

# BÚSQUEDA Y COMUNICACIÓN DE RATAS CICLANTES EN UN CONTEXTO SEXUAL Y SOCIAL DE ACUERDO A LA FASE DEL CICLO ESTRAL

Paula Hernández  
Orientadora: Daniella Agrati  
Co-orientador: Jose Pedro Prieto

# ÍNDICE

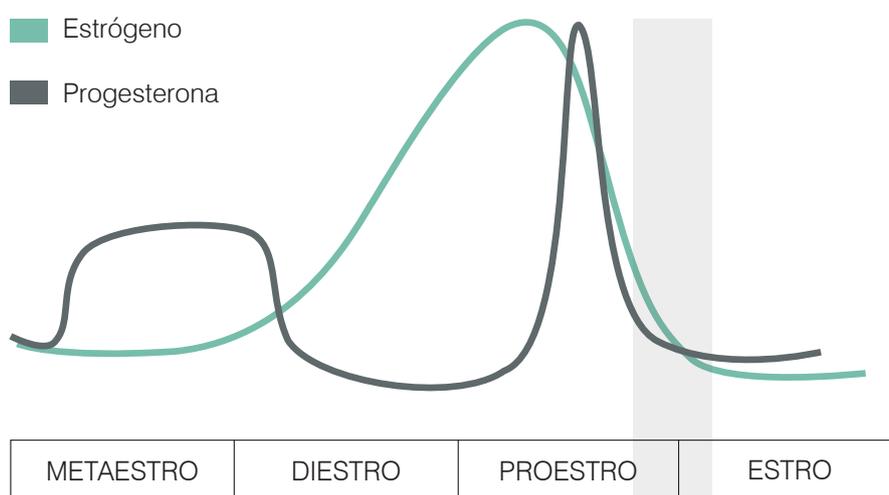
RESUMEN.....	3
ANTECEDENTES.....	4
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	9
MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29

## RESUMEN

Los cambios en los niveles plasmáticos de los esteroides ováricos, estrógenos y progestágenos, a lo largo del ciclo estral de la rata modulan diversos aspectos del funcionamiento de su cerebro influyendo en su comportamiento social y sexual. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se evaluó la comunicación social entre coespecíficos a través de la emisión de ultra-vocalizaciones (USVs), y se evidenció que las hembras en proestro tardío (sexualmente activas) emitían un mayor número de USVs luego de interactuar con un macho —estímulo sexual— comparado con una hembra —estímulo social—, mientras que durante el metaestro (fase sin actividad sexual) este patrón se invertía, emitiendo más USVs luego de interactuar con una hembra. En base a este antecedente hipotetizamos que el valor de incentivo de un estímulo social relativo a un estímulo sexual para ratas hembras ciclantes, así como la interacción con éstos, varía según la etapa del ciclo estral. Para indagar en el valor de incentivo de estos dos estímulos presentados en simultáneo, comparamos el comportamiento de ratas hembras ciclantes en una prueba de preferencia macho vs hembra, entre las etapas de proestro y metaestro del ciclo estral. Además, estudiamos la comunicación a través de USVs entre coespecíficos durante la interacción de hembras ciclantes en proestro y metaestro con un estímulo sexual o uno social. Los resultados de la prueba de preferencia ratifican el alto valor de incentivo del estímulo sexual para las hembras en proestro, mientras que las hembras en metaestro no presentaron preferencia entre ambos estímulos, sugiriendo que el valor de incentivo relativo de ambos no difiere en esta fase. De forma interesante, en la comunicación a través de USVs entre diferentes tipos de díadas, encontramos que el patrón de emisión de los subtipos de USVs de 50 kHz analizados fue similar entre éstas. Las interacciones entre hembras sexualmente activas (en proestro) con machos fueron las más distintivas, diferenciándose de las interacciones con hembras tanto en el número total de USVs emitidas como en sus características sonográficas. A su vez, en las interacciones sexuales detectamos USVs de 30 kHz, un tipo de vocalización escasamente estudiado hasta el momento. Este estudio aporta conocimiento nuevo y relevante sobre la comunicación entre coespecíficos en la rata hembra de acuerdo a su estado reproductivo.

## Cambios comportamentales durante el ciclo estral de la rata

La rata es un mamífero poliéstrico no estacional que ovula espontáneamente. Su ciclo ovárico completo tiene una duración de 4 o 5 días y se divide en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro, las que se asocian a perfiles de hormonas ováricas diferentes (Fig. 1). El período preovulatorio está caracterizado por el crecimiento de los folículos ováricos y por la secreción incrementada de estrógenos, principalmente estradiol  $17\beta$ . Así, en el proestro temprano ocurre el pico pre-ovulatorio de estrógeno y en el tardío el de progesterona; ambos producidos por el folículo. El principal progestágeno secretado por las ratas adultas es la  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona. En el estro temprano ocurre la ovulación y luego se da la formación y activación del cuerpo lúteo (metaestro tardío-diestro temprano). Este es un proceso atípico en ratas, por su corta duración y por la baja secreción de  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona (Levine, 2015).



**Figura 1.** Esquematación de niveles plasmáticos de estrógenos y progestágenos durante el ciclo estral de la rata. En gris se señala el período de actividad sexual.

Los cambios en los niveles plasmáticos de estos esteroides ováricos modulan diversos aspectos del funcionamiento del cerebro de la rata, debido a que sus receptores están distribuidos en áreas implicadas en la función reproductiva, pero también en áreas asociadas con procesos cognitivos y emocionales (Barth et al., 2015). Uno de los principales efectos de los esteroides sexuales en el comportamiento de la rata adulta es la expresión del comportamiento sexual. Las hembras ciclantes se encuentran sexualmente activas durante las fases de proestro tardío y estro temprano del ciclo estral, luego de la ocurrencia de los picos pre-ovulatorios de estrógenos y progestágenos (Beach, 1976; Fig. 1). Además de la regulación del comportamiento sexual, se ha evidenciado que los cambios hormonales también regulan la ansiedad experimental, en particular existe una disminución en la ansiedad asociada a altos niveles de progesterona en diferentes modelos conductuales (Picazo & Fernández-Guasti, 1993; Marcondes et al., 2001; Zulgera et al., 2005). También

se ha evidenciado que la inducción farmacológica del comportamiento obsesivo-compulsivo varía a lo largo del ciclo reproductivo de las hembras, y que esta variación se ha relacionado con las fluctuaciones en los niveles plasmáticos de las hormonas esteroideas (Agrati et al., 2005; Fernández-Guasti et al., 2006). Varios estudios muestran la influencia de los esteroides sexuales en el aprendizaje y la memoria. Walf y colaboradores (2006) observaron que la memoria de reconocimiento de las hembras varía de acuerdo a la etapa del ciclo estral, y proponen que los estrógenos y progestágenos actúan mejorando la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos. Asimismo, se ha evidenciado en otros modelos que altos niveles de estrógenos mejoran la memoria y el aprendizaje (Daniel et al. 1997; El-Bakri et al., 2004; Vedder et al., 2013).

Si bien existen numerosos trabajos que muestran cómo los niveles plasmáticos de esteroides sexuales influyen en procesos emocionales y cognitivos, poco se sabe sobre su influencia en las interacciones sociales, exceptuando su fuerte influencia en el valor sexual del macho. Así, se ha mostrado en numerosos modelos, que durante las etapas de proestro tardío y estro temprano del ciclo estral, el macho —estímulo sexual— tiene un alto valor atractivo para la hembra (Beach, 1976; Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Este resultado no solo se evidencia en ratas ciclantes en las etapas de proestro tardío y estro temprano del ciclo estral, sino que también se observa en ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y progesterona, indicando la influencia de estas hormonas en el aumento del valor atractivo del macho. Pero ¿qué sucede cuando se evalúa la interacción entre coespecíficos sin valor sexual en las otras etapas del ciclo estral? Nofrey y colaboradores (2008) realizaron un estudio en ratas hembra donde registraron el tiempo en que la hembra experimental tardaba en alcanzar el estímulo. Observaron que al presentarle un estímulo femenino —estímulo social—, la hembra experimental no sexualmente activa demoraba menos tiempo en alcanzar ese estímulo en relación a cuando estaba sexualmente activa, lo contrario ocurrió cuando le presentaron un estímulo masculino. Este estudio sugiere que tanto el valor del macho como el de la hembra varían para hembras ciclantes de acuerdo a la fase del ciclo estral.

Existen diferentes modelos que permiten estudiar la diferencia en el valor de incentivo entre dos estímulos; uno ampliamente utilizado en nuestro laboratorio es el laberinto Y de preferencia (Agrati et al., 2008; Ferreño et al., 2018; Agrati et al., 2019). Este modelo consta de tres compartimentos de igual tamaño al final de cada brazo, dos de los compartimentos contienen los estímulos, mientras el tercer compartimento permanece vacío (compartimento neutro). El tiempo de permanencia del animal experimental en cada compartimento se utiliza como índice del valor de incentivo relativo del estímulo. En el laboratorio se realizó esta prueba en hembras sexualmente activas frente a un estímulo social —hembra no sexualmente activa— y un estímulo sexual —macho sexualmente activo— y se evidenció un mayor valor del macho frente a la hembra. Sin embargo, sobre la base de que el valor de incentivo de los coespecíficos varía de acuerdo a la fase del ciclo estral, es posible especular que la interacción social entre aquellos también cambia. Por lo tanto, sería interesante evaluar qué ocurre al realizar una prueba de preferencia con hembras no sexualmente activas frente a un estímulo social —hembra no sexualmente activa— y a un estímulo sexual —macho sexualmente activo—.

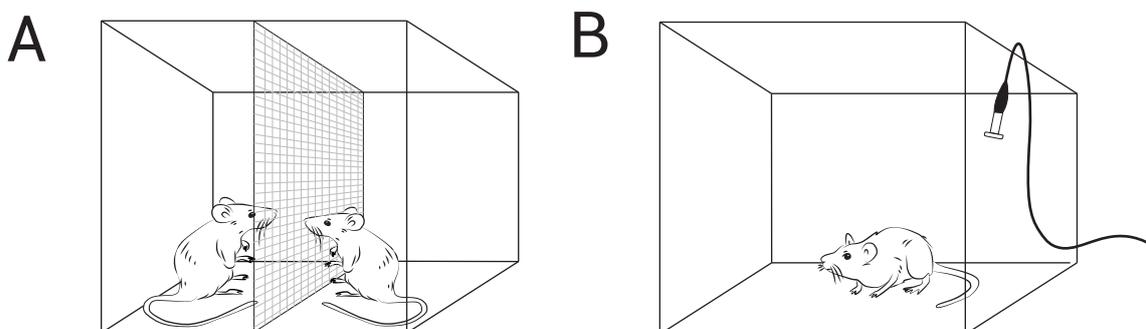
## Emisión de ultra-vocalizaciones en la comunicación entre coespecíficos

Una de las formas relativamente recientes, de explorar las interacciones sociales en roedores de laboratorio radica en el análisis de su comunicación a través de ultra-vocalizaciones (USVs). Las ratas utilizan las USVs como un mecanismo de comunicación intraespecífica, éstas se proponen como índices de estados afectivos y se conceptualizan como una forma de expresión emocional (Knutson et al., 2002). Las USVs se dividen en dos grandes grupos: 22 kHz y 50 kHz. Estas categorías se diferencian en características acústicas, como duración y frecuencia del sonido. Por ejemplo, las vocalizaciones de 22 kHz son principalmente emisiones de larga duración con una frecuencia de sonido relativamente constante no superior a 25 kHz. Las vocalizaciones de 50 kHz poseen alta frecuencia de sonido (no inferior a 30 kHz) y son de corta duración (Brudzynski, 2007). Respecto a sus características acústicas y sonográficas, las USVs de 50 kHz son notoriamente más variadas que las de 22 kHz, por lo que se subdividen en diferentes categorías. La categorización más utilizada es en flat —frecuencia relativamente constante— y FM —frecuencia modulada—. Algunos autores además subdividen a las FM en múltiples subtipos, siendo algunas clasificaciones más extensas que otras (Wright & Gourdon, 2010; Mulvihill & Brudzynski, 2018).

Si bien se desconoce el significado etológico preciso de las USVs, éstas nos permiten cuantificar una respuesta no condicionada y nos aportan información sobre el estado afectivo del animal frente a diferentes estímulos. Por esta razón, son consideradas una herramienta muy valiosa a la hora de estudiar las interacciones entre coespecíficos. En este sentido, se ha postulado que las USVs de 22 kHz reflejan bajos niveles de activación conductual; por ejemplo, son emitidas por el macho en el período post-eyaculatorio y muchas veces se asocian con un estado emocional negativo (Barfield et al., 1979). Por otro lado, las USVs de 50 kHz reflejan altos niveles de excitación conductual y se asocian principalmente con un estado emocional positivo. Ambos tipos de USVs se observan durante diferentes interacciones sociales como el juego, la cópula y la agresión (Burgdorf et al., 2008). Es interesante señalar, que la emisión de diferentes subtipos de USVs de 50 kHz de acuerdo a sus características acústicas y sonográficas se ha asociado a diferentes contextos. Por ejemplo, Mulvihill & Brudzynski (2018) subdividieron las USVs de 50 kHz en tres categorías: flat, FM no-trill y trill, y estudiaron cómo variaba la proporción de estas categorías en función del estímulo que le presentaban al macho experimental. Encontraron que las USVs del tipo flat se asociaban al comportamiento alimenticio, las FM no-trill a la comunicación social con coespecíficos, y los trills estaban asociados específicamente a la comunicación con la hembra estímulo. El diferenciar el perfil de emisión de diferentes tipos de USVs de 50 kHz durante una interacción sexual y una interacción social, puede constituir un excelente insumo para comenzar a comprender mejor este tipo de comunicación.

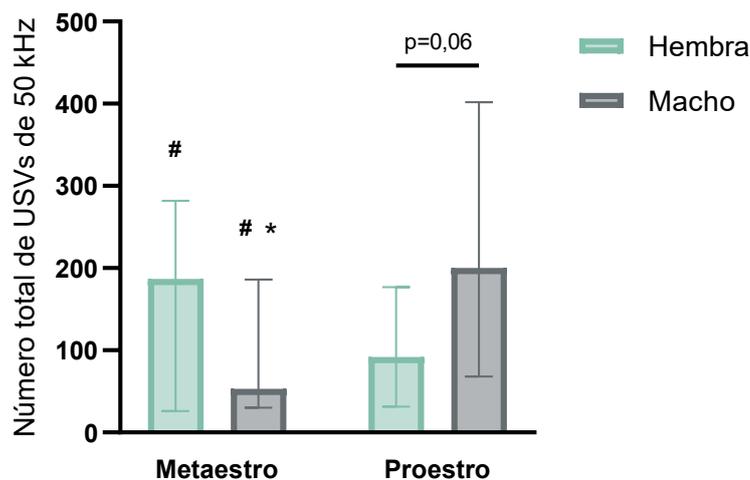
## Antecedentes del laboratorio y planteamiento del problema

En un trabajo previo de nuestro laboratorio (Armas et al., 2021), las autoras utilizaron un modelo de emisión de USVs con el fin de comparar la motivación sexual entre ratas adultas y adolescentes en respuesta a un macho y a una hembra no sexualmente activa. El modelo experimental de emisión de USVs utilizado fue validado por McGinnis & Vakulenko (2003) y consiste en habilitar la interacción de una hembra sexualmente activa con un macho o con una hembra a través de una malla metálica (Fig. 2). Luego de la interacción de las díadas durante 5 minutos, retiraron el estímulo y la malla metálica, y registraron y clasificaron las USVs emitidas por la hembra experimental sola. Para profundizar en la validación de este modelo y determinar si las hembras responden de forma diferencial a una interacción social y a una sexual de acuerdo a la fase del ciclo estral en la cual se encuentran, evaluaron la emisión de USVs luego de la interacción de hembras vírgenes ciclantes con una hembra no sexualmente activa —estímulo social— o un macho sexualmente activo —estímulo sexual— cuando ellas estaban sexualmente activas (proestro tardío) y cuando no lo estaban (metaestro).



**Figura 2.** Modelo utilizado para el registro de USV. Interacción entre la hembra experimental (derecha) y el estímulo (izquierda) a través de una malla metálica (panel A) y registro de USVs de la hembra experimental sola, posterior a la retirada del estímulo y de la malla metálica (panel B).

De forma interesante, en dicho trabajo observaron un patrón inverso en el número de USVs de 50 kHz emitidas hacia el macho y hacia la hembra en las dos etapas del ciclo estral analizadas (Fig. 3). Cuando las hembras se encontraban en proestro emitieron un mayor número de USVs luego de interactuar con un macho comparado con la hembra, mientras que al estar en metaestro emitieron mayor número de USVs luego de interactuar con la hembra comparado con el macho. Al analizar la variación individual en la emisión de USVs frente a un mismo estímulo en las dos fases del ciclo estral, observaron que 9 de las 11 hembras aumentaron el número de USVs luego de interactuar con un macho aproximadamente un 300% en proestro comparado con metaestro. A su vez, 6 de 10 hembras disminuyeron el número de USVs emitidas luego de interactuar con una hembra en aproximadamente un 40% en proestro comparado con metaestro (Fig. 3).



**Figura 3.** Número de USVs de 50 kHz emitidas por hembras (n=11) en las fases de metaestro y proestro del ciclo estral, luego de una interacción breve con una hembra (barras verdes) o con un macho (barras grises). \* $p < 0,05$  y  $p = 0,06$  vs. hembra dentro de una misma fase del ciclo estral y #  $p < 0,05$  vs. proestro, prueba pareada de Wilcoxon.

Si bien el resultado observado en proestro —mayor emisión de USVs luego de una interacción sexual que una social— era esperable, el cambio en la respuesta hacia el estímulo social entre las diferentes fases del ciclo es un resultado interesante de analizar y abre nuevas preguntas.

Por un lado, nos preguntamos si el valor de incentivo de un estímulo social en relación a uno sexual para las hembras es mayor durante el metaestro. Por otra parte, asumiendo que la emisión de USVs pos-interacción es influida por la comunicación que tuvo lugar durante la interacción, nos preguntamos si esta comunicación difiere entre las díadas de acuerdo al sexo del estímulo y al estado reproductivo de la hembra experimental. En este sentido, un estudio previo sobre USVs emitidas durante la interacción en ratones hembra muestra que el número de USVs está influenciado por la etapa del ciclo estral. Particularmente, los autores observaron que las hembras no sexualmente activas emiten mayor número de USVs que las hembras sexualmente activas frente a un intruso del mismo sexo (Moles et al., 2007). Los antecedentes mencionados previamente sugieren que la comunicación entre coespecíficos podría ser distinta considerando la etapa del ciclo en el cual se encuentra la hembra experimental y el estímulo al que se enfrenta. Dado que durante el experimento previo del laboratorio (Fig. 3) se recabaron y archivaron los audios correspondientes a los 5 minutos de interacción, resulta de interés estudiar sus características.

## HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes que muestran una respuesta comportamental diferente de las hembras ciclantes no solo frente a machos, sino también ante hembras, en función de la fase del ciclo estral en la que se encuentran, hipotetizamos que:

El valor de incentivo de un estímulo social relativo a un estímulo sexual para ratas hembras ciclantes, así como la interacción con éstos, varía según la etapa del ciclo estral.

## OBJETIVOS

- 1-** Determinar si el valor de incentivo de un estímulo social en relación a un estímulo sexual difiere para ratas hembras ciclantes cuando éstas están sexualmente activas y cuando no lo están.
- 2-** Determinar si la comunicación durante la interacción con un estímulo social y con uno sexual difiere para ratas hembras ciclantes cuando éstas están sexualmente activas y cuando no lo están.

## Estrategia experimental

Para determinar si el valor de incentivo de un estímulo social en relación a un estímulo sexual cambia de acuerdo a la fase del ciclo, comparamos la preferencia entre un estímulo social (hembra no sexualmente activa) y un estímulo sexual (macho sexualmente activo) en una prueba de preferencia de hembras vírgenes ciclantes en las fases de metaestro y proestro del ciclo estral. Seleccionamos la fase de proestro tardío del ciclo porque es en este período que las hembras están sexualmente activas. En el mismo sentido, seleccionamos la fase de metaestro porque las hembras no están sexualmente activas, los niveles plasmáticos de estrógenos son bajos y es la fase del ciclo que nos permitió la máxima separación entre pruebas.

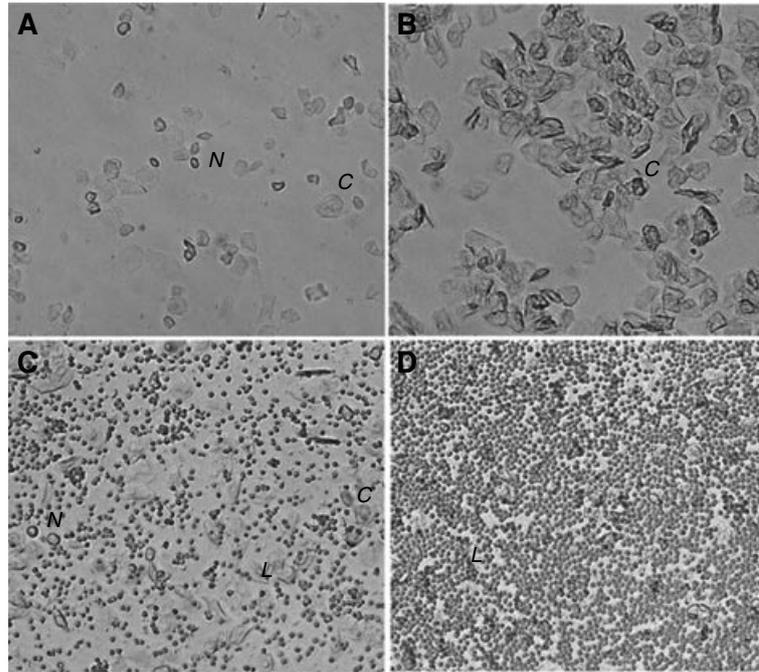
Por otro lado, para determinar si la comunicación durante una interacción social breve difiere de acuerdo al sexo del estímulo y del estado reproductivo de la hembra experimental, decidimos caracterizar y comparar el patrón de emisión de USVs durante la interacción de díadas formadas por hembras vírgenes ciclantes cuando éstas están sexualmente activas y cuando no lo están, frente a un estímulo social (hembra no sexualmente activa) y un estímulo sexual (macho sexualmente activo). Para este análisis se utilizaron las grabaciones correspondientes a los 5 minutos de interacción recabados en el proyecto de Armas (2018) (Fig. 2).

## Animales

En este estudio 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 invertido 12/12 hrs (luces encendidas 03:30 hrs) y temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Se utilizaron hembras adultas, vírgenes y ciclantes, a las cuales se les siguió el ciclo estral mediante exudados vaginales matutinos con frecuencia diaria para determinar la fase del ciclo estral en la cual se encontraba cada hembra.

## Seguimiento del ciclo estral

La etapa del ciclo estral se definió monitoreando los tipos celulares que aparecen en el exudado vaginal (Fig. 4). La etapa de proestro se caracteriza por la predominancia de células epiteliales nucleadas, apareciendo también células escamosas cornificadas. Las células epiteliales nucleadas son células redondeadas con un núcleo prominente. La etapa siguiente, el estro, se caracteriza por una gran abundancia de células escamosas cornificadas. Estas son células queratinizadas, sin núcleo, gran citoplasma y forma irregular que generalmente se observan formando grandes grupos. Las etapas de metaestro y diestro se caracterizan por la aparición de leucocitos, células pequeñas y redondas con citoplasma granular. Junto con los leucocitos aparecen las células nucleadas nuevamente. El ciclo completo puede tener un día adicional de prominencia de células cornificadas o de leucocitos (Caligioni, 2009).



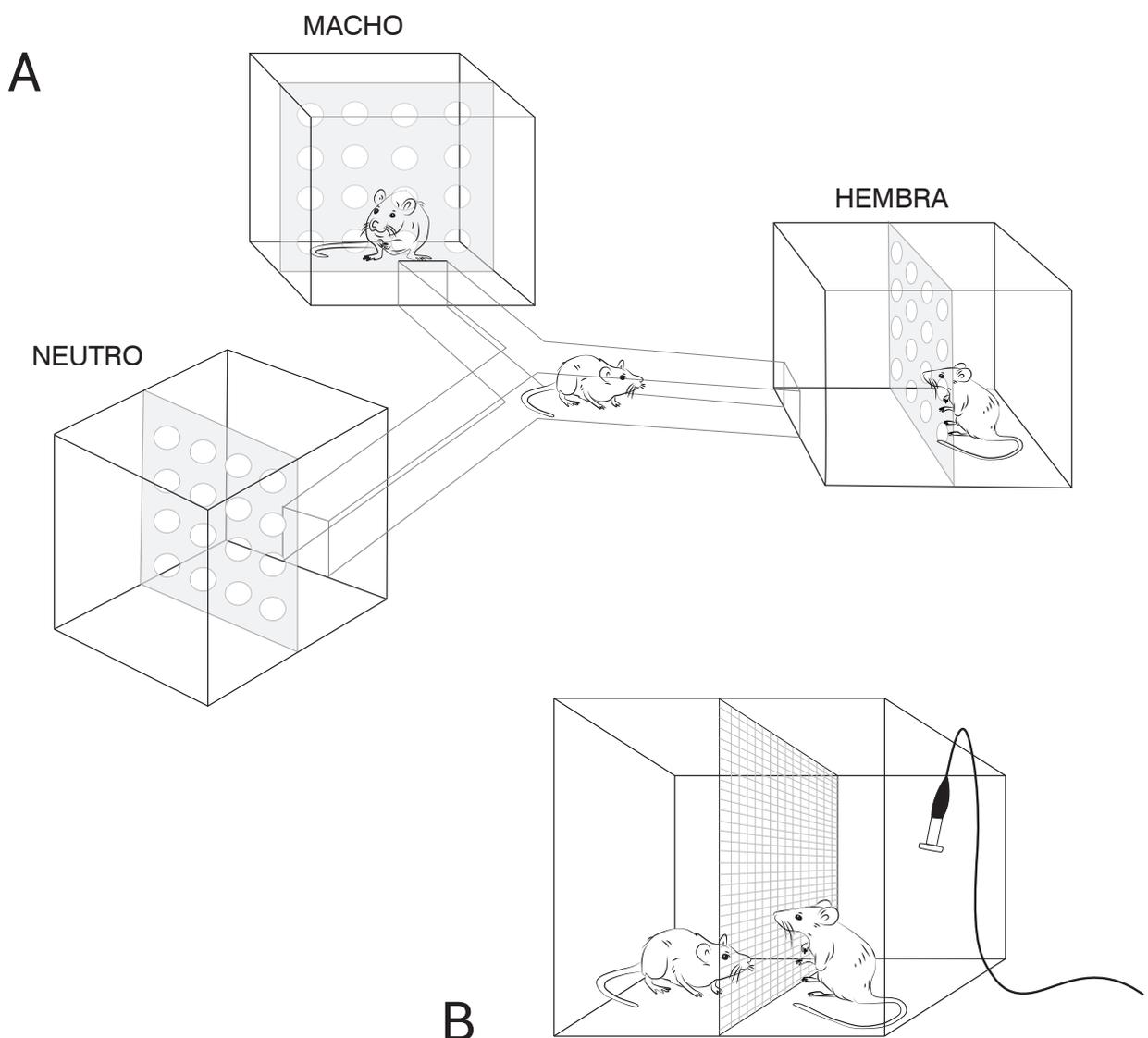
**Figura 4.** Imagen representativa de los tipos celulares encontrados en las diferentes etapas del ciclo estral, extraída de Caligioni, 2009. Proestro, predominancia de células epiteliales nucleadas (panel A). Estro, predominancia de células escamosas cornificadas (panel B). Metaestro, se observan leucocitos, células escamosas cornificadas y células epiteliales nucleadas (panel C). Diestro, predominancia de leucocitos (panel D). Células epiteliales nucleadas (N), células escamosas cornificadas (C), leucocitos (L).

## Prueba de preferencia macho vs hembra

El modelo de preferencia es un modelo ampliamente utilizado por nuestro laboratorio para estudiar el valor de incentivo de dos estímulos presentados de manera simultánea. La prueba de preferencia consiste en un laberinto transparente de acrílico en forma de Y con tres cámaras de igual tamaño (25 x 30 x 18 cm) al final de cada brazo (10 x 60 x 10 cm). Dos de las cámaras contienen los estímulos, mientras que la tercera cámara permanece vacía (cámara neutra) (Fig. 5). A su vez, cada cámara contiene una división de acrílico transparente perforada, que permite que la rata experimental pueda ver, oler y oír a los estímulos, sin posibilitar contacto físico con ellos. Previo a las pruebas se coloca a la rata experimental en el centro del modelo y se le permite explorarlo por 15 minutos para que se habitúe a éste. Luego de este período se colocan los estímulos y durante 20 minutos se registra el tiempo de permanencia en cada cámara (Agrati et al., 2008), así como la exploración de los estímulos (olfateos a la pared interna de la cámara) y los intentos por acceder a los mismos (mordidas y rasguños a la pared interna) (Armas et al., 2021). A su vez, se cuantifica el número de entradas a los tres compartimientos y la movilidad de la rata experimental durante la prueba, calculada como la suma del número de entradas a los brazos y a los tres compartimientos del modelo.

## Registro y análisis de las USVs

Para la realización de este trabajo se utilizaron audios recabados por el proyecto de Armas (2018). En dicho proyecto, el modelo experimental utilizado para el registro de USVs consistió 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 del estímulo (macho sexualmente activo o hembra no sexualmente activa) (Fig. 5). En el fondo de la arena se colocó una cama de viruta limpia para promover la comodidad de los animales. La malla metálica permite que el sujeto experimental y el estímulo tengan una interacción visual, auditiva, olfativa y táctil moderada. En uno de los compartimentos se colocó al estímulo durante 2 minutos, a continuación se colocó el sujeto experimental en el compartimento adyacente y se les permitió interactuar durante 5 minutos. Esta interacción fue grabada por un micrófono UltraSoundGate colocado sobre el modelo (Armas et al., 2021).



**Figura 5.** Dibujos representativos de los modelos utilizados en este proyecto. Se representa el modelo de preferencia macho vs. hembra (panel A) y la fase de interacción en el modelo de emisión de USVs (panel B).

El análisis de los audios se realizó mediante el software Avisoft-SAS Lab Pro. En primer lugar, se generaron espectrogramas a partir de cada audio mediante la aplicación de la herramienta matemática transformada de Fourier, de modo de transformar la señal de audio al dominio de la frecuencia. El siguiente paso consistió en eliminar el ruido de forma manual y aislar selectivamente las vocalizaciones ultrasónicas mediante su reconocimiento visual y auditivo. Finalmente, se procedió a la cuantificación y clasificación de las USVs de cada interacción. Para la caracterización de la interacción se utilizó la clasificación de Mulvihill & Brudzynski (2018), esta clasificación nos pareció adecuada para realizar un análisis más profundo de la interacción. La clasificación de las USVs en los diferentes grupos se realizó analizando las formas sonográficas y las características acústicas de las mismas. Las USVs de 22 kHz se caracterizaron por tener frecuencia constante, abarcar un ancho de banda estrecho (~ 3 kHz) y ser de larga duración. Las USVs de 50 kHz se dividieron en 4 subtipos: flat, FM no-trill, trill y superpuestas. A la categoría flat se incorporó todas aquellas USVs que tenían una frecuencia relativamente constante (pendiente entre -0,2 y 0,2 kHz/ms) y una frecuencia mayor a 30 kHz, mientras que en las categorías FM no-trill y trill se incorporaron todas las USVs con frecuencia variada entre 30 y 90 kHz. De estas últimas, aquellas USVs con rápidas oscilaciones de frecuencia fueron incluidas en la categoría trill. En la categoría superpuestas se incorporaron aquellas USVs que se superponían en el sonograma, y que por las características del software utilizado no era posible separarlas.

Se contabilizó el número total de USVs de 50 kHz emitidas por cada día, así como el número y proporción de los cuatro subtipos de USVs de 50 kHz analizadas. A su vez, se determinó la duración, el ancho de banda y el pico de frecuencia para cada USVs, generándose un valor promedio de cada una de estas variables por subtipo de USV para cada día.

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

### ***Experimento I: Preferencia entre un estímulo social y uno sexual de hembras ciclantes en diferentes fases de su ciclo estral***

Para este experimento se utilizaron 8 hembras vírgenes de aproximadamente 90-100 días de edad, a las que se les siguió el ciclo estral a través de exudados vaginales matutinos diarios. Solo aquellas hembras que exhibieron dos ciclos estrales regulares fueron utilizadas. Cada hembra se probó en las etapas de metaestro y proestro tardío del ciclo estral (entre ambas etapas se dejó pasar un ciclo estral completo), comenzando las pruebas cuatro hembras en metaestro y cuatro en proestro. Previo a cada prueba se colocó la hembra con un macho durante 1 minuto para corroborar que estuviera sexualmente activa o no (si la hembra está sexualmente activa realiza conductas proceptivas como hops & darts y posturas de presentación, además se da el reflejo de lordosis frente a la monta del macho). Luego, las hembras fueron sometidas a la prueba de preferencia entre un estímulo social (hembra no sexualmente activa) y un estímulo sexual (macho sexualmente activo). La localización de los estímulos en el modelo estuvo contrabalanceada entre hembras de cada grupo.

## ***Experimento II: Patrón de emisión de USVs durante la interacción con un estímulo social y un estímulo sexual de hembras ciclantes de acuerdo a la fase del ciclo estral***

A continuación se describe brevemente el protocolo experimental utilizado en el proyecto de Armas (2018). Se utilizaron 11 hembras vírgenes de aproximadamente 90-100 días de edad, a las que se les siguió el ciclo estral a través de exudados vaginales matutinos diarios. Solo aquellas hembras que exhibieron dos ciclos estrales regulares fueron utilizadas. Estas fueron sometidas a la prueba de emisión de USVs en las fases de metaestro y de proestro tardío del ciclo estral en dos situaciones experimentales diferentes: presencia de una hembra no sexualmente activa o de un macho sexualmente activo. Las pruebas se realizaron con 6 días de diferencia entre sí y de forma contrabalanceada.

De esta manera se formaron 4 grupos experimentales:

Interacción entre hembras en metaestro con una hembra (meta-hembra)

Interacción entre hembras en metaestro con un macho (meta-macho)

Interacción entre hembras en proestro con una hembra (pro-hembra)

Interacción entre hembras en proestro con un macho (pro-macho)

En el marco de esta pasantía se analizó el primer minuto de la interacción de los audios recabados en el proyecto de Armas (2018) de acuerdo a lo descrito previamente.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

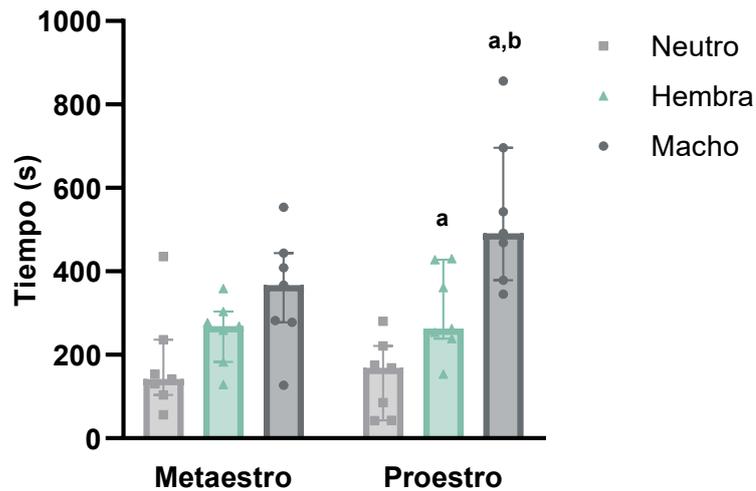
Debido a que la mayoría de los datos comportamentales no se ajustaron a una distribución normal, se expresan como medianas (rango intercuartiles, RIC) y se analizaron mediante pruebas no-paramétricas (Gibbons & Chakraborti, 2020). Tanto en las pruebas de preferencia macho vs hembra como en el análisis de las USVs, las comparaciones entre 2 grupos pareados se realizó mediante la prueba pareada de Wilcoxon y entre tres grupos pareados se realizó mediante el test de Friedman seguido de la prueba pareada de Wilcoxon. El análisis estadístico se realizó en el software PAST. El estadístico de prueba mencionado en los resultados es W y corresponde al estadístico de prueba brindado por el software utilizado.

## RESULTADOS

### **Experimento I: Preferencia entre un estímulo social y uno sexual de hembras ciclistas en diferentes fases de su ciclo estral**

Durante la fase de metaestro, no se detectaron diferencias significativas en el tiempo de permanencia de las hembras entre los tres compartimentos (Fig. 6,  $\chi^2(2)=3,71$ ,  $p=0,19$ , ANOVA de Friedman). Por otro lado, durante la fase de proestro las ratas permanecieron más tiempo en el compartimento del macho en comparación con el tiempo en el compartimento de la hembra y el neutro (Fig. 6, macho vs. neutro:  $W(7)=28$ ,  $p=0,023$ ; macho vs. hembra:  $W(7)=27$ ,  $p=0,039$ , prueba pareada de Wilcoxon). A su vez, en proestro el tiempo en el compartimento de la hembra fue mayor al tiempo en el compartimento neutro (Fig. 6,  $W(7)=27$ ,  $p=0,039$ ).

La comparación del tiempo de permanencia en los compartimentos entre las dos fases del ciclo estral mostró que en proestro las hembras tendieron a permanecer más tiempo con el macho que en metaestro (Fig. 6,  $W(7)=24,5$ ,  $p=0,094$ ). No detectamos diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los compartimentos de la hembra y el neutro (Fig. 6, hembra metaestro vs. proestro:  $W(7)=19$ ,  $p=0,47$ ; neutro metaestro vs. proestro:  $W(7)=18$ ,  $p=0,59$ ).



**Figura 6.** Tiempo (s) de permanencia de las hembras durante las fases de metaestro y de proestro en el compartimento neutro (cuadrados gris claro), de la hembra (triángulos verdes) y del macho (círculos gris oscuro). Valores expresados en medianas (RIC) y cada punto representa un individuo. a  $p<0,05$  vs. neutro, b  $p<0,05$  vs. hembra dentro de cada fase del ciclo, prueba pareada de Wilcoxon.

De igual forma, en metaestro, no detectamos diferencias en el número de entradas a los tres compartimentos (Tabla 1,  $\chi^2(2)=2,79$ ,  $p=0,24$ ). En proestro, las entradas a los compartimentos del macho y de la hembra fueron mayores a las entradas al compartimento neutro (Tabla 1, macho vs. neutro:  $W(7)=28$ ,  $p=0,023$ ; hembra vs. neutro:  $W(7)=28$ ,  $p=0,026$ ). Al comparar el número de entradas a los compartimentos entre las fases de proestro y metaestro no se detectaron diferencias significativas (Tabla 1, macho metaestro vs. proestro:  $W(7)=21$ ,  $p=0,29$ ; hembra metaestro vs. proestro:  $W(7)=22,5$ ,  $p=0,19$ ; neutro metaestro vs. proestro:  $W(7)=12$ ,  $p=0,81$ ). Tampoco hubo diferencias en la movilidad de las hembras en el modelo entre las dos fases del ciclo estral (Tabla 1,  $W(7)=23$ ,  $p=0,16$ ).

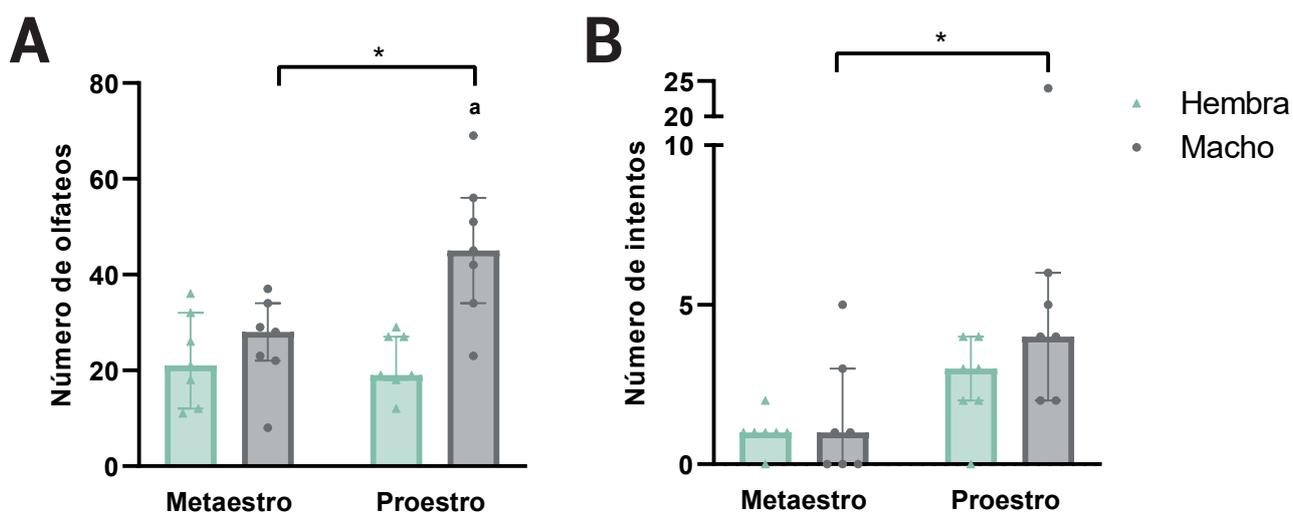
**Tabla 1.** Número de entradas a los tres compartimentos y movilidad de hembras en diferentes fases del ciclo estral

	Entradas a compartimentos			Movilidad
	Macho	Hembra	Neutro	
<b>Metaestro</b>	14 (10-18,5)	11 (10,5-13,5)	9 (5,5-12)	104 (96-117)
<b>Proestro</b>	16 <sup>a</sup> (13,5-20)	16 <sup>a</sup> (12,5-16,5)	10 (8,5-11)	124 (109,5-143,5)

Datos expresados en medianas (cuartil 1-cuartil 3). a  $p < 0,05$  vs. neutro dentro de cada fase del ciclo, prueba pareada de Wilcoxon. La movilidad de la rata experimental durante la prueba se calculó como la suma del número de entradas a los brazos y a los tres compartimentos del modelo.

En metaestro, no se detectaron diferencias significativas en el número de olfateos a la pared interna del compartimento de la hembra y del macho (Fig. 7A,  $W(7)=18,5$ ,  $p=0,52$ ). En proestro, el número de olfateos fue mayor hacia el macho (Fig. 7A,  $W(7)=28$ ,  $p=0,016$ ). La comparación entre grupos mostró que durante el proestro las hembras realizaron un mayor número de olfateos al macho en relación a metaestro (Fig. 7A,  $W(7)=26$ ,  $p=0,047$ ), mientras que el número de olfateos a la hembra no difirió entre grupos (Fig. 7A,  $W(7)=11$ ,  $p=1$ ).

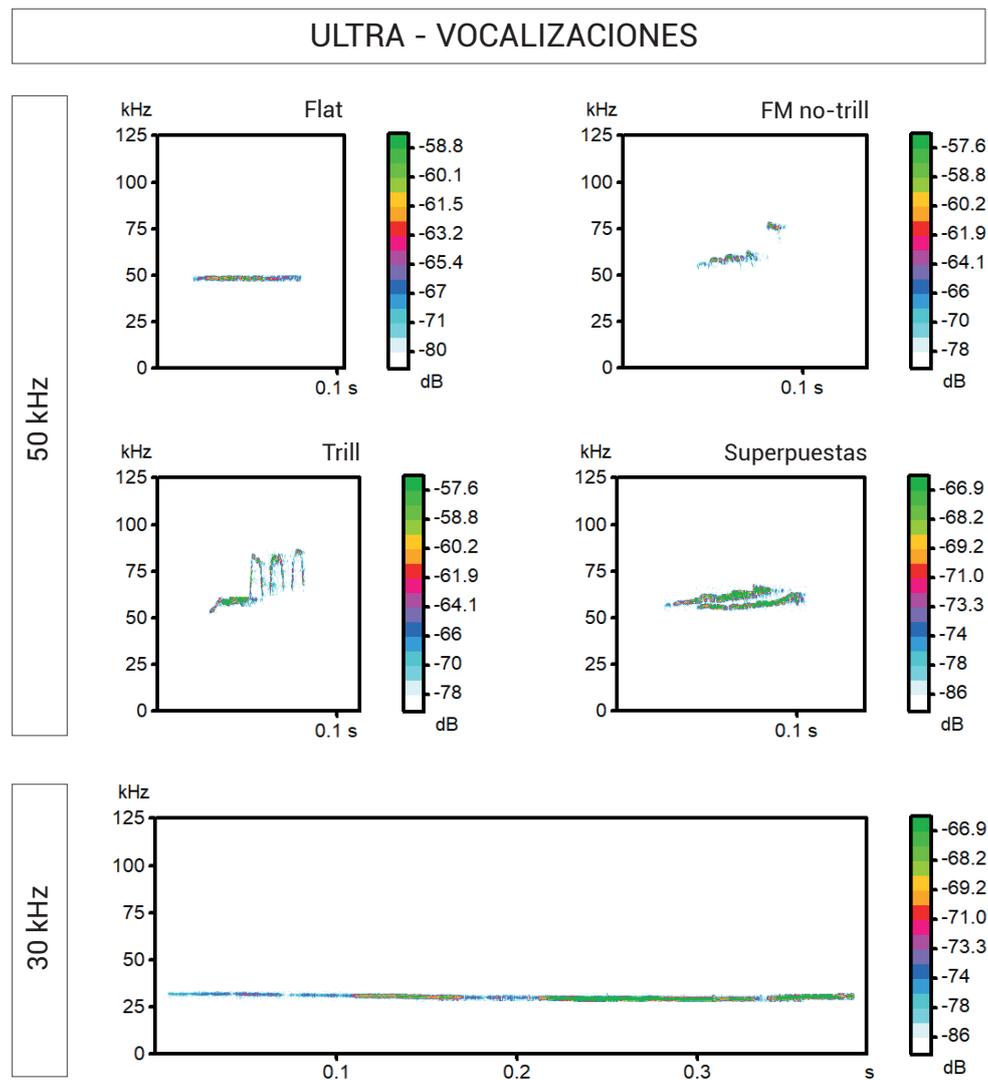
Por otra parte, si bien el número de intentos por acceder a los estímulos macho y hembra no difirió dentro de cada fase del ciclo estral (Fig. 7B, metaestro:  $W(7)=16$ ,  $p=0,83$ ; proestro:  $W(7)=19$ ,  $p=0,13$ ), durante la fase de proestro las ratas realizaron un mayor número de intentos por acceder al macho en comparación con la fase de metaestro (Fig. 7B,  $W(7)=21$ ,  $p=0,031$ ). El número de intentos por acceder a la hembra no difirió entre las fases del ciclo (Fig. 7B,  $W(7)=19,5$ ,  $p=0,094$ ).



**Figura 7.** Número de olfateos a la pared interna del compartimento del macho (círculos grises) y de la hembra (triángulos verdes) (panel A) y de intentos por acceder a ambos estímulos (panel B) realizados por las hembras en las fases de metaestro y proestro de su ciclo estral. Valores expresados en medianas (RIC) y cada punto representa un individuo. a  $p < 0,05$  vs. hembra dentro de cada grupo, \*  $p < 0,05$  comparación macho-macho entre fases del ciclo, prueba pareada de Wilcoxon.

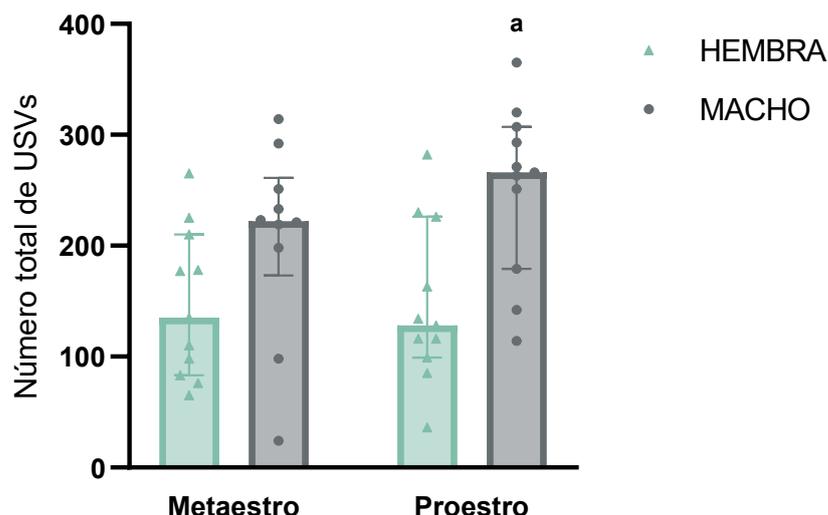
## Experimento II: Emisión de USVs durante la interacción con un estímulo social y un estímulo sexual de hembras ciclotantes en diferentes fases de su ciclo estral

Como se muestra en la Fig. 8, identificamos los cuatro subtipos de USVs de 50 kHz inicialmente categorizados. Las USVs de 22 kHz estuvieron ausentes en todos los audios analizados. Además de las categorías inicialmente utilizadas, se identificó la presencia de un tipo de vocalización no esperada, por lo que se clasificó en una nueva categoría. Como se muestra en la Fig. 8, esta categoría se caracteriza por USVs de frecuencia estable alrededor de los 30 kHz.



**Figura 8.** Imagen representativa de las USVs encontradas en el análisis que fueron clasificadas en USVs de 50 kHz (subtipos: flat, FM no-trill, trill y superpuestas) y USVs de 30 kHz.

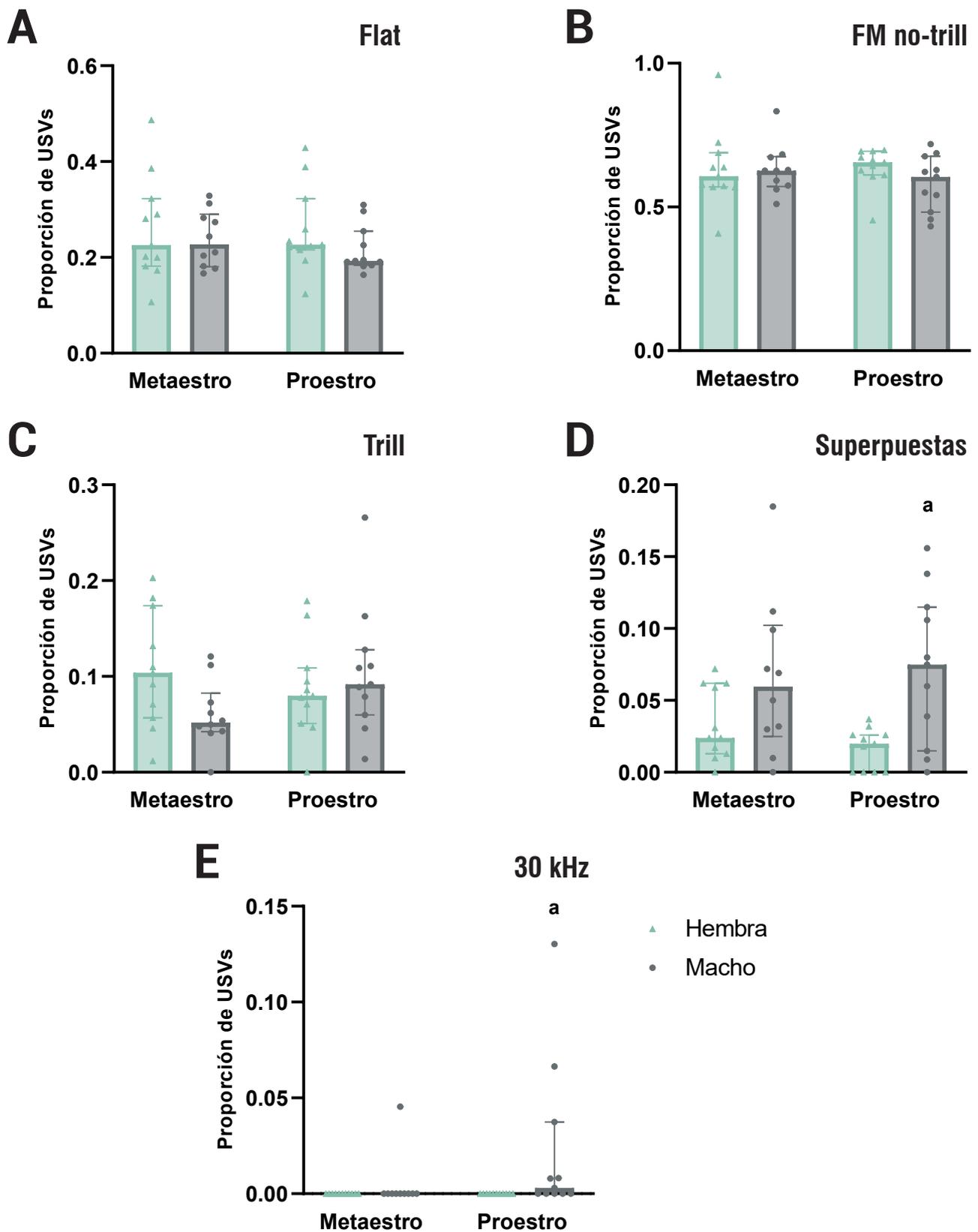
Durante el metaestro, el número total de USVs de 50 kHz emitidas por las díadas tendió a ser mayor cuando el animal estímulo era un macho en comparación a cuando era una hembra (Fig. 9,  $W(11)=37,5$ ,  $p=0,082$ ). Por otra parte, en el proestro, el número de USVs fue significativamente mayor en la interacción pro-macho en comparación con la interacción pro-hembra (Fig. 9,  $W(11)=61$ ,  $p=0,0098$ ). No observamos diferencias en el número de USVs en las interacciones con macho o con hembra entre las fases del ciclo estral (Fig. 6, meta-hembra vs. pro-hembra:  $W(11)=35$ ,  $p=0,89$ ; meta-macho vs. pro-macho:  $W(11)=37$ ,  $p=0,38$ ).



**Figura 9.** Número de USVs totales emitidas durante la interacción de hembras en las fases de metaestro y proestro con una hembra (triángulos verdes) y con un macho (círculos grises). Valores expresados en medianas (RIC) y cada punto representa un individuo. a  $p < 0,05$  vs. hembra dentro de cada fase del ciclo, prueba pareada de Wilcoxon.

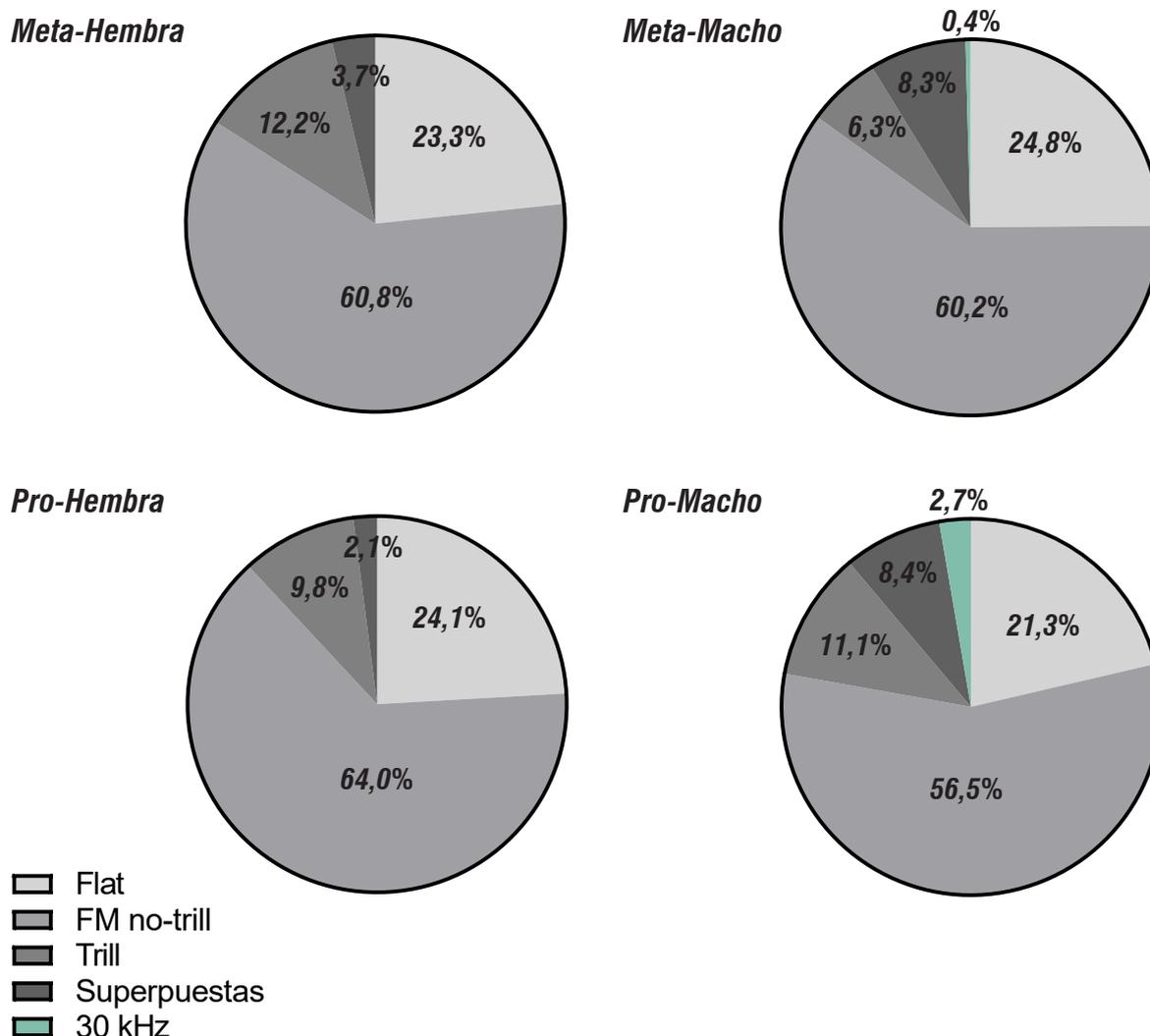
Al analizar la proporción de las 4 categorías de USVs de 50 kHz dentro del total de USVs emitidas por las díadas, encontramos que la proporción de flat, FM no-trill y trill no difirió entre nuestros grupos experimentales (Fig. 10A-C,  $p > 0,1$  para todas las comparaciones). Por otra parte, si bien la proporción de USVs superpuestas no difirió de acuerdo al estímulo durante el metaestro (Fig. 10D,  $W(11)=42$ ,  $p=0,16$ ), en proestro fue mayor en las interacciones pro-macho en comparación a las interacciones pro-hembra (Fig. 10D,  $W(11)=62$ ,  $p=0,0068$ ). No detectamos diferencias en la proporción de USVs superpuestas en las interacciones con hembra y con macho entre las fases del ciclo (Fig. 10D, meta-hembra vs. pro-hembra:  $W(11)=42$ ,  $p=0,16$ ; pro-macho vs. pro-macho:  $W(11)=28$ ,  $p=0,98$ ).

De forma similar, la proporción de USVs de 30 kHz no difirió entre las interacciones con macho y con hembra durante el metaestro (Fig. 10E,  $W(11)=1$ ,  $p=1$ ), mientras que en proestro detectamos una mayor emisión de éstas en las interacciones pro-macho en comparación con las interacciones pro-hembra (Fig. 10E,  $W(11)=21$ ,  $p=0,031$ ). A su vez, la proporción de emisión de estas USVs en las interacciones con macho tendió a ser mayor cuando las hembras experimentales se encontraban en proestro en comparación con metaestro (Fig. 10E, meta-macho vs. pro-macho:  $W=15$ ,  $p=0,063$ ). En este sentido, la proporción de díadas pro-macho que emitió USVs de 30 kHz fue 6/11, mientras que en meta-macho fue 1/11 (PNS,  $p=0,13$ , prueba de McNemar).



**Figura 10.** Proporción de los diferentes subtipos de USVs de 50 kHz (Flat: panel A, FM no-trill: panel B, Trill: panel C y Superpuestas: panel D) y de USVs de 30 kHz (panel E) emitidas en díadas de hembras ciclantes en las fases de metaestro y proestro del ciclo estral, con una hembra (triángulos verdes) y con un macho (círculos grises). Valores expresados en medianas (RIC) y cada punto representa un individuo. <sup>a</sup> p < 0,05 vs. hembra dentro de cada grupo, prueba pareada de Wilcoxon.

La ausencia de diferencias entre las díadas en la proporción de las USVs de 50 kHz más abundantes —flat, FM no-trill y FM trill— se refleja en un perfil descriptivo de emisión de USVs similar entre éstas (Fig. 11). En este perfil se observa que la emisión de USVs de 30 kHz estuvo presente únicamente en las interacciones con macho.



**Figura 11.** Perfil de emisión de USVs por tipo de díada. De acuerdo al número total de USVs por grupo experimental, se muestra el porcentaje de USVs de 50 kHz (flat, FM no-trill, trill y superpuestas) y USVs de 30 kHz.

Al analizar características sonográficas —duración, ancho de banda y pico de frecuencia— de las USVs emitidas en las diferentes interacciones, detectamos algunas diferencias entre éstas. Durante el metaestro, las USVs FM no-trill detectadas en las interacciones con una hembra (meta-hembra) tuvieron un mayor pico de frecuencia en comparación con las interacciones con un macho (meta-macho) (Tabla 2,  $W(11)=49$ ,  $p=0,027$ ), mientras que las USVs trill del grupo meta-hembra tuvieron un menor ancho de banda en comparación con meta-macho (Tabla 2,  $W(11)=41$ ,  $p=0,027$ ).

De forma similar, durante el proestro, las USVs FM no-trill detectadas en las interacciones con una hembra (pro-hembra) mostraron un mayor pico de frecuencia en comparación con la interacción con macho (pro-macho) (Tabla 2,  $W(11)=57$ ,  $p=0,032$ ). En proestro, a su vez, tanto las USVs flat como las trill emitidas durante la interacción con un macho (pro-

macho) mostraron mayor duración (Tabla 2, flat:  $W(11)=53$ ,  $p=0,0059$ ; trill:  $W(11)=47$ ,  $p=0,047$ ) y ancho de banda (Tabla 2, flat:  $W(11)=60$ ,  $p=0,012$ ; trill:  $W(11)=52$ ,  $p=0,0097$ ) en comparación a las emitidas con una hembra (pro-hembra). Por otra parte, las USVs flat exhibieron un menor pico de frecuencia en la interacción pro-macho en relación a la interacción pro-hembra (Tabla 2, pro-hembra vs pro-macho:  $W(11)=61$ ,  $p=0,0097$ ).

En las comparaciones entre las fases de metaestro y proestro solo se encontró que el ancho de banda de las flat tiende a ser mayor en la interacción meta-hembra que en la interacción pro-hembra (Tabla 2,  $W(11)=53$ ,  $p=0,083$ ). En el resto de las comparaciones entre metaestro y proestro no se detectaron diferencias (Tabla 2,  $p>0,1$  para todas las comparaciones).

Las USVs de 30 kHz no fueron agregadas a la tabla 2 ya que solo fueron encontradas en los grupos meta-macho (proporción: 1/11) y pro-macho (proporción: 6/11). Debido a la mayor proporción de esta categoría de USVs en pro-macho, tomamos como representativas de las características sonográficas de las USVs de 30 kHz de las díadas de este grupo (Fig. 8). Estas USVs se caracterizaron por presentar una duración de 81,5 ms (67,8-99,8), un ancho de banda de 3,9 kHz (3,4-4,5) y un pico de frecuencia de 33,8 kHz (32,8-34,5). Datos expresados en medianas (cuartil 1-cuartil 3).

**Tabla 2.** Características sonográficas de las USVs de 50 kHz flat, FM-notrill y trill

Categoría	Grupo	Duración (ms)	Ancho de banda (kHz)	Pico de frecuencia (kHz)
Flat	Meta-Hembra	23,2 (20,9-27,8)	3,8 (3,4-4,7)	58,4 (55,9-62,8)
	Meta-Macho	24,1 (22,6-27,8)	4,6 (3,9-4,7)	56,6 (55,5-59,5)
	Pro-Hembra	20,8 (14,3-23,3)	3,3 (3,2-3,9)	58,5 (57,0-62,9)
	Pro-Macho	31,1 <sup>a</sup> (28,7-40,0)	4,3 <sup>a</sup> (3,9-4,7)	56,6 <sup>a</sup> (54,5-56,8)
FM no-trill	Meta-Hembra	33,3 (31,3-35,7)	17,2 (14,8-17,9)	70,6 (67,9-72,8)
	Meta-Macho	39,7 (33,1-42,8)	16,0 (15,2-17,4)	65,8 <sup>a</sup> (63,7-69,1)
	Pro-Hembra	32,6 (29,7-35,3)	16,7 (15,6-18,3)	70,9 (68,8-74,8)
	Pro-Macho	45,5 (39,0-50,4)	17,2 (15,9-19,4)	67,9 <sup>a</sup> (65,8-70,2)
Trill	Meta-Hembra	48,8 (47,4-57,3)	24,4 (20,8-26,3)	78,4 (73,5-82,7)
	Meta-Macho	62,9 (51,2-77,8)	29,6 <sup>a</sup> (28,1-30,6)	79,9 (78,6-83,3)
	Pro-Hembra	53,9 (47,8-57,8)	24,7 (20,4-26,2)	78,8 (78,2-82,1)
	Pro-Macho	67,2 <sup>a</sup> (62,8-78,5)	31,0 <sup>a</sup> (27,7-32,6)	83,9 (78,6-85,0)

Datos expresados en medianas (cuartil 1-cuartil 3). a  $p<0,05$  vs. hembra dentro de cada etapa del ciclo.

### **La prueba de preferencia macho vs. hembra reveló cambios en el comportamiento de las hembras asociados a la fase del ciclo estral**

En la prueba de preferencia hembra vs. macho el comportamiento de las hembras experimentales difirió entre las etapas del ciclo estral, evidenciando la influencia de la fase del ciclo en el valor de incentivo relativo de ambos estímulos. De acuerdo a lo esperado, las hembras en proestro permanecieron más tiempo en el compartimento del macho y realizaron más olfateos a este compartimento, indicando una clara preferencia de las hembras sexualmente activas por el macho. Este resultado concuerda con hallazgos previos en diversos modelos que muestran un aumento en el valor de incentivo del macho cuando la hembra está sexualmente activa (López et. al., 2009; Rudzinskas et. al., 2019; Agrati et al., 2019). Por ejemplo, Eliasson & Meyerson (1975) realizaron una prueba de elección —macho intacto vs. hembra ovariectomizada tratada con estrógeno (E) y progesterona (P)— en hembras ciclantes y observaron que el número de elecciones por el macho aumentó cuando las hembras estaban sexualmente activas. En el mismo sentido, Clark y colaboradores (2004) compararon en una prueba de preferencia el comportamiento de un grupo de hembras ovariectomizadas tratadas hormonalmente —E y P vs. aceite— y un grupo de hembras ciclantes —proestro vs. diestro—. Los resultados de este trabajo muestran que las hembras tratadas con E y P y las hembras ciclantes en proestro prefieren al macho en relación a las tratadas con aceite y las hembras en diestro respectivamente. Este trabajo no solo coincide con nuestros resultados, sino que además evidencia el efecto de las hormonas esteroideas en el desarrollo de la motivación sexual de las hembras. Otros trabajos realizados empleando otros modelos, reafirman la preferencia de las hembras sexualmente activas por un macho activo ante un macho indiferente (Drewett et. al., 1973; Avitsor et. al., 1999) e incluso evidencian que éstas mantienen la preferencia por un mismo macho en ensayos sucesivos (French et. al. 1972).

A diferencia de las hembras en proestro, las hembras en metaestro no exhibieron diferencias en el tiempo de permanencia entre los compartimentos, ni en el número de olfateos e intentos por acceder a los estímulos. Esta ausencia de preferencia entre ambos estímulos, sugiere que la hembra no sexualmente activa y el macho sexualmente activo poseen un valor de incentivo similar para las hembras en metaestro. Este resultado contrasta con nuestra hipótesis y estudios previos de nuestro y otros laboratorios, que sugieren un mayor valor de incentivo del estímulo social cuando la hembra no está sexualmente activa. En este sentido, antecedentes de nuestro laboratorio (Fig. 1) evidencian que la hembra en metaestro vocaliza más luego de interactuar con un estímulo social —hembra no sexualmente activa— que con un estímulo sexual —macho sexualmente activo—. En el mismo sentido, en el estudio de Nofrey y colaboradores (2008) encontraron que las hembras no sexualmente activas corren más rápido hacia una hembra que hacia un macho. Además, Lukas & Neumann (2014) y Chari y colaboradores (2020) en diferentes modelos de preferencia evidencian que hembras ciclantes no sexualmente activas prefieren a un coespecífico del mismo sexo frente a un compartimento vacío. Sin embargo, nuestro resultado coincide con el de Eliasson & Meyerson (1975) quienes realizaron una prueba de elección en hembras ciclantes entre un macho intacto y una hembra ovariectomizada tratada con E y P y encontraron que las hembras no sexualmente activas eligieron 50% de las veces a cada estímulo; es decir, no presentaron

preferencia. Kentrop y colaboradores (2020) utilizaron un modelo de dos palancas en ratas hembra ciclantes, que al ser presionadas por la rata, una le daba recompensa solo a ella y la otra le daba recompensa a ella y a un coespecífico del mismo sexo colocado en una cámara adyacente. Evidenciaron que las hembras —sin importar la etapa del ciclo— presionaban por igual ambas palancas, por lo que no se reveló una preferencia prosocial.

Esta aparente discrepancia entre estudios en el comportamiento de hembras no sexualmente activas ante otro coespecífico podría deberse a las diferencias en los modelos y los procedimientos experimentales. En este sentido, Clark y colaboradores (2004) realizaron una prueba de preferencia en dos condiciones diferentes: sin contacto, permitiendo la interacción visual, auditiva y olfativa, y con contacto, permitiendo la interacción física entre los animales. En estas dos condiciones probaron el comportamiento de hembras ovariectomizadas tratadas hormonalmente —E y P vs. aceite— y de hembras ciclantes —proestro vs. diestro— frente a un macho intacto y una hembra ovariectomizada tratada con E y P. De forma interesante, encontraron que en la condición sin contacto las hembras tratadas con aceite y en diestro no prefirieron ninguno de los dos estímulos, como en nuestro experimento. Sin embargo, en la condición con contacto encontraron que dichos grupos de hembras prefirieron interactuar con la hembra. Este estudio lleva a inferir que algunas de las discrepancias entre trabajos podrían deberse a: estímulos presentados en simultáneo vs. estímulos presentados individualmente, las características de los estímulos utilizados (ej: hembras sexualmente activas vs. no sexualmente activas), tipo y magnitud de la interacción con los estímulos (visual, olfativa, auditiva, táctil), medidas conductuales utilizadas (número de USVs, velocidad de corrida, tiempo en compartimento, etc.), así como pruebas de aprendizaje vs. pruebas incondicionadas. En este sentido, al realizar las pruebas de preferencia observamos (si bien no cuantificamos) que el nivel de actividad de ambos animales utilizados como estímulos durante la prueba difirió. El macho sexualmente activo tenía mayor nivel de actividad conductual, se desplazaba constantemente dentro de su compartimento e intentaba acceder a la hembra experimental, mientras que la hembra estímulo permanecía en su compartimento con baja actividad motora. Es posible entonces, que el alto nivel de actividad del macho haya influido en los tiempos de permanencia de la hembra experimental en ambos compartimentos. Como una perspectiva a futuro sería conveniente sistematizar la actividad conductual de los estímulos a efectos de comprobar si existe correlación entre aquella y el comportamiento de la hembra. Si es así se podría modificar la estrategia experimental —aislar a la hembra estímulo previo a la prueba— para que el nivel de actividad conductual de la hembra aumente (Niesink & Van Ree, 1982).

El hecho de que las hembras en metaestro no prefieran a la hembra no sexualmente activa sobre el macho en una prueba de preferencia (resultado de la presente pasantía), pero que vocalicen significativamente más luego de interactuar de forma similar con una hembra no sexualmente activa en relación a un macho (resultados previos, Fig. 3) nos lleva a cuestionarnos, cuando la hembra está en metaestro: ¿cuál es el valor de las hembras no sexualmente activas? ¿Qué subyace al aumento en la emisión de USVs luego de una breve interacción sin contacto físico? En relación al valor de la hembra, la divergencia en los resultados de diferentes estudios y modelos (incluyendo el usado en la presente tesis), lleva a plantear, tal como lo postulan Ventura-Aquino & Paredes (2017), la necesidad de emplear más de un modelo para responder esta pregunta. Por otra parte, resulta fundamental analizar los factores que influyen o determinan la alta emisión de USVs de las hembras en metaestro luego de una breve interacción con una hembra, con el objetivo de comprender mejor este

modelo y el comportamiento social de las ratas hembras no sexualmente activas.

## **La presencia de un macho en las díadas se asocia a un aumento en la emisión de USVs, incrementándose este efecto cuando las hembras están sexualmente activas**

El mayor número de USVs emitidas durante las interacciones con un macho en relación a las interacciones con una hembra indica que la comunicación difiere cuando uno de los individuos de la díada es masculino. En concordancia con nuestros resultados, Mulvihill & Brudzynski (2018) reportaron cómo varían las USVs emitidas por machos luego de enfrentarse a diferentes estímulos, y observaron que éstos incrementan el número de USVs luego de interactuar con una hembra ciclante en relación a otro macho y a otros estímulos recompensantes como alcohol y comida palatable. En base a este antecedente, el incremento en el número de USVs observado cuando el macho está presente en la interacción podría deberse a que éste emite un gran número de vocalizaciones frente a la hembra, dado que ésta es un estímulo altamente motivante.

Por otro lado, este incremento en la emisión de USVs fue significativamente mayor cuando las hembras se encontraban sexualmente activas, lo que puede deberse a que el macho constituye un estímulo con un alto valor motivacional para ellas (Eliasson & Meyerson, 1975; Clark et al., 2004). Esto fuera constatado además en nuestra prueba de preferencia, donde las hembras sexualmente activas mostraron una clara preferencia por el macho. En diversos estudios se observó que hembras ovariectomizadas tratadas con E y P vocalizan más frente a un macho que hembras ovariectomizadas tratadas con aceite (White et. al., 1991; Matochik et. al., 1992; McGinnis & Vakulemko, 2003). Por otro lado, los machos emiten un número mayor de USVs frente a hembras ovariectomizadas tratadas con E y P que frente a hembras no tratadas hormonalmente (Barfield et. al., 1979; Bialy et. al., 2000; McGinnis & Vakulemko, 2003). En el mismo sentido, Thomas & Barfield (1895) encontraron que en una interacción entre un macho y una hembra ovariectomizada tratada con E y P, ambos individuos emiten el mismo número de USVs. De forma interesante, y concordante con nuestro trabajo, en dicho estudio evidenciaron que hembras ovariectomizadas tratadas con E y P vocalizan igual que hembras ciclantes en estro conductual. En base a estos antecedentes y los resultados de la presente tesina, podemos concluir que existe una clara influencia de las hormonas esteroideas sobre la emisión de USVs durante la comunicación con un estímulo con valor sexual, tanto en la emisión de USVs por las hembras como en la respuesta del macho. Por este motivo, es posible proponer que la intensidad de la comunicación a través de USVs en animales sexualmente activos refleja los niveles motivacionales en ambos individuos. Por lo tanto, el incremento en la emisión de vocalizaciones en la interacción entre una hembra en proestro y un macho, podría deberse a un aumento en la emisión de USVs por ambos individuos. El incremento en el número de USVs superpuestas observado en este grupo apoya esta idea.

La interacción entre hembras cuando una de estas estaba sexualmente activa (pro-hembra) y cuando ambas no lo estaban (meta-hembra) no difirió en el número total de USVs emitidas. Este resultado, contrasta con los obtenidos en el trabajo de García y colaboradores (2016), quienes observaron que en la interacción entre hembras ovariectomizadas no tratadas hormonalmente se producían mayor número de USVs que en la interacción entre hembras ovariectomizadas tratadas con E y P. Esta discordancia entre estudios podría deberse

a las diferencias evidentes en los niveles hormonales de hembras ciclantes y hembras ovariectomizadas tratadas hormonalmente. Además, en nuestro trabajo las hembras en proestro interactuaron con hembras no sexualmente activas, mientras que en el trabajo de García y colaboradores (2016) las hembras ovariectomizadas tratadas con E y P fueron probadas con hembras con su mismo tratamiento. Una posible interpretación de este resultado es que la comunicación entre hembras sea similar y no esté influenciada por la etapa del ciclo en el cual se encuentren. Esta propuesta está apoyada por el análisis de las características de la interacción, discutido más adelante.

Al contrastar la emisión de USVs por las díadas durante la interacción con nuestros antecedentes sobre cómo vocaliza la hembra experimental después de dicha interacción (Fig 3), observamos que el número de USVs emitido durante la interacción y luego de ésta depende de la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la hembra experimental. Cuando la hembra experimental se encontraba en proestro —sexualmente activa—, el número de USVs emitido durante la interacción con un macho fue mayor que en la interacción con una hembra y la hembra experimental emitió mayor número de vocalizaciones ante la ausencia del macho que de la hembra. Sin embargo, en metaestro el número de USVs emitido durante la interacción con un macho tendió a ser mayor al emitido durante la interacción con una hembra, pero estas mismas hembras emitieron significativamente más vocalizaciones ante la ausencia de la hembra que del macho. El hecho de que el número de USVs emitidas por la díada durante la interacción y por la hembra luego de ésta se relacione en proestro, pero no en metaestro, revela que existe una mayor complejidad en la comunicación por USVs entre coespecíficos a la esperada. Por lo tanto, es necesario un nivel de análisis más exhaustivo de esta comunicación, tanto a nivel de las USVs como en relación a otras señales, como pueden ser señales olfativas y comportamentales, que puedan determinar o modificar el comportamiento de las hembras experimentales luego de que se retira el estímulo.

### **Las díadas presentaron un patrón de emisión de USVs con características similares, independientemente de su composición**

De acuerdo a las características de la interacción analizadas en este trabajo, no se encontraron grandes diferencias en el perfil de la interacción entre los cuatro grupos experimentales. Sorprendentemente, la proporción de los subtipos de USVs de 50 kHz —flat, FM no-trill y trill— emitidas, que en conjunto componen más del 90% de las USVs totales, no difirió entre las díadas. Esta ausencia de diferencias en cuanto al perfil de interacción general de nuestros grupos experimentales, es un resultado llamativo e interesante debido a que diversos estudios han evidenciado que las USVs de 50 kHz no solo reflejan un estado afectivo positivo, sino que los diferentes subtipos se asocian a diferentes aspectos de la comunicación. Por ejemplo, el subtipo flat se ha asociado a una llamada de exploración y contacto social (Wöhr et al., 2008; Burgdorf et al., 2011; Wöhr, 2018), mientras que el subtipo FM se ha asociado a los componentes apetitivos y gratificantes del comportamiento —estado afectivo positivo—, y los trills a una elevada excitación general en presencia de estímulos altamente motivantes (Burke et al., 2017). En el mismo sentido, Mulvihill & Brudzynski (2018) observaron un aumento en la emisión de trills por los machos luego de interactuar con una hembra en relación a un macho y otros estímulos recompensantes. Por lo tanto, si bien suponíamos la ausencia de diferencias en la proporción de flat y FM no-trill en nuestros grupos experimentales, esperábamos un aumento de los trills en las interacciones

en que ambos individuos reflejan altos niveles motivacionales, por ejemplo, en la interacción pro-macho. De todos modos, escasos trabajos analizan la interacción entre coespecíficos como una unidad, por lo tanto, es evidente que la interacción entre los individuos es más compleja de lo esperado, y seguramente el intercambio de señales genere variaciones en la interpretación de los diferentes tipos de USVs.

El perfil de emisión de USVs en las interacciones con hembras en ambas fases del ciclo —meta-hembra y pro-hembra— fue similar tanto a nivel del número total de USVs emitidas y proporción de los diferentes subtipos de USVs de 50 kHz —flat, FM no-trill, trill y superpuestas—, como de las características sonográficas de éstas. En ambas interacciones con hembra observamos una mayor proporción de FM en relación a flat (en nuestro trabajo las USVs FM estarían conformadas por la suma de FM no-trill y trill), resultado que contrasta con el trabajo de Garcia y colaboradores (2017), quienes observaron que tanto en la interacción entre hembras ovariectomizadas no tratadas hormonalmente como en la interacción entre hembras ovariectomizadas tratadas con E y P, hubo un aumento en las USVs flat en relación a las FM. La diferencia en la emisión de ambos subtipos de USVs entre ambos trabajos, más allá del estado endócrino de las hembras, puede deberse a que en el trabajo de García y colaboradores (2017) los animales pasan por varios trials luego de pasar por una semana de aislamiento, protocolo que modifica la motivación social. De todas formas, tanto en la presente pasantía como en el trabajo de Garcia y colaboradores (2017), el perfil de interacción no varió de acuerdo a la fase del ciclo y al tratamiento hormonal respectivamente, lo que parece evidenciar que las hormonas esteroideas no están influyendo en la comunicación con otra hembra, al menos en este nivel de análisis.

Por otra parte, el perfil de emisión de USVs también fue similar en las interacciones de las hembras experimentales con un macho —meta-macho y pro-macho—, donde tampoco detectamos diferencias en el número y características sonográficas de los subtipos de USVs de 50 kHz entre las interacciones. Sin embargo, en las díadas con macho registramos USVs de 30 kHz, cuya proporción aumentó significativamente en las interacciones sexuales pro-macho en comparación con las interacciones meta-macho (diferencia que será discutida más adelante). Estos resultados evidencian que pueden existir patrones comunes en la comunicación entre individuos del mismo sexo y del sexo opuesto.

Si bien las características sonográficas no difirieron entre las interacciones con individuos estímulo del mismo sexo, en ambas fases del ciclo las características sonográficas de las USVs emitidas en la interacción con un macho difirieron de las emitidas en la interacción con una hembra (Tabla 2). Por ejemplo, detectamos un aumento en el pico de frecuencia de las FM no-trill y una disminución en el ancho de banda de las trill en las interacciones con hembra en comparación con las interacciones con macho, tanto en las díadas meta-macho como en las pro-macho. Este resultado denota sutilezas en la comunicación que trascienden la categorización de los subtipos de USVs de 50 kHz y sugiere que podrían existir diferencias en las características sonográficas de las USVs de 50 kHz emitidas por un macho y por una hembra.

Las diferencias mencionadas previamente en la comunicación entre las hembras experimentales y los machos se acentúan al focalizarnos en la comparación de pro-macho y pro-hembra, es decir al comparar la emisión de USVs entre hembras sexualmente activas con una hembra (estímulo social) y con un macho (estímulo sexual). No solo el número de USVs fue significativamente mayor en la interacción pro-macho en relación a pro-hembra, sino

que, aunque la proporción de flat, trills y FM no-trill no difirió entre ambos tipos de díadas, el número de USVs superpuestas fue mayor en la interacción pro-macho (como se discutió anteriormente). Este resultado va en el mismo sentido que el de Burgdorf y colaboradores (2008), quienes evidenciaron que durante la interacción de hembras ovariectomizadas tratadas con E y P y un macho encontraron una mayor proporción de USVs FM en relación a flat. Otro aspecto de la comunicación a través de USVs que difirió en la interacción de hembras sexualmente activas con otra hembra y con un macho, fue la duración de las vocalizaciones flat y trill, esta fue mayor en pro-macho que en pro-hembra. Si bien no sabemos el significado de este cambio en la comunicación, el mismo puede estar asociado a los valores reforzadores del macho y de la hembra y a su comunicación en el contexto sexual. También en este grupo detectamos un tipo de USVs inicialmente no considerado —30 kHz— que no estuvo presente en la interacción entre hembras y estuvo marginalmente presente en las interacciones meta-macho.

La emisión de USVs de 30 kHz fue la mayor diferencia encontrada entre las díadas. Bialy y colaboradores (2019) describieron este tipo de USVs utilizando un modelo de interacción sin contacto físico entre machos con experiencia sexual y hembras ovariectomizadas tratadas con E y P. Dichos autores, atribuyeron este tipo de vocalización al macho y lo asociaron a un estado de alta excitación y frustración, dado que éste tiene experiencia sexual y no puede acceder a la hembra. En la presente pasantía, solo observamos este tipo de vocalización en las interacciones donde el macho estuvo presente, encontrándose una cantidad considerable de estas vocalizaciones durante la interacción pro-macho (cuando la hembra es un estímulo altamente motivante). Si bien nuestro resultado concuerda con lo observado por Bialy y colaboradores (2019), dado que las USVs de 30 kHz se han descrito en un número tan limitado de trabajos, sería necesario un análisis más profundo sobre este tipo de vocalización para poder asociarlas a un estado afectivo determinado.

En síntesis, la descripción detallada de la emisión de USVs durante una interacción sin contacto físico entre hembras en diferente estado reproductivo y un estímulo sexual y social, aporta conocimiento nuevo y relevante sobre la comunicación entre coespecíficos. Cabe señalar que es una temática poco abordada hasta el momento. Las similitudes y diferencias en la comunicación observada entre los diferentes tipos de díadas constituyen una primera aproximación para entender mejor la interacción entre coespecíficos. Es necesario un nivel de análisis más profundo sobre este tema y el uso de diferentes modelos y abordajes con el fin de comprender mejor la interacción entre individuos del mismo sexo y de sexo opuesto.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta pasantía permiten concluir que cuando las hembras están sexualmente activas el estímulo sexual —macho sexualmente activo— tiene mayor valor de incentivo que el estímulo social —hembra no sexualmente activa—, mientras que para las hembras no sexualmente activas ambos estímulos parecen valer lo mismo. Debido a que este resultado contrasta con el encontrado en la prueba de emisión de USVs luego de una breve interacción, como perspectiva de este trabajo se debería implementar el uso de otros modelos o estrategias experimentales que permitan indagar en mayor profundidad en el valor social de los coespecíficos para hembras no-sexualmente activas.

Respecto a la comunicación a través de ultra-vocalizaciones, la proporción similar de los subtipos de USVs de 50 kHz analizadas entre las díadas, sugiere un patrón de emisión de USVs, y por ende, una comunicación similar independientemente del estado reproductivo y el sexo de los individuos. Sin embargo, algunos datos, principalmente asociados a las características sonográficas, sugieren diferencias entre las díadas de hembras —meta-hembra y pro-hembra— y aquellas de hembras y machos —meta-macho y pro-macho—. Estas diferencias señalan particularidades de estas interacciones. Una forma de continuar con este estudio es realizar un análisis más profundo de esta comunicación para identificar otras posibles diferencias. Además, se podría diseñar un modelo que permita registrar las USVs que emite cada individuo por separado durante la interacción, y de esta forma diferenciar los subtipos y las características sonográficas de las USVs de 50 kHz emitidas por cada animal.

Finalmente, el hecho de que las diferencias mencionadas previamente se acentúan en las interacciones sexuales —hembras sexualmente activas y machos—, junto con la identificación de las USVs de 30 kHz, indica que los altos niveles motivacionales de ambos individuos está influyendo en su comunicación. En particular, sería interesante profundizar en el estudio de las USVs de 30 kHz, escasamente estudiadas hasta el momento, para comprender el contexto en el que son emitidas, las características del emisor y el estado emocional al que se asocian.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., Zuluaga, M. J., Uriarte, N., Pereira, M., & Ferreira, A. (2005). Compulsive-like behaviour according to the sex and the reproductive stage of female rats. *Behavioural brain research*, 161(2), 313-319.
- Agrati, D., Machado, L., Delgado, H., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., & Ferreira, A. (2019). Sexual behaviour of the female rat during late adolescence: effect of chronic cocaine treatment. *Behavioural pharmacology*, 30(5), 396-404.
- Armas, M., Marín, G., Uriarte, N., & Agrati, D. (2021). Increase in sexual motivation throughout adolescence in the cycling female rat. *Developmental Psychobiology*, 63(6), e22162.
- Armas, M. (2019). Patrón de emisión de ultravocalizaciones de ratas hembras frente a un macho como índice de su motivación sexual: de la adolescencia a la adultez.
- Avitsur, R., & Yirmiya, R. (1999). The partner preference paradigm: a method to study sexual motivation and performance of female rats. *Brain Research Protocols*, 3(3), 320-325.
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., & McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *American Zoologist*, 19(2), 469-480.
- Barth, C., Villringer, A., & Sacher, J. (2015). Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience*, 9, 37.
- Beach, F. A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and behavior*, 7(1), 105-138.
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., & Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol. Exp*, 79, 1-12.
- Bialy, M., Rydz, M., & Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behavioral neuroscience*, 114(5), 983.
- Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine–dopamine interaction and acoustic coding. *Behavioural brain research*, 182(2), 261-273.
- 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.
- Burgdorf, J., Panksepp, J., & Moskal, J. R. (2011). Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1831-1836.
- Burke, C. J., Kisko, T. M., Swiftwolfe, H., Pellis, S. M., & Euston, D. R. (2017). Specific 50-kHz vocalizations are tightly linked to particular types of behavior in juvenile rats anticipating play. *PLoS One*, 12(5), e0175841.
- Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*, 48(1), A-41.
- Chari, T., Griswold, S., Andrews, N. A., & Fagiolini, M. (2020). The stage of the estrus cycle is

- critical for interpretation of female mouse social interaction behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 113.
- 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.
- Daniel, J. M., Fader, A. J., Spencer, A. L., & Dohanich, G. P. (1997). Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Hormones and behavior*, 32(3), 217-225.
- Drewett, R. F. (1973). Sexual behaviour and sexual motivation in the female rat. *Nature*, 242(5398), 476-477.
- Eliasson, M., & Meyerson, B. J. (1975). Sexual preference in female rats during estrous cycle, pregnancy and lactation. *Physiology & behavior*, 14(6), 705-710.
- El-Bakri, N. K., Islam, A., Zhu, S., Elhassan, A., Mohammed, A., Winblad, B., & Adem, A. (2004). Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(4), 537-544.
- Fernández-Guasti, A., Agrati, D., Reyes, R., & Ferreira, A. (2006). Ovarian steroids counteract serotonergic drugs actions in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 31(8), 924-934.
- Ferreño, M., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Ferreira, A., & Agrati, D. (2018). Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats. *Physiology & behavior*, 188, 134-139.
- French, D., Fitzpatrick, D., & Law, O. T. (1972). Operant investigation of mating preference in female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(2), 226.
- Garcia, A. N., Bezner, K., Depena, C., Yin, W., & Gore, A. C. (2017). The effects of long-term estradiol treatment on social behavior and gene expression in adult female rats. *Hormones and behavior*, 87, 145-154.
- Gibbons, J. D., & Chakraborti, S. (2020). *Nonparametric statistical inference*. CRC press.
- Kentrop, J., Kalamari, A., Danesi, C. H., Kentrop, J. J., van IJzendoorn, M. H., Bakermans-Kranenburg, M. J., ... & van der Veen, R. (2020). Pro-social preference in an automated operant two-choice reward task under different housing conditions: Exploratory studies on pro-social decision making. *Developmental cognitive neuroscience*, 45, 100827.
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological bulletin*, 128(6), 961.
- Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (1199-1257). Elsevier.
- López, H. H., Webb, S. A., & Nash, S. (2009). Cannabinoid receptor antagonism increases female sexual motivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(1), 17-24.
- Lukas, M., & Neumann, I. D. (2014). Social preference and maternal defeat-induced social avoidance in virgin female rats: sex differences in involvement of brain oxytocin and vasopressin. *Journal of neuroscience methods*, 234, 101-107.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & behavior*, 74(4-5), 435-440.
- 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.

- McGinnis, M. Y., & Vakulenko, M. (2003). Characterization of 50-kHz ultrasonic vocalizations in male and female rats. *Physiology & behavior*, 80(1), 81-88.
- Moles, A., Costantini, F., Garbugino, L., Zanettini, C., & D'Amato, F. R. (2007). Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability?. *Behavioural brain research*, 182(2), 223-230.
- Mulvihill, K. G., & Brudzynski, S. M. (2018). Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiology & behavior*, 196, 200-207.
- Niesink, R. J., & Van Ree, J. M. (1982). Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric analysis. *Physiology & behavior*, 29(5), 819-825.
- Nofrey, B., Rocha, B., Lopez, H. H., & Ettenberg, A. (2008). The effects of sexual experience and estrus on male-seeking motivated behavior in the female rat. *Physiology & behavior*, 95(3), 533-538.
- Picazo, O., & Fernández-Guasti, A. (1993). Changes in experimental anxiety during pregnancy and lactation. *Physiology & behavior*, 54(2), 295-299.
- Rudzinkas, S. A., Williams, K. M., Mong, J. A., & Holder, M. K. (2019). Sex, drugs, and the medial amygdala: A model of enhanced sexual motivation in the female rat. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 203.
- Thomas, D. A., & Barfield, R. J. (1985). Ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) during mating. *Animal Behaviour*, 33(3), 720-725.
- Vedder, L. C., Smith, C. C., Flannigan, A. E., & McMahon, L. L. (2013). Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus*, 23(1), 108-115.
- 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.
- Walf, A. A., Rhodes, M. E., & Frye, C. A. (2006). Ovarian steroids enhance object recognition in naturally cycling and ovariectomized, hormone-primed rats. *Neurobiology of learning and memory*, 86(1), 35-46.
- White, N. R., Colona, L. C., & Barfield, R. J. (1991). Sensory cues that elicit ultrasonic vocalizations in female rats (*Rattus norvegicus*). *Behavioral and neural biology*, 55(2), 154-165.
- Wöhr, M. (2018). Ultrasonic communication in rats: appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 72(1), 14.
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2008). Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: no evidence for an audience effect. *Animal Behaviour*, 76(3), 749-760.
- Wright, J. M., Gourdon, J. C., & Clarke, P. B. (2010). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 211(1), 1-13.
- Zuluaga, M. J., Agrati, D., Pereira, M., Uriarte, N., Fernandez-Guasti, A., & Ferreira, A. (2005). Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiology & behavior*, 84(2), 279-286.

