K., Chini, B., Papaleo, F., Vassanelli, S., & Gozzi, A. (2017). Intranasal Oxytocin and Vasopressin Modulate Divergent Brainwide Functional Substrates. *Neuropsychopharmacology*, *42*(7), 1420–1434. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.283>

- Ganella, D. E., Callander, G. E., Ma, S., Bye, C. R., Gundlach, A. L., & Bathgate, R. A. D. (2013). Modulation of feeding by chronic rAAV expression of a relaxin-3 peptide agonist in rat hypothalamus. *Gene Therapy*, *20*(7), 703–716. <https://doi.org/10.1038/gt.2012.83>
- Garrido, C., Clairis, N., Evelyn, L., Cavalcante, S., Regina, C., Furini, G., Carvalho, J. De, & Izquierdo, I. (2016). Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *PNAS*, *113*(33), 4914–4919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609883113>
- Gasbarri, A., Sulli, A., & Packard, M. G. (1997). The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *21*(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(96\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(96)00157-1)
- Geldenhuys, W. J., & Van der Schyf, C. J. (2011). Role of Serotonin in Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*, *25*(9), 765–781. <https://doi.org/10.2165/11590190-000000000-00000>
- Geschwind, D. H. (2009). Advances in autism. *Annual Review of Medicine*, *60*, 367–380. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.053107.121225>
- Ghashghaei, H. ., & Barbas, H. (2002). Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey. *Neuroscience*, *115*(4), 1261–1279. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00446-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00446-3)
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiological Reviews*, *81*(2), 629–683. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>
- Gómez-gómez, Y. M., Sánchez-aparicio, P., Mejía-chávez, S., García-garcía, F., Pascual-mathey, L. I., & Aguilera-reyes, U. (2019). c-Fos immunoreactivity in the hypothalamus and reward system of young rats after social novelty exposure. *NeuroReport*, *30*, 510–515. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001236>
- Gonzalez, L. E., Rujano, M., Tucci, S., Paredes, D., Silva, E., Alba, G., & Hernandez, L. (2000). Medial prefrontal transection enhances social interaction. *Brain Research*, *887*(1), 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02931-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02931-0)
- Gothard, K. M., Battaglia, F. P., Erickson, C. A., Spitler, K. M., & Amaral, D. G. (2007). Neural responses to facial expression and face identity in the monkey amygdala. *Journal of Neurophysiology*, *97*(2), 1671–1683. <https://doi.org/10.1152/jn.00714.2006>
- Goto, M., Swanson, L. W., & Canteras, N. S. (2001). Connections of the nucleus incertus. *The Journal of Comparative Neurology*, *438*(1), 86–122. <https://doi.org/10.1002/cne.1303>
- Gray, J., & McNaughton, N. (2003). *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press.
- Griffin, M. G., & Taylor, G. T. (1995). Norepinephrine modulation of social memory: Evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. *Behavioral Neuroscience*, *109*(3), 466–473. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.109.3.466>
- Groenewegen, H. J., ZEE, E. V.-V. Der, Kortschot, A. Te, & Wittex, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, *23*(1), 103–120. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90275-2)

- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(1), 103–120. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Grossmann, T. (2013). The role of medial prefrontal cortex in early social cognition. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00340>
- Gritti, I., Henny, P., Galloni, F., Mainville, L., Mariotti, M., & Jones, B. E. (2006). Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase (ChAT), glutamic acid decarboxylase (GAD) or phosphate-activated glutaminase (PAG) and colocalizing vesicular glutamate trans. *Neuroscience*, 143(4), 1051–1064. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.024>
- Guillemin, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *The FEBS Journal*, 279(8), 1356–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Gundlach, A. L., Smith, C. M., Ryan, P. J., Blasiak, A., Olucha-Bordonau, F. E., & Ma, S. (2013). Relaxins. In A. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides* (Vol. 1, pp. 907–916). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00121-4>
- Gur, R., Tendler, A., & Wagner, S. (2014). Long-Term Social Recognition Memory Is Mediated. *Biological Psychiatry*, 76(5), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.022>
- Gusmão, I. D., Monteiro, B. M. M., Cornélio, G. O. S., Fonseca, C. S., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. (2012). Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural Brain Research*, 228(2), 440–446. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.040>
- Guzma, K., Bermu, F., & Osorio-go, D. (2016). Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity : interaction between amygdala and insular cortex. *Learning and Memory*, 24(1), 14–23. <https://doi.org/10.1101/lm.042895.116>
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436, 801–806. <https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Hagan, J. J., Salamone, J. D., Simpson, J., Iversen, S. D., & Morris, R. G. M. (1988). Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behavioural Brain Research*, 27(1), 9–20. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90105-2)
- Haidar, M., Guèvremont, G., Zhang, C., Bathgate, R. A. D., Timofeeva, E., Smith, C. M., & Gundlach, A. L. (2017). Relaxin-3 inputs target hippocampal interneurons and deletion of hilar relaxin-3 receptors in “floxed-RXFP3” mice impairs spatial memory. *Hippocampus*, 27(5), 529–546. <https://doi.org/10.1002/hipo.22709>
- Haller, J., Tóth, M., Halasz, J., & Boer, S. F. De. (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Psychology & Behavior*, 88, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.030>
- Harasta, A. E., Power, J. M., Von Jonquieres, G., Karl, T., Drucker, D. J., Housley, G. D., Schneider, M., & Klugmann, M. (2015). Septal glucagon-like peptide 1 receptor expression determines suppression of cocaine-induced behavior. *Neuropsychopharmacology*, 40(8), 1969–1978.

<https://doi.org/10.1038/npp.2015.47>

- Harris, E., & Stewart, M. (2001). Intrinsic Connectivity of the Rat Subiculum : II . Properties of Synchronous Spontaneous Activity and a Demonstration of Multiple Generator Regions. *The Journal of Comparative Neurology*, *518*, 506–518.
- Hashimotodani, Y., Nasrallah, K., Jensen, K. R., Chávez, A. E., Carrera, D., & Castillo, P. E. (2017). LTP at Hilar Mossy Cell-Dentate Granule Cell Synapses Modulates Dentate Gyrus Output by Increasing Excitation/Inhibition Balance. *Neuron*, *95*(4), 928–943. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.028>
- Hatton, G. I., & Wang, Y. (2008). Neural mechanisms underlying the milk ejection burst and reflex. *Elsevier*, *170*(08), 155–166. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00414-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00414-7)
- Higashida, H., Yokoyama, S., Huang, J., Liu, L., & Ma, W. (2012). Neurochemistry International Social memory , amnesia , and autism : Brain oxytocin secretion is regulated by NAD + metabolites and single nucleotide polymorphisms of CD38. *Neurochemistry International*, *61*(6), 828–838. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.01.030>
- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, *508*(1), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature13028>
- Holland, F. H., Ganguly, P., Potter, D. N., Chartoff, E. H., & Brenhouse, H. C. (2014). Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neuroscience Letters*, *566*, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.023>
- Honea, R., Crow, T. J., Passingham, D., & Mackay, C. E. (2005). Regional Deficits in Brain Volume in Schizophrenia: A Meta-Analysis of Voxel-Based Morphometry Studies. *American Journal of Psychiatry*, *162*(12), 2233–2245. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.12.2233>
- Hosken, I. T., Sutton, S. W., Smith, C. M., & Gundlach, A. L. (2015). Relaxin-3 receptor (Rxfp3) gene knockout mice display reduced running wheel activity: Implications for role of relaxin-3/RXFP3 signalling in sustained arousal. *Behavioural Brain Research*, *278*, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.028>
- Huang, T. N., Hsu, T. T., Lin, M. H., Chuang, H. C., Hu, H. T., Sun, C. P., Tao, M. H., Lin, J. Y., & Hsueh, Y. P. (2019). Interhemispheric Connectivity Potentiates the Basolateral Amygdalae and Regulates Social Interaction and Memory. *Cell Reports*, *29*(1), 34-48.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.082>
- Huber, D. (2005). Vasopressin and Oxytocin Excite Distinct Neuronal Populations in the Central Amygdala. *Science*, *308*(5719), 245–248. <https://doi.org/10.1126/science.1105636>
- Hung, L. W., Neuner, S., Polepalli, J. S., Beier, K. T., Wright, M., Walsh, J. J., Lewis, E. M., Luo, L., Deisseroth, K., Dölen, G., & Malenka, R. C. (2017). Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science*, *357*(6358), 1406–1411. <https://doi.org/10.1126/science.aan4994>
- Igarashi, K. M. (2016). The entorhinal map of space. *Brain Research*, *1637*, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.041>
- Imai, H., Steindler, D. A., & Kitai, S. T. (1986). The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *243*(3), 363–380. <https://doi.org/10.1002/cne.902430307>



- lñiguez, C., Gayoso, M. J., & Carreres, J. (1985). A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. *Journal of Neuroscience Methods*, 13(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90045-7)
- Inoue, K. (1997). ATP receptors in the central nervous system. *Folia Pharmacologica Japonica*, 110(4), 173–182. <https://doi.org/10.1254/fpj.110.173>
- Insausti, R., & Amaral, D. G. (2008). Entorhinal Cortex of the Monkey : IV . Topographical and Laminar Organization of Cortical Afferents. *The Journal of Comparative Neurology*, 641, 608–641. <https://doi.org/10.1002/cne.21753>
- Insel, T. R., & Fernald, R. D. (2004). How the brain processes social information: Searching for the Social Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 697–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144148>
- Jacobs, J., & Lee, S. A. (2016). Spatial Cognition: Grid Cells Support Imagined Navigation. *Current Biology*, 26(7), R277–R279. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.032>
- Jacobsen, J. P. R., Medvedev, I. O., & Caron, M. G. (2012). The 5-HT deficiency theory of depression: Perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601), 2444–2459. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0109>
- Jennes, L., Stumpf, W. E., & Kalivas, P. W. (1982). Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 210(3), 211–224. <https://doi.org/10.1002/cne.902100302>
- Jeon, D., Kim, S., Chetana, M., Jo, D., Ruley, H. E., Rabah, D., Kinet, J., & Shin, H. (2010). Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 CA+2 channels in ACC. *Nature Neuroscience*, 13(4), 482–488. <https://doi.org/10.1038/nn.2504.Observational>
- Jinno, S., & Kosaka, T. (2002). Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. *Brain Research*, 945(2), 219–231. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02804-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02804-4)
- Jurado, M. B., & Rosselli, M. (2007). The elusive nature of executive functions: A review of our current understanding. *Neuropsychology Review*, 17(3), 213–233. <https://doi.org/10.1007/s11065-007-9040-z>
- Kaidanovich-beilin, O., Lipina, T., Vukobradovic, I., Roder, J., & Woodgett, J. R. (2011). Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(2473), 1–6. <https://doi.org/10.3791/2473>
- Kania, A., Gugula, A., Grabowiecka, A., de Ávila, C., Blasiak, T., Rajfur, Z., Lewandowski, M. H., Hess, G., Timofeeva, E., Gundlach, A. L., & Blasiak, A. (2017). Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3-RXFP3 signalling. *The Journal of Physiology*, 595(11), 3425–3447. <https://doi.org/10.1113/JP273787>
- Kastman, H. E., Blasiak, A., Walker, L., Siwiec, M., Krstew, E. V., Gundlach, A. L., & Lawrence, A. J. (2016). Nucleus incertus Orexin2 receptors mediate alcohol seeking in rats. *Neuropharmacology*, 110, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.006>
- Katayama, T., Jodo, E., & Suzuki, Y. (2009). Phencyclidine affects firing activity of basolateral amygdala neurons related to social behavior in rats. *Neuroscience*,

159(1), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.002>

- Kennedy, D. P., Gläscher, J., Tyszka, J. M., & Adolphs, R. (2009). Personal space regulation by the human amygdala. *Nature Neuroscience*, 12(10), 1226–1227. <https://doi.org/10.1038/nn.2381>
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. (2007). Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region : The Lateral and Medial Entorhinal Areas. *Hippocampus*, 17(8), 697–708. <https://doi.org/10.1002/hipo>
- Kishi, T., Tsumori, T., Yokota, S., & Yasui, Y. (2006). Topographical Projection from the Hippocampal Formation to the Amygdala: A Combined Anterograde and Retrograde Tracing Study in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(3), 349–368. <https://doi.org/10.1002/cne.20919>
- Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H. A., Murison, R., Moser, E. I., & Moser, M. B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10825–10830. <https://doi.org/10.1073/pnas.152112399>
- Klausberger, T., & Somogyi, P. (2015). Neuronal Diversity and Temporal Dynamics : The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science*, 348(6245), 51–57. <https://doi.org/10.1126/science.1149381.Neuronal>
- Kocan, M., Sarwar, M., Hossain, M. A., Wade, J. D., & Summers, R. J. (2014). Signalling profiles of H3 relaxin, H2 relaxin and R3(BΔ23-27)R/15 acting at the relaxin family peptide receptor 3 (RXFP3). *British Journal of Pharmacology*, 171(11), 2827–2841. <https://doi.org/10.1111/bph.12623>
- Kocsis, B., & Vertes, R. P. (1997). Phase relations of rhythmic neuronal firing in the supramammillary nucleus and mammillary body to the hippocampal theta activity in urethane anesthetized rats. *Hippocampus*, 7(2), 204–214. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1997\)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:2<204::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)
- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R., & Tonegawa, S. (2013). Cell type – specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature Publishing Group*, 17(2), 269–279. <https://doi.org/10.1038/nn.3614>
- Koshimizu, T., & Tsujimoto, G. (2009). New Topics in Vasopressin Receptors and Approach to Novel Drugs: Vasopressin and Pain Perception. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109(1), 33–37. <https://doi.org/10.1254/jphs.08R18FM>
- Kuraoka, K., & Nakamura, K. (2007). Responses of single neurons in monkey amygdala to facial and vocal emotions. *Journal of Neurophysiology*, 97(2), 1379–1387. <https://doi.org/10.1152/jn.00464.2006>
- Ladrón de Guevara-Miranda, D., Millón, C., Rosell-Valle, C., Pérez-Fernández, M., Missiroli, M., Serrano, A., Pavón, F. J., Rodríguez de Fonseca, F., Martínez-Losa, M., Álvarez-Dolado, M., Santín, L. J., & Castilla-Ortega, E. (2017). Long-lasting memory deficits in mice withdrawn from cocaine are concomitant with neuroadaptations in hippocampal basal activity, GABAergic interneurons and adult neurogenesis. *Disease Models & Mechanisms*, 10(3), 323–336. <https://doi.org/10.1242/dmm.026682>
- Landgraf, R., Frank, E., Aldag, J. M., Neumann, I. D., Sharer, C. A., Ren, X., Niwa, M., Wigger, A., & Young, L. J. (2003). Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum : improved social discrimination and active social behaviour. *European Journal of Neuroscience*, 18, 403–411.

<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02750.x>

- Laviolette, S. R. (2007). Dopamine Modulation of Emotional Processing in Cortical and Subcortical Neural Circuits: Evidence for a Final Common Pathway in Schizophrenia? *Schizophrenia Bulletin*, 33(4), 971–981. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm048>
- Le Moal, M., Dantzer, R., Michaud, B., & Koob, G. F. (1987). Centrally injected arginine vasopressin (AVP) facilitates social memory in rats. *Neuroscience Letters*, 77(3), 353–359. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90527-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90527-1)
- Lebel, C., Caverhill-godkewitsch, S., & Beaulieu, C. (2010). Neurolmage Age-related regional variations of the corpus callosum identified by diffusion tensor tractography. *NeuroImage*, 52(1), 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.03.072>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23(1), 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lee, E., Rhim, X. I., Lee, J. W., Ghim, J., Lee, S., Kim, E., & Jung, M. W. (2016). Enhanced Neuronal Activity in the Medial Prefrontal Cortex during Social Approach Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 36(26), 6926–6936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0307-16.2016>
- Lee, H.-J., Macbeth, A. H., Pagani, J., & Young, W. S. (2010). Oxytocin: the Great Facilitator of Life. *Prog Neurobiol.*, 88(2), 127–151. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.001>. Oxytocin
- Lee, L. C., Rajkumar, R., & Dawe, G. S. (2014). Selective lesioning of nucleus incertus with corticotropin releasing factor-saporin conjugate. *Brain Research*, 1543, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.11.021>
- Leitner, F. C., Melzer, S., Lütcke, H., Pinna, R., Seeburg, P. H., Helmchen, F., & Monyer, H. (2016). Spatially segregated feedforward and feedback neurons support differential odor processing in the lateral entorhinal cortex. *Nature Neuroscience*, 19(7), 935–944. <https://doi.org/10.1038/nn.4303>
- Lemaire, Barnéoud, Böhme, Piot, Haun, Roques, & Blanchard. (1994). CCK-A and CCK-B receptors enhance olfactory recognition via distinct neuronal pathways. *Learn Mem.*, 1(3), 153–164. <https://doi.org/10.1101/lm.1.3.153>
- Lenglos, C., Mitra, A., Guèvremont, G., & Timofeeva, E. (2013). Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes, Brain and Behavior*, 12(4), 370–387. <https://doi.org/10.1111/gbb.12028>
- Leroy, F., Park, J., Asok, A., Brann, D. H., Meira, T., Boyle, L., Buss, E. W., Kandel, E. R., & Siegelbaum, S. A. (2018). A hippocampal CA2 to lateral septal circuit disinhibits social aggression. *Nature*, 564(7735), 213–218. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0772-0>
- Leung, C., Cao, F., Nguyen, R., Iii, O. C. S., Kim, J. C., & Jia, Z. (2018). Activation of Entorhinal Cortical Projections to the Dentate Gyrus Underlies Social Memory Retrieval Article Activation of Entorhinal Cortical Projections to the Dentate Gyrus Underlies Social Memory Retrieval. *CellReports*, 23(8), 2379–2391. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.073>
- Leutgeb, S., & Mizumori, S. J. Y. (1999). Excitotoxic Septal Lesions Result in Spatial Memory Deficits and Altered Flexibility of Hippocampal Single-Unit Representations. *The Journal of Neuroscience*, 19(15), 6661–6672.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06661.1999>

- Levin, N., Kritman, M., Maroun, M., & Akirav, I. (2017). Differential roles of the infralimbic and prelimbic areas of the prefrontal cortex in reconsolidation of a traumatic memory. *European Neuropsychopharmacology*, 27(9), 900–912. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.06.007>
- Li, S., Tang, J., Gao, Y., Thiel, C. M., & Wolf, O. T. (2019). The serotonin transporter gene variants modulate acute stress-induced hippocampus and dorsomedial prefrontal cortex activity during memory retrieval. *PsyCh Journal*, 8(3), 363–377. <https://doi.org/10.1002/pchj.297>
- Lim, L. W., Stegeman, R. A., Leimgruber, N. K., Gierse, J. K., & Abdel-Meguid, S. S. (1989). Preliminary crystallographic study of glycosylated recombinant human renin. *Journal of Molecular Biology*, 210(1), 239–240. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90305-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90305-7)
- Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470(7333), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature09736>
- Lin, X. Y., Hsieh, T., Tsai, T., Chen, C., Huang, C., & Hsu, X. (2018). Conditional Deletion of Hippocampal CA2 / CA3a Oxytocin Receptors Impairs the Persistence of Long-Term Social Recognition Memory in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 38(5), 1218–1231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1896-17.2017>
- Liu, C., Chen, J., Sutton, S., Roland, B., Kuei, C., Farmer, N., Sillard, R., & Lovenberg, T. W. (2003). Identification of Relaxin-3/INSL7 as a Ligand for GPCR142. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50765–50770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308996200>
- Liu, Changlu, Eriste, E., Sutton, S., Chen, J., Roland, B., Kuei, C., Farmer, N., Jörnvall, H., Sillard, R., & Lovenberg, T. W. (2003). Identification of Relaxin-3/INSL7 as an Endogenous Ligand for the Orphan G-protein-coupled Receptor GPCR135. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50754–50764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308995200>
- Logue, M. W., Rooij, S. J. H. Van, Dennis, E. L., Davis, S. L., Hayes, J. P., Stevens, J. S., Densmore, M., Haswell, C. C., Ipser, J., Koch, S. B. J., Korgaonkar, M., Lebois, L. A. M., Peverill, M., Baker, J. T., Boedhoe, P. S. W., Frijling, J. L., Gruber, S. A., Harpaz-rotem, I., Jahanshad, N., ... Morey, R. A. (2018). Archival Report Smaller Hippocampal Volume in Posttraumatic Stress Disorder : A Multisite ENIGMA-PGC Study : Subcortical Volumetry Results From Posttraumatic Stress Disorder Consortia. *Biological Psychiatry*, 83(3), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.09.006>
- Lopatina, O. L., Komleva, Y. K., Gorina, Y. V., Olovyannikova, R. Y., Trufanova, L. V., Hashimoto, T., Takahashi, T., Kikuchi, M., Minabe, Y., Higashida, H., & Salmina, A. B. (2018). Oxytocin and excitation/inhibition balance in social recognition. *Neuropeptides*, 72, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.09.003>
- Love, T. M. (2014). Oxytocin, Motivation and the Role of Dopamine. *Pharmacol Biochem Behav*, 120(7), 806–811. <https://doi.org/10.1093/jn/120.7.806>
- Lu, L., Ren, Y., Yu, T., Liu, Z., Wang, S., Tan, L., Zeng, J., Feng, Q., Lin, R., Liu, Y., Guo, Q., & Luo, M. (2020). Control of locomotor speed, arousal, and hippocampal theta rhythms by the nucleus incertus. *Nature Communications*, 11(1), 262. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14116-y>

- Lukas, M., Toth, I., Veenema, A. H., & Neumann, I. D. (2013). Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: Male juvenile versus female adult conspecifics. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(6), 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.09.018>
- Lymer, J. M., Sheppard, P. A. S., Kuun, T., Blackman, A., Jani, N., Mahbub, S., & Choleris, E. (2018). Estrogens and their receptors in the medial amygdala rapidly facilitate social recognition in female mice. *Psychoneuroendocrinology*, *89*(2017), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.12.021>
- M'Harzi, M., & Jarrard, L. E. (1992). Effects of medial and lateral septal lesions on acquisition of a place and cue radial maze task. *Behavioural Brain Research*, *49*(2), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80160-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80160-3)
- Ma, S., Bonaventure, P., Ferraro, T., Shen, P. J., Burazin, T. C. D., Bathgate, R. A. D., Liu, C., Tregear, G. W., Sutton, S. W., & Gundlach, A. L. (2007). Relaxin-3 in GABA projection neurons of nucleus incertus suggests widespread influence on forebrain circuits via G-protein-coupled receptor-135 in the rat. *Neuroscience*, *144*(1), 165–190. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.072>
- Ma, Sherie, Allocca, G., Ong-Pålsson, E. K. E., Singleton, C. E., Hawkes, D., McDougall, S. J., Williams, S. J., Bathgate, R. A. D., & Gundlach, A. L. (2017). Nucleus incertus promotes cortical desynchronization and behavioral arousal. *Brain Structure and Function*, *222*(1), 515–537. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1230-0>
- Ma, Sherie, Olucha-Bordonau, F. E., Hossain, M. A., Lin, F., Kuei, C., Liu, C., Wade, J. D., Sutton, S. W., Nuñez, A., & Gundlach, A. L. (2009). Modulation of hippocampal theta oscillations and spatial memory by relaxin-3 neurons of the nucleus incertus. *Learning and Memory*, *16*(11), 730–742. <https://doi.org/10.1101/lm.1438109>
- Maass, A., Berron, D., Libby, L. A., Ranganath, C., & Düzel, E. (2015). Functional subregions of the human entorhinal cortex. *eLife*, *4*, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.06426>
- Malkani, S., & Rosen, J. B. (2000). Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience*, *97*(4), 693–702. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00058-0)
- Malkani, Seema, & Rosen, J. B. (2000). Differential expression of EGR-1 mRNA in the amygdala following diazepam in contextual fear conditioning. *Brain Research*, *860*(1–2), 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)01976-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)01976-4)
- Malkani, Seema, Wallace, K. J., Donley, M. P., & Rosen, J. B. (2004). An egr-1 (zif268) antisense oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learning and Memory*, *11*(5), 617–624. <https://doi.org/10.1101/lm.73104>
- Manfré, G., Novati, A., Faccini, I., Rossetti, A. C., Bosch, K., Molteni, R., Riva, M. A., Van der Harst, J. E., Nguyen, H. P., & Homberg, J. R. (2018). BACHD rats expressing full-length mutant huntingtin exhibit differences in social behavior compared to wild-type littermates. *PLoS ONE*, *13*(2), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192289>
- Maren, S., & Fanselow, M. (1995). Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *The Journal of Neuroscience*, *15*(11), 7548–7564. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07548.1995>
- Marino, M. D., Bourd, B. N., Liles, L. C., & Weinshenker, D. (2005). Genetic reduction of

- noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behavioural Brain Research*, 161, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.005>
- Martin, M. M., Horn, K. L., Kusman, K. J., & Wallace, D. G. (2007). Medial septum lesions disrupt exploratory trip organization: Evidence for septohippocampal involvement in dead reckoning. *Physiology and Behavior*, 90(2–3), 412–424. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.10.007>
- Martínez-Bellver, S., Cervera-Ferri, A., Luque-García, A., Martínez-Ricós, J., Valverde-Navarro, A., Bataller, M., Guerrero, J., & Teruel-Martí, V. (2017). Causal relationships between neurons of the nucleus incertus and the hippocampal theta activity in the rat. *Journal of Physiology*, 595(5), 1775–1792. <https://doi.org/10.1113/JP272841>
- Matsumoto, M., Kamohara, M., Sugimoto, T., Hidaka, K., Takasaki, J., Saito, T., Okada, M., Yamaguchi, T., & Furuichi, K. (2000). The novel G-protein coupled receptor SALPR shares sequence similarity with somatostatin and angiotensin receptors. *Gene*, 248(1–2), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00123-2)
- Matsumoto, N., Kitanishi, T., & Mizuseki, K. (2019). The subiculum : Unique hippocampal hub and more. *Neuroscience Research*, 143, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.002>
- Mchugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2004). Amygdala and Ventral Hippocampus Contribute Differentially to Mechanisms of Fear and Anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 118(1), 63–78. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.63>
- Mcnaughton, N. (2006). The role of the subiculum within the behavioural inhibition system. *Behavioural Brain Research*, 174, 232–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.05.037>
- Meessen, H., & Olszewski, J. (1950). Notices of Recent Publications. *Brain*, 73(4), 544–544. <https://doi.org/10.1093/brain/73.4.544>
- Miller, E. K., & Cohen, J. D. (2001). An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Minami, C., Shimizu, T., & Mitani, A. (2017). Neural activity in the prelimbic and infralimbic cortices of freely moving rats during social interaction: Effect of isolation rearing. *PLoS ONE*, 12(5), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176740>
- Mitchell, S. J., Rawlins, J. N. P., Steward, O., & Olton, D. S. (1982). Medial septal area lesions disrupt  $\theta$  rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *Journal of Neuroscience*, 2(3), 292–302. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-03-00292.1982>
- Moadab, G., Bliss-Moreau, E., & Amaral, D. G. (2015). Adult Social Behavior With Familiar Partners Following Neonatal Amygdala or Hippocampus Damage. *Behavioral Neuroscience*, 129(3), 339–350. <https://doi.org/10.1037/bne0000062>
- Monteiro, B. M. M., Moreira, A., & Massensini, R. (2014). Enriched Environment Increases Neurogenesis and Improves Social Memory Persistence in Socially Isolated Adult Mice. *Hippocampus*, 24(8), 239–248. <https://doi.org/10.1002/hipo.22218>
- Mooney, S. J., Douglas, N. R., & Holmes, M. M. (2014). Hormones and Behavior Peripheral administration of oxytocin increases social affiliation in the naked mole-

- rat ( *Heterocephalus glaber* ). *Hormones and Behavior*, 65(4), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.003>
- Morest, D. K. (1961). Connexions of the dorsal tegmental nucleus in rat and rabbit. *Journal of Anatomy*, 95, 229–246.
- Morris, R. G. M., Schenk, F., Tweedie, F., & Jarrard, L. E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *European Journal of Neuroscience*, 2(12), 1016–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1990.tb00014.x>
- Moser, E. I., Moser, M., & McNaughton, B. L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nature Publishing Group*, 20(11), 1448–1464. <https://doi.org/10.1038/nn.4653>
- Müller, C., & Remy, S. (2018). Septo–hippocampal interaction. *Cell and Tissue Research*, 373(3), 565–575. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2745-2>
- Müller, N. G., Machado, L., & Knight, R. T. (2002). Contributions of subregions of the prefrontal cortex to working memory: Evidence from brain lesions in humans. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 14(5), 673–686. <https://doi.org/10.1162/08989290260138582>
- Müller, R.-A. (2007). The study of autism as a distributed disorder Ralph-Axel. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 13(1), 85–95. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20141>.
- Murray, A. J., Sauer, J., Riedel, G., & McClure, C. (2011). Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nature Neuroscience*, 14(3), 297–299. <https://doi.org/10.1038/nn.2751>. Parvalbumin-positive
- Murray, A. J., Woloszynowska-Fraser, M. U., Ansel-Bollepalli, L., Cole, K. L. H., Foggetti, A., Crouch, B., Riedel, G., & Wulff, P. (2015). Parvalbumin-positive interneurons of the prefrontal cortex support working memory and cognitive flexibility. *Scientific Reports*, 5(1), 16778. <https://doi.org/10.1038/srep16778>
- Naber, P. A., Caballero-Bleda, M., Jorritsma-Byham, B., & Witter, M. P. (1997). Parallel input to the hippocampal memory system through peri- and postrhinal cortices. *NeuroReport*, 8(11), 2617–2621. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707280-00039>
- Nagasawa, M., Sakimura, K., Mori, K. J., Bedell, M. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Mishina, M. (1996). Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. *Molecular Brain Research*, 36(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00225-H](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00225-H)
- Namura, S., Takada, M., Kikuchi, H., & Mizuno, N. (1994). Topographical organization of subicular neurons projecting to subcortical regions. *Brain Research Bulletin*, 35(3), 221–231. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)90126-0](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)90126-0)
- Nategh, M., Nikseresht, S., Khodagholi, F., & Motamedi, F. (2015). Nucleus incertus inactivation impairs spatial learning and memory in rats. *Physiology and Behavior*, 139, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.014>
- Naya, Y. (2016). Declarative association in the perirhinal cortex. *Neuroscience Research*, 113, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.07.001>
- Neumann, I. D., & Landgraf, R. (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences*, 35(11), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.004>

- NEWMAN, S. W. (1999). The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior: A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877(1), 242–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
- Neylan, T. C., Mueller, S. G., Wang, Z., Metzler, T. J., Lenoci, M., Truran, D., Marmar, C. R., Weiner, M. W., & Schuff, N. (2010). Volume of the CA3 / Dentate Gyrus Hippocampal. *BPS*, 68(5), 494–496. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.04.035>
- Nguyen, R., Morrissey, M. D., Mahadevan, X. V., Cajanding, J. D., Woodin, X. M. A., Yeomans, J. S., Takehara-nishiuchi, K., & Kim, J. C. (2014). Parvalbumin and GAD65 Interneuron Inhibition in the Ventral Hippocampus Induces Distinct Behavioral Deficits Relevant to Schizophrenia. *The Journal of Neuroscience*, 34(45), 14948–14960. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2204-14.2014>
- Nilssen, E. S., Doan, T. P., Nigro, M. J., Ohara, S., & Witter, M. P. (2019). Neurons and networks in the entorhinal cortex: A reappraisal of the lateral and medial entorhinal subdivisions mediating parallel cortical pathways. *Hippocampus*, 29(12), 1238–1254. <https://doi.org/10.1002/hipo.23145>
- Nova-Marques, J. A., Garcia-Diaz, C., & Olucha-Bordonau, F. E. (2018). [A new agent in the mechanisms underlying addiction and ingestion of alcohol: the nucleus incertus and the neuropeptide relaxin-3]. *Revista de Neurologia*, 67(5), 175–186. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30047120>
- Numan, M., & Young, L. J. (2016). Hormones and Behavior Neural mechanisms of mother – infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Hormones and Behavior*, 77, 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.015>
- Núñez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F. ., Ruiz-Torner, A., Teruel, V., Nunez, A., Cervera-Ferri, A., Olucha-Bordonau, F. ., Ruiz-Torner, A., & Teruel, V. (2006). Nucleus incertus contribution to hippocampal theta rhythm generation. *The European Journal of Neuroscience*, 23(10), 2731–2738. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04797.x>
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599–3639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735>
- O'Keefe, J., & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*, 3(3), 317–330. <https://doi.org/10.1002/hipo.450030307>
- O'Mara, S. (2005). The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *Journal of Anatomy*, 207(3), 271–282. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00446.x>
- Ochsner, K. N. (2008). The Social-Emotional Processing Stream: Five Core Constructs and Their Translational Potential for Schizophrenia and Beyond. *Biological Psychiatry*, 64(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2008.04.024>
- Okada, R., Fujiwara, H., Mizuki, D., Araki, R., Yabe, T., & Matsumoto, K. (2015). Involvement of dopaminergic and cholinergic systems in social isolation-induced deficits in social affiliation and conditional fear memory in mice. *Neuroscience*, 299, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.064>
- Okada, Ryo, Matsumoto, K., Tsushima, R., Fujiwara, H., & Tsuneyama, K. (2014). Social



- isolation stress-induced fear memory deficit is mediated by down-regulated neuro-signaling system and Egr-1 expression in the brain. *Neurochemical Research*, 39(5), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1283-5>
- Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S., & Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353(6307), 1536–1541. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7003>
- Olucha-Bordonau, F. E., Albert-Gascó, H., Ros-Bernal, F., Rytova, V., Ong-Pålsson, E. K. E., Ma, S., Sánchez-Pérez, A. M., & Gundlach, A. L. (2018). Modulation of forebrain function by nucleus incertus and relaxin-3/RXFP3 signaling. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 24(8), 694–702. <https://doi.org/10.1111/cns.12862>
- Olucha-Bordonau, F. E., Otero-García, M., Sánchez-Pérez, A. M., Núñez, Á., Ma, S., & Gundlach, A. L. (2012). Distribution and targets of the relaxin-3 innervation of the septal area in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(9), 1903–1939. <https://doi.org/10.1002/cne.23018>
- Olucha-Bordonau, F. E., Teruel, V., Barcia-González, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A. A., & Martínez-Soriano, F. (2003). Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 62–97. <https://doi.org/10.1002/cne.10774>
- Olucha-Bordonau, F., Fortes-Marco, L., Otero-García, M., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2014). The amygdala structure and function. In *The rat nervous system. IV Edition* (In: Paxino, pp. 441–490).
- Opendak, M., Briones, B. A., & Gould, E. (2016). Social behavior, hormones and adult neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 41, 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.02.002>
- Ostrowski, N. L. (1998). Oxytocin receptor mRNA expression in rat brain: implications for behavioral integration and reproductive success. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 989–1004. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(98\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(98)00070-5)
- Ota, M., Sato, N., Hidese, S., Teraishi, T., Maikusa, N., Matsuda, H., Hattori, K., & Kunugi, H. (2017). Structural differences in hippocampal subfields among schizophrenia patients, major depressive disorder patients, and healthy subjects. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 259, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2016.11.002>
- Owen, S. F., Tuncdemir, S. N., Bader, P. L., Tirko, N. N., Fishell, G., & Tsien, R. W. (2013). Oxytocin enhances hippocampal spike transmission by modulating fast-spiking interneurons. *Nature*, 500(7463), 458–462. <https://doi.org/10.1038/nature12330>
- Padilla-coreano, N., Bolkan, S. S., Pierce, G. M., Blackman, D. R., Hardin, W. D., Garcia-garcia, A. L., Spellman, T. J., & Joshua, A. (2016). Direct ventral hippocampal-prefrontal input is required for anxiety-related neural activity and behavior. *Neuron*, 89(4), 857–866. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.011>.Direct
- Pan, Y., Xu, L., Young, K. A., Wang, Z., & Zhang, Z. (2010). Hormones and Behavior Agonistic encounters and brain activation in dominant and subordinate male greater long-tailed hamsters. *Hormones and Behavior*, 58(3), 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.001>
- Parashar, A., Mehta, V., & Malairaman, U. (2017). Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated with Social Recognition Memory Deficit and Altered Dopaminergic

- Neurotransmission in the Amygdala. *Annals of Neurosciences*, 24(4), 212–220. <https://doi.org/10.1159/000479637>
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, 16(2), 146–153. <https://doi.org/10.1038/nn.3296>; 10.1038/nn.3296
- Paxinos, G. G., & Watson, C. (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (Vol. 3rd). Academic Press.
- Pentkowski, N. S., Litvin, Y., Blanchard, D. C., King, L. B., & Blanchard, R. J. (2010). Effects of acidic-astressin and ovine-CRF microinfusions into the ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Hormones and Behavior*, 56(1), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.007>.Effects
- Pereira, C. W., Santos, F. N., Sánchez-Pérez, A. M., Otero-García, M., Marchioro, M., Ma, S., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2013). Electrolytic lesion of the nucleus incertus retards extinction of auditory conditioned fear. *Behavioural Brain Research*, 247, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.025>
- Perez-Villalba, A., Teruel-Martí, V., Ruiz-Torner, A., & Olucha-Bordonau, F. (2005). The effect of long context exposure on cued conditioning and c-fos expression in the rat forebrain. *Behavioural Brain Research*, 161(2), 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.028>
- Pérez De La Mora, M., Hernández-Gómez, A. M., Arizmendi-García, Y., Jacobsen, K. X., Lara-García, D., Flores-Gracia, C., Crespo-Ramírez, M., Gallegos-Cari, A., Nuche-Bricaire, A., & Fuxe, K. (2007). Role of the amygdaloid cholecystinin (CCK)/gastrin-2 receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8S on anxiety-like behaviour and [3H]GABA release. *European Journal of Neuroscience*, 26(12), 3614–3630. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05963.x>
- Petrulis, A., Alvarez, P., & Eichenbaum, H. (2005). Neural correlates of social odor recognition and the representation of individual distinctive social odors within entorhinal cortex and ventral subiculum. *Neuroscience*, 130(1), 259–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.001>
- Petrulis, A., & Eichenbaum, H. (2003). The perirhinal–entorhinal cortex, but not the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect. *Neuroscience*, 122(3), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.009>
- Phelps, E. A., & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron*, 48(2), 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.025>
- Pickel, V. M., Segal, M., & Bloom, F. E. (1974). A radioautographic study of the efferent pathways of the nucleus locus coeruleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 155(1), 15–41. <https://doi.org/10.1002/cne.901550103>
- Pikkarainen, M., & Ro, S. (1999). Projections From the Lateral , Basal , and Accessory Basal Nuclei of the Amygdala to the Hippocampal Formation in Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 260, 229–260.
- Popik, P., & Vetulani, J. (1991). Opposite action of oxytocin and its peptide antagonists on social memory in rats. *Neuropeptides*, 18(1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(91\)90159-G](https://doi.org/10.1016/0143-4179(91)90159-G)
- Popik, Piotr, & Vetulani, J. (1991). Opposite action of oxytocin and its peptide antagonists

- on social memory in rats. *Neuropeptides*, 18(1), 23–27. [https://doi.org/10.1016/0143-4179\(91\)90159-G](https://doi.org/10.1016/0143-4179(91)90159-G)
- Prast, H., Argyriou, A., & Philippu, A. (1996). Histaminergic neurons facilitate social memory in rats. *Brain Research*, 734(1–2), 316–318. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00886-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00886-4)
- Raam, T., McAvoy, K. M., Besnard, A., Veenema, A. H., & Sahay, A. (2017). Hippocampal oxytocin receptors are necessary for discrimination of social stimuli. *Nature Communications*, 8(1), 2001. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02173-0>
- Racaniello, M., Cardinale, A., Mollinari, C., D’Antuono, M., De Chiara, G., Tancredi, V., & Merlo, D. (2010). Phosphorylation Changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt Kinases and CREB Activation during Early Long-Term Potentiation at Schaffer Collateral-CA1 Mouse Hippocampal Synapses. *Neurochemical Research*, 35(2), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0047-0>
- Radulovic, J., Rühmann, A., Liepold, T., & Spiess, J. (1999). Modulation of Learning and Anxiety by Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Stress: Differential Roles of CRF Receptors 1 and 2. *The Journal of Neuroscience*, 19(12), 5016–5025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-05016.1999>
- Raine, Y. Y. & A. (2009). Prefrontal Structural and Functional Brain Imaging findings in Antisocial, Violent, and Psychopathic Individuals: A Meta-Analysis. *Psychiatry Rev.*, 174(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2009.03.012.Prefrontal>
- Rajkowska, G., Selemon, L. D., & Goldman-Rakic, P. S. (1998). Neuronal and Glial Somal Size in the Prefrontal Cortex. *Archives of General Psychiatry*, 55(3), 215. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.55.3.215>
- Ramirez, S., Liu, X., Lin, P.-A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R. L., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2013). Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science*, 341(6144), 387–391. <https://doi.org/10.1126/science.1239073>
- Rawlins, J. N. P., & Olton, D. S. (1982). The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behavioural Brain Research*, 5(4), 331–358. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(82\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(82)90039-0)
- Rennie, S. M., Moita, M. M., Mainen, Z. F., Flor, H., Diers, M., & Andoh, J. (2013). Social cognition in the rodent: nothing to be sniffed at The neural basis of phantom limb pain. *Trends in Cognitive Sciences*, 17(7), 306–307. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.04.011>
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *BRESR*, 24(2–3), 115–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00009-X)
- Robinson, J. L., Molina-Porcel, L., Corrada, M. M., Raible, K., Lee, E. B., Lee, V. M.-Y., Kawas, C. H., & Trojanowski, J. Q. (2014). Perforant path synaptic loss correlates with cognitive impairment and Alzheimer’s disease in the oldest-old. *Brain*, 137(9), 2578–2587. <https://doi.org/10.1093/brain/awu190>
- Robinson, K. J., Twiss, S. D., Hazon, N., Moss, S., & Pomeroy, P. P. (2017). Positive social behaviours are induced and retained after oxytocin manipulations mimicking endogenous concentrations in a wild mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1855), 20170554. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0554>
- Rosen, J. B., Fanselow, M. S., Young, S. L., Sitcoske, M., & Maren, S. (1998). Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Research*, 796(1–2), 132–142. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00294-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00294-7)

- Rosenberger, L. A., Eisenegger, C., Naef, M., Terburg, D., Fourie, J., Stein, D. J., & van Honk, J. (2019). The Human Basolateral Amygdala Is Indispensable for Social Experiential Learning. *Current Biology*, 29(20), 3532–3537. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.078>
- Ross, L. A., & Olson, I. R. (2010). Social cognition and the anterior temporal lobes. *NeuroImage*, 49(4), 3452–3462. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.11.012>
- Rowland, D. C., Obenhaus, H. A., Skytøen, E. R., Zhang, Q., Kentros, C. G., Moser, E. I., & Moser, M. (2018). Functional properties of stellate cells in medial entorhinal cortex layer II. *ELife*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.36664>
- Ryan, P. J., Krstew, E. V., Sarwar, M., Gundlach, A. L., & Lawrence, A. J. (2014). Relaxin-3 mRNA levels in nucleus incertus correlate with alcohol and sucrose intake in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 140, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.04.017>
- Ryan, Philip J., Büchler, E., Shabanpoor, F., Hossain, M. A., Wade, J. D., Lawrence, A. J., & Gundlach, A. L. (2013). Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation decreases anxiety- and depressive-like behaviours in the rat. *Behavioural Brain Research*, 244, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.034>
- Ryan, Philip J., Kastman, H. E., Krstew, E. V., Rosengren, K. J., Hossain, M. A., Churilov, L., Wade, J. D., Gundlach, A. L., & Lawrence, A. J. (2013). Relaxin-3/RXFP3 system regulates alcohol-seeking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20789–20794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317807110>
- Sabatier, N., Leng, G., & Menzies, J. (2013). Oxytocin, Feeding, and Satiety. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00035>
- Sainsbury, R. S., & Bland, B. H. (1981). The effects of selective septal lesions on theta production in CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Physiology & Behavior*, 26(6), 1097–1101. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90214-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90214-6)
- Sala, M., Braidà, D., Lentini, D., Busnelli, M., Bulgheroni, E., Capurro, V., Finardi, A., Donzelli, A., Pattini, L., Rubino, T., Parolaro, D., Nishimori, K., Parenti, M., & Chini, B. (2010). Pharmacologic Rescue of Impaired Cognitive Flexibility, Social Deficits, Increased Aggression, and Seizure Susceptibility in Oxytocin Receptor Null Mice: A Neurobehavioral Model of Autism. *BPS*, 69(9), 875–882. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.12.022>
- Sánchez-Pérez, A. M., Arnal-Vicente, I., Santos, F. N., Pereira, C. W., El Mili, N., Sanjuan, J., Ma, S., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2015). Septal projections to the nucleus incertus in the rat: Bidirectional pathways for modulation of hippocampal function. *J Comp Neurol*, 523(4), 565–588. <https://doi.org/10.1002/cne.23687>
- Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(5), 290–304. <https://doi.org/10.1038/nrn3918>
- Santos, F. N., Pereira, C. W., Sánchez-Pérez, A. M., Otero-García, M., Ma, S., Gundlach, A. L., & Olucha-Bordonau, F. E. (2016). Comparative Distribution of Relaxin-3 Inputs and Calcium-Binding Protein-Positive Neurons in Rat Amygdala. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00036>
- Sasaki, T., Leutgeb, S., & Leutgeb, J. K. (2015). Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 32, pp. 16–23).

- Schwarcz, R., Whetsell, W., & Mangano, R. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, *219*(4582), 316–318. <https://doi.org/10.1126/science.6849138>
- Science, A. I. for B. (2004). *Allen Brain Atlas: Mouse Brain*. <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/527>
- Seamans, J. K., Lapish, C. C., & Durstewitz, D. (2008). Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: Insights from electrophysiology. *Neurotoxicity Research*, *14*(2–3), 249–262. <https://doi.org/10.1007/BF03033814>
- Selemon, L. D. (2001). Regionally Diverse Cortical Pathology in Schizophrenia: Clues to the Etiology of the Disease. *Schizophrenia Bulletin*, *27*(3), 349–377. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a006881>
- Shang, Y., & Dluzen, D. E. (2001). Nisoxetine infusion into the olfactory bulb enhances the capacity for male rats to identify conspecifics. *Neuroscience*, *104*(4), 957–964. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00120-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00120-8)
- Sheehan, T. P., Chambers, R. A., & Russell, D. S. (2004). Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Research Reviews*, *46*(1), 71–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.009>
- Shibata, H. (1993). Direct projections from the anterior thalamic nuclei to the retrohippocampal region in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *337*(3), 431–445. <https://doi.org/10.1002/cne.903370307>
- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., & Quirk, G. J. (2011). Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology*, *36*(2), 529–538. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.184>
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 490–502. <https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Simó, S., Pujadas, L., Segura, M. F., La Torre, A., Del Río, J. A., Ureña, J. M., Comella, J. X., & Soriano, E. (2007). Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cerebral Cortex*, *17*(2), 294–303. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj147>
- Simpson, E. A., Sclafani, V., Paukner, A., Hamel, A. F., Novak, M. A., Meyer, J. S., Suomi, S. J., & Ferrari, P. F. (2014). Inhaled oxytocin increases positive social behaviors in newborn macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(19), 6922–6927. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402471111>
- Singewald, N., Salchner, P., & Sharp, T. (2003). Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biological Psychiatry*, *53*(4), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01574-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01574-3)
- Smith, C. M., Hosken, I. T., Sutton, S. W., Lawrence, A. J., & Gundlach, A. L. (2012). Relaxin-3 null mutation mice display a circadian hypoactivity phenotype. *Genes, Brain and Behavior*, *11*(1), 94–104. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00730.x>
- Smith, Craig M., Chua, B. E., Zhang, C., Walker, A. W., Haidar, M., Hawkes, D., Shabanpoor, F., Hossain, M. A., Wade, J. D., Rosengren, K. J., & Gundlach, A. L. (2014). Central injection of relaxin-3 receptor (RXFP3) antagonist peptides reduces

- motivated food seeking and consumption in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 268, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.03.037>
- Smith, Craig M., Shen, P. J., Banerjee, A., Bonaventure, P., Ma, S., Bathgate, R. A. D., Sutton, S. W., & Gundlach, A. L. (2010). Distribution of relaxin-3 and RXFP3 within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 518(19), 4016–4045. <https://doi.org/10.1002/cne.22442>
- Sotty, F., Danik, M., Manseau, F., Laplante, F., Quirion, R., & Williams, S. (2003). Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: Novel implications for hippocampal rhythmicity. *Journal of Physiology*, 551(3), 927–943. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046847>
- Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Ribeiro, A., Pfaff, D. W., & Agmo, A. (2010). The role of the estrogen receptor alpha in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. *Behavioural Brain Research*, 210(2), 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.033>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev*, 20, 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Sun, W., Li, X., & An, L. (2018). Distinct roles of prelimbic and infralimbic proBDNF in extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology*, 131, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.018>
- Sun, Y., Nguyen, A. Q., Nguyen, J. P., Le, L., Saur, D., Choi, J., & Callaway, E. M. (2014). Resource Cell-Type-Specific Circuit Connectivity of Hippocampal CA1 Revealed through Cre-Dependent Rabies Tracing. *CellReports*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.030>
- Sutton, S. W., Shelton, J., Smith, C., Williams, J., Yun, S., Motley, T., Kuei, C., Bonaventure, P., Gundlach, A., Liu, C., & Lovenberg, T. (2009). Metabolic and neuroendocrine responses to RXFP3 modulation in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1160, 242–249. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03812.x>
- SWAAB, D. F., NIJVELDT, F., & POOL, C. W. (1975). Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *Journal of Endocrinology*, 67(3), 461–462. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0670461>
- Sweeney, P., & Yang, Y. (2016). An inhibitory septum to lateral hypothalamus circuit that suppresses feeding. *Journal of Neuroscience*, 36(44), 11185–11195. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2042-16.2016>
- Szönyi, A., Sos, K. E., Nyilas, R., Schlingloff, D., Domonkos, A., Takács, V. T., Pósfai, B., Hegedüs, P., Priestley, J. B., Andrew, L., Gulyás, A. I., Varga, V., Losonczy, A., & Freund, T. F. (2019). Brainstem nucleus incertus controls contextual memory formation. *Science*, 364(6442), 1–33. <https://doi.org/10.1126/science.aaw0445.Brainstem>
- Szot, P., & Dorsa, D. M. (1993). Differential timing and sexual dimorphism in the expression of the vasopressin gene in the developing rat brain. *Developmental Brain Research*, 73(2), 177–183. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90136-X](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90136-X)
- Sztainberg, Y., Kuperman, Y., Justice, N., & Chen, A. (2011). An Anxiolytic Role for CRF Receptor Type 1 in the Globus Pallidus. *The Journal of Neuroscience*, 30(48), 17416–17424. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3087-11.2011>
- Taghzouti, K., Simon, H., & Le Moal, M. (1986). Disturbances in exploratory behavior

and functional recovery in the Y and radial mazes following dopamine depletion of the lateral septum. *Behavioral and Neural Biology*, 45(1), 48–56. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(86)80005-X)

- Tamamaki, N., & Nojyo, Y. (1995). Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 353(3), 379–390. <https://doi.org/10.1002/cne.903530306>
- Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., & Ibata, Y. (2005). Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1659–1670. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x>
- Teffer, K., & Semendeferi, K. (2012). Human prefrontal cortex. Evolution, development, and pathology. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 195). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53860-4.00009-X>
- Teicher, M. H., Anderson, C. M., & Polcari, A. (2011). Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *PNAS*, 13(35), 563–572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115396109>
- Toth, K., Borhegyi, Z., & Freund, T. (1993). Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *The Journal of Neuroscience*, 13(9), 3712–3724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-09-03712.1993>
- Toth, M., Fuzesi, T., Halasz, J., Tulogdi, A., & Haller, J. (2010). Neural inputs of the hypothalamic “aggression area” in the rat. *Behavioural Brain Research*, 215, 7–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.050>
- Trent, N. L., & Menard, J. L. (2010). The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats’ open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior*, 101(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.035>
- Tsao, A., Moser, M., & Moser, E. I. (2013). Traces of Experience in the Lateral Entorhinal Cortex. *Current Biology*, 23(5), 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>
- Urban, I. J. A. (1999). Effects of vasopressin and related peptides on neurons of the rat lateral septum and ventral hippocampus. In *Progress in Brain Research* (Vol. 119, pp. 285–310). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61576-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61576-9)
- Uylings, H. B. M., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.028>
- Valero, M., Menendez, L., & Prida, D. (2018). The hippocampus in depth: a sublayer-specific perspective of entorhinal – hippocampal function. *Current Opinion in Neurobiology*, 52, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.013>
- van der Westhuizen, E. T., Christopoulos, A., Sexton, P. M., Wade, J. D., & Summers, R. J. (2010). H2 Relaxin Is a Biased Ligand Relative to H3 Relaxin at the Relaxin Family Peptide Receptor 3 (RXFP3). *Molecular Pharmacology*, 77(5), 759–772. <https://doi.org/10.1124/mol.109.061432>
- Van Der Westhuizen, E. T., Werry, T. D., Sexton, P. M., & Summers, R. J. (2007). The relaxin family peptide receptor 3 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 through a protein kinase C-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*, 71(6), 1618–1629. <https://doi.org/10.1124/mol.106.032763>

- van Groen, T., & Wyss, J. M. (1990). The connections of presubiculum and parasubiculum in the rat. *Brain Research*, 518(1–2), 227–243. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90976-I](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90976-I)
- van Leeuwen, F. W., Caffè, A. R., & Vries, G. J. d. (1985). Vasopressin cells in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: sex differences and the influence of androgens. *Brain Research*, 325(1–2), 391–394. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90348-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90348-8)
- van Wimersma Greidanus, T. B., & Maigret, C. (1996). The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain Research*, 713(1–2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01505-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01505-1)
- Veenema, A. H., Bredewold, R., & De Vries, G. J. (2012). Vasopressin regulates social recognition in juvenile and adult rats of both sexes, but in sex- and age-specific ways. *Hormones and Behavior*, 61(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.10.002>
- Vertes, R. P. (2005). Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus*, 15(7), 923–935. <https://doi.org/10.1002/hipo.20118>
- Vertes, R. P., & Kocsis, B. (1997). Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience*, 81(4), 893–926. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00239-X)
- Walker, L. C., Kastman, H. E., Koeleman, J. A., Smith, C. M., Perry, C. J., Krstew, E. V., Gundlach, A. L., & Lawrence, A. J. (2017). Nucleus incertus corticotrophin-releasing factor 1 receptor signalling regulates alcohol seeking in rats. *Addiction Biology*, 22(6), 1641–1654. <https://doi.org/10.1111/adb.12426>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J., & Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, Y., Zhao, S., Liu, X., & Fu, Q. (2014). Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44, 353–359. <https://doi.org/10.3906/sag-1301-2>
- Wang, Z., Neylan, T. C., Mueller, S. G., Lenoci, M., Truran, D., Marmar, C. R., Weiner, M. W., & Schuff, N. (2015). Magnetic Resonance Imaging of Hippocampal Subfields in Posttraumatic Stress Disorder. *American Medical Association*, 67(3), 296–303.
- Wassum, K. M., & Izquierdo, A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 57, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.017>
- Weeden, C. S. S., Roberts, J. M., Kamm, A. M., & Kesner, R. P. (2015). The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 118, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.12.002>
- Weniger, G., Lange, C., & Irle, E. (2006). Abnormal size of the amygdala predicts impaired emotional memory in major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 94(1–3), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.04.017>
- Wilkinson, T. N., & Bathgate, R. A. (2007). The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 612, 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74672-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74672-2_1)
- Windle, R. J., Shanks, N., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (1997). Central oxytocin



- administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology*, 138(7), 2829–2834. <https://doi.org/10.1210/endo.138.7.5255>
- Winocur, G. (1990). Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behavioural Brain Research*, 38(2), 145–154. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90012-4)
- Winslow, J. T., & Camacho, F. (1995). Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology*, 121(2), 164–172. <https://doi.org/10.1007/BF02245626>
- Winston, J. S., Strange, B. A., O'Doherty, J., & Dolan, R. J. (2002). Automatic and intentional brain responses during evaluation of trustworthiness of faces. *Nature Neuroscience*, 5(3), 277–283. <https://doi.org/10.1038/nn816>
- Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 13(8), 3582–3598. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-08-03582.1993>
- Witter, M.P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H., & Lohman, A. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33(3), 161–253. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(89\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90009-9)
- Witter, Menno P. (2007a). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learning and Memory*, 3, 705–713. <https://doi.org/10.1101/lm.725207.called>
- Witter, Menno P. (2007b). The perforant path : projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 43–61. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63003-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63003-9)
- Witter, Menno P, Doan, T. P., Jacobsen, B., Nilssen, E. S., & Ohara, S. (2017). Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00046>
- Wolf, O. T. (2019). Memories of and influenced by the Trier Social Stress Test. *Psychoneuroendocrinology*, 105, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.10.031>
- Wyss, J. M., Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1979). A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, 4(4), 463–476. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90124-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90124-6)
- Yadin, E., Thomas, E., Grishkat, H. L., & Strickland, C. E. (1993). The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiology & Behavior*, 53(6), 1077–1083. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90362-J](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90362-J)
- Yang, C. F., Chiang, M. C., Gray, D. C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S. A., Unger, E. K., Wells, J. A., & Shah, N. M. (2013). Sexually Dimorphic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus Govern Mating in Both Sexes and Aggression in Males. *Cell*, 153(4), 896–909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017>
- Yang, T., Yang, C. F., Chizari, M. D., Maheswaranathan, N., Kenneth, J., Jr, B., Borius, M., Inoue, S., Chiang, M. C., & Bender, K. J. (2017). Social control of hypothalamus-mediated male aggression. *Neuron*, 95(4), 955–970. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.046.Social>

- Yizhar, O. (2012). Optogenetic Insights into Social Behavior Function. *BPS*, 71(12), 1075–1080. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.12.029>
- Yoganarasimha, D., Rao, G., & Knierim, J. J. (2012). Lateral entorhinal neurons are not spatially selective in cue-rich environments. *Hippocampus*, 21(12), 1363–1374. <https://doi.org/10.1002/hipo.20839>.Lateral
- Zhang, C., Chua, B. E., Yang, A., Shabanpoor, F., Hossain, M. A., Wade, J. D., Rosengren, K. J., Smith, C. M., & Gundlach, A. L. (2015). Central relaxin-3 receptor (RXFP3) activation reduces elevated, but not basal, anxiety-like behaviour in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 292, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.010>