



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Patrón de emisión de ultravocalizaciones de ratas hembras frente a un macho como índice de su motivación sexual: de la adolescencia a la adultez

2019



Trabajo final de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Magdalena Armas

Tutora: Daniella Agrati

ÍNDICE

Resumen	3
Antecedentes	4
Hipótesis	9
Objetivos	10
Metodología	11
Resultados	15
Discusión	19
Perspectivas	23
Referencias bibliográficas	25

RESUMEN

Las ultravocalizaciones (USV) son emisiones sonoras producidas por las ratas con una frecuencia que sobrepasa el umbral de audición humano. Se ha evidenciado que las USV de 50 kHz son emitidas en diversos tipos de interacciones sociales recompensantes como el encuentro sexual. El comportamiento sexual en la rata hembra es un comportamiento altamente motivado. A pesar de que la motivación sexual ha sido ampliamente estudiada en ratas hembras adultas, son escasos los estudios acerca del desarrollo de la misma durante la adolescencia, etapa en la cual el comportamiento sexual comienza a expresarse. Se ha reportado que la expresión del comportamiento sexual aumenta progresivamente a lo largo de la adolescencia, estabilizándose al final de la misma, por lo que sería de esperar que la motivación sexual siga un patrón ascendente desde el inicio de la adolescencia hasta la adultez. En base a esta hipótesis, comparamos la emisión de USV 50kHz luego de una breve interacción sin contacto físico con un macho (estímulo sexual) y con una hembra no receptiva (estímulo social), entre hembras en adolescencia media y tardía y adultas. La emisión de USV de 50 kHz frente al estímulo sexual fue mayor en comparación al estímulo social para las hembras en adolescencia tardía y adultas, pero no para las hembras en adolescencia media. Por otro lado, la emisión de USV frente a un macho mostró un patrón similar al de una U-invertida de acuerdo a la edad, caracterizado por un aumento de la emisión de USV desde la adolescencia media a la tardía, seguido de una leve disminución en la adultez. Sin embargo, la emisión de USV frente al estímulo social fue similar durante la adolescencia y disminuyó en la adultez. Estos resultados sugieren que existe un aumento de la motivación sexual de las hembras a lo largo de la adolescencia y evidencian que existen cambios en los circuitos neurales que regulan el comportamiento sexual durante este período, posiblemente producto de un aumento en la sensibilidad hormonal.

ANTECEDENTES

Comportamiento sexual en la rata hembra como comportamiento motivado

El ciclo reproductivo de la rata hembra tiene una duración de 4 a 5 días y puede dividirse en 4 etapas: proestro (en la noche de este día la hembra se encuentra sexualmente activa), estro (la hembra se encuentra sexualmente activa al inicio del mismo y ocurre la ovulación), metaestro y diestro (Caligioni, 2009). El comportamiento sexual desplegado en las etapas de proestro tardío y estro del ciclo estral ocurre como consecuencia del efecto activacional de los esteroides ováricos, picos pre-ovulatorios de estrógenos y progestágenos (Beach, 1976).

El comportamiento sexual de las ratas hembras es un comportamiento altamente motivado, lo cual se puede evidenciar a través de pruebas motivacionales específicas (Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Por ejemplo, en pruebas de preferencia se observa que éstas eligen a un macho sexualmente activo frente a un macho castrado o a una hembra (Agrati, Fernández-Guasti, & Ferreira, 2008; Clark, Kelton, Guarraci, & Clyons, 2004). A su vez, la motivación sexual de las hembras se refleja durante la interacción sexual, a través de la expresión de comportamientos proceptivos por parte de las mismas, los cuales promueven el acercamiento y la monta del macho (Beach, 1976; Erskine, 1989; Pfaus, Smith, Byrne, & Stephens, 2000).

Existen diversos modelos utilizados con la finalidad de estudiar la motivación sexual en la rata hembra, sin existir consenso en cuanto al método más adecuado para evaluarla (Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Muchos de los modelos propuestos se basan en procesos de aprendizaje asociados a la experiencia sexual (Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Sin embargo, el uso de los mismos conlleva el trabajo con hembras ovariectomizadas tratadas con dosis suprafisiológicas de esteroides sexuales, perdiendo la riqueza de trabajar con hembras ciclantes, cuya actividad sexual se asocia a cambios fisiológicos naturales. A su vez, el hecho de que la experiencia sexual induzca cambios endócrinos (incluyendo pseudo-gestación) en hembras ciclantes (Terkel, 1986), dificulta el uso de este tipo de modelo en animales intactos. Por esta razón, al trabajar con hembras ciclantes resulta conveniente optar por modelos incondicionados, sin entrenamiento previo. En relación a tales modelos, las pruebas de preferencia en las cuales los sujetos se ven, huelen y escuchan, sin permitir la interacción sexual, utilizan las conductas de aproximación del sujeto hacia el cebo como índice de motivación sexual. En este tipo de pruebas la presencia del cebo y la interacción con el mismo puede condicionar el comportamiento del sujeto experimental.

McGinnis & Vakulenko (2003) propusieron que el número de ultra-vocalizaciones (USV) de 50 kHz emitido por las hembras luego de un breve contacto sin interacción física con un macho, representa un índice de la motivación sexual de las mismas. Según los autores, tales USV son más frecuentes cuando las hembras se encuentran sexualmente activas y cuando se las presenta frente a un macho tratado con testosterona en comparación con un macho castrado o hembras sexualmente receptivas u ovariectomizadas. Algunas teorías proponen que, posiblemente, este tipo de USV funcionen de manera de atraer al macho y regular la interacción durante la cópula (Matochik, Barfield, & Nyby, 1992).

Ultravocalizaciones de 50 kHz en el contexto sexual

Barfield, Auerbach, Geyer, & McIntosh (1979, p.479) expresaron que *“la 'arena sexual', que una vez fue silenciosa, está ahora viva con sonido”*. Los autores hacen referencia a las USV, un tipo de vocalizaciones emitidas por las ratas (y otros animales) con una frecuencia que sobrepasa el umbral de audición del ser humano. En contraste con los sonidos audibles, los cuales se generan por un mecanismo de oscilaciones de las cuerdas vocales inducidas por el flujo de aire, las USV se generan por mecanismos tipo silbido debido al pasaje de aire a través de la laringe, faringe, nariz y boca durante la espiración (Riede, 2011). La emisión de USV por parte de ratas durante el encuentro sexual fue estudiada por primera vez en el año 1972 (Sales, 1972), y desde entonces existieron grandes avances en el área. Se ha evidenciado que las hormonas gonadales tienen un efecto directo sobre la emisión de USV; los hallazgos de Matochik, White, & Barfield (1992) dieron cuenta que el número de USV emitidas por un hembra frente a un macho era significativamente mayor durante la etapa de proestro del ciclo estral (cuando ocurre un aumento en la concentración de estrógenos y progestágenos) en comparación con las fases de estro, diestro y metaestro. Además de la capacidad para emitir tales vocalizaciones de alta frecuencia, las ratas poseen mecanismos para percibir las USV. Se ha evidenciado que existe en la rata una sensibilidad aumentada a nivel coclear para frecuencias ultrasónicas, además de regiones corticales dedicadas al procesamiento superior de tales estímulos (Knutson, Burgdorf, & Panksepp, 2002).

Las USV surgen frente a diferentes tipos de contextos sociales como el juego, la agresión, la cópula y el contacto con conspecíficos (Knutson et al., 2002). Algunas de las hipótesis existentes sostienen que dichas emisiones sonoras cumplen funciones de comunicación mientras que otras destacan su importancia como expresión del estado emocional subjetivo del animal (Knutson et al., 2002; Seffer, Schwarting, & Wöhr, 2014). El tipo de USV emitida cambia a lo largo del ciclo de vida de la rata. Mientras que en la infancia

predominan las emisiones con una frecuencia basal aproximada de 40kHz, tanto en ratas adolescentes como en adultas se observan otros dos tipos principales: USV de 50kHz, asociadas a interacción social y a estados emocionales positivos; y USV de 22kHz, asociadas a interacciones sociales aversivas y estados emocionales negativos (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 2002). Un claro ejemplo de las diferencias entre ambos tipos de emisión surge de la interacción sexual. En la primera fase de la interacción, donde se dan conductas proceptivas por parte de la hembra y montas e intromisiones por parte del macho, ambos individuos emiten vocalizaciones de 50kHz. Sin embargo, luego de la eyaculación (etapa refractaria del comportamiento sexual del macho), donde se observa poca o nula interacción, los machos emiten exclusivamente USV de frecuencia basal de 22kHz (Knutson et al., 2002).

Dentro de la categoría de USV de 50kHz, a su vez, se pueden distinguir dos subcategorías: USV del tipo *flat* (la frecuencia no varía o varía poco) y USV con frecuencia modulada (FM). Según Burgdorf et al. (2008), las USV del tipo FM se asocian a un comportamiento motivacional positivo durante el juego y la actividad sexual, correlacionándose con un alto valor de recompensa hacia el sujeto que emite tales USV. Por otro lado, se ha evidenciado que las USV de la subcategoría *flat* son emitidas con mayor frecuencia que las FM durante comportamientos agresivos (Burgdorf et al., 2008) y durante interacciones sociales no-recompensantes (Wöhr, Houx, Schwarting, & Spruijt, 2008).

Las diferentes categorías de USV no solo difieren en cuanto a los contextos en los que se emiten o en los estados emocionales a los que se asocian, sino que también se diferencian en los circuitos neurales responsables de su emisión. El circuito encargado de la emisión de USV de 22kHz es el circuito mesolímbico colinérgico ascendente, el cual consiste en neuronas colinérgicas ubicadas en el Núcleo Tegmental Dorsolateral, las cuales proyectan principalmente al Septum Lateral (SL) y al Área Preóptica (POA) del hipotálamo anterior. Por otro lado, el circuito encargado de la emisión de USV de 50kHz es el circuito mesolímbico dopaminérgico ascendente. Éste consta de neuronas dopaminérgicas ubicadas en el Área Tegmental Ventral (VTA), que proyectan principalmente al Núcleo Accumbens (NAcc), SL y parte de la corteza prefrontal (Brudzynski, 2013).

Además, resulta interesante la evidencia de que, ante la percepción de los diferentes tipos de USV, las regiones cerebrales que se activan también son dispares. Mientras que frente al estímulo de USV de 50kHz se encuentra expresión de la proteína c-Fos (indicando activación neural) en áreas cerebrales vinculadas a la motivación (como el NAcc, corteza motora y corteza prefrontal), la percepción de USV de 22kHz es seguida por la expresión de la misma proteína en áreas vinculadas con la aversión, como la amígdala (Sadananda, Wöhr

& Schwarting, 2008).

Börner, Hjemdahl, Götz, & Brown (2016), utilizando la metodología propuesta por McGinnis & Vakulenko (2003), hallaron que el número de USV de 50kHz emitidas por las hembras era mayor cuando se encontraban frente a un macho tratado con testosterona en comparación a cuando se encontraba frente a un macho castrado o una hembra. Además, los autores observaron una mayor proporción de USV de 50 kHz del tipo FM cuando el estímulo era un macho en comparación a cuando el estímulo era una hembra. En base a estos datos, se entiende que al momento de estudiar la motivación sexual a través de las USV emitidas frente a un estímulo no solo resulta importante caracterizar su número y frecuencia, sino también tomar en cuenta la proporción de las sub-categorías registradas.

Adolescencia en la rata y comportamiento sexual

La motivación sexual se estudia usualmente en hembras adultas, sin embargo, las ratas comienzan a expresar comportamiento sexual durante la adolescencia, luego de la apertura vaginal (la cual sucede generalmente entre los días 35 y 37 de vida) (Hashizume & Ohashi, 1984). Se le llama adolescencia al período de desarrollo asociado a la pubertad, la cual consiste en una etapa de transición donde el individuo pasa de ser un juvenil no reproductivo a un adulto reproductivamente competente (Holder & Blaustein, 2014). En la rata, la adolescencia se suele definir desde el día 35 al día 60 post-natal (Brenhouse & Andersen, 2011) o desde el día 21 al día 60 post-natal (Tirelli, Laviola, & Adriani, 2003), según si se considera que inicia con el destete o con la apertura vaginal, respectivamente (Figura 1). Los principales cambios que ocurren en esta etapa consisten, por un lado, en la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal que permite la generación de gametos y, por otro, en la maduración comportamental que da lugar al repertorio de conductas de un individuo adulto reproductivamente maduro. Ambos procesos se encuentran vinculados a través de asociaciones complejas entre el sistema nervioso y las hormonas gonadales (Sisk & Foster, 2004), es decir que, en parte, se deben a cambios organizacionales que ejercen las hormonas en el cerebro dentro de la ventana temporal determinada por la adolescencia (Schulz, Molenda-Figueira, & Sisk, 2009).

Desde el punto de vista comportamental, se ha evidenciado que la adolescencia se caracteriza por una gran exploración social, una menor inhibición conductual y una mayor frecuencia de comportamientos de búsqueda y riesgo con respecto a la etapa adulta (Adriani, Chiarotti, & Laviola, 1998; Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, & Spear, 2010; Holder & Blaustein, 2014; Spear, 2000; Steinberg, 2005). Actualmente, se cree que parte de estas

diferencias se deben, no tanto al efecto directo de las hormonas puberales, sino a los cambios propios del desarrollo que ocurren en el cerebro del adolescente (Spear, 2000). Particularmente, se ha evidenciado que los circuitos neurales que controlan los procesos motivacionales, como el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Balfour, Yu, & Coolen, 2004), no se encuentran completamente desarrollados en la adolescencia, por lo que el procesamiento de la recompensa difiere entre adolescentes y adultos en múltiples regiones cerebrales (Simon & Moghaddam, 2015). Algunas de las diferencias observadas consisten en un aumento en la activación de la corteza orbitofrontal frente a estímulos con valor de incentivo (Sturman & Moghaddam, 2011) y a un pico de concentración de receptores dopaminérgicos en la región prelímbica de la corteza prefrontal medial (Andersen, Thompson, Rutstein, Hostetter, & Teicher, 2000).

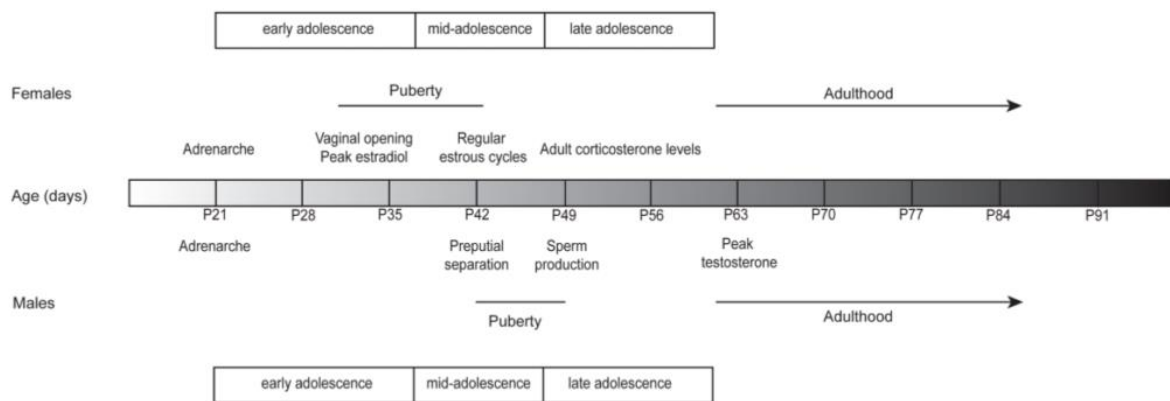


Figura 1. Tiempo y eventos del desarrollo puberal y adolescencia en roedores hembras y machos. Extraído de Holder & Blaustein (2014).

En función del desarrollo neural y los cambios comportamentales observados a lo largo de la adolescencia en la rata, algunos autores sub-dividen este período en 3 etapas (Figura 1): adolescencia temprana (animales pre-púberes del día 21 al día 34 post-natal), adolescencia media (animales peri-adolescentes del día 34 al día 46 post-natal) y adolescencia tardía (animales del día 46 al día 59 post-natal) (Holder & Blaustein, 2014; Tirelli et al., 2003). Cabe destacar que es en la adolescencia media cuando ocurre la apertura vaginal en las hembras y las mismas comienzan a expresar comportamiento sexual.

Si bien no existen estudios específicos abordando la motivación sexual de las hembras durante la adolescencia, Södersten (1975) reportó que la capacidad de un tratamiento

hormonal de inducir la respuesta de lordosis en ratas adolescentes ovariectomizadas antes de la pubertad, mejora conforme aumenta la edad de las hembras. A su vez, se evidenció que la expresión de los comportamientos proceptivos, modulados por el estado motivacional de las hembras, aumenta en el correr de la adolescencia en ratas ovariectomizadas previo a la pubertad expuestas a ciclicidad de esteroides sexuales a través de un tratamiento hormonal (Hliňák, 1986). En este sentido, los autores plantean que la inducción de conductas proceptivas por un tratamiento hormonal es máxima y se estabiliza a los 54 días de vida (Hliňák, 1986), es decir, cerca de la culminación de la etapa de adolescencia tardía y comienzo de la adultez. En nuestro laboratorio observamos que la motivación sexual de hembras ciclantes durante la adolescencia tardía en una prueba de preferencia sexual no difiere de la de hembras adultas (Agrati et al., 2018), si bien no exploramos la preferencia de hembras en adolescencia media. Estos resultados en conjunto sugieren que la expresión del comportamiento sexual no está completamente desarrollada durante la adolescencia media. Sin embargo, desconocemos como es la expresión de la motivación sexual durante este período y como es la dinámica de maduración de la misma hacia la adultez.

HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes mencionados, que indican que el comportamiento sexual de las ratas hembras madura a lo largo de la adolescencia y que, según el modelo desarrollado por McGinnis & Vakulenko (2003), la emisión de USV de 50kHz (particularmente del tipo FM), en respuesta a un contacto breve con un macho señalaría el estado motivacional sexual de las hembras, se propone la siguiente *hipótesis de trabajo*:

Las ratas hembras presentan menor motivación sexual durante la adolescencia media que durante la adolescencia tardía y la adultez. Esto queda reflejado a través una menor emisión de USV de 50kHz, y en particular del tipo FM, por parte de hembras en adolescencia media luego del contacto con un macho.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la emisión de USV en respuesta a un macho, como índice de motivación sexual, de ratas hembras ciclantes durante la adolescencia y la adultez.

Objetivos Específicos

- I. Comparar el número de USV de 50 kHz emitidas por hembras en adolescencia media, en adolescencia tardía y adultas luego de una interacción sin contacto físico con un estímulo sexual, macho, o con un estímulo social, hembra no-receptiva.
- II. Comparar la proporción de USV de 50kHz FM emitidas por las hembras en adolescencia media, en adolescencia tardía y adultas luego de ambos tipos de interacciones.

METODOLOGÍA

Estrategia Experimental

Con el fin de evaluar la maduración de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia en la hembra, comparamos el número y el tipo de USV emitidas en respuesta a un macho por hembras ciclantes sexualmente activas durante la adolescencia media, la adolescencia tardía y la adultez. Debido a que la emisión de USV frente a un con-específico puede variar a lo largo del desarrollo, comparamos la respuesta frente al macho de los tres grupos de hembras con la respuesta a la misma interacción con una hembra no-receptiva sexualmente, con el objetivo de diferenciar la respuesta sexual de la social.

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) alojadas en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 hrs (luces encendidas 03:30 hrs) y temperatura controlada ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Las hembras se dividieron en tres grupos de acuerdo a su edad: de 39-43 días (grupo de adolescencia media), 49-53 días (grupo de adolescencia tardía) y entre 90-115 días (grupo de adultas). Los machos cebos utilizados fueron machos sexualmente activos (que realizaban una eyaculación en menos de 15 minutos) de 3-4 meses y 5-6 meses de edad para las pruebas con hembras adolescentes y adultas, respectivamente, con el fin de reducir las diferencias de tamaño entre las hembras y los cebos. Con el mismo objetivo, las hembras utilizadas como cebo fueron hembras primíparas no-receptivas de distintas edades, procurando disminuir la diferencia de tamaño entre el cebo y la hembra estudiada.

El protocolo de experimentación fue aprobado por el CEUA de la Facultad de Ciencias (número de protocolo: 240011 -000941-17) bajo la normativa de la ley 18.611 acerca del uso de animales para investigación científica.

Seguimiento del ciclo ovárico y obtención de los grupos experimentales

Se utilizaron hembras vírgenes, ciclantes y sexualmente activas (en la fase de proestro tardío), a las cuales se les siguió el ciclo estral de acuerdo a McLean, Valenzuela, Fai, & Bennett (2012) para determinar su posible actividad sexual. Con este objetivo, se registró la edad de apertura vaginal en las hembras adolescentes por observación desde el día 33 de vida de acuerdo a Caligioni (2009). Luego, se realizaron frotis vaginales matutinos con frecuencia diaria y posterior observación al microscopio para determinar la fase del ciclo en la cual se

encontraban (Figura 2) (Caligioni, 2009; Goldman, Murr, & Cooper, 2007; Montes & Luque, 1988). Al grupo de hembras adultas se les siguió el ciclo desde el día 85 con el mismo procedimiento que fue descrito para el grupo adolescente y solo se utilizaron hembras que presentaron dos ciclos estrales regulares.

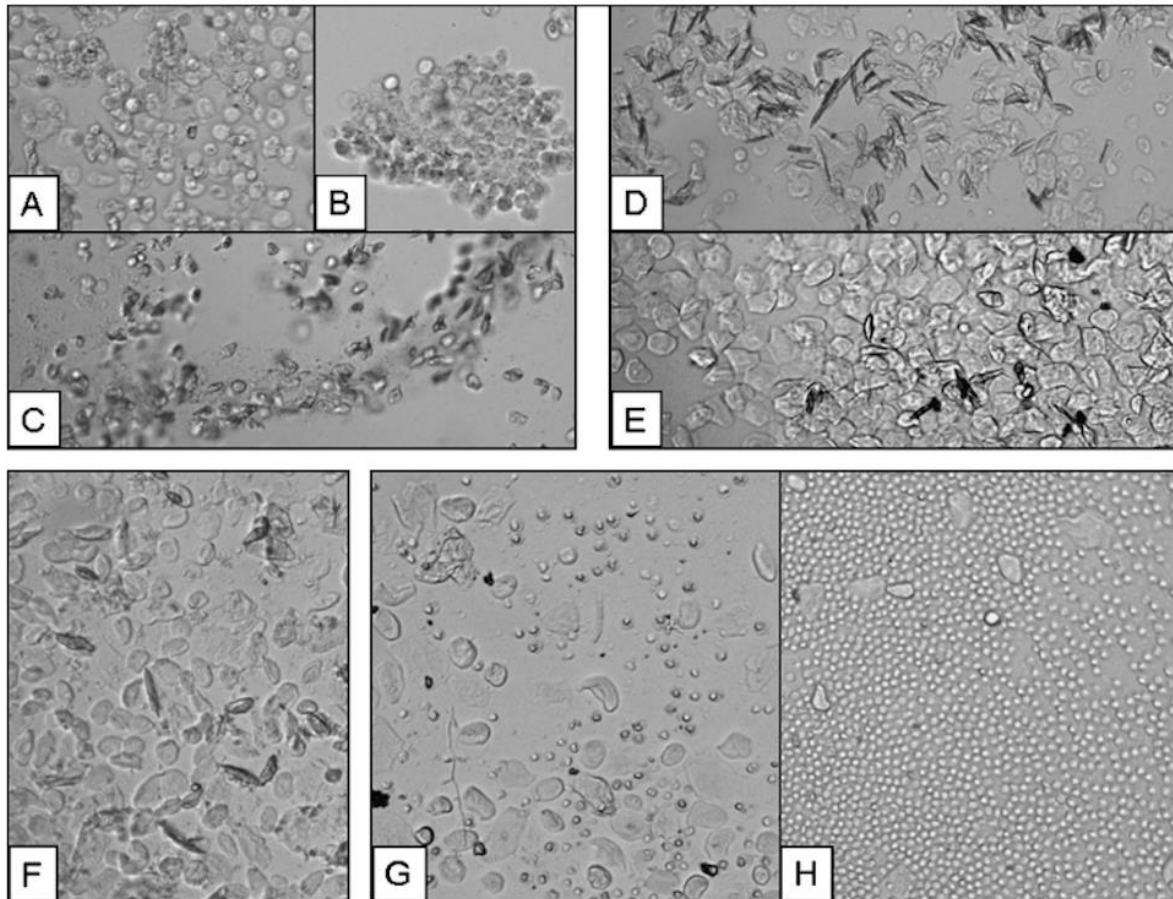


Figura 2. Representación de frotis vaginales en diferentes etapas del ciclo estral de la rata. A-C: Proestro. Se observan agrupaciones de células nucleadas con forma redondeada. D-E: Estro. Se observan células queratinizadas con forma de aguja (D) o redondeadas con bordes irregulares (E). F: Metaestro. Se observa una mezcla de células queratinizadas, células redondeadas y pocas células pequeñas tipo leucocitos. G-H: Diestro. Se observan mayormente células pequeñas tipo leucocitos junto con células nucleadas con forma redondeada. Extraído de Goldman, Murr, & Cooper (2007).

Prueba para el registro de USV en respuesta a un estímulo social

El modelo experimental se basa en el validado por McGinnis & Vakulenko (2003). Consiste en una arena rectangular de acrílico (38 x 38 x 40 cm) dividida al medio por una malla metálica deslizable que separa al sujeto experimental (hembra sexualmente activa) del cebo (macho sexualmente activo o hembra no-receptiva). Esta división permite una interacción auditiva, olfativa, visual y táctil moderada entre ambos individuos (Figura 3).

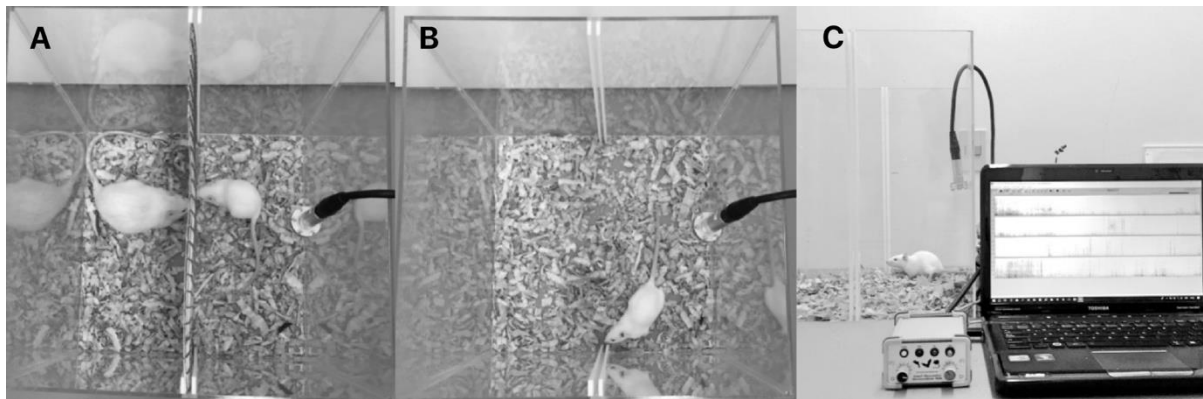


Figura 3. Modelo utilizado para el registro de USV. A) Interacción entre hembra sexualmente activa en adolescencia media (derecha) y macho (izquierda) a través de una malla metálica. B) Registro de USV de hembra posterior a la retirada del estímulo y la malla metálica. C) Equipamiento utilizado para el registro de USV (micrófono, transformador y computadora con software de registro).

Se coloca al cebo (macho sexualmente activo o hembra no-receptiva) en su compartimiento correspondiente sobre viruta limpia durante 2 minutos. A continuación, se coloca al sujeto experimental en el compartimiento adyacente y se los deja interactuar a través de la malla. Luego de 5 minutos de interacción, se retira al cebo junto con la malla fuera del cuarto de experimentación y se registran durante 5 minutos el número y tipo de las USV emitidas por el sujeto experimental (micrófono UltraSoundGate y software de registro Avisoft Bioacoustics) (Figura 3).

Análisis de las USV

El análisis de las USV emitidas se llevó a cabo con el software Avisoft-SASLab Pro (desarrollado por Avisoft Bioacoustics) en base a estudios previos (Wöhr et al., 2008). Las USV fueron caracterizadas utilizando la clasificación de Brudzynski (2013) y se determinó el número de USV de 50 kHz y 22 kHz emitidas por las hembras, así como la proporción de USV de 50 kHz de tipo *flat* y FM (de acuerdo a Figura 4).

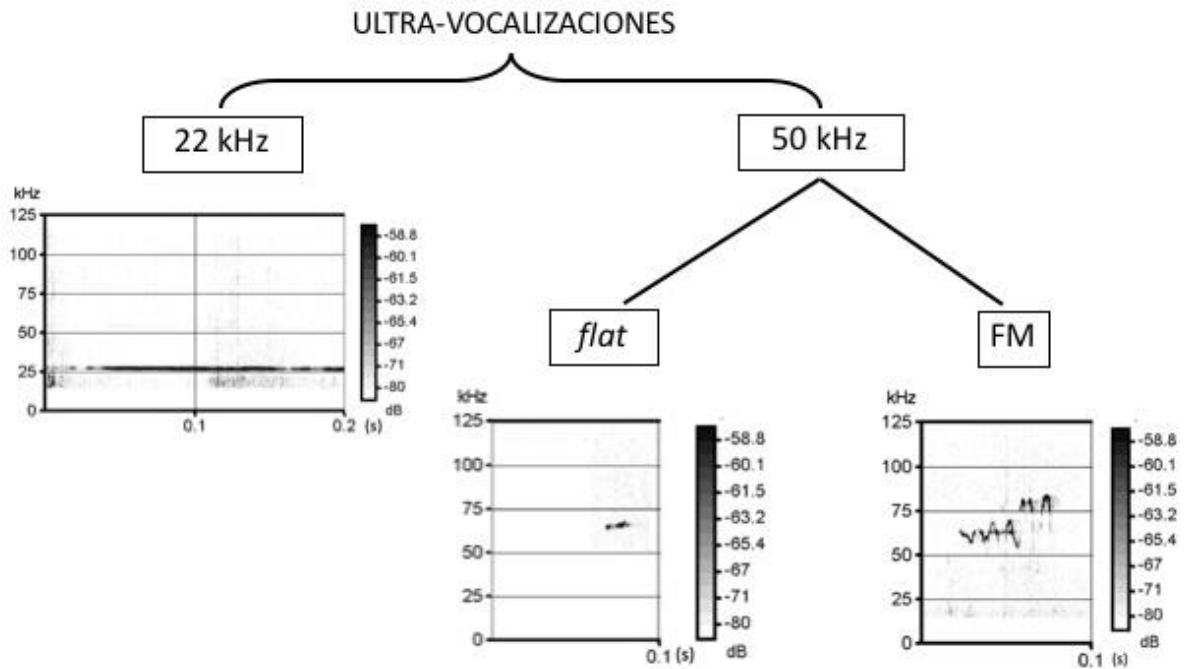


Figura 4. Clasificación de las USV según su frecuencia. Las vocalizaciones clasificadas en el grupo de 22 kHz presentan una frecuencia entre 20 y 30 kHz, generalmente son del tipo monótonas (su frecuencia no se ve alterada en la totalidad de su duración) y de larga duración (entre 300 y 5000 ms). Las vocalizaciones clasificadas en el grupo de 50kHz presentan valores de frecuencia entre 35 y 80 kHz, generalmente son de corta duración (entre 10 y 150 ms) y pueden presentarse de forma monótona (*flat*) o con frecuencia modulada (FM) (clasificación según Brudzynski (2013)).

Protocolo experimental

Se habituó a los sujetos al modelo de experimentación por un tiempo de 10 minutos durante los 5 días consecutivos previos a alcanzar la edad requerida en base a el trabajo de Knutson, Burgdorf, & Panksepp (1998) en donde se demostró que la habituación aumenta la emisión de USV en individuos juveniles. Se siguió el ciclo estral de acuerdo al protocolo previamente mencionado y el día en que las hembras se encontraban en la fase de proestro y dentro del rango etario apropiado para el grupo experimental (adolescencia media, tardía o adultez), fueron probadas brevemente con un macho a las 18 hrs para confirmar su actividad sexual (expresión de conductas proceptivas *-hops&darts-* durante la interacción y lordosis en respuesta a la monta). Esta prueba se llevó a cabo debido a que, a diferencia de lo observado para hembras adultas, en adolescentes un frotis vaginal de proestro no necesariamente se correlaciona con un estado de actividad sexual.

Si las hembras se encontraban sexualmente activas, fueron probadas entre las 18:30 y 20:00 hrs en la prueba de emisión de USV con un macho sexualmente activo o con una hembra adulta desconocida no-receptiva sexualmente. Esta ventana temporal fue seleccionada

para asegurar la máxima actividad sexual de las hembras (Hardy, 1972; Kuehn & Beach, 1963).

De esta forma, se conformaron los siguientes grupos experimentales:

1. Adolescentes medias con hembra no-receptiva (n=8) (41 ± 1 día de edad)
2. Adolescentes medias con macho (n=10) (42 ± 1 días de edad)
3. Adolescentes tardías con hembra no-receptiva (n=8) (51 ± 1 días de edad)
4. Adolescentes tardías con macho (n=9) (51 ± 2 días de edad)
5. Adultas con hembra no-receptiva (n=9) (104 ± 22 días de edad)
6. Adultas con macho (n=12) (113 ± 27 días de edad)

Análisis estadístico

Debido a que la mayoría de los datos comportamentales no se ajustan a una distribución normal, los datos se expresan como medianas (rango semi-intercuartiles, RSIQs) y se analizaron mediante pruebas no-paramétricas (Siegel, 1956). Las comparaciones entre los grupos de diferentes edades se realizaron mediante el análisis de varianzas de Kruskal Wallis seguido de la prueba U de Mann Whitney, mientras que las comparaciones entre respuesta a macho y a hembra no-receptiva dentro de un mismo grupo etario se realizaron mediante la prueba U de Mann Whitney.

RESULTADOS

USV en respuesta a la interacción con un macho o una hembra

Las hembras adultas emitieron un número mayor de vocalizaciones de 50 kHz frente a un macho que frente a una hembra no-receptiva (Figura 5, $U_{(9, 12)}=20$, $p=0,015$, prueba U de Mann Whitney). Tal diferencia también fue hallada durante la adolescencia tardía entre el grupo expuesto a un macho en comparación al grupo expuesto a una hembra no-receptiva (Figura 5, $U_{(8,9)}=11$, $p=0,015$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de USV de 50 kHz emitidas entre el grupo de adolescencia media frente a un macho y el de adolescencia media frente a una hembra no-receptiva (Figura 5, $U_{(8, 10)}=30$, $p=0,408$).

Al analizar el número de USV de 50 kHz emitidas frente a un macho por los distintos grupos de hembras, se observa que el mismo varía siguiendo un patrón similar al de una U invertida de acuerdo a la edad ($H_{(2)}=7,58$, $p=0,023$, análisis de varianzas de Kruskal Wallis).

En este sentido, constatamos un aumento significativo entre los grupos de adolescencia media y adolescencia tardía (Figura 5, $U_{(9, 10)}=13$, $p=0,008$), y un leve descenso no significativo entre la adolescencia tardía y la adultez (Figura 5, $U_{(9, 12)}=32$, $p=0,129$).

Por otro lado, frente a una hembra no-receptiva, se observó un descenso entre la adolescencia y la adultez ($H_{(2)}=6,05$, $p=0,049$); detectándose una reducción significativa en el número de USV de 50 kHz emitidas por el grupo de adultas en comparación tanto al grupo de adolescencia media como al grupo de adolescencia tardía (Figura 5, vs. adolescencia media: $U_{(9, 8)}=14,5$, $p=0,036$ y vs. adolescencia tardía: $U_{(9, 8)}=14,5$, $p=0,036$).

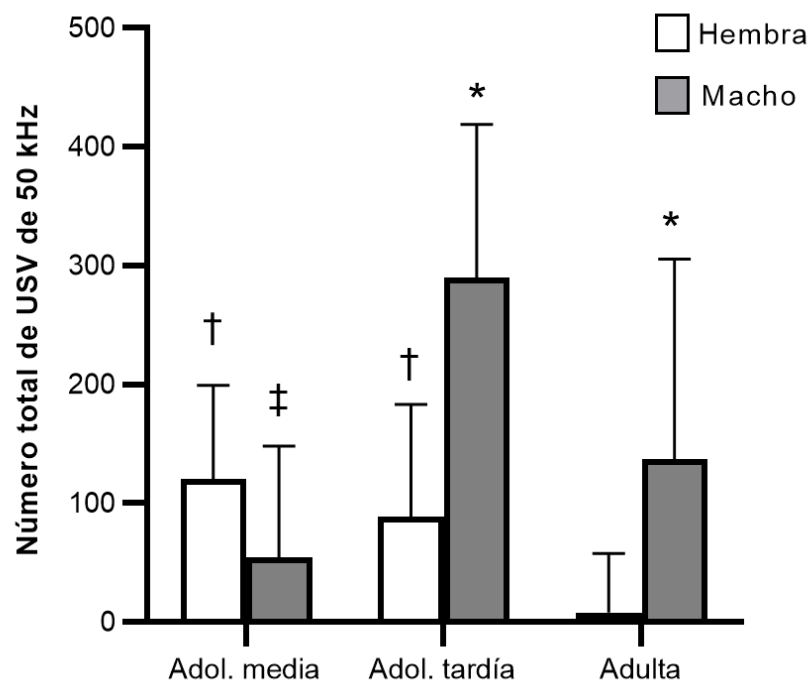


Figura 5. Número total de USV de 50 kHz emitidas frente a una hembra no-receptiva (barras blancas) o frente a un macho (barras grises) por hembras durante la adolescencia media, la adolescencia tardía y la etapa adulta. Datos expresados en medianas (RSIQs), * $p < 0,05$ hembra vs. macho dentro de cada grupo etario; † $p < 0,05$ vs. adultas comparación entre respuesta a hembras y ‡ $p < 0,05$ vs. adol tardía comparación entre respuestas a machos, prueba U de Mann-Whitney.

Muy pocas hembras emitieron un bajo número vocalizaciones de 22 kHz durante las pruebas, tanto frente a macho como frente a hembra no-receptiva en los tres grupos etarios, observándose una mediana (RSIQs) de 0,0 (0,0) en todas las condiciones analizadas.

Número y proporción de USV de 50 kHz de FM

En cuanto a la comparación del número de USV de 50 kHz de tipo FM emitidas entre los grupos, se observa el mismo patrón encontrado para la totalidad de USV de 50 kHz. Así, las hembras adultas y en adolescencia tardía emitieron un número mayor de USV de 50 kHz de tipo FM frente a un macho en comparación con una hembra (Tabla 1, adultas: $U_{(9, 12)}=22,5$, $p=0,023$ y adolescencia tardía $U_{(9, 8)}=9,5$, $p=0,008$), a diferencia de las hembras en adolescencia media (Tabla 1, $U_{(8, 10)}=30$, $p=0,408$).

Al considerar el número de USV de 50 kHz del tipo FM emitidas frente a un macho, se observa un patrón en U invertida más pronunciado al obtenido con el número total de vocalizaciones (Tabla 1, $H_{(2)}=9,57$, $p=0,008$), caracterizado por un aumento de las USV tipo FM en el grupo de adolescencia tardía con respecto al grupo de adolescencia media ($U_{(9, 10)}=10$, $p=0,003$) y un descenso al comparar el grupo de adolescencia tardía con el grupo de adultas (Tabla 1, $U_{(9, 12)}=26$, $p=0,049$). De forma interesante, la emisión de vocalizaciones tipo *flat* frente a un macho no varió entre los grupos de hembras (Tabla 1, $H_{(2)}=3,17$, $p=0,204$).

Por otra parte, frente a una hembra no-receptiva, las USV de 50kHz del tipo FM mostraron una tendencia a la disminución entre la adolescencia y la adultez ($H_{(2)}=5,94$, $p=0,051$; Tabla 1; FM: adultas vs. adolescencia media: $U_{(8, 9)}=15$, $p=0,046$, y adultas vs. adolescencia tardía: $U_{(8, 9)}=14$, $p=0,04$). Sin embargo, bajo esta misma condición, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos etarios en el número de USV del tipo *flat* ($H_{(2)}=5,57$, $p=0,062$).

Tabla 1. Número de vocalizaciones de 50 kHz del tipo FM y *flat*

	FM		Flat	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho
Adol. media	66,5 (28,9)‡	33,0 (39,5) †	39,0 (16,6)	25,0 (24,6)
Adol. tardía	50,5 (35,8) ‡	206,0 (60,0) *	35,0 (13,9)	109,0 (48,0)
Adultas	6,0 (10,0)	103,0 (62,1) * †	2,0 (5,0)	27,5 (48,8)*

Datos expresados en medianas (RSIQs), * $p < 0,05$ macho vs. hembra, † $p < 0,05$ vs. Adol. Tardía comparación entre respuesta FM a macho, ‡ $p < 0,05$ vs. adultas comparación entre respuesta FM frente a hembra, prueba U de Mann-Whitney.

En cuanto a la proporción de USV del tipo FM, cabe destacar que en todos los grupos se observó una mayor emisión de USV de 50 kHz del tipo FM que del tipo flat, lo cual se refleja en un valor mayor a 0,5 de la proporción de USV de 50kHz FM con respecto a la totalidad de USV de 50kHz para todos los grupos (Figura 6). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de USV de 50 kHz de tipo FM frente a un macho y frente a una hembra no-receptiva dentro de ninguno de los tres grupos etarios (Figura 6, adolescencia media: $U_{(8,10)}=26$, $p=0,574$; adolescencia tardía $U_{(8,9)}=21$, $p=0,167$ y adultas $U_{(9,12)}=48$, $p=1,000$). Asimismo, la proporción de USV de 50 kHz del tipo FM no difirió entre los grupos frente al estímulo de la hembra ($H_{(2)}=0,23$, $p=0,892$) ni frente al estímulo del macho ($H_{(2)}=3,86$, $p=0,145$).

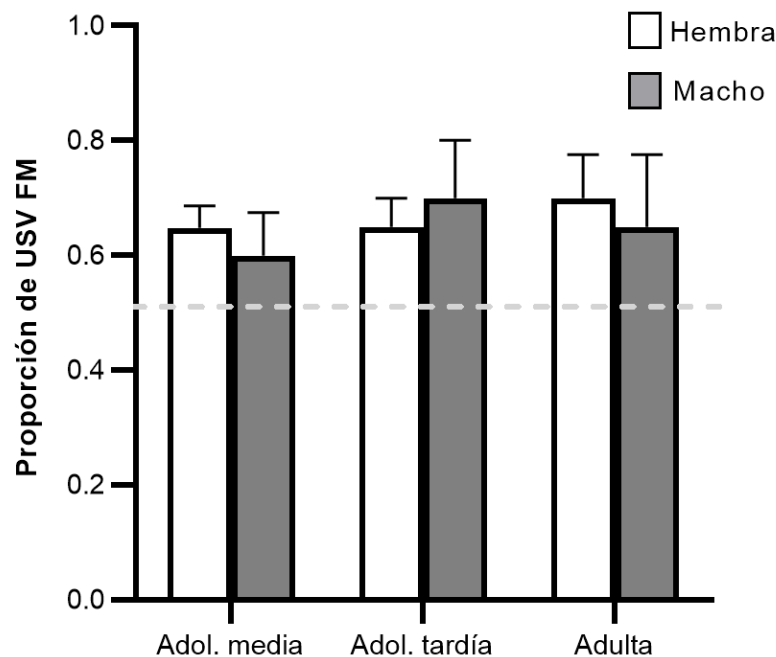


Figura 6. Proporción de USV del tipo FM (en relación a la totalidad de USV de 50 kHz) emitidas por hembras en adolescencia media, tardía y adultez frente a una hembra no-receptiva (barras blancas) y a un macho (barras grises). Datos expresados en medianas (RSIQs); $P=NS$, análisis de varianzas de Kruskal Wallis. La línea punteada horizontal indica un índice igual a 0,5.

DISCUSIÓN

Validación del modelo

Basados en el análisis de las USV emitidas por hembras sexualmente activas frente a un macho, McGinnis & Vakulenko (2003) proponen al modelo utilizado en el presente estudio como una prueba para la evaluación de la motivación sexual de las ratas hembras. La mayor emisión de USV frente a un macho en comparación a una hembra por parte de ratas ciclistas adultas sexualmente activas hallada en este trabajo concuerda con lo observado por los autores, reafirmando la validez del modelo.

A pesar de que el número de USV del tipo FM emitidas por hembras adultas fue mayor frente a un macho en comparación con una hembra, no se encontraron diferencias en la proporción de tales USV en relación a las del tipo *flat* frente al estímulo social y sexual. Este hecho se opone a hallazgos previos que evidenciaron que la proporción de USV del tipo FM emitidas por hembras fue mayor frente a un macho que frente a una hembra (Börner et al., 2016). Tal discrepancia podría deberse tanto a diferencias en la cepa de las ratas evaluadas, así como a diferencias en el procedimiento llevado a cabo. De todos modos, es importante destacar que en todos los casos, las USV del tipo FM fueron emitidas con mayor frecuencia en comparación a las *flat*, y su emisión fue mayor frente a un macho que a una hembra, sugiriendo un papel más relevante de las USV del tipo FM en este tipo de comunicación social.

Según Burgdorf et al. (2008), las USV del tipo FM se relacionan con un comportamiento motivado positivo durante la actividad sexual, mientras que las USV de la subcategoría *flat* son emitidas con mayor frecuencia que las FM durante comportamientos agresivos. Además, Wöhr, Houx, Schwarting, & Spruijt (2008) encontraron que las USV del tipo *flat* son emitidas frecuentemente durante interacciones sociales no-recompensantes. Si bien se desconoce el rol de los diferentes tipos de USV en la comunicación entre los individuos, las USV del tipo *flat* podrían servir como llamadas de coordinación social, sin tener necesariamente un valor hedónico (Brudzynski, 2013). El hecho de que, a pesar de que las USV del tipo FM fueron emitidas por las adultas en mayor número que las del tipo *flat*, la diferencia entre ellas no fuera significativa, podría estar evidenciando un papel más importante de las USV de tipo *flat* en la interacción sexual de lo que se ha propuesto hasta el momento. Queda entonces en evidencia la necesidad de profundizar el estudio de la emisión de USV, tanto del tipo FM como del tipo *flat* de manera de determinar con mayor precisión qué rol cumplen en la comunicación durante la interacción sexual.

Emisión de USV de 50 kHz en respuesta a un macho desde la adolescencia hasta la adultez

En contraposición a lo hallado para el grupo de adultas, la ausencia de diferencias en la emisión de USV frente al estímulo sexual y al social en las hembras en adolescencia media, sugiere que en esta etapa del desarrollo la motivación sexual propia de la etapa adulta no se encuentra completamente desarrollada. Por otro lado, las hembras en adolescencia tardía mostraron emisión de USV similar a la del grupo de adultas, con un patrón de respuesta a macho y a hembra diferencial al hallado para la etapa anterior de adolescencia media.

Este incremento en la emisión de USV de 50 kHz en respuesta a un macho entre la adolescencia media y tardía concuerda con estudios anteriores que hallaron que la expresión de componentes del comportamiento sexual asociados a aspectos motivacionales del mismo, como los *hops & darts* y las posturas de presentación de las ratas hembras, en respuesta a un tratamiento hormonal, comienza a desarrollarse progresivamente desde el día de apertura vaginal, estabilizándose en niveles comparables a los exhibidos por hembras adultas al día 54 post natal (etapa de adolescencia tardía) (Hliňák,1986). Estos resultados en conjunto sugieren que el desarrollo de la motivación sexual posee un patrón ascendente alcanzando su máximo, y estabilizándose, durante la adolescencia tardía. Además, pruebas de preferencia llevadas a cabo en nuestro laboratorio han evidenciaron que la preferencia hacia un macho frente a una hembra receptiva no difiere entre las etapas de adolescencia tardía y adultez (Agrati et al., 2018). Sería interesante ampliar tal estudio de manera de determinar la preferencia de hembras en adolescencia media frente a un macho y una hembra receptiva.

Por otra parte, si bien los grupos de adolescencia tardía y adultez emitieron más USV frente al macho que ante la hembra no-receptiva, las hembras en adolescencia tardía emitieron el mayor número de USV de 50 kHz del tipo FM, reflejado en un patrón de U-invertida en la emisión de este tipo de USV a lo largo de los tres grupos etarios. La disminución en la emisión de USV desde la adolescencia tardía a la adultez en respuesta a un macho podría sugerir una motivación sexual aumentada propia de la etapa final de la adolescencia. Sin embargo, el análisis de la emisión de USV frente al estímulo social abre otra posibilidad, ya que ambos grupos de hembras adolescentes exhibieron un número de USV de 50kHz en general, y FM en particular, similar, y mayor al emitido por el grupo de hembras adultas. Este resultado sugiere que posiblemente exista una diferencia en el patrón de comunicación social entre las hembras adolescentes y adultas. De esta forma, las diferencias en la emisión de USV frente a un macho entre los grupos de adolescencia tardía y adultez pueden no necesariamente deberse a fluctuaciones en el valor de incentivo otorgado al estímulo sexual, lo cual se ajusta

a los hallazgos previos que evidencian una preferencia similar entre hembras sexualmente activas de ambos grupos etarios por un macho frente a una hembra receptiva (Agrati et al., 2018). Se propone continuar con el estudio de la motivación sexual de ratas en adolescencia tardía y adultez de manera de dilucidar las causas que subyacen las diferencias observadas.

Respecto al sustrato neural de las diferencias halladas en la respuesta al macho de acuerdo a la edad de las hembras, éstas podrían asociarse tanto al estado de maduración de los circuitos neurales que modulan la motivación sexual, así como a una sensibilidad diferencial de los mismos a la acción de los esteroides sexuales. Trabajando con ratas hembras ovariectomizadas y tratadas con hormonas esteroideas de forma exógena, Södersten (1975) propuso que existe un aumento en la sensibilidad hacia las hormonas gonadales producto de la reiterada exposición cíclica a las mismas durante la adolescencia. En base a esta teoría, las ratas adultas y en adolescencia tardía presentarían una mayor sensibilidad a los picos de estrógenos y progestágenos producidos en la fase de proestro del ciclo estral, en comparación a las ratas en adolescencia media.

El estrógeno es esencial en la inducción de la conducta sexual de la hembra, actuando principalmente a través de la unión a receptores nucleares, en regiones cerebrales como el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN) y el POA, ambas fundamentales para el despliegue de la conducta sexual en ratas hembras (Snoeren et al., 2015). Snoeren et al. (2015) dieron cuenta que una disminución en la concentración del receptor de estrógeno (ER) α en el VMN y POA producía una disminución de la conducta sexual de las hembras, evidenciada por un descenso en las conductas proceptivas y la frecuencia de lordosis. Considerando la teoría de Södersten (1975), que postula un aumento de sensibilidad a esteroides a lo largo de la adolescencia, es posible que la exposición repetida a estrógenos aumente la densidad de receptores estrogénicos con el desarrollo en áreas cerebrales vinculadas con el comportamiento sexual. Apoyando esta hipótesis, Ceccarelli, Della Seta, Fiorenzani, Farabollini, & Aloisi (2007) hallaron que, en hembras vírgenes, existe un aumento significativo en el número de ER α en el VMN entre el día 37 (adolescencia media) y el día 90 de vida (adultez). Además, los autores dieron cuenta que la exposición a estrógenos en la pubertad temprana produce un aumento en los ER α en áreas cerebrales clave para el comportamiento reproductivo tanto a corto como a largo plazo.

Extrapolando tales antecedentes a nuestro estudio, se podría hipotetizar que las hembras en adolescencia tardía y adultas poseen una motivación sexual aumentada con respecto a las hembras en adolescencia media debido a que la mayor exposición a ciclos

estrales (propia de la edad) causó un aumento en la concentración de ER α en regiones hipotalámicas como VMN y POA, aumentando así su sensibilidad al estrógeno.

Por otra parte, es posible, a su vez, que la maduración del comportamiento sexual no se asocie a un aumento de la sensibilidad hormonal *per se*, sino a un aumento de la concentración de esteroides sexuales (gonadales y/o neuroesteroides) en el cerebro producto de la reiterada exposición a hormonas gonadales como consecuencia de varios ciclos estrales.

Resulta relevante señalar que la motivación sexual no solo es promovida por el efecto de los estrógenos y progestágenos a nivel hipotalámico, sino que tales hormonas, a su vez, ejercen efectos sobre el sistema dopaminérgico mesolímbico de la hembra, a pesar de que tal relación no se encuentra aun completamente dilucidada (Yoest, Cummings, & Becker, 2014). Dicho sistema consiste principalmente en neuronas generadoras de dopamina (DA), ubicadas en el VTA que proyectan, atravesando el hipotálamo lateral, hacia el NAcc y la corteza prefrontal (Berridge & Robinson, 1998; Knutson et al., 2002). El estrógeno en ratas hembras modula la actividad dopaminérgica del sistema mesocorticolímbico a través de cambios genómicos y no-genómicos (Thompson & Moss, 1994), encontrándose éstas más sensibles a agonistas dopaminérgicos durante la fase de proestro/estro de su ciclo estral (Pfaus et al., 1995), momento en el cual se encuentran sexualmente activas.

Durante el desarrollo desde la infancia a la adultez, el circuito mesocorticolímbico sufre cambios. Por ejemplo, se ha evidenciado que la concentración de receptores dopaminérgicos D1 tanto en el estriado dorsal como en el NAcc es mayor durante la adolescencia (con pico en la adolescencia media) en comparación tanto a etapas anteriores o posteriores (Brenhouse, Sonntag, & Andersen, 2008; Teicher, Andersen, & Hostetter, 1995). En línea con tales resultados, se ha propuesto que durante la adolescencia media existiría una mayor sensibilidad a estímulos naturalmente recompensantes o drogas (Doremus-Fitzwater et al., 2010). Nuestros resultados, los cuales sugieren que las hembras en adolescencia media tienen menor motivación sexual en comparación a etapas posteriores, se contraponen a esta idea en lo que concierne al comportamiento sexual. Este hecho da lugar a la posibilidad de que las variaciones en el valor de incentivo otorgado al macho que se observan a lo largo del desarrollo se relacionen no tanto a cambios madurativos del circuito neural encargado de la recompensa, sino a diferencias en los efectos de los esteroides gonadales tanto a nivel hipotalámico como mesolímbico.

Se suele considerar a la adolescencia como un período uniforme, diferenciado de la infancia y la adultez, pero relativamente homogéneo en el período que abarca. Los hallazgos del presente estudio apoyan la idea de que la adolescencia, a pesar de su corta duración, debe

ser considerada como un período heterogéneo. El desarrollo, en todos sus aspectos, tiene un carácter gradual, por lo que es de esperarse que, dentro del período de la adolescencia, se encuentren patrones comportamentales diferenciales. El patrón dispar de emisión de USV hallado para los tres grupos etarios en ambas condiciones sugiere que las ratas en adolescencia media presentan una motivación sexual claramente distinta a aquellas en adolescencia tardía, mientras que estas últimas difieren también de ratas adultas en lo que respecta a su respuesta social hacia una hembra. La adolescencia se presenta como un período de grandes cambios que ocurren en una ventana temporal no tan extensa, por lo que su estudio fragmentado no solo es importante, sino esencial, para la comprensión de la dinámica del desarrollo.

Sin duda resulta necesario ahondar en el estudio de la dinámica de la motivación sexual en el desarrollo tanto desde un punto de vista comportamental, de manera de obtener resultados que describan los cambios que se observan en las diferentes etapas del ciclo de vida, como desde un punto de vista neuronal, que permita comprender los mecanismos que subyacen a tales cambios.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados hallados y procurando expandir el conocimiento acerca del desarrollo de la motivación sexual en ratas hembras, pretendemos en un futuro profundizar este trabajo a través de:

- el empleo de un modelo de preferencia sexual con estímulos incondicionados: macho y hembra no receptiva, para ratificar la existencia de diferencias en la motivación sexual de hembras en la adolescencia media, tardía y adultez;
- la determinación del posible cambio en la expresión de receptores ER α entre la adolescencia media, adolescencia tardía y adultez en regiones cerebrales relacionadas con la motivación y el comportamiento sexual de hembras como POA, VMN y sistema dopaminérgico mesolímbico. El mismo podría llevarse a cabo a través de una cuantificación del ARNm que codifica para el receptor en diferentes regiones de los cerebros obtenidos de ratas de los 3 grupos etarios en fase de proestro tardío.
- explorar el posible cambio en la concentración de esteroides sexuales en el cerebro de hembras pertenecientes a los 3 grupos etarios en fase de proestro tardío.

El presente trabajo fue realizado en el marco del proyecto FCE_1_2017_1_136603: “Aspectos motivacionales del comportamiento sexual de ratas hembras durante la adolescencia y sus bases neurales” a cargo de Daniella Agrati.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriani, W., Chiarotti, F., & Laviola, G. (1998). Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behavioral Neuroscience*, *112*(5), 1152–1166. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.112.5.1152>
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., & Ferreira, A. (2008). The Reproductive Stage and Experience of Sexually Receptive Mothers Alter Their Preference for Pups or Males. *Behavioral Neuroscience*, *122*(5), 998–1004. <https://doi.org/10.1037/a0012585>
- Agrati, D., Machado, L., Delgado, H., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., & Ferreira, A. (2018). Sexual behaviour of the female rat during late adolescence: effect of chronic cocaine treatment. *Behavioural Pharmacology*, *1*.
<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000451>
- Andersen, S. L., Thompson, A. T., Rutstein, M., Hostetter, J. C., & Teicher, M. H. (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse*, *37*(2), 167–169. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200008\)37:2<167::AID-SYN11>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200008)37:2<167::AID-SYN11>3.0.CO;2-B)
- Balfour, M. E., Yu, L., & Coolen, L. M. (2004). Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology*, *29*(4), 718–730. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300350>
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., & McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Integrative and Comparative Biology*, *19*(2), 469–480.
<https://doi.org/10.1093/icb/19.2.469>
- Beach, F. A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*, *7*(1), 105–138. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(76\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(76)90008-8)
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *El Sevier*, *92*(1).
<https://doi.org/10.1063/1.2814044>
- Börner, A., Hjemdahl, R., Götz, T., & Brown, G. R. (2016). Ultrasonic vocalizations of female norway rats (*Rattus norvegicus*) in response to social partners. *Journal of Comparative Psychology*, *130*(1), 76–80. <https://doi.org/10.1037/com0000017>
- Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(8), 1687–1703.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.013>

- Brenhouse, H. C., Sonntag, K. C., & Andersen, S. L. (2008). Transient D1 Dopamine Receptor Expression on Prefrontal Cortex Projection Neurons: Relationship to Enhanced Motivational Salience of Drug Cues in Adolescence. *Journal of Neuroscience*, 28(10), 2375–2382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5064-07.2008>
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(3), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic Vocalizations of Rats (*Rattus norvegicus*) During Mating, Play, and Aggression: Behavioral Concomitants, Relationship to Reward, and Self-Administration of Playback. *Journal of Comparative Psychology*, 122(4), 357–367. <https://doi.org/10.1037/a0012889>
- Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, (SUPPL. 48), 1–8. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
- Ceccarelli, I., Della Seta, D., Fiorenzani, P., Farabollini, F., & Aloisi, A. M. (2007). Estrogenic chemicals at puberty change ER α in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 29(1), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.10.011>
- Clark, A. S., Kelton, M. C., Guarraci, F. A., & Clyons, E. Q. (2004). Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Hormones and Behavior*, 45(5), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.12.010>
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*, 72(1), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.008>
- Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Hormones and Behavior*, 23(4), 473–502. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(89)90037-8)
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Developmental and Reproductive Toxicology*, 97, 80–84. <https://doi.org/10.1002/bdrb>
- Hardy, D. F. (1972). Sexual behaviour in continuously cycling rats. *Behaviour*, 41, 288–297.
- Hashizume, K., & Ohashi, K. (1984). Timing of sexual receptivity and the release of gonadotrophins during puberty in female rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72(1), 87–91. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720087>

- Hlišák, Z. (1986). Estradiol plus progesterone treatment and precopulatory behavior in prepubertally ovariectomized female rats: Dose-response relationships. *Hormones and Behavior*, 20(3), 263–269. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(86\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(86)90036-X)
- Holder, M. K., & Blaustein, J. (2014). Puberty and Adolescence as a Time of Vulnerability to Stressors that Alter Neurobehavioral Processes. *Front Neuroendocrinol.*, 35(1), 89–110. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0452-9>.Engineering
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology*, 112(1), 65–73. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.1.65>
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological Bulletin*, 128(6), 961–977. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.128.6.961>
- Kuehn, R. E., & Beach, F. A. (1963). Quantitative Measurement of Sexual Receptivity in Female Rats Stable. *Behaviour*, 21(3), 282–299. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/4533057>
- Matochik, J. A., Barfield, R. J., & Nyby, J. (1992). Regulation of sociosexual communication in female Long-Evans rats by ovarian hormones. *Hormones and Behavior*, 26(4), 545–555. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90021-M](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90021-M)
- Matochik, J. A., White, N. R., & Barfield, R. J. (1992). Variations in scent marking and ultrasonic vocalizations by Long-Evans rats across the estrous cycle. *Physiology and Behavior*, 51(4), 783–786. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90116-J](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90116-J)
- McGinnis, M. Y., & Vakulenko, M. (2003). Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 80(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00227-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00227-0)
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. L. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67), 4–9. <https://doi.org/10.3791/4389>
- Montes, G. S., & Luque, E. H. (1988). Effects of Ovarian Steroids on Vaginal Smears in the Rat. *Acta Anar*, 133, 192–199.
- Pfaus, J. G., Damsma, G., Wenkstern, D., & Fibiger, H. C. (1995). Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Research*, 693(1–2), 21–30. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00679-K](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00679-K)
- Pfaus, J. G., Smith, W. J., Byrne, N., & Stephens, G. (2000). Appetitive and Consummatory

- Sexual Behaviors of Female Rats in Bilevel Chambers. *Hormones and Behavior*, 37(1), 96–107. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1562>
- Riede, T. (2011). Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *Journal of Neurophysiology*, 106(5), 2580–2592. <https://doi.org/10.1152/jn.00478.2011>
- Sadananda, M., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience Letters*, 435(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.02.002>
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and mating behavior in rodents with some observations on other behavioral situations. *Journal of Zoology*, 168(2), 149–164.
- Schulz, K. M., Molenda-Figueira, H. A., & Sisk, C. L. (2009). Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Hormones and Behavior*, 55(5), 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.010>
- Seffer, D., Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.023>
- Siegel, S. (1956). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. *McGraw-Hill Series in Psychology*, 323.
- Simon, N. W., & Moghaddam, B. (2015). Neural processing of reward in adolescent rodents. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 11, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2014.11.001>
- Sisk, C. L., & Foster, D. L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1040–1047. <https://doi.org/10.1038/nn1326>
- Snoeren, E. M. S., Antonio-Cabrera, E., Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Pfaff, D. W., & Ågmo, A. (2015). Role of Oestrogen α Receptors in Sociosexual Behaviour in Female Rats Housed in a Seminatural Environment. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(11), 803–818. <https://doi.org/10.1111/jne.12321>
- Södersten, P. (1975). Receptive behavior in developing female rats. *Hormones and Behavior*, 6(4), 307–317. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(75\)90001-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(75)90001-X)
- Spear, L. P. (2000). *The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 24). [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Steinberg, L. (2005). Cognitive and affective development in adolescence. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(2), 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2004.12.005>

- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2011). Reduced Neuronal Inhibition and Coordination of Adolescent Prefrontal Cortex during Motivated Behavior. *Journal of Neuroscience*, 31(4), 1471–1478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4210-10.2011>
- Teicher, M. H., Andersen, S. L., & Hostetter, J. C. (1995). Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Developmental Brain Research*, 89(2), 167–172. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(95\)00109-Q](https://doi.org/10.1016/0165-3806(95)00109-Q)
- Terkel, J. (1986). Neuroendocrinology of Coitally and Noncoitally Induced Pseudopregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 474(1), 76–94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb28000.x>
- Thompson, T. L., & Moss, R. L. (1994). Estrogen Regulation of Dopamine Release in the Nucleus Accumbens: Genomic-and Nongenomic-Mediated Effects. *Journal of Neurochemistry*, 62(5), 1750–1756. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62051750.x>
- Tirelli, E., Laviola, G., & Adriani, W. (2003). Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 163–178. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00018-6)
- Ventura-Aquino, E., & Paredes, R. G. (2017). Animal Models in Sexual Medicine: The Need and Importance of Studying Sexual Motivation. *Sexual Medicine Reviews*, 5(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2016.07.003>
- Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., & Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology and Behavior*, 93(4–5), 766–776. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.031>
- Yoest, K. E., Cummings, J. A., & Becker, J. B. (2014). Estradiol, dopamine and motivation. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 14(2), 83–89. <https://doi.org/10.14440/jbm.2015.54.A>