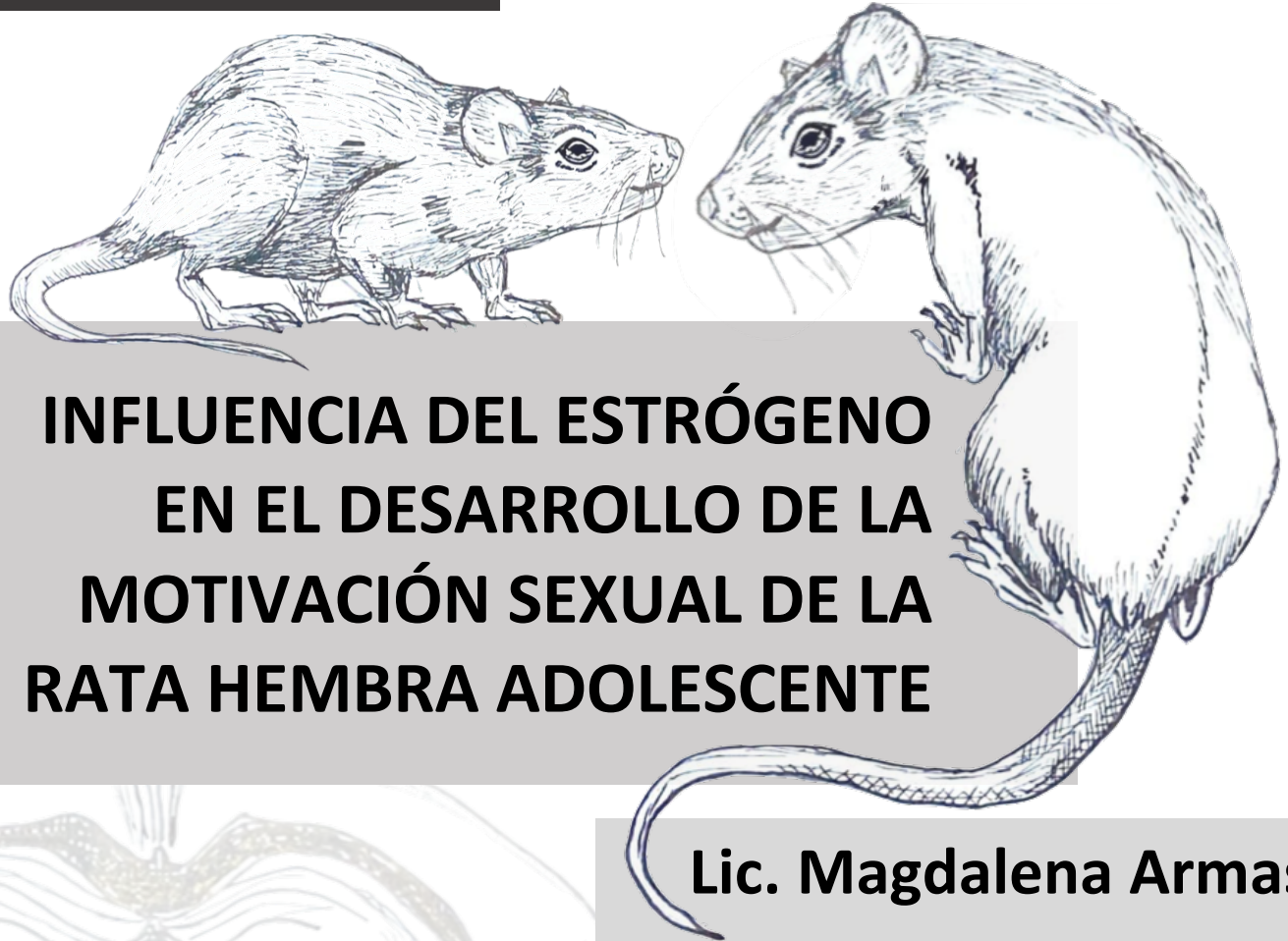


Tesis de Maestría
PEDECIBA
Ciencias Biológicas
sub-área Neurociencias



**INFLUENCIA DEL ESTRÓGENO
EN EL DESARROLLO DE LA
MOTIVACIÓN SEXUAL DE LA
RATA HEMBRA ADOLESCENTE**

Lic. Magdalena Armas

Dra. Daniella Agrati – Orientadora

Sección Fisiología y Nutrición

Laboratorio de Experimentación Animal

Dra. Gabriela Bedó – Co-orientadora

Sección Genética Evolutiva



ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
MARCO GENERAL DE LA TESIS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
ANTECEDENTES	9
Comportamiento sexual en la rata hembra	9
Adolescencia	10
Comportamiento y motivación sexual durante la adolescencia	12
Circuito neural de regulación del comportamiento y la motivación sexual	13
Efecto activacional de los esteroides gonadales sobre el circuito sexual	16
Sensibilización comportamental a estrógenos	19
Bases neuroendocrinas del comportamiento sexual durante la adolescencia	20
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA E HIPÓTESIS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	24
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL	25
CAPÍTULO 1: MOTIVACIÓN SEXUAL A LO LARGO DE LA ADOLESCENCIA Y LA ADULTEZ	37
CAPÍTULO 2: EXPRESIÓN CEREBRAL DE ER- α A LO LARGO DE LA ADOLESCENCIA Y EN LA ADULTEZ	41
CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A ESTRADIOL DURANTE LA ADOLESCENCIA MEDIA EN LA MOTIVACIÓN SEXUAL Y EN LA EXPRESIÓN DE ER- α EN MPOA	45
DISCUSIÓN	55
Aumento de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia	55
Aumento de la motivación sexual durante la adolescencia media por la exposición repetida a estradiol	56
¿Sensibilización comportamental al estradiol?	57
¿Podría la exposición repetida a estrógenos que ocurre luego de la pubertad mediar el aumento natural de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia?	58
Cambios en la expresión cerebral de ER- α en el mPOA entre la adolescencia y la adultez	60
Expresión de ER- α en mPOA luego de la exposición repetida a estradiol durante la adolescencia media	62
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66

ABREVIATURAS

Amígdala MePD: Amígdala medial Posterodorsal

Arc: Núcleo Arcuato del Hipotálamo

ER: Receptor de estrógeno

ER- α : Receptor de estrógeno alfa

ER- β : Receptor de estrógeno beta

ERE: Elemento de respuesta al estrógeno

LQ: Cociente de lordosis

mPOA: Área pre-óptica media

NAcc: Núcleo Accumbens

PR: Receptor de progesterona

RIC: Rango intercuartil

USV: Vocalizaciones ultrasónicas

VMNvl: Región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo

VTA: Área Tegmental Ventral

MARCO GENERAL DE LA TESIS

La presente tesis de Maestría constituye el primer reporte en el marco de un proyecto de investigación que pretende evaluar las bases neuroendócrinas que subyacen al desarrollo de la motivación sexual de la rata hembra a lo largo de la adolescencia (CSIC I+D 2020: *Aumento de la motivación sexual de la rata hembra durante la adolescencia: incremento de la sensibilidad a estrógenos como posible mecanismo responsable*). A su vez, representa una continuación de mi Trabajo final de grado, que sugiere un aumento de la motivación sexual de la rata hembra a lo largo de la adolescencia. Tales resultados, así como parte de los reportados en la presente tesis (Capítulo 1), forman parte de un manuscrito recientemente publicado en la revista *Developmental Psychobiology* (Armas, Marín, Uriarte, & Agrati, 2021).

A pesar de que la adolescencia consiste en una fase del desarrollo en la que ocurren numerosos cambios cerebrales, endócrinos y comportamentales, aquellos relativos a la conducta reproductiva femenina han sido pobremente estudiados. Considerando que nuestra línea de investigación reporta por primera vez variaciones en la motivación sexual a lo largo de la adolescencia en la rata hembra ciclante, resulta relevante estudiar la interacción entre factores neurales y endócrinos que puedan brindar una explicación a los mecanismos que subyacen a estos cambios. Sin embargo, la literatura científica sobre el desarrollo de la motivación sexual es escasa, y los efectos de esteroides gonadales sobre el sistema nervioso durante la adolescencia son variados, por lo que los posibles mecanismos a estudiar son múltiples y diversos. Uniendo cabos entre la evidencia existente, la presente tesis explora la posibilidad de que a lo largo de la adolescencia se desarrolle una respuesta comportamental diferencial a los esteroides ováricos modulada por la maduración de determinados circuitos neurales como consecuencia de la exposición repetida a estrógenos que comienza en etapas tempranas de este período. Es relevante enfatizar que en el presente trabajo se pone a prueba una de las múltiples posibilidades y que, para lograr una comprensión completa del desarrollo de la motivación sexual en este período complejo, aún queda un largo camino por recorrer.

RESUMEN

El comportamiento sexual de la rata hembra comienza a expresarse durante la adolescencia media, pero resultados previos sugieren que la motivación sexual no se encuentra madura en esta etapa. Debido a que la expresión de este comportamiento es dependiente de la acción del estrógeno actuando sobre el receptor de estrógeno α (ER- α) en ciertas estructuras cerebrales, variaciones en la expresión de este receptor podrían mediar la maduración de este comportamiento durante la adolescencia. A su vez, se ha demostrado que los efectos conductuales de la administración exógena repetida de estrógeno se sensibilizan con sucesivas exposiciones; y se ha propuesto que luego de la pubertad podría desarrollarse una sensibilidad comportamental al estrógeno, pero los mecanismos se desconocen. En base a esta evidencia, se propone que la motivación sexual aumenta a lo largo de la adolescencia como consecuencia de un proceso madurativo del circuito cerebral que la regula, el cual involucra un aumento en la expresión de ER- α , y está mediado por la exposición repetida a picos pre-ovulatorios de estrógenos que comienza durante la adolescencia media.

Con el objetivo de determinar el curso de la motivación sexual de hembras ciclantes desde la adolescencia -media y tardía- a la etapa adulta, se comparó su comportamiento en un modelo de preferencia macho vs. hembra, ampliamente validado. Los resultados obtenidos refuerzan resultados anteriores e indican que la motivación sexual no se encuentra completamente madura en la adolescencia media, sino que aumenta de la adolescencia media a la tardía, cuando alcanza los niveles de la adultez.

En una segunda instancia, para caracterizar la expresión de ER- α a lo largo de la adolescencia en regiones claves del circuito cerebral que regula el comportamiento sexual, se cuantificó mediante inmunohistoquímica el número de células ER- α^+ en el Área pre-óptica media (mPOA), la porción ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMNvl), el Núcleo Arcuato (Arc) y la Amígdala Medial Posterodorsal (MePD) de hembras ciclantes en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas durante el período de actividad sexual. Como segunda aproximación, la expresión de ER- α en mPOA y VMNvl se cuantificó mediante Western Blot. Se observó que la expresión de ER- α en mPOA, pero no en las demás regiones, disminuye entre la adolescencia tardía y la adultez y es intermedia en la adolescencia media, indicando que esta área clave en la regulación de la motivación sexual se encuentra aún en proceso de maduración durante la adolescencia.

Finalmente, para probar si una mayor exposición a estrógenos durante la adolescencia media aumenta la motivación sexual y modula la expresión cerebral de ER- α , hembras ciclantes tratadas con estradiol o aceite luego de la apertura vaginal (3 dosis diarias consecutivas de 2,5 μ g/rata) fueron probadas

en la adolescencia media en una prueba de preferencia macho-hembra y en una prueba de interacción sexual, y se cuantificaron los niveles de expresión de ER- α en mPOA mediante Western Blot. El tratamiento con estradiol durante la adolescencia media aumentó la motivación sexual, la atraktividad y el despliegue de comportamientos proceptivos, igualando lo observado en hembras en adolescencia tardía. Sin embargo, este tratamiento no modificó la expresión de ER- α en mPOA.

En conclusión, la presente tesis muestra que la adolescencia de la rata hembra es un período de maduración de la motivación sexual y del circuito cerebral que la regula. A su vez, los resultados obtenidos sugieren que la exposición a picos estrogénicos durante la adolescencia media juega un rol importante en tal maduración, posiblemente mediante una sensibilización comportamental al efecto de esteroides gonadales que ocurre por un mecanismo independiente a variaciones en los niveles de expresión de ER- α en mPOA.

PALABRAS CLAVE: motivación sexual, rata hembra, adolescencia, receptor de estrógeno alfa, estrógeno, Área pre-óptica media.

ABSTRACT

Sexual behavior in the female rat is first displayed during mid-adolescence, but according to previous results from our lab sexual motivation is not yet fully mature at this developmental stage. Given that the expression of sexual behavior depends on estrogen acting on estrogen receptor alpha (ER- α) in certain brain structures, differences in the expression of this receptor could mediate the maturation of this behavior throughout adolescence. Furthermore, it has been shown that the behavioral effects of a repeated administration of estrogen sensitize with successive exposures; and it has been proposed that after puberty a behavioral sensitization to estrogen takes place, but the mechanisms that underly this are unknown. Based on this evidence, we propose that sexual motivation increases throughout adolescence as a consequence of the maturation of the neural circuits that regulate this behavior, which involves an increase in ER- α expression and is mediated by the repeated exposure to pre-ovulatory estrogen peaks that starts during mid-adolescence.

To determine the development of sexual motivation in naturally cycling female rats from adolescence -mid and late- to adulthood, the behavior of these females in the male vs. female preference test, a validated model for the assessment of sexual motivation, was compared. The results obtained support previous studies and show that sexual motivation is not fully mature by mid-adolescence, but rather that it increases from mid to late adolescence, when it reaches adult-like levels.

With the aim of characterizing the expression of ER- α throughout adolescence in key brain areas that modulate the expression of sexual behavior, the number of ER- α ⁺ cells in the medial pre-optic Area (mPOA), the ventrolateral division of the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus (vlVMN), the Arcuate Nucleus (ARC), and the medial Posterodorsal Amygdala were quantified through immunohistochemistry and compared between mid-adolescent, late adolescent and adult naturally cycling females during the period of sexual activity. As a second approach, the expression of ER- α in the mPOA and vlVMN was measured through Western Blot. Results show that ER- α expression in the mPOA, but not in the other regions, decreases from late adolescence to adulthood and is intermediate in mid-adolescence, indicating that this brain region, that plays a fundamental role in the regulation of sexual motivation, undergoes a maturation process throughout adolescence.

Finally, to evaluate if a higher number of exposures to estrogen during mid-adolescence increases sexual motivation and modulates ER- α expression, cycling females treated with estrogen or vehicle after vaginal opening (3 doses of 2,5 μ g/rat) were tested during mid-adolescence in a male/female preference test and a sexual interaction test, and ER- α expression in the mPOA was quantified through Western Blot. The estrogenic treatment during mid-adolescence increased sexual motivation, attractivity and the

display of proceptive behavior, to match those observed during late adolescence. However, the treatment did not modify the expression of ER- α in the mPOA.

All in all, this thesis shows that, during the adolescent period of the female rat, sexual motivation and the neural circuit that regulate it are still in maturation. Furthermore, results obtained suggest that the exposure to estrogenic peaks in mid-adolescence plays an important role in this maturation process, possibly by causing a behavioral sensitization to the effects of gonadal hormones that occurs by a mechanism that is independent to variations in ER- α expression in the mPOA.

ANTECEDENTES

Comportamiento sexual en la rata hembra

Desde el año 1976 (Beach, 1976), el comportamiento sexual femenino se estudia mediante análisis de diferentes componentes que reflejan la atractividad, proceptividad y receptividad de la hembra. La atractividad se refleja en aquellos comportamientos por parte del macho que dan cuenta del valor de incentivo sexual de una hembra, y que puede estar mediado por señales activas o pasivas de la misma, mientras que la proceptividad refiere a comportamientos voluntarios de la hembra que reflejan el valor de incentivo sexual del macho para ésta. Por último, la receptividad hace referencia a los comportamientos ejecutados por la hembra en respuesta a la estimulación del macho que son suficientes y necesarias para una cópula exitosa (Beach, 1976). En la rata, la interacción sexual comienza con una exploración mutua mediante olfateo anogenital, seguida por el despliegue de comportamientos proceptivos que ocurren de manera espontánea antes y entre montas (Blaustein & Erskine, 2002) y aumentan la probabilidad de la ejecución del comportamiento sexual por parte del macho (Erskine, 1989). Frente a la monta, una hembra sexualmente receptiva responde con una postura de lordosis (arqueo de la espalda de forma cóncava que expone la región genital hacia el macho) que permite la intromisión. Esta secuencia se repite hasta que ocurre la eyaculación, la cual es seguida por un período refractario de ausencia de actividad sexual (Blaustein & Erskine, 2002; Pfaus, Jones, Flanagan-Cato, & Blaustein, 2015; Yang & Clemens, 1996).

La rata hembra se encuentra sexualmente activa en la fase de proestro tardío-estro temprano del ciclo estral. Este ciclo tiene una duración total de 4 a 5 días y se divide en 4 etapas que difieren en su perfil hormonal (Figura 1), reflejándose en la citología vaginal y expresión comportamental (Pfaus et al., 2015). Durante la fase de proestro ocurren picos pre-ovulatorios secuenciales de estrógeno y progesterona gonadales (Figura 1), que son necesarios para el despliegue del

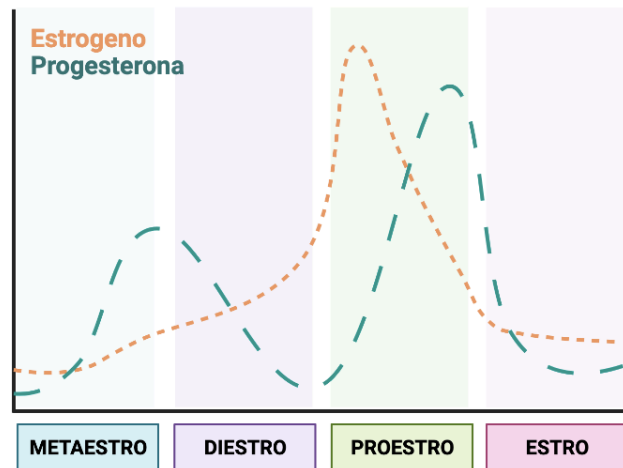


Figura 1. Fluctuaciones de los niveles de estrógeno y progesterona en plasma a lo largo del ciclo estral de la rata hembra. Las diferentes fases del ciclo se representan en los cuadros inferiores.

Estrógeno: líneas punteadas, anaranjadas
Progesterona: líneas entrecortadas, verdes.
Esquema adaptado de Pfaus et al. (2015)

comportamiento sexual (Beach, Etkin, & Rasquin, 1942; Pfaff, 1970; Snoeren, 2018; Sodersten & Eneroth, 1981).

El comportamiento sexual es un comportamiento motivado

Más allá de la expresión de un patrón comportamental específico durante la cópula, las hembras realizan comportamientos voluntarios y flexibles en la búsqueda activa de interacción con un macho, que reflejan la base motivacional de su comportamiento sexual. El valor de incentivo sexual (valor motivacional) de un macho para un hembra ha sido ampliamente estudiado mediante el análisis del despliegue de componentes proceptivos durante la interacción sexual (Agrati, Fernández-Guasti, Ferreño, & Ferreira, 2011; Pfaus, Smith, Byrne, & Stephens, 2000; Södersten, 1975). Sin embargo, debido al carácter complejo de la motivación sexual, la cual puede definirse como el *mecanismo que activa, dirige y causa persistencia en los comportamientos dirigidos hacia un incentivo sexual* (Ågmo, 2014), se ha propuesto que para lograr una comprensión completa, la misma debe estudiarse utilizando pruebas motivacionales específicas, que no impliquen la ejecución del comportamiento sexual en sí, y en más de una prueba, ya que diferentes modelos pueden reflejar diferentes aspectos del estado motivacional de las hembras (Blaustein & Erskine, 2002). Así, se evidenció el carácter altamente motivado del comportamiento sexual en la rata hembra (Ventura-Aquino & Paredes, 2017) quien, cuando se encuentra sexualmente activa, prefiere un estímulo sexual en una prueba de preferencia entre un macho y una hembra (Agrati, Fernández-Guasti, & Ferreira, 2008; Clark, Kelton, Guarraci, & Clyons, 2004) y aprieta repetidamente una palanca (French, Fitzpatrick, & Law, 1972) o cruza una barrera electrificada para acceder a un macho (McDonald & Meyerson, 1973).

A pesar de que los estudios de comportamiento y motivación sexual se han enfocado principalmente en hembras adultas ovariectomizadas con comportamiento sexual inducido por tratamiento hormonal, en las hembras ciclantes el comportamiento sexual comienza a expresarse de forma natural durante la adolescencia, cuando ocurre el primer ciclo estral (Hansen, 1977; Hashizume & Ohashi, 1984; Meaney & Stewart, 1981).

Adolescencia

La adolescencia es un período de cambios

El primer ciclo estral en la rata hembra coincide con la apertura vaginal, la cual ocurre durante la adolescencia, aproximadamente entre los 35 y los 37 días de vida (Södersten, 1975; Vandenbergh, 1976;

Vetter-O'Hagen & Spear, 2012). La adolescencia puede definirse como el periodo de transición asociado a la pubertad donde ocurren un amplio conjunto de eventos mediante los cuales el individuo transita desde la infancia a la adultez adquiriendo, por ejemplo, los comportamientos sociales y cognitivos propios del individuo adulto. La pubertad, por otra parte, refiere a la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal por la cual ocurre la transición desde un individuo no reproductivo a un individuo reproductivamente competente (Holder & Blaustein, 2014; Sisk & Foster, 2004; Spear, 2000). A pesar de que no existen consensos con respecto a límites temporales absolutos que determinen el periodo de la adolescencia en la rata hembra (Spear, 2000), una clasificación usualmente utilizada la ubica entre los 21 días de vida (cuando ocurre el destete) y los días 60 de vida (cuando comienza la adultez) (Holder & Blaustein, 2014; Tirelli, Laviola, & Adriani, 2003). Este período presenta un patrón comportamental característico que incluye mayor exploración social y conducta de juego (Agrati et al., 2018; Panksepp, 1981; Thor & Holloway, 1984), mayor emisión de ultravocalizaciones (USV) luego de interactuar con un estímulo social (Armas et al., 2021), menor inhibición conductual y mayor frecuencia de comportamientos de búsqueda y riesgo en comparación a la etapa adulta (Doremus-Fitzwater, Varlinskaya, & Spear, 2010; Holder & Blaustein, 2014; Spear, 2000).

Este perfil conductual particular se relaciona con cambios propios del proceso de maduración de circuitos neurales implicados en el procesamiento cognitivo, emocional y motivacional (Schulz & Sisk, 2016; Sisk & Zehr, 2005; Spear, 2000). Por ejemplo, el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico de recompensa se encuentra aún en proceso de maduración durante la adolescencia (Andersen, Thompson, Rutstein, Hostetter, & Teicher, 2000; Teicher, Andersen, & Hostetter, 1995), y se ha postulado que existe una hipersensibilidad de este circuito hacia la recompensa (Simon & Moghaddam, 2015; Walker et al., 2017) que parece variar a lo largo de la adolescencia, siendo mayor durante las etapas finales de la misma (Friemel, Spanagel, & Schneider, 2010).

La adolescencia no es un período homogéneo

La adolescencia en la rata puede subdividirse en diferentes estadios, en función del grado de maduración o desarrollo del sistema nervioso y del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, denominados adolescencia temprana (21 a 34 días de vida), adolescencia media (34 a 46 días de vida) y adolescencia tardía (46 a 59 días de vida) (Holder & Blaustein, 2014; Lynn & Brown, 2010; Tirelli et al., 2003). El comportamiento de los individuos difiere en estas etapas de la adolescencia. En este sentido, durante la adolescencia tardía existe mayor conducta exploratoria de ambientes nuevos (Lynn & Brown, 2010), mientras que durante la adolescencia media las ratas exhiben más conducta de juego (Panksepp, 1981) y

exploración social (Armas et al., 2021; Klein, Padow, & Romeo, 2010). Estos resultados, junto con otros (Friemel et al., 2010; Varlinskaya & Spear, 2006), sugieren que la adolescencia no es un período homogéneo. Esto es cierto, también, para estudios sobre el desarrollo del comportamiento sexual, dado que la expresión de este comportamiento parece variar a lo largo de la adolescencia.

Comportamiento y motivación sexual durante la adolescencia

Dado que la mayor parte de los estudios sobre comportamiento y motivación sexual se centran en hembras adultas, conocemos poco acerca de las dinámicas de su desarrollo (Bell, 2018). Este comportamiento es expresado por primera vez durante la adolescencia media, cuando ratas hembra alojadas junto a machos comienzan a expresar *earwiggling* (conducta proceptiva) y lordosis en respuesta a la monta (Meaney & Stewart, 1981). Tal despliegue del comportamiento sexual parece ser completo desde el comienzo, dado que estudios previos evidencian que hembras en adolescencia media y tardía naturalmente ciclantes son capaces de expresar el repertorio completo del comportamiento sexual adulto durante la interacción con un macho, incluyendo tanto los componentes proceptivos como los receptivos del mismo (Agrati et al., 2018; Armas et al., 2021).

En línea con estos hallazgos, utilizando pruebas comportamentales específicas de evaluación de la motivación sexual, se observó que hembras ciclantes en adolescencia tardía presentan una fuerte preferencia por el macho en una prueba de preferencia macho/hembra, sin diferenciar su comportamiento del de ratas adultas (Agrati et al., 2018). Por otra parte, utilizando una prueba de emisión de USV luego de una breve interacción sin contacto directo con un estímulo social (hembra adulta no receptiva) o un estímulo sexual (macho) (McGinnis & Vakulenko, 2003), obtuvimos resultados similares. Hembras ciclantes en adolescencia tardía, cuando se encuentran sexualmente activas, emiten un mayor número de USV de 50kHz luego de interactuar con el estímulo sexual en comparación al estímulo social, al igual que hembras adultas (Armas et al., 2021), lo cual sugiere un mayor valor de incentivo de un macho en comparación al de una hembra (McGinnis & Vakulenko, 2003). En conjunto, estos resultados indican que hembras en adolescencia tardía y adultas no se diferencian en su motivación sexual.

¿Madura la motivación sexual a lo largo de la adolescencia?

A diferencia de hembras en adolescencia tardía y adultas, hembras ciclantes en adolescencia media no emiten un mayor número de USV de 50 kHz luego de interactuar con un estímulo sexual en comparación a un estímulo social (Armas et al., 2021) lo cual sugiere una menor motivación sexual en esta

etapa del desarrollo en comparación a etapas posteriores (Figura 2). Esta menor motivación parecería ser específicamente sexual, dado que estas mismas hembras muestran mayor exploración social y juego cuando interactúan con una rata hembra adulta (Armas et al., 2021), resultados en línea con estudios previos que reportan que la interacción y la motivación social están aumentadas en etapas tempranas de la adolescencia (Douglas, Varlinskaya, & Spear, 2004; Klein et al., 2010; Panksepp, 1981).

De todas maneras, el hecho de que ratas en adolescencia media no difieran en el número de USV que emiten luego de interactuar con un macho o una hembra podría deberse a una motivación social aumentada, y no una menor motivación sexual. Por este motivo, es necesario utilizar pruebas motivacionales adicionales que confirmen si la motivación sexual es menor durante este período.

Resultaría interesante evaluar cómo es el comportamiento de hembras en adolescencia media en una prueba de preferencia macho/hembra, ya que esta prueba está ampliamente validada como modelo para evaluar motivación sexual y fue previamente utilizada en hembras en adolescencia tardía (Figura 2) (Ågmo, Turi, Ellingsen, & Kaspersen, 2004; Agrati et al., 2018; Clark et al., 2004).

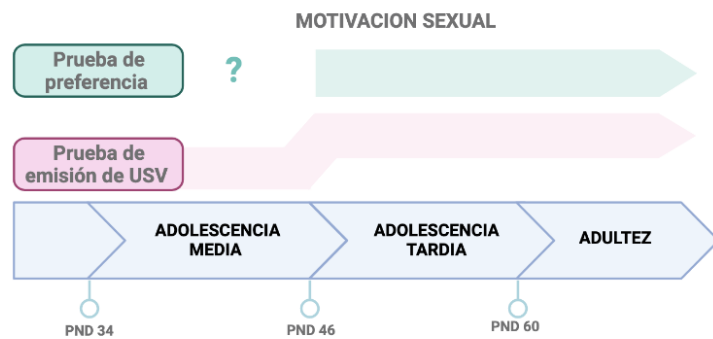


Figura 2. Representación gráfica del desarrollo de la motivación sexual durante la adolescencia y la adultez. Se representan los resultados obtenidos mediante una prueba de preferencia de hembras en adolescencia tardía y adultas (Agrati et al., 2018) y utilizando una prueba de emisión de ultravocalizaciones en hembras en adolescencia media, tardía y adultas (Armas et al., 2021).

Circuito neural de regulación del comportamiento y la motivación sexual

De manera similar a lo que ocurre con los estudios comportamentales, el circuito cerebral encargado de regular la expresión del comportamiento sexual ha sido estudiado predominantemente en individuos adultos, por lo que desconocemos las bases neuroendócrinas que subyacen el desarrollo de este comportamiento durante la adolescencia.

Definir las regiones, sus respectivas conexiones y las variables que modulan la actividad del circuito cerebral que regula el comportamiento sexual en roedores no es una tarea fácil, principalmente debido a dos razones: 1) las regiones cerebrales involucradas en la regulación del comportamiento sexual también están involucradas en otros comportamientos sociales (como el comportamiento maternal y la

agresión), formando parte de lo que ha postulado como la “red del comportamiento social” (Newman, 1999); y 2) tales regiones están estrechamente interconectadas de forma recíproca entre sí (Jennings & de Lecea, 2020). Estos dos aspectos llevan a que el establecimiento de una secuencia lineal de conexiones y de las dinámicas de regulación entre las regiones cerebrales que modulan el comportamiento sexual sea particularmente complejo (Snoeren, 2018).

En la Figura 3 se representan las principales regiones cerebrales involucradas en la regulación del comportamiento sexual femenino en roedores. Entre éstas se encuentra la Amígdala Medial (MeA) en su región posterodorsal (MePD). Esta región es el destino principal de proyecciones del sistema olfativo accesorio, inerva múltiples regiones cerebrales del circuito sexual (Figura 3) y está implicada en el procesamiento olfatorio de claves sexuales. Esta región cerebral se activa durante la cópula y frente a la exposición a feromonas del individuos del sexo opuesto, y su inactivación modifica la preferencia por un sitio condicionado por un estímulo sexual (García-Horsman, Ágmo, & Paredes, 2008; Jennings & de Lecea, 2020).

Especialmente importante en la regulación de la expresión del comportamiento sexual femenino, tanto de los componentes proceptivos como receptivos, es la región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMNvl) (Clark, Pfeifle, & Edwards, 1981; Spiteri et al., 2010). Esta región se considera el nodo de salida de la respuesta receptiva del circuito hipotalámico formado por el Núcleo Arcuato (Arc), el Área pre-óptica media (mPOA) y el VMNvl (Figura 4), porque tiene un rol fundamental en la expresión de lordosis (Inoue et al., 2019; P. Micevych & Meisel, 2017; P. Micevych & Sinchak, 2018). En este sentido, el VMNvl proyecta a centros inferiores que conducen a la activación de las motoneuronas espinales encargadas de la contracción muscular responsable de la postura de lordosis (Pfaff, Kow, Loose, & Flanagan-Cato, 2008).

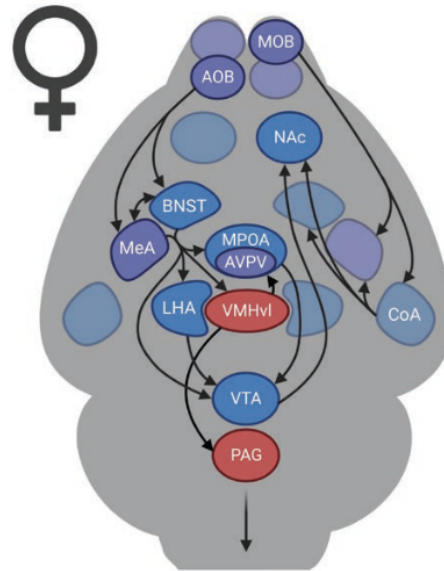


Figura 3. Representación esquemática de las regiones cerebrales involucradas en la regulación de la expresión del comportamiento sexual del roedor y sus principales conexiones, vista dorsal. AOB: bulbo olfatorio accesorio; MOB: bulbo olfatorio principal; BNST: Bed Nucleus de la Stria Terminalis; MeA: Amígdala medial; LHA: hipotálamo lateral; VMHvl: región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo; AVPV: Núcleo Periventricular Anteroventral; mPOA: Área pre-óptica media; VTA: Área Tegmental Ventral; PAG: Sustancia gris periacueductal. Esquema extraído de Jennings & DeLecea (2020)

coordinados con el estado reproductivo de la hembra. Las hormonas ováricas, actuando sobre sus receptores en el circuito hipotalámico juegan un papel fundamental en esta coordinación (Pfaus et al., 2015; Snoeren, 2018).

Efecto activacional de los esteroides gonadales sobre el circuito sexual

La interacción entre los sistemas endócrino y nervioso permite la coordinación del despliegue del comportamiento sexual con la ovulación, asegurando una cópula fértil. En este sentido, el comportamiento sexual es inducido por los picos pre-ovulatorios de estrógeno y progesterona que actúan sobre las diferentes regiones cerebrales involucradas en el comportamiento sexual, las cuales se caracterizan por presentar altos niveles de expresión de receptores de estrógeno (ER) y de progesterona (PR) (Parsons, Rainbow, MacLusky, & McEwen, 1982; Rainbow, Parsons, MacLusky, & McEwen, 1982; Shughrue, Lane, & Merchenthaler, 1997). La acción del estrógeno sobre sus receptores es necesaria para inducir el comportamiento sexual tanto en hembras naturalmente ciclantes como en hembras ovariectomizadas con comportamiento sexual inducido. Cuando el estrógeno se administra de forma exógena en baja concentración (o cuando se trata de picos de estrógeno endógeno en hembras ciclantes), se requiere la posterior acción de la progesterona para el completo despliegue del comportamiento sexual, pero la receptividad puede ser inducida únicamente con estrógeno administrado de forma exógena en altas concentraciones (por revisión acerca de diferentes tratamientos referirse a: Micevych & Sinchak, 2013).

Se han caracterizado diferentes tipos de receptores de estrógeno

Se han caracterizado dos tipos principales de receptores nucleares de estrógeno: el receptor de estrógeno α (ER- α) y el receptor de estrógeno β (ER- β) (McEwen & Alves, 1999). Estos son receptores nucleares de tipo 1, los cuales frente a la unión al estradiol, actúan como factores de transcripción mediante su unión a secuencias genómicas denominadas “elementos de respuesta de estrógeno” (ERE) (Klinge, 2001). Este efecto se denomina efecto genómico y se caracteriza por un retardo en su comienzo y por su perduración en el tiempo (McEwen, 2019). Uno de los efectos genómicos relevantes de ER- α en la regulación del comportamiento sexual es el de promover la expresión de PR (Harris, Katzenellenbogen, & Katzenellenbogen, 2002; Sá, Pereira, Malikov, & Madeira, 2013), necesaria para que la progesterona

sea efectiva en la inducción de este comportamiento (Shaila K. Mani, Reyna, Jian, Mulac-Jericevic, & Conneely, 2006; Parsons, Maclusky, Krey, Pfaff, & McEwen, 1980).

De todas maneras, de forma reciente, se ha propuesto que la regulación del comportamiento sexual por parte del estrógeno también se lleva a cabo mediante efectos no-genómicos basados en modificaciones en la señalización intracelular (P. Micevych & Sinchak, 2013, 2018), los cuales comienzan rápidamente y tienen corta duración (McEwen, 2019). Estos efectos ocurren mediante receptores asociados a la membrana celular. Aunque se han descrito diversos receptores de estrógeno de membrana (ER-X, receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) y el receptor de estrógeno de membrana activado por STX (Gq-mER) (P. Micevych & Sinchak, 2013, 2018)), los receptores clásicos, ER- α y ER- β , también pueden actuar como receptores de membrana mediante su asociación con receptores de membrana clásicos, como receptores metabotrópicos de glutamato o el factor de crecimiento insulínico (P. Micevych & Dewing, 2011). La unión del estrógeno sobre los receptores de membrana causa la activación de mecanismos rápidos de señalización intracelular y cascadas de fosforilación de otras proteínas y factores de transcripción (Levin, 2018).

Importancia de la expresión cerebral de ER- α para el comportamiento y la motivación sexual

La existencia de múltiples ER, cada uno con diferentes isoformas, dificulta el estudio de los efectos del estrógeno sobre el comportamiento sexual. A pesar de que diferentes tipos de ER parecen jugar algún papel en la regulación de este comportamiento (Dominguez & Micevych, 2010; Long et al., 2017; P. Micevych, Mermelstein, & Sinchak, 2017; Tominna, Chokr, Feri, Chuon, & Sinchak, 2019), ER- α juega un rol fundamental en su despliegue, así como también en la motivación asociada al mismo (Pfaus et al., 2015). Por una parte, estudios utilizando agonistas específicos mostraron que el tratamiento con agonistas de ER- α previo al tratamiento con progesterona induce la expresión de componentes tanto proceptivos como receptivos del comportamiento sexual en la rata hembra, efecto que se reduce si se utilizan agonistas de ER- α y ER- β en conjunto, y que no ocurre si se utilizan únicamente agonistas de ER- β (Mazzucco, Walker, Pawluski, Lieblich, & Galea, 2008).

Por otra parte, estudios utilizando la técnica de *knockdown* de ER- α , donde se reduce significativamente la expresión del receptor de forma localizada, permitieron dilucidar la importancia de la expresión de este receptor en las diferentes áreas que conforman el circuito de regulación del comportamiento sexual. De esta manera, cuando se reduce la expresión de ER- α en mPOA o VMN, hembras ovariectomizadas tratadas con estrógeno y progesterona disminuyen el despliegue de componentes proceptivos y receptivos del comportamiento sexual (Musatov, Chen, Pfaff, Kaplitt, &

Ogawa, 2006; Spiteri et al., 2010), así como su atractividad (evaluada mediante el número de montas recibidas por parte del macho) (Snoeren et al., 2015). Además, el *knockdown* de ER- α en estas regiones resulta en una disminución de la motivación sexual evaluada en una prueba de preferencia entre un macho intacto y uno castrado (Spiteri et al., 2010; Spiteri, Ogawa, Musatov, Pfaff, & Ågmo, 2012). Sin embargo, cuando se reduce la expresión de ER- α en la Amígdala MePD no se observan cambios en el comportamiento sexual ni en el comportamiento en una prueba de preferencia (Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2010). Estos estudios en conjunto sugieren un rol fundamental de la expresión de ER- α en mPOA y VMN en el comportamiento y la motivación sexual.

El estrógeno actúa en mPOA modulando la liberación de dopamina en NAcc

Como fue mencionado previamente, el mPOA se ha postulado como un nodo de vínculo entre el circuito hipotalámico y el circuito de recompensa mesocorticolímbico, modulando la liberación de dopamina en el NAcc mediante proyecciones GABAérgicas al VTA (Tobiansky et al., 2013). Estas neuronas que envían proyecciones del mPOA al VTA expresan ER- α , y se ha postulado un posible rol regulador del estrógeno, actuando mediante este receptor en mPOA, sobre la liberación de dopamina en el NAcc (Yoest, Quigley, & Becker, 2018). A favor de esta idea, microinyecciones de estradiol en mPOA aumentan la liberación de dopamina en el NAcc inducida por cocaína (Tobiansky et al., 2016). Además, estudios en ratones hembra dieron cuenta que la estimulación optogenética de una subpoblación de neuronas ER- α^+ de mPOA que proyectan a VTA aumenta la liberación de dopamina en el NAcc y la preferencia por un macho frente a una hembra castrada, siendo ambos efectos mayores si la hembra fue previamente tratada con estradiol (McHenry et al., 2017).

A pesar de que la importancia de los estrógenos actuando a través de su unión a ER- α en diferentes regiones del circuito cerebral que modula el comportamiento y la motivación sexual ha sido probada en adultas, desconocemos cómo es la expresión de este receptor y cómo el circuito neural responde a esta hormona durante la adolescencia, cuando naturalmente comienzan las exposiciones cíclicas a la misma.

Sensibilización comportamental a estrógenos

Las hembras adultas y adolescentes, en particular en adolescencia media, difieren en la cantidad de exposiciones a picos preovulatorios de estrógenos que experimentaron previamente. En este sentido, cuando hembras adultas ovariectomizadas son expuestas a niveles fisiológicos de estradiol de forma repetida en intervalos de 4 días, aumentan sucesivamente el despliegue de componentes proceptivos y receptivos del comportamiento sexual, así como su atractividad (Jones, Farrell, Gardner Gregory, & Pfaus, 2013; Jones & Pfaus, 2014). Este fenómeno se conoce como sensibilización comportamental a estrógeno, y se define como la potenciación de las respuestas sexuales inducidas por la exposición repetitiva a la misma dosis hormonal. Los mecanismos que subyacen este efecto no son claros (Jones, Gardner Gregory, & Pfaus, 2015; Jones, Germé, et al., 2015).

La exposición a estrógeno modula la expresión de ER- α

Los mecanismos a través de los cuales la exposición repetida a estrógeno conduce a una sensibilización de su efecto en el comportamiento sexual pueden ser múltiples, dado que este esteroide sexual causa efectos variados, tanto agudos como prolongados, sobre las estructuras que regulan este comportamiento (Flanagan-Cato, 2000; Jennings & de Lecea, 2020; P. Micevych & Meisel, 2017). Dada la importancia de ER- α en la regulación del comportamiento sexual, es posible que el mecanismo que subyace a esta sensibilización comportamental implique cambios en la expresión de este receptor. En este sentido, se ha postulado que los estrógenos modulan la expresión de ER- α en regiones cerebrales del circuito que regula el comportamiento sexual. Así, la cantidad de ARNm de ER en mPOA, VMN y ARC (Shughrue, Bushnell, & Dorsa, 1992), y la expresión de ER en mPOA (Zhou, Shughrue, & Dorsa, 1995), fluctúan de manera región-específica a lo largo del ciclo estral, y frente a un tratamiento con estradiol la expresión de ER- α varía tanto en mPOA (Zhou et al., 1995) como en VMN (Devidze, Mong, Jasnow, Kow, & Pfaff, 2005; Lauber, Mobbs, Muramatsu, & Pfaff, 1991).

Sin embargo, estos estudios difieren en la dirección del cambio (aumento/disminución) de la expresión de ER- α inducido por el estrógeno. Esto se debe, por una parte, a que los estudios que abordan la temática presentan importantes diferencias metodológicas en el tipo, la duración y el momento en que ocurre la exposición a estradiol; y, por otra parte, a que la regulación de la expresión de este receptor por parte del estrógeno parece ser dependiente tanto de la región cerebral como del tipo celular (Blaustein & Erskine, 2002; Pfaus et al., 2015). A pesar de que los mecanismos mediante los cuales el estrógeno modularía la expresión de ER- α no están del todo claros, es posible que ER- α regule su propia expresión

actuando como factor de transcripción sobre los sitios ERE en la región promotora del gen que lo codifica (Castles, Oesterreich, Hansen, & Fuqua, 1997). A su vez, es posible que la exposición a estrógenos modifique las marcas epigenéticas en esta región promotora, lo cual también podría resultar en cambios en la expresión del receptor (Champagne et al., 2006; Matsuda, 2014; Peña, Neugut, & Champagne, 2013; Schwarz, Nugent, & McCarthy, 2010).

Bases neuroendocrinas del comportamiento sexual durante la adolescencia

Posible sensibilización comportamental al estrógeno a lo largo de la adolescencia

La exposición a hormonas gonadales durante la adolescencia causa una re-organización del circuito neural que regula el comportamiento sexual, que modula el efecto activacional de las hormonas ováricas en etapa adulta (Bell, 2018; Sisk & Zehr, 2005). En este sentido, el mismo tratamiento con estradiol y progesterona no es igualmente eficaz en la inducción del comportamiento sexual en ratas pre-púberes o ovariectomizadas previo a la pubertad, como lo es en pos-púberes o ovariectomizadas luego de la pubertad (Hlinák, 1985; Meerts, Anderson, Farry-Thorn, Johnson, & Taxier, 2017). A su vez, Södersten (1975) evidenció que, frente a la misma dosis de estrógeno, hembras ovariectomizadas de forma pre-púber muestran una menor respuesta comportamental en comparación a aquellas ovariectomizadas luego de la pubertad, y planteó que podría existir, con la edad, un aumento en la sensibilidad a los efectos del estrógeno sobre el comportamiento sexual.

Dado que en la adolescencia media, a partir de la aparición del primer ciclo estral, comienza una exposición repetida natural a picos endógenos pre-ovulatorios de estrógenos, es posible que, luego de sucesivos ciclos, esta exposición genere una sensibilización comportamental, al igual que ocurre en adultas ovariectomizadas con un tratamiento exógeno (Jones et al., 2013; Jones & Pfaus, 2014). En este sentido, Hlinak (1986) reporta que en hembras ovariectomizadas de forma pre-púber el efecto en el comportamiento sexual de un tratamiento repetido con estrógeno y progesterona aumenta entre la 4^{ta} y la 6^{ta} exposición. En esta línea, es posible que la menor motivación sexual de hembras en adolescencia media, sugerida por resultados previos (Armas et al., 2021), se asocie a un menor número de exposiciones previas a estrógeno (entre 1 y 2 ciclos estrales) de éstas en comparación a hembras en adolescencia tardía (quienes experimentaron entre 4 y 5 ciclos estrales).

Expresión cerebral de ER- α a lo largo de la adolescencia

Esta exposición repetida a picos endógenos de estrógenos, que comienza en la adolescencia media, podría modular la expresión cerebral de ER- α . Sin embargo, al momento, desconocemos cómo son los niveles de expresión de este receptor durante la adolescencia en las áreas cerebrales implicadas en la regulación del comportamiento sexual. De todas maneras, de los resultados de Ceccarelli, Della Seta, Fiorenzani, Farabollini, & Aloisi (2007) se puede interpretar que la expresión de ER- α en el NAcc y VMN es menor durante la adolescencia media en comparación a la adultez de ratas hembra ciclantes tratadas con aceite.

Las gónadas no son el único sitio de producción de estrógeno y progesterona, sino que estas hormonas son producidas también en el cerebro, en un proceso que parecería estar, a su vez, regulado por esteroides ováricos (Cornil, 2018). Específicamente, se ha propuesto que el estrógeno modula la síntesis de neuroprogesterona en un proceso que depende de ER- α (Paul Micevych & Sinchak, 2008). De forma interesante, los resultados de Mohr, Wong, Tomm, Soma, & Micevych (2019) indican que, en respuesta a estrógenos, la producción de neuroprogesterona en astrocitos del hipotálamo es mayor en adultas que en ratas en adolescencia media, sugiriendo que las funciones de ER- α varían a lo largo de esta etapa del desarrollo. Dado que, como se mencionó previamente, una reducción de la expresión de este receptor en mPOA y VMNvl se relaciona con una motivación sexual disminuida en ratas adultas (Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2012), una menor expresión de ER- α en alguna de estas áreas durante la adolescencia media podría explicar una menor motivación sexual durante esta etapa. De todas maneras, se desconoce (1) cómo es esta expresión a lo largo de la adolescencia y, por ende, si cambios en esta expresión se asocian a cambios en la motivación sexual que parecen ocurrir durante este período, y (2) si esta expresión es modulada por la exposición repetida a estrógenos que comienza durante la adolescencia media.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA E HIPÓTESIS

Estudios previos sugieren que la motivación sexual no se encuentra completamente madura en la adolescencia media, sino que aumenta entre este período y la adolescencia tardía, cuando alcanza los niveles de la adultez (Armas et al., 2021). Sin embargo, se requiere el uso de otras pruebas específicas de evaluación de la motivación sexual para validar esta afirmación.

En ratas adultas, la expresión del comportamiento y la motivación sexual es dependiente, por lo menos en parte, de la acción del estrógeno actuando sobre su receptor ER- α en regiones cerebrales claves del circuito que regula este comportamiento, como mPOA y VMN (Musatov et al., 2006; Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2010, 2012). Por este motivo, variaciones en la expresión de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia podrían deberse a cambios en la expresión de este receptor. Sin embargo, desconocemos cómo es la expresión cerebral de ER- α a lo largo de la adolescencia en hembras ciclantes en proestro tardío, período de actividad sexual.

Estudios en hembras ovariectomizadas previo a la pubertad sugieren que el efecto comportamental de un tratamiento hormonal exógeno aumenta con sucesivas exposiciones (Hlinak, 1986), y se ha postulado que con la edad podría desarrollarse un aumento en la sensibilidad comportamental a estrógenos (Södersten, 1975). En hembras adultas, la exposición repetida a niveles fisiológicos de estrógenos genera una sensibilización de la expresión del comportamiento sexual (Jones et al., 2013; Jones & Pfau, 2014), y se ha evidenciado que la exposición a estrógenos modula la expresión de ER- α en el circuito que regula la motivación y el comportamiento sexual (Devidze et al., 2005; Lauber et al., 1991; Zhou et al., 1995). Es posible suponer, entonces, que la exposición repetida a los picos pre-ovulatorios de estrógeno que ocurre a partir de la pubertad en hembras naturalmente ciclantes sensibilice el circuito neural sexual, impactando en la expresión de la motivación sexual. Si este fuera el caso, la menor motivación sexual de las hembras en adolescencia media podría deberse a una menor exposición a estrógenos.

En base a estos antecedentes, se propone que la motivación sexual de la rata hembra ciclante aumenta a lo largo de la adolescencia como consecuencia de un proceso madurativo del circuito cerebral que regula este comportamiento, que involucra un aumento en la expresión de ER- α . Esta maduración está mediada por la exposición repetida a picos pre-ovulatorios de estrógenos que comienza durante la adolescencia media, con la ocurrencia del primer ciclo estral.

Sobre esta base se plantean las siguientes **hipótesis de trabajo**:

- La expresión de la motivación sexual de la rata hembra aumenta a lo largo de la adolescencia.
- La expresión de ER- α en las regiones cerebrales claves del circuito que regula el comportamiento y la motivación sexual aumenta a lo largo de la adolescencia.
- Una mayor exposición a estrógenos durante la adolescencia media aumenta la expresión de motivación sexual a niveles comparables a los de la adolescencia tardía, y aumenta la expresión de ER- α en regiones cerebrales claves del circuito que regula el comportamiento y la motivación sexual.

Considerando estas hipótesis, se proponen los siguientes **objetivos**:

- 1) Determinar si la expresión de la motivación sexual en una prueba de preferencia macho/hembra de hembras vírgenes ciclantes sexualmente activas difiere entre la adolescencia media, la adolescencia tardía y la adultez.
- 2) Determinar si la expresión de ER- α en áreas cerebrales involucradas en el control de la motivación y el comportamiento sexual difiere entre la adolescencia media, adolescencia tardía y adultez.
- 3) Determinar si la mayor exposición a niveles elevados de estrógenos durante la adolescencia media aumenta la expresión de la motivación sexual y la expresión cerebral de la proteína ER- α a niveles comparables a los de la adolescencia tardía.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Debido a que la ausencia de diferencias en la emisión de USV por parte de hembras en adolescencia media ante un macho y una hembra sugiere una menor motivación sexual durante este período (Armas et al., 2021), en el presente estudio se validó esta afirmación comparando el comportamiento de hembras vírgenes ciclantes sexualmente activas en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas en una prueba de evaluación de la motivación sexual ampliamente validada: la prueba de preferencia macho/hembra (Ågmo et al., 2004; Agrati et al., 2018; Clark et al., 2004) (**Capítulo 1**). Los grupos etarios fueron seleccionados según una clasificación frecuentemente utilizada (Tirelli et al., 2003), y de manera de igualar los grupos comparados previamente en la prueba de emisión de USV (Armas et al., 2021). El modelo de preferencia macho/hembra, al igual que la prueba de emisión de USV luego de una interacción social/sexual, es una prueba motivacional no condicionada, que no requiere entrenamiento previo. Esta característica resulta de extrema importancia estratégica cuando se pretende estudiar este comportamiento en una ventana temporal corta de la vida de un individuo.

Con el objetivo de evaluar si la expresión de ER- α en áreas clave del circuito sexual difiere a lo largo de la adolescencia (**Capítulo 2**), se comparó el número de células que expresan el receptor (ER- α^+) en cerebros de hembras en adolescencia media, tardía y adultas. El número de células ER- α^+ fue cuantificando mediante inmunohistoquímica realizada sobre cortes correspondientes a coordenadas anteroposteriores específicas en las siguientes regiones: mPOA, VMNvl, Amígdala MePD y Arc. Estas fueron seleccionadas debido a su importancia en la regulación del comportamiento y la motivación sexual (Jennings & de Lecea, 2020; P. Micevych & Meisel, 2017; Pfaus et al., 2015). Debido a que la técnica de inmunohistoquímica no permite una cuantificación directa y global de la expresión proteica en la región de interés, como segunda aproximación se comparó la expresión de ER- α en micro disecciones del mPOA y VMNvl entre los tres grupos etarios, cuantificada mediante Western Blot. Estas áreas fueron subseleccionadas debido a la importancia de la expresión de ER- α en las mismas para la expresión de la motivación sexual de la rata hembra adulta (Musatov et al., 2006; Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2010, 2012). En ambas aproximaciones se utilizaron cerebros de hembras vírgenes ciclantes en proestro tardío, extraídos luego de confirmada su receptividad sexual.

Finalmente, con el objetivo de evaluar los efectos de una mayor exposición a estrógenos sobre la expresión de la motivación sexual durante la adolescencia media (**Capítulo 3**), se comparó el comportamiento en la prueba de preferencia macho/hembra y en una prueba de interacción sexual, de hembras vírgenes en adolescencia media previamente tratadas con estradiol con el de hembras en

adolescencia media y tardía tratadas con aceite, cuando se encontraban sexualmente activas en fase de proestro tardío del ciclo estral. Apuntando a aproximar el número de exposiciones a estrógenos de hembras en adolescencia media a aquel experimentado naturalmente por hembras en adolescencia tardía, y considerando que hembras en adolescencia tardía experimentaron aproximadamente 3 ciclos estrales más que hembras en adolescencia media, comenzando el día de la apertura vaginal las hembras fueron tratadas con dosis diarias de estradiol (o aceite) durante 3 días. Se utilizó una concentración de 2,5µg/rata, ya que se ha evidenciado que tiene efectos fisiológicos en hembras pre-púberes (Södersten, 1975) y que concentraciones similares (2,0µg/rata) elevan los niveles de estrógeno en plasma de ratas adultas a los mismos que el pico estrogénico propio del ciclo estral (Geary & Asarian, 1999; P. Micevych, Eckersell, Holland, & Smith, 1996). Adicionalmente, con el objetivo de evaluar el efecto de la mayor exposición a estrógenos sobre la expresión cerebral de ER- α , se comparó entre las mismas hembras la expresión del receptor -cuantificada mediante Western Blot- (**Capítulo 3**) en aquellas regiones cerebrales donde se observaron cambios más relevantes de expresión de ER- α durante el desarrollo (según resultados obtenidos en el Capítulo 2).

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL

Animales

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

Las hembras experimentales fueron utilizadas durante la adolescencia media (39-43 días), adolescencia tardía (49-53 días) o adultez (90-115 días) y los animales estímulo fueron utilizados durante la adultez (aproximadamente 90 días). Animales adolescentes y adultos fueron alojados en cajas de 5 o 4 animales, respectivamente. Los machos utilizados como estímulo sexual fueron machos sexualmente activos, entrenados para eyacular en menos de 15 minutos, mientras que las hembras utilizadas como estímulo social en la prueba de preferencia fueron hembras ciclantes, no-receptivas.

Los protocolos de experimentación fueron aprobados por la CEUA de la Facultad de Ciencias (número de expediente: 240011-000564-20) bajo la normativa de la Ley Nacional N°18.611 acerca del uso de animales para la investigación científica

Monitoreo del ciclo estral y determinación de apertura vaginal

Se utilizaron hembras vírgenes naturalmente ciclantes en fase de proestro tardío del ciclo estral, período de máxima expresión de actividad sexual (Beach, 1976). En hembras adolescentes se realizó un monitoreo de la apertura vaginal a partir del día 33 de vida (Caligioni, 2009). A partir de este día, o a partir del día 80-90 de vida en adultas, el monitoreo del ciclo estral se realizó diariamente mediante exudados vaginales matutinos (Goldman, Murr, & Cooper, 2007; Marcondes, Bianchi, & Tanno, 2002). Solamente aquellas hembras que mostraron un exudado de proestro en la mañana (Figura 5) fueron consideradas para el estudio. En caso de

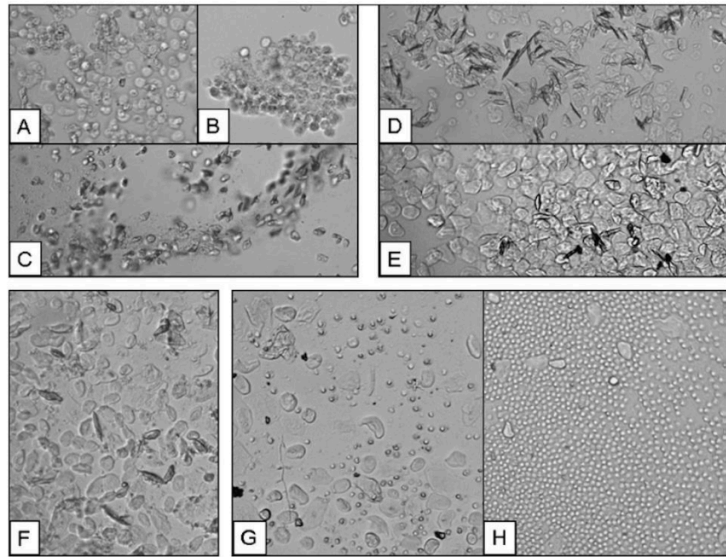


Figura 5. Imágenes representativas del perfil celular obtenido mediante exudados vaginales según la fase del ciclo estral. **a-c.** Fase de proestro; agrupaciones de numerosas células redondeadas. **d-e.** Fase de estrus; numerosas células queratinizadas con bordes irregulares, muchas veces dobladas con apariencia de aguja. **f.** Fase de metaestro; células redondeadas, células queratinizadas y leucocitos. **g-h.** Fase de diestro; presencia predominante de células leucocitarias con posible presencia menor de otros tipos celulares.

Figura extraída de Goldman, Murr & Cooper (2007).

hembras adultas, solamente aquellas que mostraran al menos 2 ciclos estrales regulares de 4-5 días de duración fueron utilizadas, pero este criterio no se aplicó a hembras adolescentes debido a que generalmente durante esta etapa los ciclos estrales aún no son estrictamente regulares (Södersten, 1975).

Prueba de receptividad sexual

Las hembras que mostraron un exudado matinal de proestro fueron probadas brevemente (menos de 2 minutos) con un macho, 2-3 horas luego de apagadas las luces. Solamente aquellas hembras que respondieron a la monta con una postura de lordosis fueron consideradas sexualmente activas y utilizadas como hembras experimentales. El mismo procedimiento se utilizó para corroborar la no-receptividad sexual de las hembras utilizadas como estímulo social. De esta manera, solamente fueron utilizadas como estímulo aquellas hembras que mostraron conducta de rechazo hacia el macho (patada al macho con los miembros posteriores) y no adoptaron postura de lordosis frente a un intento de monta o una monta.

Pruebas comportamentales

Todas las pruebas comportamentales fueron realizadas durante el período de oscuridad, comenzando 2-3 horas luego de apagadas las luces, de manera de asegurar la máxima actividad sexual de las hembras (Kuehn & Beach, 1963).

Prueba de preferencia macho/hembra

La prueba de preferencia macho/hembra (Agrati et al., 2018) se realiza en un laberinto de acrílico con forma de Y con un compartimiento (25cm ancho × 30cm largo × 18cm alto) al final de cada uno de los tres brazos (10cm ancho × 30cm largo × 10cm alto). Un compartimiento es ocupado por un macho sexualmente activo (estímulo sexual), otro por una hembra sexualmente no-receptiva (estímulo social), mientras que el tercer compartimiento se mantiene vacío (compartimiento neutro) (Figura 6). Cada compartimiento se divide al medio por una pared de acrílico que contiene agujeros (la hembra experimental puede acceder a la mitad interior del compartimiento, mientras que el estímulo se encuentra en la mitad exterior del mismo), de manera que la hembra experimental puede ver, oler y escuchar a los estímulos. Dentro de cada grupo, los estímulos fueron asignados a sus compartimientos de manera contrabalanceada. Entre cada prueba, el modelo fue lavado con etanol 50% y secado.

Si bien usualmente la prueba de preferencia se realiza con una hembra sexualmente receptiva como estímulo social (Agrati et al., 2018; Clark et al., 2004), en el presente estudio se utilizaron hembras no-receptivas con el fin de separar completamente el componente social del sexual, considerando que el estado hormonal de las hembras ciclantes cuando se encuentran sexualmente activas puede actuar como clave sexual (McGinnis & Vakulenko, 2003). A su vez, debido a que en el modelo de emisión de USV luego de una interacción sexual o social utilizamos hembras no-sexualmente activas como estímulo (Armas et al., 2021), consideramos importante utilizar el mismo tipo de estímulos para reforzar la validez de los resultados obtenidos.

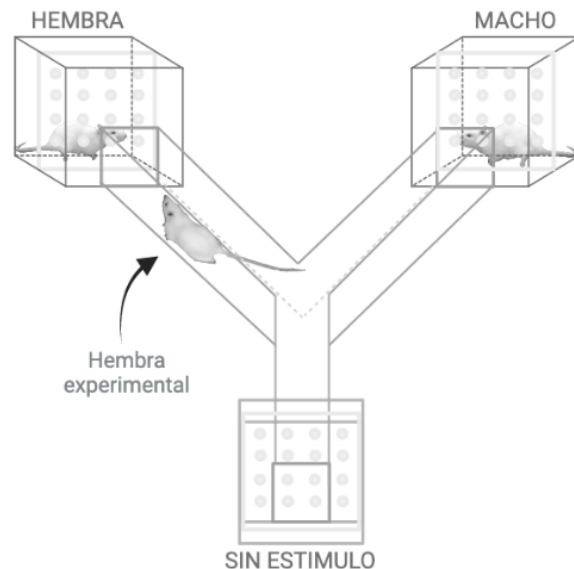


Figura 6. Esquema representativo de modelo utilizado para la prueba de preferencia macho/hembra.

Al comenzar la prueba, se colocó a la hembra experimental en el centro del laberinto y se le permitió explorar el mismo durante un período de habituación de 15 minutos. Luego, los estímulos fueron colocados en sus compartimientos correspondientes. Durante 20 minutos se registraron las siguientes variables (según Agrati et al. (2018)): el tiempo total que la hembra experimental permaneció dentro de cada comportamiento, el número de entradas a cada brazo y compartimiento (en casos donde la movilidad difirió entre grupos se reemplazó esta variable por el porcentaje de entradas a un compartimiento relativo a la totalidad de entradas a los 3 compartimientos), el número de olfateos a la pared divisora de cada compartimiento y el número de intentos por acceder a cada estímulo (los cuales se definen como el acto de arañar o morder la pared divisora del compartimiento). Por otra parte, la movilidad dentro del modelo fue cuantificada sumando el número total de entradas a los brazos y el número total de entradas a los compartimientos.

A cada hembra experimental se le asignó preferencia por un estímulo cuando permaneció en el compartimiento del estímulo más del 50% del tiempo total que permaneció dentro de cualquiera de los 3 compartimientos, siendo este tiempo 25% mayor al tiempo que pasó en cualquiera de los dos compartimientos restantes (Agrati et al., 2016, 2018; Pereira & Ferreira, 2006). Para cada grupo, se expresó la distribución de preferencia como la proporción de hembras que prefirieron el compartimiento del macho, de la hembra no-receptiva, el compartimiento neutro o que no exhibieron ninguna preferencia.

Prueba de comportamiento sexual

El comportamiento sexual fue evaluado en una arena redonda de acrílico (90 cm de diámetro) (Figura 7). Al comenzar, la hembra experimental fue colocada sola en el modelo durante un período de habituación de 2 minutos. Luego, se introdujo un macho sexualmente activo y se registró la interacción sexual durante 8 minutos.

Según Agrati et al. (2018) se registraron los siguientes componentes del comportamiento sexual de la hembra: número de lordosis en respuesta a la monta, olfateos anogenitales, hops & darts (saltos y/o corridas de corta distancia cerca del estímulo, generalmente acompañadas de una postura rígida), posturas de presentación (postura en forma arqueada que se mantiene de manera rígida por un corto período de tiempo) y solicitudes (breve aproximación al estímulo

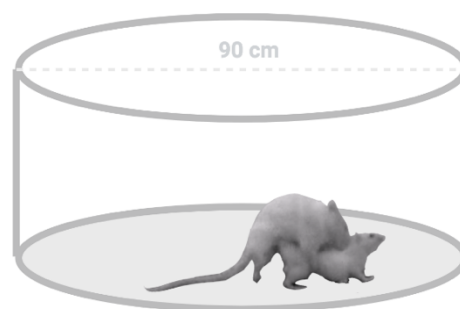


Figura 7. Esquema representativo de modelo utilizado para prueba de comportamiento sexual

seguido de una corrida de larga distancia que finaliza con una postura de presentación). El número total de conductas proceptivas fue considerado como la suma de hops & darts, posturas de presentación y solicitudes. Se determinó también la latencia a la expresión de la primer conducta proceptiva. Como índice de receptividad sexual de la hembra se calculó el cociente de lordosis como el número de lordosis en respuesta a la monta del macho sobre el número de montas totales (incluyendo montas con y sin intromisión, y eyaculaciones).

El comportamiento del macho también fue analizado, registrándose la ocurrencia de montas (con o sin intromisión, indistintamente) y eyaculaciones. Se midieron, además, las latencias a la primer monta y a la primer eyaculación.

En el comportamiento sexual de la rata, la eyaculación del macho es seguida por un período de inactividad sexual conocido como período posteyaculatorio refractario, el cual ocurre tanto en machos como en hembras (Barfield, Wilson, & McDonald, 1975; Yang & Clemens, 1996). Por esta razón, el análisis total del comportamiento sexual en casos donde la latencia de eyaculación del macho difiere entre grupos, incluye períodos temporales de actividad sexual de diferente duración. Con el objetivo de controlar esta variable, cuando la latencia de eyaculación difirió entre grupos se analizó también el comportamiento sexual expresado únicamente durante la primer serie eyaculatoria (desde el comienzo de la prueba hasta la primer eyaculación o hasta el final de la prueba en caso de que no ocurriera eyaculación) normalizado por la latencia de eyaculación, y se reportó el número de comportamientos ocurridos por minuto (Olster & Blaustein, 1988; Pfaus et al., 2000).

Tratamiento hormonal

Las hembras fueron sometidas a un tratamiento diario matutino con aceite (0,1ml s.c.) o estradiol (2,5µg de 17-β estradiol en 0,1ml de aceite / rata s.c., Sigma) durante 3 días consecutivos (de acuerdo con (Södersten, 1975)), comenzando el día de apertura vaginal (Capítulo 3). La correcta administración del tratamiento con estradiol fue verificada mediante exudados vaginales, con la corroboración de un perfil de fase de estro del ciclo estral (ver Figuras 1 y 5) (Goldman et al., 2007).

Inmunohistoquímica

Obtención de muestras

Los cerebros de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas (Capítulo 2) fueron obtenidos según Pose et al. (2019). Brevemente, las hembras fueron anestesiadas con tiopental sódico (80mg/kg; i.p.) y perfundidas de forma transcardíaca con buffer fosfato salino (PBS) heparinizado, seguido

de paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Mo, USA) en PBS. Los cerebros fueron removidos y post-fijados en formaldehído 4% durante la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron crioprotegidos en solución de sacarosa 15% (24 hrs), seguido de solución sacarosa 30% (48-72 hrs) en PBS. Luego de la crioprotección, las muestras fueron congeladas mediante congelación rápida en isopentano y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Los cerebros fueron seccionados en un criostato mediante cortes coronales de 40µm de espesor, y las regiones con las áreas de interés fueron colectadas y almacenadas a -20°C en solución *antifreeze* (1% PVP-10, 30% sacarosa, 30% etilenglicol en PBS). Se seleccionaron, para el análisis de cada región cerebral de interés, secciones coronales correspondientes a coordenadas anteroposteriores específicas. Para cada animal, cada región fue analizada en un único corte.

Todos los cerebros fueron obtenidos 2-3 horas luego de apagada la luz, en hembras en proestro tardío a las cuales se les verificó previamente la actividad sexual.

Inmunohistoquímica

Los cortes fueron procesados mediante inmunohistoquímica siguiendo un protocolo del tipo *free-floating*. Luego de 5 lavados en buffer de Tris 0,05M (solución TB), los cortes fueron incubados en concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno con el objetivo de inactivar las peroxidasas endógenas: 0,5% y 1,0% disuelto en TB, durante 30 minutos cada uno. Luego de 5 lavados (2 en TB, 1 en 0,09% NaCl en TB (solución TBS) y 2 en 0,05% Tritón disuelto en TBS (solución TBST)), los cortes fueron incubados en solución de bloqueo durante 60 minutos (3% BSA y 5% suero de cabra, disuelto en TBST). Luego del bloqueo, los cortes fueron lavados (3 en TBS, 2 en TBST) e incubados en anticuerpo primario policlonal generado en conejo y dirigido contra la región c-terminal del ER-α humano (06-935, Millipore, Upstate, NY, USA) disuelto 1:5.000 en TBST con 3% BSA y 1% suero de cabra durante 36 horas a 4°C. Luego de 5 lavados (4 con TBS y 1 con TBST), los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario (anticuerpo IgG generado en cabra, anti-conejo (BA-1000) biotinizado Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) disuelto 1:500 en TBST con 1% suero de cabra durante 2 horas, lavados 5 veces en e incubados en complejo avidina-biotina (kit ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 2 horas. Terminada la incubación, los cortes fueron lavados 5 veces en TBS y revelados con 3-3'diaminobenzoato y níquel (DAB substrate kit SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Los cortes fueron lavados (3 en TBS, 3 en TB), montados sobre portaobjetos de vidrio cubiertos con poli-L-lisina (0,01% en agua destilada; P8920 Sigma-Aldrich, MI, USA), y secados a temperatura ambiente *overnight*. Al día siguiente, los cortes montados fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 80%, 90% y 100%) y luego en xilol, y finalmente cubiertos con un cubreobjetos con Medio de Montaje *Permount*.

Todos los pasos fueron realizados a temperatura ambiente con agitación (100 rpm), excepto aquellos donde se indica lo contrario. Los grupos experimentales fueron procesados en conjunto, acompañados por una muestra utilizada como control negativo (sometidas al mismo protocolo, pero sin incubación con anticuerpo primario) de manera de controlar posible inmunoreactividad inespecífica.

Selección de regiones de interés y cuantificación de células ER- α positivas

Las siguientes áreas fueron seleccionadas para el análisis de expresión de ER- α mediante inmunohistoquímica (Figura 8): el Área pre-óptica media (mPOA) analizada en una región anterior (Bregma: -0,24mm) y otra posterior (Bregma: -0,84mm); el Núcleo Arcuato (Arc) y la región ventrolateral

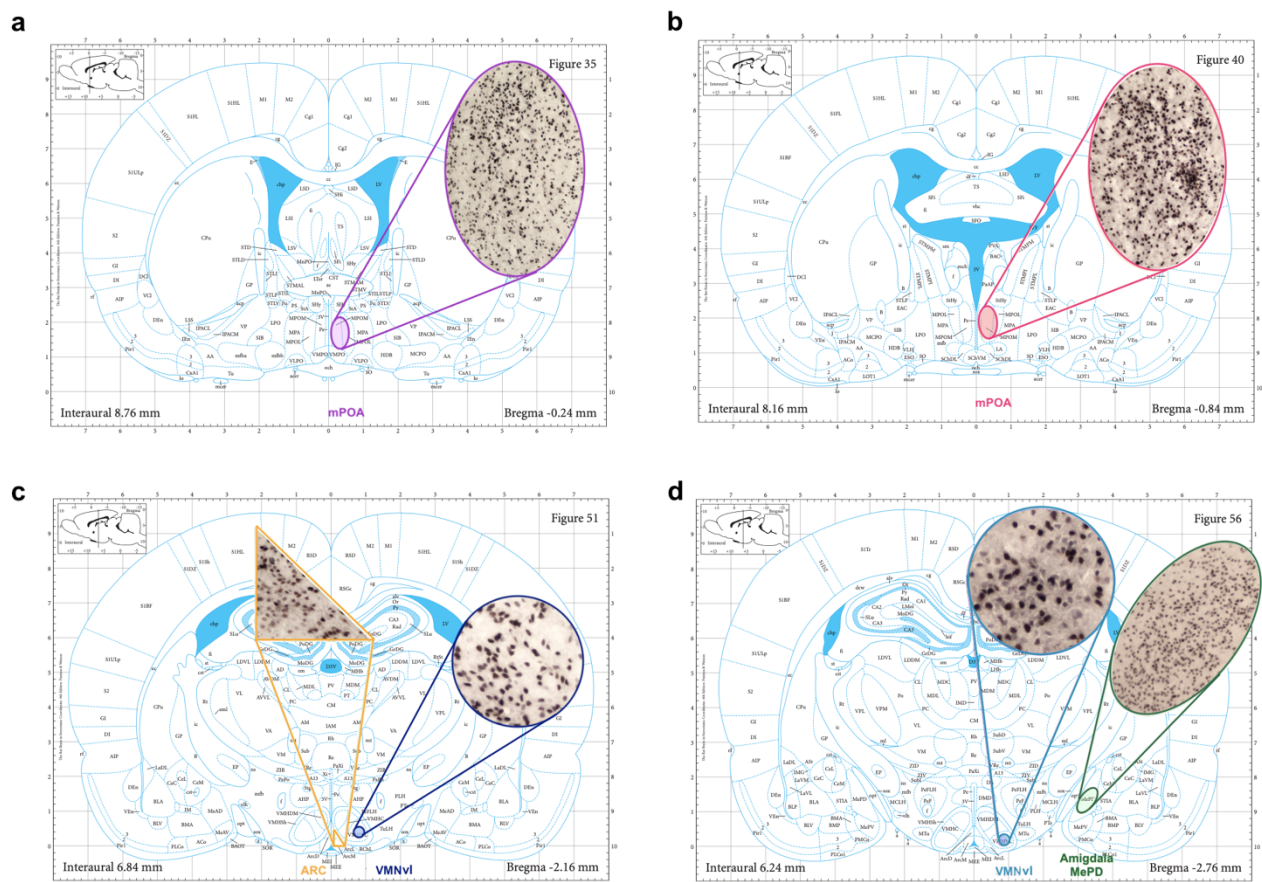


Figura 8. Esquemas representativos de las regiones de interés establecidas para el conteo del número de células ER- α mediante inmunohistoquímica, para cada región cerebral analizada.

a. mPOA anterior (violeta); **b.** mPOA posterior (rojo); **c.** ARC (amarillo) y VMNvl anterior (azul); **d.** Amígdala MePD (verde) y VMNvl posterior (celeste).

Las imágenes de fondo fueron extraídas de Paxinos & Watson (2007). Las burbujas muestran ejemplos de fotografías (10x) pertenecientes a cada región de interés, dentro de las que se cuantificó el número de células ER- α +

del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMNvl) en su región anterior (Bregma: -2,16mm) y VMNvl en su región posterior (Bregma: -2,76mm); y la Amígdala Medial Posterodorsal (AmyMPD) (Bregma: -

2,76mm). Estas regiones fueron identificadas utilizando un Atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2007).

Los cortes fueron visualizados en un microscopio Eclipse 80i 241 (Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo de aumento 10x. Las imágenes de las regiones de interés fueron fotografiadas con una cámara DS-5Mc-U2 digital (Nikon) mediante el software NIS Element (Nikon).

Utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) (<http://imagej.nih.gov/ij>), las imágenes fueron convertidas a 8-bits y, utilizando el *ROI Manager*, se estableció, para cada región cerebral, una región de interés (ROI) (Figura 8) que se mantuvo constante entre individuos en sus coordenadas medio lateral y dorsoventral y en su tamaño (mPOA ROI: 0,2mm²; VMNvl ROI: 0,03mm²; Arc ROI: 0,03mm²; AmyMPD ROI: 0,2mm²). Dentro de esta región, el umbral fue ajustado utilizando la función *Image -> Adjust -> Autothreshold-> opción: Li* (Li & Tam, 1998) y se cuantificó de forma unilateral y al azar el número de células ER- α inmunoreactivas utilizando la función *Analyze -> Analyze particles / size: 2,3 μ m² (o 10 pixels) - infinity; circularity 0-1*. El número de partículas contabilizadas utilizando estos criterios fue considerado como el número de células ER- α ⁺ y utilizado para comparar los grupos mediante análisis estadístico.

Cuantificación de niveles de proteína ER- α mediante Western Blot

Obtención de muestras

Las hembras fueron sacrificadas mediante sobredosis de tiopental sódico (100mg/kg, i.p.) y sus cerebros fueron extraídos y las regiones de interés fueron rápidamente disecadas mediante la técnica de *micropunch*. Para ello, manualmente se realizaron dos cortes coronales para la obtención de secciones de 1mm de espesor con coordenadas anteroposteriores aproximadas: Bregma 0,12mm a -0,88mm (conteniendo mPOA), y Bregma -2,12mm a -3,12mm (conteniendo VMNvl). Las regiones de interés (mPOA y VMNvl) fueron localizadas utilizando un Atlas de cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2007); (Figura 9) y fueron disecadas de forma bilateral mediante cortes circulares utilizando un *punch* de biopsia de 1mm de diámetro (Miltex Biopsy Punch; Ted Pella, Redding, CA, USA). Las muestras fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. La Figura 10 muestra un ejemplo de un cerebro luego de realizada la extracción del mPOA y VMNvl según el protocolo descrito.

Todos las muestras fueron obtenidas 2-3 horas luego de apagada la luz, luego de confirmada la actividad sexual de las hembras.

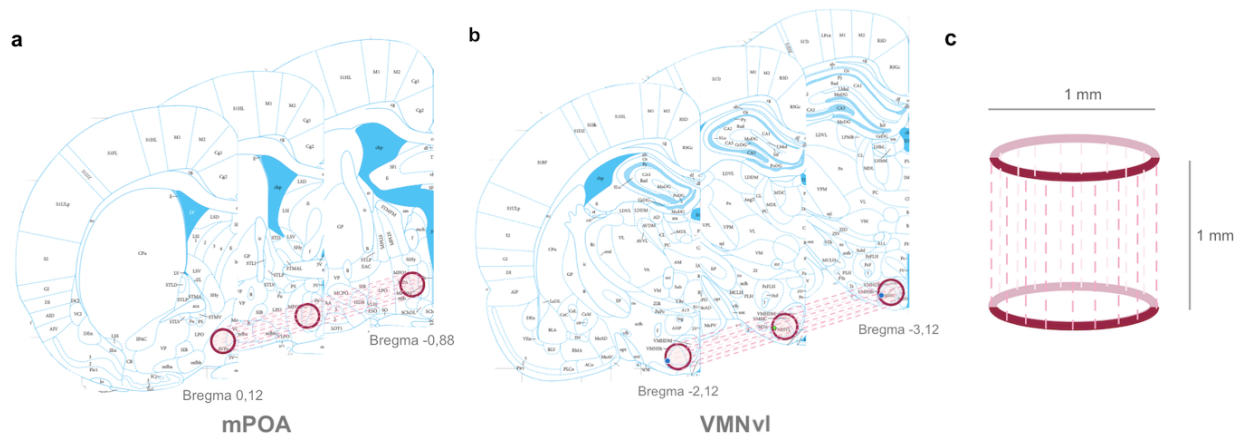


Figura 9. Representación esquemática de las regiones cerebrales disecadas mediante la técnica de *micropunch*. Se representan 3 niveles anteroposteriores incluidas en las secciones cerebrales de 1mm de espesor obtenidas mediante cortes coronales, conteniendo (a) el Área pre-óptica media y (b) la región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo. Las regiones de interés fueron disecadas desde estas secciones utilizando un *micropuncher* de 1mm de diámetro (círculos rojos). c. Se obtuvieron secciones cerebrales cilíndricas (1mm de diámetro x 1mm de altura) conteniendo las regiones de interés. Esquemas extraídos de Paxinos & Watson (2007).

SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras cerebrales fueron lisadas con ayuda de un homogeneizador en 70 μ l de solución de homogenización (*Urea Cracking Buffer* (urea 5mM, Na₂HPO₄ 10mM, SDS 1%) suplementado con 1% PMSF, 1% *cocktail* inhibidor de proteasas (Sigma) y 1% β -mercaptoetanol), e incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras homogeneizadas fueron luego centrifugadas a 1.127 xg a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante fue almacenado a -20°C y su concentración proteica se midió mediante fluorimetría utilizando un Fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

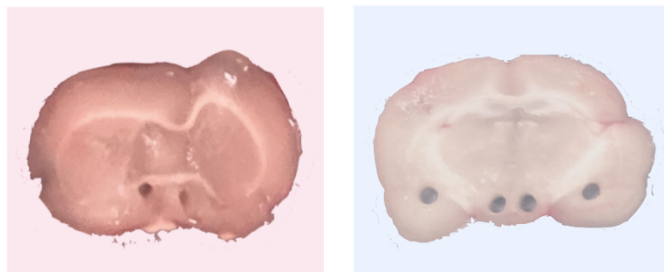


Figura 10. Fotografías representativas de cortes cerebrales luego de realizada la extracción de mPOA (recuadro rosado-izquierda) y VMNvl (recuadro celeste-derecha) mediante *micropunch*. Las fotografías corresponden a las secciones realizadas mediante cortes coronales y las regiones de tejido faltante corresponden a las regiones de interés, extraídas mediante *micropunch* para la cuantificación de ER- α mediante Western Blot.

Para la separación de proteínas mediante SDS-PAGE, el volumen de muestra conteniendo 40 μ g de proteína combinado en una proporción 4:1 con *loading buffer* (50% glicerol, 5% SDS, Tris-Cl 0,225M pH6,8, 0,02% azul de bromofenol y 0,25M DTT), fue incubado a 100°C durante 5 minutos y cargado en un

gel de poliacrilamida (gel de *stacking*: acrilamida 3,75%, Tris pH 6,8 0,126M, SDS 1%, APS 1% y Temed 0,1%; gel separador: acrilamida 12%, tris pH 8,8 0,375M, SDS 1%, APS 1%, Temed 0,05%). Dos geles (cada uno conteniendo muestras de tres individuos de cada grupo experimental) fueron corridos en simultáneo durante 75 minutos a una intensidad de corriente de 50mA. En cada gel, un carril fue cargado con un marcador de peso molecular (Page Ruler Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizado como referencia. Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, cat.# 162-0115) mediante electroblotting a 4°C, utilizando un *blotter* húmedo (Amersham, Buckinghamshire, UK) a una diferencia de potencial de 100V durante 105 minutos.

Las membranas fueron luego lavadas con buffer de Tris Salino (TBS: Tris 0,02M y NaCl 0,5M, pH7,5) y teñidas con solución Ponceau S durante 5 minutos para cuantificación de proteína (ver más abajo). Luego de ser escaneadas, las membranas fueron lavadas en TBS (2 lavados) e incubadas durante 1 hora en solución de bloqueo (5% leche descremada disuelta en TBS). Luego de 3 lavados en buffer de Tris Salino con Tween (TBST: 0,05% Tween en TBS) las membranas fueron incubadas *overnight* a 4°C con anticuerpo primario generado en conejo, policlonal dirigido contra la región c-terminal de ER- α humano (06-935, Millipore, Upstate, NY, USA) disuelto 1:500 en TBST con 3% BSA. Al día siguiente, luego de 3 lavados en TBST, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpo secundario generado en cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Mo, USA) disuelto 1:5.000 en TBST con 3% BSA. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas 4 veces con TBST e incubadas durante 5 minutos con solución de revelado basado en quimioluminiscencia (Novex ECL Chemiluminiscent Substrate Reagent Kit, Invitrogen, MA, USA).

Con excepción de aquellos pasos donde se indica lo contrario, todos los lavados e incubaciones fueron realizados a temperatura ambiente y con agitación (100rpm).

Evaluación cuantitativa de la expresión de ER- α

Las membranas fueron reveladas con kit de quimioluminiscencia que revela la actividad peroxidasa (Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit) y fotografiadas mediante G:BOX F3 y el software GeneSys (Syngene, MD, USA).

Las imágenes fueron analizadas mediante un análisis densiométrico utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Se midió la cantidad de ER- α en cada carril (un individuo / carril) cuantificando la densidad óptica a la altura de la banda perteneciente a un peso molecular aproximado de 66kDa (Figuras 16 y 22). En caso de que las bandas de cada carril no se encontraran alineadas horizontalmente, las imágenes fueron rotadas utilizando la función *Image -> Transform ->*

Rotate. Se seleccionaron luego todas las bandas de interés utilizando la función *Analyze -> Gel -> Select first lane* sobre un rectángulo horizontal que incluyó todas las bandas de interés. Utilizando la función *Analyze -> Gels -> Plot Lanes* se obtuvo un gráfico representando la densidad óptica del rectángulo global, del cual se obtuvo la densidad óptica correspondiente a cada banda utilizando la *Wand tool*. Fueron comparadas únicamente aquellas muestras incluidas en un mismo experimento de Western Blot. Con el objetivo de normalizar la cuantificación de ER- α de acuerdo con la cantidad de proteína total cargada en cada carril, se calculó la densidad óptica relativa como el cociente entre la densidad óptica de la marca de ER- α y la densidad óptica de la marca obtenida mediante la tinción con Ponceau S (Figura 11).

Normalización con solución Ponceau S

Con el objetivo de controlar la cantidad total de proteína de cada muestra transferida a la membrana de nitrocelulosa, las mismas fueron teñidas con solución Ponceau S (0,5% Ponceau S en 1% ácido acético) de acuerdo con Kurian, Forbes-Lorman, & Auger (2007), y fotografiadas utilizando un scanner (Epson, Suwa, Japón). Se

cuantificó la densidad óptica a la altura correspondiente a un peso molecular aproximado de 45 kDa (Figura 11) utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) y el mismo protocolo descrito para la medida de expresión de ER- α (ver apartado anterior).

La solución Ponceau S se une inespecíficamente a proteínas y las tiñe mostrando bandas más intensas a alturas correspondientes a pesos moleculares de proteínas muy abundantes (Kurian et al., 2007; Sander, Wallace, Plouse, Tiwari, & Gomes, 2019). Recientemente se ha recomendado esta técnica para la normalización de Western Blot (Brooks & Lindsey, 2018) dado a que presenta ciertas ventajas por sobre utilización de genes *housekeeping* (Brooks & Lindsey, 2018; R. Li & Shen, 2013). De particular interés para el objetivo del presente estudio es la menor variación biológica proporcionada por la normalización de proteínas mediante Ponceau S, gracias al amplio rango de proteínas marcadas mediante la técnica. Esto permite evitar la interferencia de posibles diferencias en la expresión de proteínas *housekeeping* en individuos de diferente edad y/o tratamiento hormonal, lo cual resulta importante, considerando que diferencias en la expresión de genes frecuentemente utilizados como *housekeeping* (GADPH, β -actina, β -tubulina, entre otros) frente a diferentes condiciones experimentales, estadio del desarrollo o sexo del

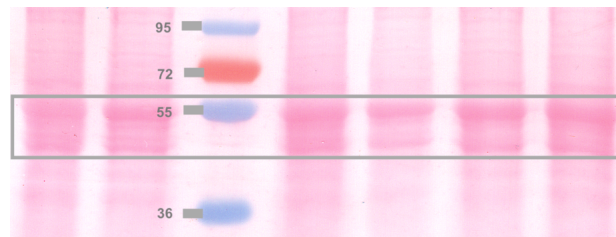


Figura 11. Tinción con Ponceau S. Ejemplo de membrana teñida con Ponceau S. El recuadro gris señala la región utilizada para el análisis de evaluación de cantidad total de proteína.

animal han sido reportados previamente (Das, Banerjee, & Shapiro, 2013; Ferguson et al., 2005; Perrot-Sinal, Davis, & McCarthy, 2001).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software PAST (Hammer, Harper, & Ryan, 2001). En cada capítulo se detallan las pruebas estadísticas utilizadas en función de las hipótesis a contrastar.

Objetivo específico

Determinar si la expresión de la motivación sexual en una prueba de preferencia macho/hembra de hembras vírgenes ciclantes sexualmente activas difiere entre la adolescencia media, la adolescencia tardía y la adultez.

Protocolo experimental

El día que mostraron un exudado vaginal matinal de proestro y luego de corroborada su receptividad sexual (2-3 hrs luego de apagadas las luces), hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas (n=9/grupo) fueron probadas en la prueba de preferencia macho/hembra entre un macho sexualmente activo (estímulo sexual) y una hembra sexualmente no receptiva (estímulo social). Las variables comportamentales previamente descritas fueron comparadas entre los grupos.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales de la prueba de preferencia no se ajustaron a una distribución normal (test de Shapiro-Wilk) ni presentaron homogeneidad de varianzas (test de Levene), por lo que se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas y se representan como mediana (cuartil 1 – cuartil 3) o mediana (rango intercuartil) (RIC). Las comparaciones entre grupos independientes (entre edades) se realizaron mediante la prueba de análisis de varianzas de Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney. La comparación de datos dependientes dentro de cada grupo etario se realizó mediante un ANOVA de Friedman seguido de una prueba de muestras pareadas de Wilcoxon (Siegel & Castellan, 1988). Las comparaciones de la distribución de las preferencias entre grupos se realizaron mediante tablas de contingencia 3x3 (al comparar la preferencia por el macho, la hembra o la ausencia de preferencia entre los 3 grupos etarios) seguido de la prueba 2x2 Exacta de Fisher (al comparar la preferencia por el macho y la no preferencia por el macho entre 2 grupos etarios) (Mehta & Patel, 1983).

Resultados

Las hembras en adolescencia tardía y adultas mostraron una mayor proporción de visitas (adol. tardía: $T_{(9)}=1,0$, $p=0,02$; adultas: $T_{(9)}=0,0$, $p \leq 0,01$, prueba de muestras pareadas de Wilcoxon; tabla 1) y permanecieron mayor cantidad de tiempo (adol. tardía: $T_{(9)}=0,0$, $p \leq 0,01$; adultas: $T_{(9)}=0,0$, $p \leq 0,01$; Figura. 12a) en el compartimiento del macho comparado al compartimiento de la hembra. Además, ambos grupos realizaron un mayor número de intentos por acceder al estímulo (adol. tardía: $T_{(9)}=0,0$, $p \leq 0,01$; adultas: $T_{(9)}=0,0$, $p \leq 0,01$; Figura 12b) y olfateos (adol. tardía: $T_{(9)}=1,0$, $p=0,01$; adultas: $T_{(9)}=1,0$, $p=0,01$; Figura 12c) en el compartimiento del macho, comparado al compartimiento de la hembra. A pesar de que las hembras en adolescencia media también permanecieron más tiempo en el compartimiento del macho comparado con el compartimiento de la hembra ($T_{(9)}=6,0$, $p=0,05$; Figura 12a), no mostraron diferencias entre estos compartimientos en el porcentaje de entradas ($T_{(9)}=14,0$, $p=0,58$; tabla 1), el número de intentos por acceder al estímulo ($T_{(9)}=8,5$, $p=0,18$; Figura 12b) ni el número de olfateos ($T_{(9)}=10,0$, $p=0,14$; Figura 12c).

Tabla 1. Comportamiento en prueba de preferencia macho/hembra

	Porcentaje de entradas a compartimiento			Locomoción
	Macho	Hembra	Neutro	
Adol. media	39,7% (34,9-55,1)	35,0% (30,4-44,4)	18,5% (15,9-22,7) ^{a,bb}	124,0 (90,0-137,0)
Adol. tardía	50,9% (40,8-53,3) ^a	38,8% (36,2-39,6)	13,7% (9,4-18,0) ^{aa,bb}	152,0 (150,0-155,0)*
Adulta	44,4% (41,7-52,0) ^{aa}	35,6% (32,0-38,5)	19,4% (15,6-20,0) ^{aa,bb}	117,0 (98,0-126,0)

Datos expresados como mediana (cuartil 1 – cuartil 3).

^a $p \leq 0,05$, ^{aa} $p \leq 0,01$ vs. hembra, y ^b $p \leq 0,05$, ^{bb} $p \leq 0,01$ vs. macho, comparación entre grupos, prueba de muestras pareadas de Wilcoxon;

* $p \leq 0,05$ vs. adulta en locomoción, prueba U de Mann-Whitney.

n=9/grupo.

El tiempo total dentro del compartimiento del macho ($H_{(2)}=6,6$, $p=0,04$, prueba de análisis de varianzas de Kruskal-Wallis) e intentos por acceder a este estímulo ($H_{(2)}=10,5$, $p \leq 0,01$) difirió entre grupos. En este sentido, las hembras en adolescencia media permanecieron menor cantidad de tiempo en el compartimiento del macho en comparación a adultas ($U_{(9,9)}=14,0$, $p=0,02$, prueba U de Mann-Whitney, Figura 12a), y realizaron un menor número de intentos por acceder al macho en comparación a adolescentes tardías y adultas (vs. adol. tardía: $U_{(9,9)}=17,0$, $p=0,04$; vs adultas: $U_{(9,9)}=6,5$, $p \leq 0,01$; Figura 12b). En línea con estos resultados, la distribución de preferencias (macho, hembra o sin preferencia) difirió entre grupos (distribución de preferencia: $p=0,01$, tablas de contingencia 3x3), siendo

significativamente menor la proporción de hembras que prefirieron al macho en el grupo de adolescencia media (5/9) que en el grupo de adultas (9/9) (distribución de preferencia: $p=0,04$, prueba Exacta de Fisher; Figura 13).

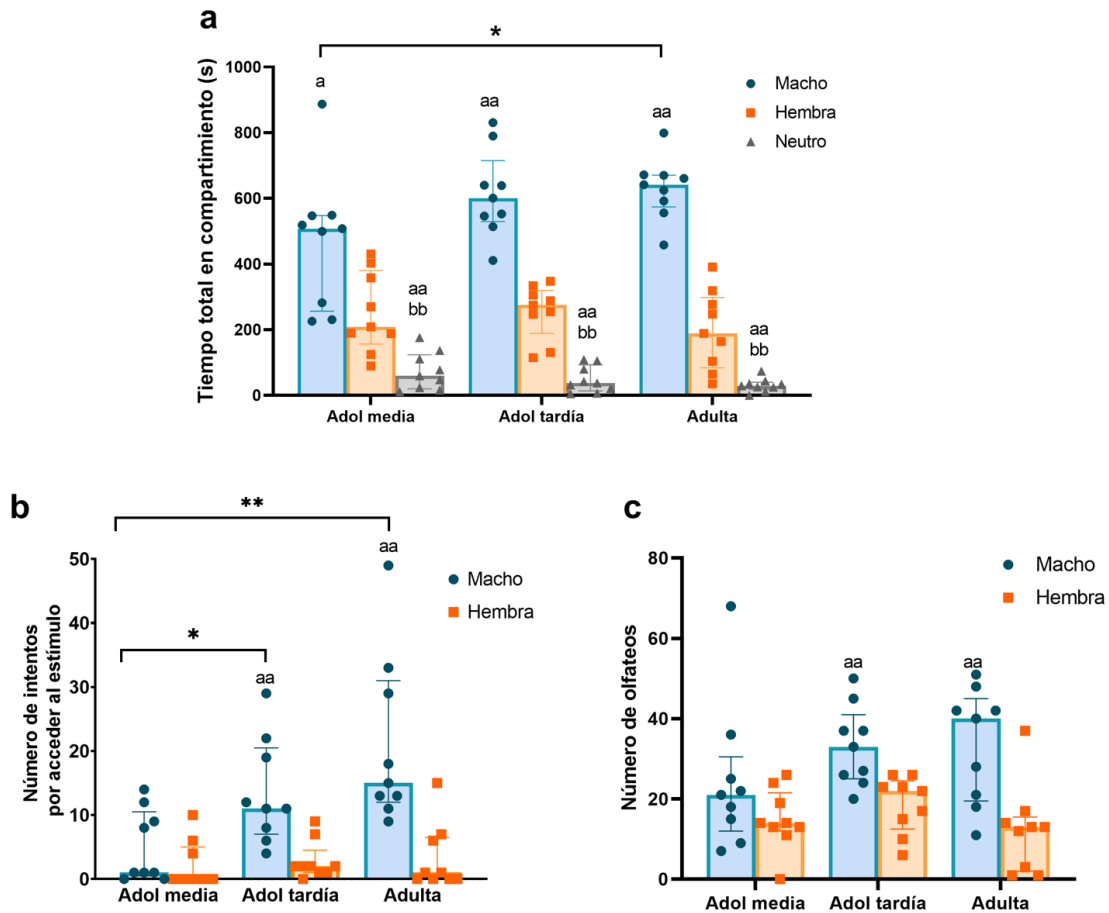


Figura 12. Comportamiento en prueba de preferencia de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas.

a. Tiempo total en compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules), hembra (estímulo social, barras naranjas) o neutro (compartimiento vacío, barras grises). **b.** Número de intentos por acceder al compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules) o hembra (estímulo social, barras naranjas). **c.** Número de olfateos a la pared interna del compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules) o hembra (estímulo social, barras naranjas).

Los datos se expresan como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo.

^a $p \leq 0,05$, ^{aa} $p \leq 0,01$ vs. hembra y ^b $p \leq 0,05$, ^{bb} $p \leq 0,01$ vs. macho dentro de un mismo grupo, prueba de muestras pareadas de Wilcoxon.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ diferencia entre grupos con el mismo estímulo, prueba U de Mann-Whitney. $n=9$ / grupo.

El porcentaje de entradas ($H_{(2)}=1,42$, $p=0,49$; tabla 1) y el tiempo total ($H_{(2)}=1,44$, $p=0,49$; Figura 12a) en el compartimiento de la hembra, así como el número de intentos por acceder a la hembra ($H_{(2)}=2,22$, $p=0,33$; Figura 12b) y de olfateos ($H_{(2)}=3,31$, $p=0,19$; Figura 12c) no difirieron entre los grupos.

A pesar de que la locomoción fue mayor en adolescencia tardía en comparación a adultas ($U_{(9,9)}=15,0$, $p=0,03$; tabla 1) y tendió a ser mayor que en adolescencia media ($U_{(9,9)}=19,0$, $p=0,06$; tabla 1), esto no se vio reflejado en el tiempo total que las hembras permanecieron dentro de los compartimientos, el cual no difirió entre los grupos ($H_{(2)}=4,39$, $p=0,11$).

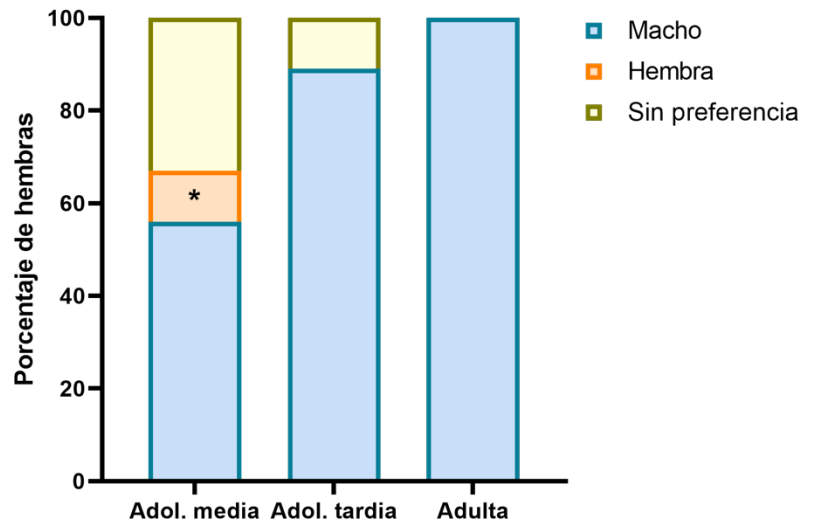


Figura 13. Distribución de preferencias
 Porcentaje de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas con preferencia por el macho (porción celeste), hembra (porción naranja) o sin preferencia (porción gris).
 * $p \leq 0,05$ vs. adulta, prueba de Fisher.
 $n=9$ / grupo.

Resultados principales y conclusión

Si bien en los 3 grupos etarios se observó un mayor tiempo de permanencia de las hembras en el compartimiento del macho, el comportamiento de las hembras en adolescencia media difirió del de aquellas en adolescencia tardía y adultas. El menor tiempo de permanencia en el compartimiento del macho con relación a las hembras adultas y el menor número de intentos por acceder a este estímulo sexual en comparación con ambas edades, indican que las hembras en adolescencia media presentan una menor motivación sexual.

Objetivo específico

Determinar si la expresión de ER- α en áreas cerebrales involucradas en el control de la motivación y el comportamiento sexual difiere entre la adolescencia media, adolescencia tardía y adultez.

Como se explicitó previamente, este objetivo se abordó utilizando dos aproximaciones experimentales. Por una parte se determinó el número de células ER- α inmunoreactivas en coordenadas específicas de las áreas de interés mediante inmunohistoquímica, y por otra parte se cuantificaron los niveles de expresión de la proteína ER- α en mPOA y VMNvl mediante de Western Blot. Ambos protocolos experimentales se detallan a continuación.

Protocolo experimental I

Los cerebros de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas (n=6 / grupo) que exhibieron un exudado vaginal matinal de proestro fueron extraídos 2-3 horas luego de apagadas las luces, una vez corroborada su receptividad sexual. El procedimiento de obtención de muestras se realizó en el marco de otro proyecto, por lo que en la presente tesis no se realizó este procedimiento, sino que se accedió a material almacenado. Los cerebros fueron luego procesados mediante la técnica inmunohistoquímica para la detección de la proteína ER- α , como fue descrito (ver Métodos). Se cuantificó y comparó el número de células ER- α inmunoreactivas entre grupos en las siguientes áreas: mPOA en su región anterior (Bregma: -0,24mm; n=6/grupo) y posterior (Bregma: -0,84mm; adol. media: n=5; adol. tardía: n=6; adultas: n=4), VMNvl en su región anterior (Bregma: -2,16mm; n=6/grupo) y posterior (Bregma: -2,76mm; n=6/grupo), Arc (Bregma: -2,16mm; adol. media: n=5; adol. tardía: n=6; adultas: n=6) y AmyMPD (Bregma: -2,76mm; n=6/grupo).

Debido a daño en el tejido, abarcando alguna región de interés e imposibilitando la cuantificación, de la totalidad de cerebros procesados (n=6/grupo) los cerebros de las siguientes hembras fueron descartados del análisis estadístico para cada una de las siguientes regiones cerebrales: mPOA posterior: 1 adol. media y 2 adultas; Arc: 1 adol. media.

Protocolo experimental II

Los cerebros de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas (n=6 / grupo) que exhibieron un exudado vaginal matinal de proestro fueron extraídos 2-3 horas luego de apagadas las luces y luego de corroborada su receptividad sexual, y las muestras cerebrales obtenidas mediante *micropunch*

fueron procesadas para Western Blot siguiendo el protocolo previamente descrito (ver Métodos). Mediante Western Blot se cuantificó y comparó la expresión de ER- α total en el mPOA (adol. media: n=5; adol. tardía: n=6; adultas: n=6) y VMNvl (adol. media: n=4; adol. tardía: n=6; adultas: n=6) entre grupos.

Debido a defectos en la corrida de proteínas mediante SDS-PAGE, las cuales imposibilitaron la medida densiométrica de ER- α , de la totalidad de muestras obtenidas (n=6/grupo) y procesadas mediante Western Blot, las muestras pertenecientes al mPOA de una hembra del grupo de adolescencia media, y al VMNvl de dos hembras en adolescencia media no fueron cuantificadas y, por ende, no fueron incluidas en el análisis estadístico.

Análisis estadístico

El número de células ER- α inmunoreactivas y el valor densiométrico relativo de expresión de proteína obtenido mediante Western Blot son expresados como media \pm error estándar. La distribución normal y la homogeneidad de varianzas de los datos fueron confirmadas mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilk y el test de Levene de homogeneidad de varianzas, respectivamente, y los datos fueron comparados entre los grupos etarios utilizando la prueba de ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey (Ruxton & Beauchamp, 2008).

Resultados

Cuantificación del número de células ER- α positivas mediante inmunohistoquímica

La figura 14 muestra la distribución típica de la marca de ER- α obtenida en las regiones de interés.



Figura 14. Microfotografías (aumento 4x) representativas de la distribución típica de células ER- α positivas obtenidas mediante inmunohistoquímica de cortes cerebrales conteniendo las regiones de interés.

Coordenadas eje anteroposterior: Área pre-óptica media anterior (mPOA anterior): Bregma: -0,24mm; mPOA posterior: Bregma: -0,84mm; Núcleo Arcuato (ARC): Bregma: -2,16mm; región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo anterior (VMNvl anterior): Bregma: -2,16 mm; VMNvl posterior: Bregma: -2,76mm; y Amígdala Medial Posterodorsal (AmyMPD): Bregma: -2,76mm.

Como se muestra en la Figura 15, no se encontraron diferencias significativas en el número de células ER- α^+ en las regiones analizadas entre hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas (VMNvl anterior: $F_{(2, 15)}=1,33$, $p=0,29$; VMNvl posterior: $F_{(2, 15)}=1,44$; $p=0,27$; Arc posterior: $F_{(2, 14)}=0,33$, $p=0,72$; AmyMPD: $F_{(2,15)}=1,68$, $p=0,22$; mPOA anterior: $F_{(2, 15)}=0,65$, $p=0,54$; mPOA posterior: $F_{(2, 12)}=1,42$, $p=0,28$; prueba de ANOVA de una vía).

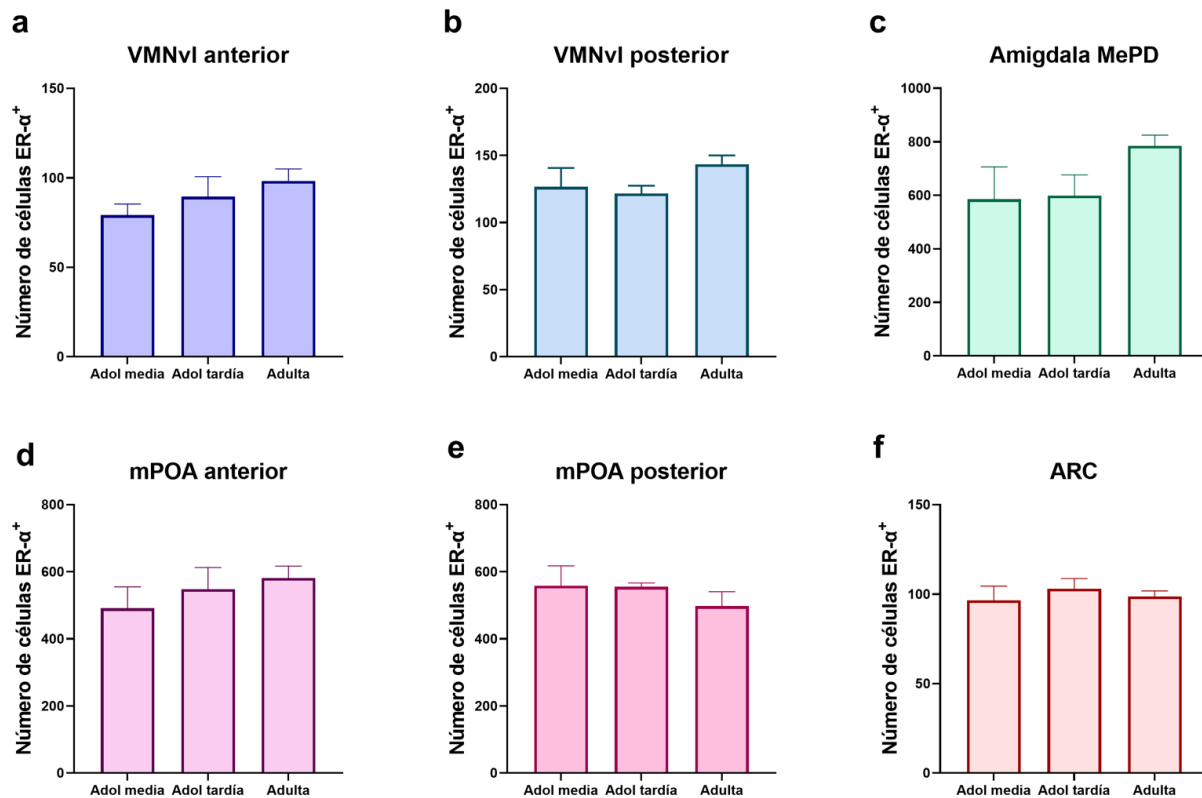


Figura 15. Número de células ER- α^+ en diferentes regiones cerebrales implicadas en el control del comportamiento y la motivación sexual de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas. Las células fueron cuantificadas dentro de la ROI perteneciente a: la región ventrolateral del Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMNvl) anterior (**a**, $n=6$ /grupo), VMNvl posterior (**b**, $n=6$ /grupo), Amígdala Medial Posterodorsal (MePD) (**c**, $n=6$ /grupo), Área pre-óptica media (mPOA) anterior (**d**, $n=6$ /grupo), mPOA posterior (**e**, adol. media: $n=5$, adol. tardía: $n=6$, adultas: $n=4$) y Núcleo Arcuato (ARC) (**f**, adol. media: $n=5$; adol. tardía: $n=6$, adultas: $n=6$). Datos expresados en media \pm error estándar. $p=ns$; ANOVA de 1 vía.

Quantificación de la expresión de ER- α mediante Western Blot

La expresión de ER- α en el mPOA difirió entre hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas ($F_{(2, 14)}=4,87$, $p=0,02$). En este sentido, la expresión de ER- α en el mPOA fue mayor en hembras en adolescencia tardía en comparación a adultas ($p=0,03$; prueba post-hoc de Tukey), tendió a ser mayor en hembras en adolescencia tardía que en hembras adolescencia media ($p=0,06$), y no difirió

entre hembras en adolescencia media y adultas ($p=0,98$) (Figura 16a). Sin embargo, la expresión de ER- α en el VMNvl no difirió entre los grupos etarios ($F_{(2,13)}= 0,62$, $p=0,55$; Figura 16b).

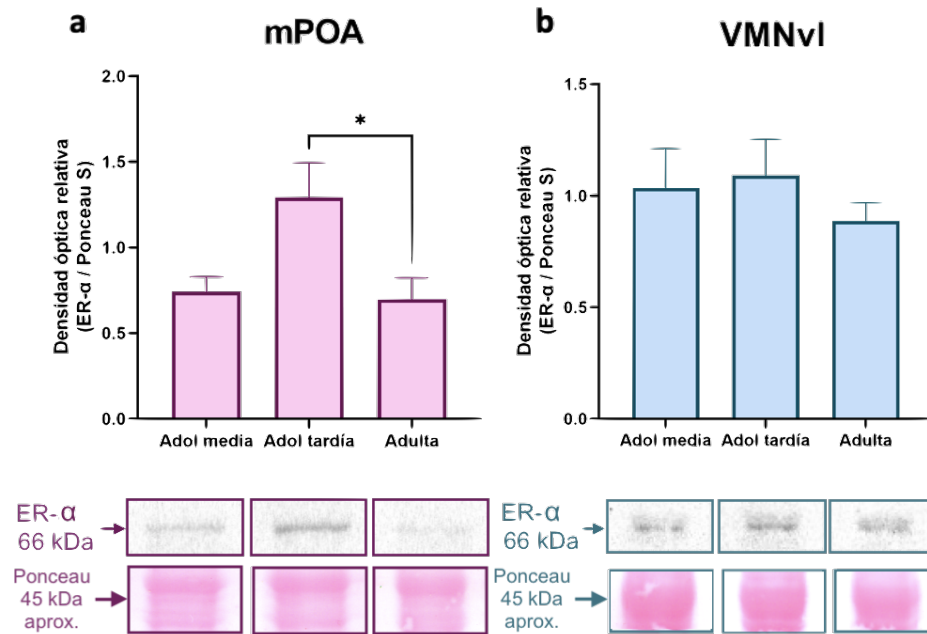


Figura 16. Expresión de ER- α de hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas en mPOA (**a**, adol. media: $n=4$; adol. tardía: $n=6$; adulta: $n=6$) y VMNvl (**b**, adol. media: $n=5$, adol. tardía: $n=6$; adulta: $n=6$).

En el panel inferior se muestran ejemplos representativos de la marca correspondientes a ER- α (aprox. 66 kDa) obtenidas mediante Western Blot para cada grupo (en cada caso, las bandas corresponden al mismo ensayo y membrana).

Datos expresados en media \pm error estándar.

* $p < 0,05$ diferencia entre grupos; prueba post-hoc de Tukey.

Resultados principales y conclusión

El número de células que expresan ER- α en el mPOA, VMNvl, Amígdala MePD y Arc no difirió entre hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas según el análisis inmunohistoquímico en las alturas anteroposteriores seleccionadas. Sin embargo, a pesar de no existir diferencias en el número de células que expresa el receptor en las regiones analizadas, la cuantificación mediante Western Blot evidenció que la expresión de ER- α en mPOA varió a lo largo del desarrollo, siendo intermedia en la adolescencia media, y mayor durante la adolescencia tardía en comparación a la adultez.

En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de ER- α en mPOA, un área cerebral clave en la regulación de la motivación sexual, muestra un proceso de cambio entre la adolescencia y la adultez de la rata hembra ciclante.

CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN REPETIDA A ESTRADIOL DURANTE LA ADOLESCENCIA MEDIA EN LA MOTIVACIÓN SEXUAL Y EN LA EXPRESIÓN DE ER- α EN mPOA

Objetivo específico

Determinar si la mayor exposición a niveles elevados de estrógenos durante la adolescencia media aumenta la expresión de la motivación sexual y la expresión cerebral de la proteína ER- α a niveles comparables a los de la adolescencia tardía.

Protocolo experimental

Como se muestra en la Figura 17, comenzando el día de apertura vaginal ($35,5 \pm 1,9$ días) las hembras ($n=23$) fueron sometidas a un tratamiento diario de 3 días con estradiol ($2,5\mu\text{g}/\text{rata}$; $n=7$) o aceite ($n=16$). Las hembras tratadas con estradiol fueron probadas durante la adolescencia media (adol. media estradiol; $n=7$), y las hembras tratadas con aceite fueron divididas en dos grupos y probadas durante la adolescencia media (adol. media aceite; $n=8$) o durante la adolescencia tardía (adol. tardía; $n=8$). Todas las hembras fueron probadas mínimo 4 días luego de la última inyección, 2-3 hrs luego de apagadas las luces, en el día que exhibieron un exudado vaginal matinal de proestro y luego de corroborada su receptividad sexual.

Las hembras fueron probadas en una prueba de preferencia macho/hembra, seguida de una prueba de comportamiento sexual. Finalizadas las pruebas comportamentales, parte de las hembras ($n=6/\text{grupo}$) fueron anestesiadas con tiopental sódico y sus cerebros fueron disecados mediante *mipropunch* para la obtención de mPOA (Figura 17). Se cuantificaron las variables previamente mencionadas para ambas pruebas comportamentales, así como la expresión de ER- α en mPOA mediante Western Blot, y se compararon entre grupos (adol. media aceite vs. adol. media estradiol vs. adol. tardía).

Debido a errores en la corrida de proteínas mediante SDS-page, las cuales no permitieron la cuantificación de ER- α para algunas muestras, de la totalidad de muestras procesadas ($n=6/\text{grupo}$), las pertenecientes a 2 hembras en adolescencia media tratadas con estradiol y a 1 hembra en adolescencia tardía no fueron cuantificadas ni consideradas en el análisis estadístico.

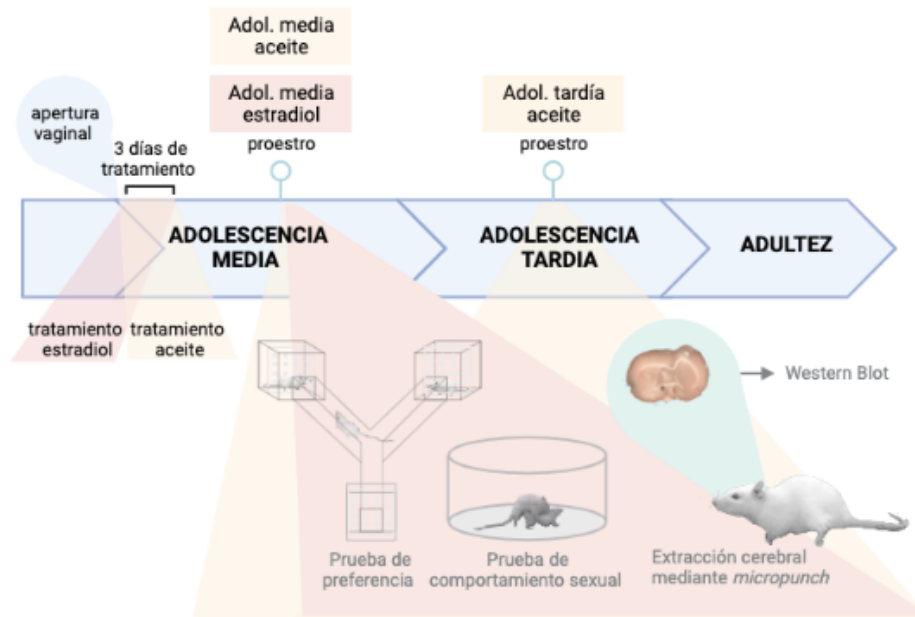


Figura 17. Procedimiento experimental, Capítulo 3.

Análisis estadístico

Datos fisiológicos como edad y peso son expresados como media \pm error estándar. Luego de confirmada la distribución normal y la homogeneidad de varianzas (test de normalidad de Shapiro-Wilk y el test de Levene de homogeneidad de varianzas, respectivamente), estos datos fueron comparados entre los tres grupos mediante la prueba de ANOVA de una vía, seguido de la prueba post-hoc de Tukey, o entre los dos grupos de hembras en adolescencia media mediante la prueba T de Student (Ruxton & Beauchamp, 2008).

Los datos comportamentales no se ajustaron a una distribución normal ni presentaron homogeneidad de varianzas (prueba de Shapiro-Wilk y prueba de Levene, respectivamente), por lo que se representan como mediana (cuartil 1-cuartil 3) o mediana (RIC) y se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas. Las comparaciones entre los grupos experimentales (grupos independientes) en la prueba de interacción sexual se realizaron mediante el análisis de varianzas de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney. Las variables de la prueba de preferencia se compararon como fue descrito previamente (ver *Análisis estadístico* de Experimento 1).

Los datos comportamentales fueron correlacionados con una variable temporal (días transcurridos desde la última inyección, o días post-tratamiento) utilizando la prueba de coeficiente de correlación de rango de Kendall para datos no paramétricos, recomendada para un número reducido de muestras (Siegel & Castellan, 1988; Zar, 2014).

Resultados

Control de variables fisiológicas

Con el objetivo de asegurar que el tratamiento con estradiol o aceite ocurriese en el mismo momento del desarrollo de todas las hembras utilizadas en el estudio, se confirmó que no existieran diferencias estadísticas en la edad de apertura vaginal (día de comienzo del tratamiento) entre los 3 grupos experimentales ($F_{(2, 20)}=0,59$, $p=0,57$; tabla 2).

Tabla 2. Control de variables fisiológicas

	Edad en día de apertura vaginal (días)	El día de la prueba			
		Edad (días)	Peso (g)	Número de días post-tratamiento	Peso macho (g)
Adol. media aceite	35±0,7	42±0,5	148±4,4	5±0,4	388±12,8
Adol. media estradiol	36±0,6	43±0,7	156±7,7	5±0,4	368±17,0
Adol. tardía	36±0,7	54±1,3	192±7,3	16±0,8	370±2,4

Datos expresados como media ± error estándar.
 $p=ns$ adol. media aceite vs. adol. media estradiol, prueba t de Student.
Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$; adol. tardía: $n=8$.

De manera de poner a prueba nuestra hipótesis, resulta fundamental controlar que los grupos en adolescencia media no difirieran entre sí en su edad el día de la prueba. Como se muestra en la Tabla 2, los grupos de hembras en adolescencia media no difirieron estadísticamente entre si en su edad ($t_{(13)}=0,88$, $p=0,39$; prueba t de Student) o su peso ($t_{(13)}=0,98$, $p=0,34$).

Por otra parte, se controlaron el número de días transcurridos entre el último día de tratamiento y el día de la prueba (días post-tratamiento), y se confirmó que los grupos de hembras en adolescencia media (con estradiol y aceite) no difirieron en esta variable ($t_{(13)}=0,55$, $p=0,59$; Tabla 2).

Por último, considerando que los machos adultos utilizados para la interacción sexual fueron diferentes para cada hembra, y que ciertos componentes del comportamiento sexual dependen de la estimulación física realizada por el mismo durante la monta (Pfaff, Montgomery, & Lewis, 1977), se corroboró que no existieron diferencias estadísticas en el peso de los machos utilizados para cada grupo, entre los tres grupos experimentales ($F_{(2,20)}=0,6$, $p=0,56$; Tabla 2).

Corroboración de la correcta administración del tratamiento hormonal

Todas las hembras tratadas con estradiol mostraron exudados vaginales representativos de la fase de estro del ciclo estral (abundancia de células epiteliales cornificadas, ver Figura 5) 24 horas luego de la primer inyección y hasta dos días luego de la última inyección, luego de lo cual retomaron la ciclicidad.

Estos datos corroboran un efecto fisiológico del tratamiento hormonal y, por ende, su correcta administración.

Prueba de preferencia macho/hembra

Todas las hembras permanecieron más tiempo (adol. media aceite: $T_{(8)}=2,0$, $p=0,03$; adol. media est.: $T_{(7)}=0,0$, $p=0,02$; adol. tardía: $T_{(8)}=0,0$, $p=0,01$; Figura 18a) y entraron un mayor número de veces (adol. media aceite: $T_{(8)}=3,0$, $p=0,04$; adol. media estradiol: $T_{(7)}=0,0$, $p=0,02$; adol. tardía: $T_{(8)}=0,0$, $p=0,01$; Tabla 3) al compartimiento del macho comparado al compartimiento de la hembra no receptiva. En este sentido, el tiempo total ($H_{(2)}=3,0$, $p=0,22$; Figura 18a) y el número de entradas ($H_{(2)}=0,48$, $p=0,79$; Tabla 3) al compartimiento del macho no difirió entre los grupos.

A pesar de que el porcentaje de hembras que mostró preferencia por el macho fue menor en las hembras en adolescencia media tratadas con aceite (6/8; 75%) que en aquellas tratadas con estradiol (7/7; 100%) y que hembras en adolescencia tardía (8/8; 100%), la diferencia entre grupos no fue significativa (distribución de preferencia: $p=0,13$, tabla de contingencia 3x3; Figura 19).

Tabla 3. Comportamiento en prueba de preferencia macho/hembra

	Número de entradas a compartimiento			Locomoción
	Macho	Hembra	Neutro	
Adol. media aceite	21,5 (18,8-32,0)	16,0 (13,5-18,5)	6,0 (5,5-7,3)	149,0 (128,8-171,3)
Adol. media estradiol	20,0 (16,5-28,0)	15,0 (12,0-16,0)	6,0 (4,5-10,0)	132,0 (119,0-154,5)
Adol. tardía	20,5 (17,0-23,0)	14,0 (12,5-16,0)	6,5 (5,0-8,0)	132,0 (124,0-140,0)

Datos expresados como mediana (cuartil 1-cuartil 3)

$p=n.s.$, prueba de Kuskal Wallis (locomoción y entradas, comparación entre grupos)

$p=n.s.$ prueba de ANOVA de Friedmann (entradas, comparación entre estímulos para cada grupo).

Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$; adol. tardía: $n=8$.

Las hembras en adolescencia tardía y en adolescencia media tratadas con estradiol expresaron un mayor número de intentos por acceder al estímulo (adol. tardía: $T_{(8)}=0,0$; $p=0,02$; adol. media estradiol: $T_{(7)}=0,0$, $p=0,02$; Figura 18b) y olfateos (adol. tardía: $T_{(8)}=0,0$; $p=0,01$; adol. media estradiol: $T_{(7)}=0,0$, $p=0,02$; Figura 18c) en el compartimiento del macho en comparación al compartimiento de la hembra. Esta diferencia no se observó en las hembras en adolescencia media tratadas con aceite (Intentos: $T_{(8)}=0,0$; $p=0,18$; olfateos: $T_{(8)}=4,5$; $p=0,06$; Figura 18b,c). En concordancia con este resultado, el número de intentos por acceder al macho difirió entre grupos ($H_{(2)}=10$, $p\leq 0,01$), siendo menor en hembras en adolescencia media tratada con aceite en comparación a hembras de la misma edad tratadas con estradiol ($U_{(8,7)}=3,5$, $p\leq 0,01$) y en comparación a hembras en adolescencia tardía ($U_{(8,8)}=8,0$, $p\leq 0,01$) (Figura 18b),

mientras que no difirió entre estos dos últimos grupos ($U_{(8,7)}=23$, $p=0,60$; Figura 18b). Por otra parte, el número de olfateos ($H_{(2)}=2,9$, $p=0,23$; Figura 18c) en el compartimiento del macho no difirió entre grupos.

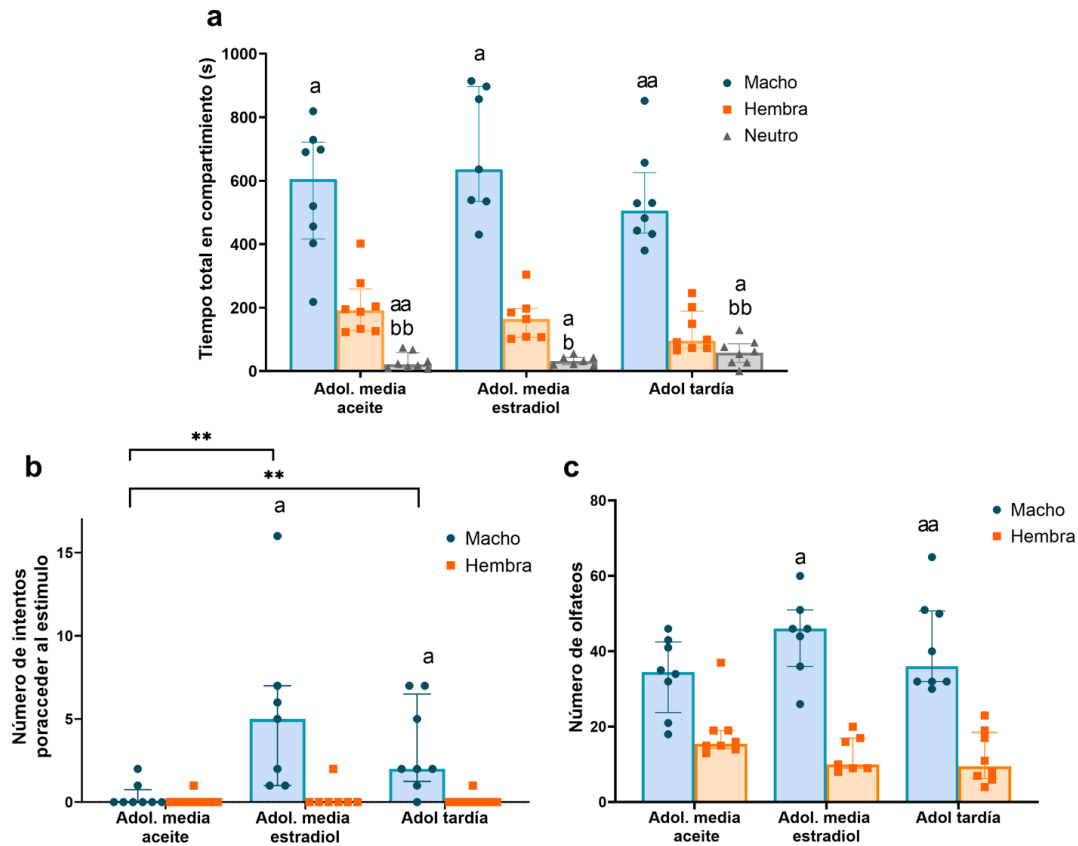


Figura 18. Comportamiento en prueba de preferencia de hembras en adolescencia media tratadas con estradiol o aceite y hembras en adolescencia tardía.

a. Tiempo total en compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules), hembra (estímulo social, barras naranjas) o neutro (barras grises). **b.** Número de intentos por acceder al compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules) o hembra (estímulo social, barras naranjas). **c.** Número de olfateos a la pared interna del compartimiento del macho (estímulo sexual, barras azules) o hembra (estímulo social, barras naranjas).

Los datos se expresan como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo.

^a $p \leq 0,05$, ^{aa} $p \leq 0,01$ vs. hembra y ^b $p \leq 0,05$, ^{bb} $p \leq 0,01$ vs. macho dentro de un mismo grupo, prueba de muestras pareadas de Wilcoxon.

** $p \leq 0,01$ entre grupos, prueba U de Mann-Whitney.

Adol. media aceite: $n=8$; Adol. media estradiol: $n=7$; adol. tardía: $n=8$.

El tiempo total ($H_{(2)}=4,77$, $p=0,09$; Figura 18a), número de entradas ($H_{(2)}=0,96$, $p=0,92$; Tabla 3), número de intentos por acceder al estímulo ($H_{(2)}=0,02$, $p=0,97$; Figura 18b), y número de olfateos ($H_{(2)}=2,90$, $p=0,24$; Figura 18c) en el compartimiento de la hembra, no difirió entre grupos. Tampoco difirió entre grupos el número de entradas y el tiempo total en el compartimiento neutro (entradas: $H_{(2)}=0,05$, $p=0,98$, tabla 3; tiempo en neutro: $H_{(2)}=3,11$, $p=0,21$, Figura 18a). A su vez, no detectamos diferencias entre grupos en la movilidad dentro del modelo ($H_{(2)}=1,78$, $p=0,41$; tabla 3), ni en el tiempo total dentro de los compartimientos ($H_{(2)}=4,22$, $p=0,12$).

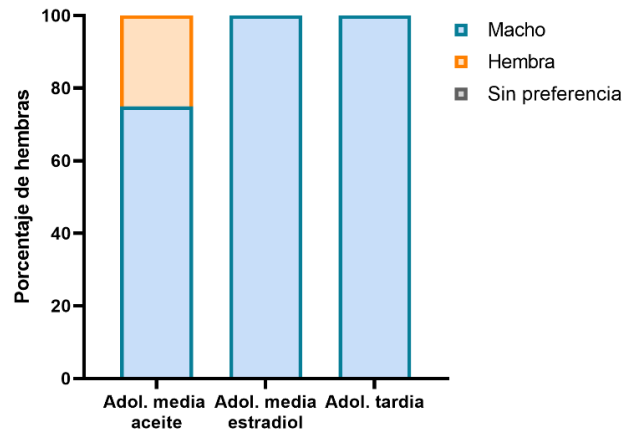


Figura 19. Distribución de preferencias. Porcentaje de hembras en adolescencia media tratadas con aceite o estradiol y en adolescencia tardía con preferencia por el macho (porción celeste), hembra (porción naranja) o sin preferencia (porción gris). $p=ns$; Tabla de contingencia 3x3. Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$; adol. tardía: $n=8$.

Prueba de comportamiento sexual

Durante la interacción sexual con un macho, todas las hembras expresaron un grado máximo de receptividad sexual (Tabla 4; cociente de lordosis: LQ). Considerando la totalidad de la prueba (8 minutos), el número de conductas proceptivas expresados por las hembras y la latencia a su expresión no difirió entre grupos (número de proceptivas: $H_{(2)}=4,03$, $p=0,13$; latencia a primer proceptiva: $H_{(2)}=0,26$, $p=0,88$; Tabla 4), así como tampoco difirieron el número de montas del macho ni su latencia (número de montas: $H_{(2)}=3,28$, $p=0,19$; latencia de monta: $H_{(2)}=3,71$, $p=0,15$; Tabla 4). Sin embargo, la latencia de eyaculación difirió entre grupos ($H_{(2)}=7,1$, $p=0,03$), siendo menor en los machos que interactuaron con hembras en adolescencia media tratadas con estradiol, en comparación a aquellos que interactuaron con hembras de la misma edad tratadas con aceite ($U_{(7,8)}=7,5$, $p=0,01$; Tabla 4). Por este motivo, a continuación se describe el comportamiento de hembras y machos durante la primer serie eyaculatoria, normalizado por la latencia de eyaculación (ver Métodos).

Tabla 4. Comportamiento sexual en interacción de 8 minutos

	Hembra				Macho			
	LQ	Número de conductas proceptivas	Número de olf. AG	Latencia (s) Proceptiva	Número de montas	Número de olf. AG	Latencia (s)	
							Monta	Eyaculación
Adol. media aceite	1,0 (1,0-1,0)	43,5 (33,3-52,8)	5,0 (4,0-7,0)	17,5 (13,5-22,3)	14,5 (12,5-17,0)	7,0 (6,3-9,8)	19,5 (16,8-25,5)	480 (394-480)
Adol. media estradiol	1,0 (1,0-1,0)	58,0 (53,0-90,5)	6,0 (5,0-12,0)	16,0 (14,0-22,0)	21,0 (16,0-25,5)	5,0 (4,0-11,0)	19,0 (10,5-22,0)	252 (158-315)**
Adol. tardía	1,0 (1,0-1,0)	37,5 (33,8-51,3)	6,0 (4,8-7,3)	17,0 (6,8-34,3)	17,5 (13,8-19,5)	6,5 (4,8-10,3)	13,0 (10,0-16,8)	363 (278-469)

Datos expresados como mediana (cuartil 1 – cuartil 3).

** $p \leq 0,01$ vs. Adol. media aceite en latencia de eyaculación del macho, prueba U de Mann-Whitney.

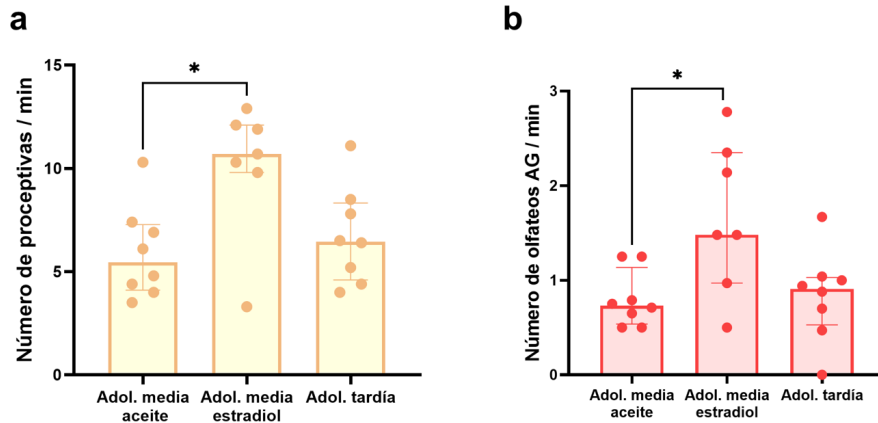
Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$; adol tardía: $n=8$.

LQ=cociente de lordosis; olf. AG= Olfateos anogenitales.

Durante la primer serie eyaculatoria, todas las hembras mostraron un grado máximo de receptividad sexual (LQ=1,0(0,0) en todos los grupos). Sin embargo, el número de conductas proceptivas y olfateos anogenitales expresados por minuto difirió entre grupos (proceptivas: $H_{(2)}=6,04$, $p=0,04$; olfateos anogenitales: $H_{(2)}=5,87$, $p=0,05$). En este sentido, hembras en adolescencia media tratadas con estradiol expresaron un mayor número de conductas proceptivas y olfateos anogenitales en comparación a hembras de la misma edad tratadas con aceite (proceptivas: $U_{(7,8)}=9,5$, $p=0,04$; Figura 20a; olfateos anogenitales: $U_{(7,8)}=8,0$, $p=0,03$; Figura 20b), y tendieron a exhibir un mayor número de estos comportamientos en relación a las hembras en adolescencia tardía (proceptivas: $U_{(7,8)}=11$, $p=0,06$; Figura 20a; olfateos anogenitales: $U_{(7,8)}=11$, $p=0,06$; Figura 20b).

Acompañando el comportamiento de las hembras, el número de montas por minuto por parte del macho difirió entre grupos ($H_{(2)}=7,55$, $p=0,02$). Las hembras en adolescencia media tratadas con estradiol recibieron un mayor número de montas en comparación a hembras de la misma edad tratadas con aceite ($U_{(7,8)}=4,0$, $p \leq 0,01$; Figura 20c), sin diferenciarse del número de montas recibidas por hembras en adolescencia tardía ($U_{(7,8)}=16$, $p=0,18$; Figura 20c). Sin embargo, el número de olfateos anogenitales del macho hacia la hembra no difirió entre grupos ($H_{(2)}=1,47$, $p=0,48$; Figura 20d).

Hembra



Macho

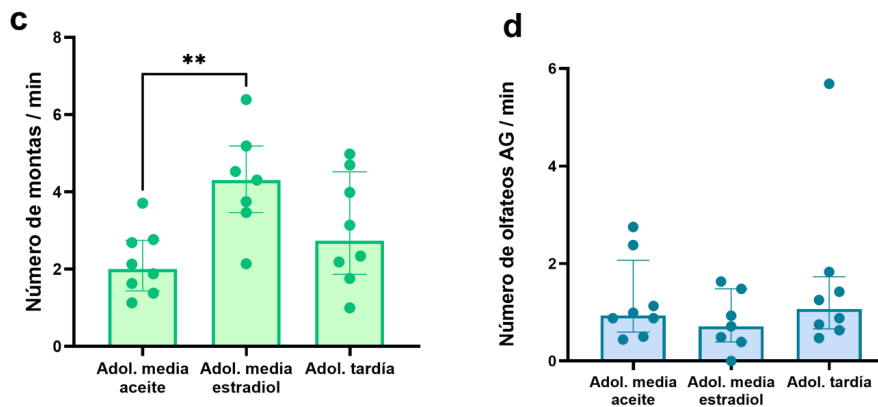


Figura 20. Expresión de comportamiento sexual durante la primer serie eyaculatoria (normalizada por minuto) de machos y hembras en adolescencia media tratadas con estradiol o aceite y hembras en adolescencia tardía.

a. Número de conductas proceptivas expresadas por la hembra. **b.** Número de olfateos anogenitales de la hembra hacia el macho. **c.** Número de montas realizadas por el macho. **d.** Número de olfateos anogenitales del macho hacia la hembra.

Los datos se expresan como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo.

* $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$, prueba U de Mann-Whitney.

Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$; adol. tardía: $n=8$.

Correlación entre el lapso temporal transcurrido entre el tratamiento con estradiol y la expresión de motivación sexual

De manera de evaluar si el efecto del tratamiento con estradiol sobre la expresión de la motivación y el comportamiento sexual varía según el tiempo transcurrido desde la última exposición a la hormona, se evaluó la correlación entre el tiempo transcurrido entre la última inyección de estradiol y el día de las pruebas comportamentales (días post-inyección) con la expresión de estos comportamientos.

En aquellas hembras tratadas con estradiol el número de días post-inyección correlacionó con la expresión de la motivación sexual. En este sentido, como se muestra en la Figura 21a, en la prueba de preferencia macho/hembra, el número de días transcurridos desde la última inyección de hembras en adolescencia media correlacionó positivamente con el número de olfateos en el compartimiento del estímulo sexual para hembras tratadas con estradiol ($k_{\tau}=0,8$, $p=0,02$, prueba de correlación de rangos de Kendall), pero no así para hembras tratadas con aceite (adol. media aceite: $k_{\tau}=4,3$, $p=0,13$). El tiempo total en el compartimiento del estímulo sexual y el número de intentos por acceder al mismo no correlacionaron con el tiempo transcurrido desde la última inyección en ninguno de los grupos (tiempo en macho: adol. media aceite: $k_{\tau}=0,0$, $p=0,89$; adol. media estradiol: $k_{\tau}=0,3$, $p=0,40$; intentos por acceder al macho: adol. media aceite: $k_{\tau}=-0,2$, $p=0,42$; adol. media estradiol: $k_{\tau}=0,0$, $p=1,0$).

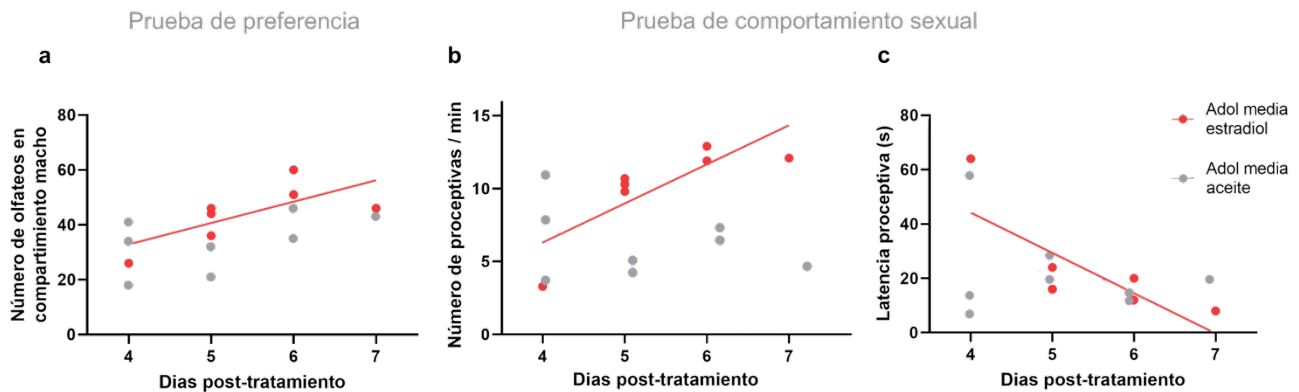


Figura 21. Motivación sexual de hembras en adolescencia media tratadas con aceite o estradiol en función del número de días post-tratamiento.

Número de olfateos en el compartimiento del macho en la prueba de preferencia (a), número de conductas proceptivas por minuto durante la primer serie eyaculatoria (b) y latencia a la expresión de la primer conducta proceptiva (c) en prueba de comportamiento sexual de hembras en adolescencia media tratadas con aceite (puntos grises, $n=8$) o estradiol (puntos rojos, $n=7$) en función al número de días transcurridos desde finalizado el tratamiento.

Cada punto representa un individuo. Se representa para cada grupo la línea de tendencia central.

Número de olfateos en el compartimiento del macho: adol. media aceite ($k_{\tau}=-0,43$, $p=0,13$); adol. media estradiol ($k_{\tau}=0,8$, $p=0,02$).

Número de proceptivas totales: adol. media aceite ($k_{\tau}=-0,1$, $p=0,68$); adol. media estradiol ($k_{\tau}=-0,7$, $p=0,03$).

Latencia a primer proceptiva: adol. media aceite ($k_{\tau}=-0,0$, $p=1,0$); adol. media estradiol ($k_{\tau}=-0,71$, $p=0,03$), prueba de correlación de rangos de Kendall.

Adol. media aceite: $n=8$; adol. media estradiol: $n=7$.

Por otra parte, en cuanto al comportamiento sexual, el número de días transcurridos desde la última inyección de estradiol correlacionó positivamente con el número de conductas proceptivas ($k_{\tau}=0,79$, $p=0,01$; Figura 21b) y negativamente con la latencia de expresión de estas ($k_{\tau}=-0,71$, $p=0,03$; Figura 21c), pero estas correlaciones no se observaron en hembras tratadas con aceite (número de

proceptivas: adol. media aceite: $k_{\tau}=-0,1$, $p=0,68$;
 latencia a proceptiva: adol. media aceite: $k_{\tau}=0,0$,
 $p=1,0$; Figura 21b,c). No se observó correlación
 entre el número de días transcurridos desde la
 última inyección con el número de montas
 realizadas por el macho para ninguno de los grupos
 (adol. media aceite: $k_{\tau}=-0,4$, $p=0,22$; adol. media
 estradiol: $k_{\tau}=0,5$, $p=0,13$).

Expresión de ER- α en mPOA

La expresión de ER- α en el mPOA no difirió
 entre grupos ($F_{(2, 12)}=1,46$, $p=0,27$; Figura 22).

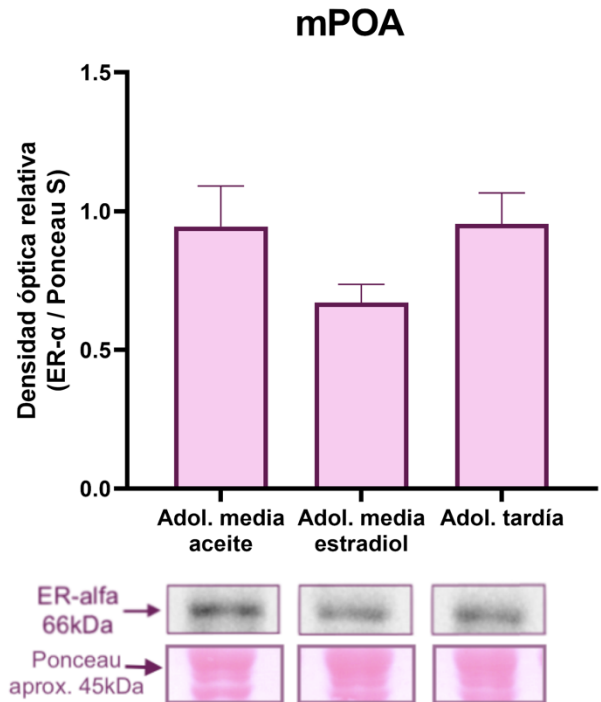


Figura 22. Expresión de ER- α en cerebros de hembras en adolescencia media tratadas con aceite o estradiol y hembras adolescencia tardía en mPOA. Datos expresados en media \pm error estándar. $p=ns$; ANOVA de 1 vía. Adol. media aceite : $n=6$; adol. media estradiol: $n=4$; adol. tardía: $n=5$. En el panel inferior se muestran ejemplos de la marca correspondientes a ER- α (aprox. 66 kDa) obtenidas mediante Western Blot para cada grupo (las bandas corresponden al mismo

Resultados principales y conclusión

Como fue hipotetizado, una mayor exposición a estradiol durante la adolescencia media aumentó la expresión de motivación sexual en la prueba de preferencia de hembras en adolescencia media, alcanzando los niveles observados durante la adolescencia tardía. A su vez, durante la interacción sexual, el despliegue de componentes motivaciones del comportamiento sexual de hembras en adolescencia media también aumentó frente a la mayor exposición a estradiol, incluso con una tendencia de aumento con respecto a hembras en adolescencia tardía. Estos resultados indican que la exposición repetida a estradiol durante etapas tempranas de la adolescencia media aumenta motivación sexual de hembras en esta etapa del desarrollo. Por otra parte, el aumento del número de montas por minuto de los macho junto con su menor latencia de eyaculación podrían indicar un aumento de la atractividad de las adolescentes tratadas con estradiol.

De todas maneras, en contra a lo hipotetizado, la mayor exposición a estradiol no aumentó la expresión de ER- α en mPOA de hembras en adolescencia media.

DISCUSIÓN

Aumento de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia

Utilizando una prueba de preferencia macho/hembra, prueba motivacional validada (Ågmo et al., 2004; Agrati et al., 2018; Clark et al., 2004), los resultados de la presente tesis evidencian que en la rata hembra naturalmente ciclante la motivación sexual es menor durante la adolescencia media y aumenta en la adolescencia tardía cuando se observa un comportamiento indistinguible del de la adultez. Esta conclusión se refuerza con estudios previos que, utilizando una prueba de emisión de USV luego de una breve interacción con un estímulo social y uno sexual, sugieren una motivación sexual disminuida durante la adolescencia media (Armas et al., 2021). La motivación sexual, entonces, presentaría un patrón ontogénico de aumento a lo largo de la adolescencia hasta la adolescencia tardía, cuando se adquiere la maduración total de este comportamiento y se alcanzan los niveles de la adultez.

Independientemente de su edad, en la prueba de preferencia macho/hembra todas las hembras permanecieron más tiempo en el compartimiento del macho en comparación a los otros dos compartimientos (Figura 12), dato que deja en evidencia el valor de incentivo de un macho para una hembra sexualmente activa (Agrati et al., 2008; Clark et al., 2004). Sin embargo, tal valor de incentivo se encontraría disminuido durante la adolescencia media, dado que estas hembras presentaron una menor preferencia por el macho que las hembras adultas (Figura 13), y realizaron un menor número de intentos por acceder a este estímulo en comparación a ratas adultas y en adolescencia tardía (Figura 12). El número de intentos por acceder a un compartimiento en la prueba de preferencia puede interpretarse como una medida del esfuerzo que el individuo está dispuesto a hacer por interactuar con el estímulo, ya que se ha evidenciado que este comportamiento se relaciona con el estado motivacional de las hembras (Agrati et al., 2016) y es dependiente de la neurotransmisión dopaminérgica (Ferreño, Uriarte, Zuluaga, Ferreira, & Agrati, 2018). En este sentido, mientras que el haber permanecido más tiempo junto al macho que junto a la hembra evidencia que las hembras en adolescencia media están sexualmente motivadas (Ågmo et al., 2004), el menor esfuerzo por acceder al macho en comparación a los otros grupos etarios sugiere que este estímulo podría generar un menor reclutamiento de sistemas generales implicados en los aspectos energizantes de las conductas motivadas, como lo es el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Salamone et al., 2016).

El menor esfuerzo realizado por las hembras en adolescencia media en la prueba de preferencia sexual (Figura 12), entonces, podría deberse a una disminución general en la expresión de conductas motivadas. Sin embargo, el valor de incentivo de estímulos recompensantes (Friemel et al., 2010;

Zakharova, Wade, & Izenwasser, 2009) y la motivación social (Douglas et al., 2004; Klein et al., 2010; Panksepp, 1981) son mayores en la adolescencia que en la etapa adulta. En particular, estudios previos reportaron que, durante el proestro tardío (cuando se encuentran sexualmente activas), las ratas adolescentes exhiben más conductas de juego y de exploración social hacia otra hembra, así como mayor emisión de USV luego de interactuar con otra hembra, en comparación a las ratas adultas (Armas et al., 2021) lo cual refuerza la idea de que la motivación social disminuye entre la adolescencia y la adultez. Esta evidencia en conjunto sugiere que el patrón de aumento de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia es un cambio que concierne específicamente al comportamiento sexual y no a otros comportamientos motivados.

Aumento de la motivación sexual durante la adolescencia media por la exposición repetida a estradiol

A diferencia de otras conductas sociales motivadas, la motivación sexual es estrictamente dependiente de los esteroides gonadales (Pfaus et al., 2015; Snoeren, 2018; Sodersten & Eneroth, 1981), y los resultados de esta tesis indican que la exposición a estradiol jugaría un papel importante en la maduración de este comportamiento a lo largo de la adolescencia. Así, en el Capítulo 3 se reporta que las hembras en adolescencia media tratadas con estradiol realizaron más esfuerzos por acceder al macho y olfatearon más al macho que a la hembra en la prueba de preferencia, al igual que hembras en adolescencia tardía (Figura 18). El marcado incremento en los esfuerzos de las hembras en adolescencia media tratadas con estradiol con relación a las tratadas con aceite, indica un aumento en su motivación sexual. En cuanto al despliegue del comportamiento sexual durante la interacción con un macho, el tratamiento con estradiol aumentó tanto la proceptividad como la atractividad sexual (evidenciada por un aumento en el número de montas por parte del macho) de hembras en adolescencia media (Figura 20). Tal despliegue del comportamiento sexual de hembras en adolescencia media tratadas con estradiol también tendió a ser mayor en comparación al de hembras en adolescencia tardía.

Como hipotetizado, entonces, cuando se sometió a ratas en adolescencia media a un tratamiento exógeno que simula el número de exposiciones a picos estrogénicos ováricos experimentados naturalmente por hembras en adolescencia tardía, estas aumentaron su motivación sexual sin mostrar diferencias con las hembras en adolescencia tardía.

¿Sensibilización comportamental al estradiol?

Tanto el incremento en la expresión de la motivación sexual como en la proceptividad y atractividad de las hembras en adolescencia media tratadas con estradiol podrían explicarse por una sensibilización a los efectos comportamentales de esta hormona, como fue previamente reportado en hembras adultas ovariectomizadas (Jones et al., 2013; Jones, Gardner Gregory, et al., 2015; Jones, Germé, et al., 2015; Jones & Pfaus, 2014), y en hembras ovariectomizadas de forma pre-púber (Hlinak, 1986). En esta línea de pensamiento, el tratamiento con estradiol utilizado en la presente tesis puede haber aumentado la sensibilidad comportamental al estrógeno de hembras en adolescencia media, de manera que el mismo pico endógeno pre-ovulatorio de estrógeno haya provocado en estas hembras una mayor expresión de comportamiento y motivación sexual en comparación al expresado por hembras de la misma edad tratadas con aceite.

Alternativamente, el aumento en la motivación y en el despliegue del comportamiento sexual inducido por el tratamiento con estradiol podrían explicarse por una mayor concentración de estrógeno circulante al momento en que las hembras fueron evaluadas. Por una parte, es posible que restos del estradiol administrado continúen presentes en el sistema cuatro días luego de la última inyección (mínimo lapso temporal entre el tratamiento y las pruebas). De todas maneras, esto parece poco probable dado que se ha reportado que en hembras adultas ovariectomizadas tratadas con 2,0µg/rata de estradiol, la concentración de estrógenos en sangre vuelve a sus niveles basales 24 horas luego del tratamiento (P. Micevych et al., 1996). Por otra parte, es posible que el tratamiento hormonal haya modificado el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal de manera que la liberación de hormonas en el siguiente pico pre-ovulatorio sea mayor en aquellas hembras tratadas con estradiol, lo que sugeriría un efecto de la exposición repetida a estrógenos durante la adolescencia en la maduración de este eje neuroendócrino. Un mecanismo similar es sugerido por Ceccarelli et al. (2007) para explicar un aumento en la relación estrógeno/testosterona en plasma que observan en ratas adultas que fueron tratadas con estradiol durante la pubertad. A pesar de poco probables, cualquiera de estos dos escenarios daría lugar a una mayor concentración de estrógeno en plasma de hembras tratadas con estradiol al momento de ser evaluadas, por lo que futuros estudios que cuantifiquen los niveles de estrógenos circulantes son necesarios para determinar si existe una relación entre éstos y la mayor expresión de motivación sexual de hembras previamente expuestas a estradiol.

De manera interesante, se observó que los efectos comportamentales del tratamiento hormonal fueron mayores cuanto mayor fue el lapso temporal entre el tratamiento y la prueba comportamental (Figura 21), lo cual sugiere que los efectos de la exposición repetida a estradiol podrían deberse a cambios complejos del tipo organizacional que no se encuentran completamente finalizados al momento en que fue evaluado el comportamiento. En este sentido, efectos comportamentales evidentes en la adultez causados por la exposición a estradiol en la pubertad (Perry, Westenbroek, & Becker, 2013) y en el período perinatal (Catanese & Vandenberg, 2018; Della Seta, Farabollini, Dessì-Fulgheri, & Fusani, 2008) han sido previamente reportados.

En cuanto al despliegue de los diferentes componentes que hacen al repertorio del comportamiento sexual de la rata hembra adulta, el comportamiento de hembras en adolescencia media y tardía tratadas con aceite (Figura 20) apoya resultados previos que indican que en la adolescencia media el despliegue del comportamiento sexual es completo y no se diferencia de hembras en adolescencia tardía o adultas (Armas et al., 2021). Por otra parte, el comportamiento en la prueba de preferencia que indica una menor motivación sexual de hembras en adolescencia media tratadas con aceite en comparación a aquellas en adolescencia tardía tratadas con aceite (Figura 18) refuerza los resultados del Capítulo 1 (Figura 12), y apoyan la conclusión de que existe un aumento en la motivación sexual entre estas etapas de la adolescencia que no se acompaña por cambios evidentes en la expresión del comportamiento sexual.

¿Podría la exposición repetida a estrógenos que ocurre luego de la pubertad mediar el aumento natural de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia?

Los resultados de la presente tesis indican que la exposición repetida a concentraciones fisiológicas de estradiol durante la adolescencia media acelera la maduración de la motivación sexual. Esta evidencia apoya el supuesto de que la exposición repetida a picos pre-ovulatorios de estrógenos, que ocurre naturalmente como parte del ciclo estral y que comienza en la adolescencia media, juega un papel importante en el incremento de la motivación sexual que ocurre entre la adolescencia media y la adolescencia tardía. Como se planteó previamente, es posible que esta maduración ocurra mediante una sensibilización comportamental a los efectos de las hormonas ováricas (Hlinak, 1986; Jones et al., 2013; Jones & Pfau, 2014).

Alternativamente, como fue discutido previamente, el aumento en la motivación sexual a lo largo de la adolescencia podría estar asociado a un aumento de la concentración de hormonas ováricas en plasma. A pesar que existe evidencia que sugiere que los picos pre-ovulatorios de estrógeno y progesterona de los

primeros dos ciclos estrales no difieren de los de la etapa adulta (Döhler & Wuttke, 1974; Meijs-Roelofs, Uilenbroek Th., De Greef, De Jong, & Kramer, 1975), Vetter-O'Hagen & Spear (2012) reportan que en todas las fases del ciclo estral los niveles de estrógeno y progesterona de hembras en adolescencia media son menores que los de hembras que se encuentran entre la adolescencia tardía y la adultez. No está claro, entonces, si las concentraciones de estrógeno y progesterona en plasma generadas por el pico pre-ovulatorio difiere entre la adolescencia media y tardía, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que un aumento de éstos sea el causante del aumento de la motivación sexual entre estas etapas que se reporta en la presente tesis.

De todas formas, al momento de interpretar el rol de la exposición a estrógenos que ocurre de manera natural sobre el desarrollo de la motivación sexual, es importante considerar que a pesar de que el objetivo fue simular el número de exposiciones a estradiol de hembras en adolescencia media a los experimentados por hembras en adolescencia tardía, el tratamiento utilizado presenta ciertas limitaciones. Por una parte, la dosis de 2,5µg/rata fue elegida porque es capaz de inducir la apertura vaginal precoz en hembras pre-púberes (Södersten, 1975) y es similar a la dosis de 2,0µg/rata que eleva los niveles de estrógeno en plasma de hembras adultas ovariectomizadas a aquellos observados durante el pico pre-ovulatorio (Geary & Asarian, 1999; P. Micevych et al., 1996). Sin embargo, se desconoce cual es la dosis de estradiol exacta necesaria para aumentar los niveles de estradiol en plasma de hembras ciclantes en adolescencia media a aquellos observados durante los picos pre-ovulatorios, por lo que es posible que la dosis que fue administrada eleve estos niveles por encima de los niveles fisiológicos y, por ende, no simule un pico estrogénico natural. Por otra parte, la administración de 3 dosis de estradiol en días consecutivos podría ocasionar efectos diferentes a la administración cada 4 días, que simularía mejor la ciclicidad natural de las hembras. Estas características del tratamiento utilizado podrían dar lugar a efectos comportamentales mayores a aquellos causados por la exposición natural a estrógenos, lo cual podría explicar la tendencia que mostraron las hembras en adolescencia media tratadas con estradiol a desplegar más componentes proceptivos y presentar una mayor atractividad que hembras en adolescencia tardía (Figura 20).

En sumatoria, desde el punto de vista del desarrollo comportamental, los resultados de la presente tesis indican que existe una maduración de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia la cual posiblemente es modulada, al menos en parte, por la exposición repetida a estrógenos que ocurre durante esta etapa.

Cambios en la expresión cerebral de ER- α en el mPOA entre la adolescencia y la adultez

En cuanto a la maduración del circuito neural que regula el comportamiento sexual, los resultados indican que existen cambios en la expresión de ER- α en el mPOA entre la adolescencia y la adultez de la rata hembra (Figura 16), lo cual indica que la maduración de la motivación sexual que ocurre durante esta etapa del desarrollo se acompaña por cambios madurativos en un área fundamental del circuito neural que la regula. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre edades en la expresión de ER- α en las demás regiones relevantes del circuito sexual que fueron evaluadas, como la amígdala MePD, el ARC y el VMNvl (Figuras 15 y 16).

Mientras que todas estas regiones cerebrales modulan la expresión del comportamiento sexual, el mPOA se ha postulado como la principal región encargada de la modulación de los aspectos motivacionales de este comportamiento, conectando áreas límbico-hipotalámicas específicas del control del comportamiento sexual con el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico como sistema motivacional general (P. Micevych & Meisel, 2017). En este sentido, el hecho de que el cambio en la expresión de ER- α , receptor fundamental para la expresión del comportamiento sexual (Mazzucco et al., 2008; Pfaus et al., 2015; Snoeren, 2018), se observe en esta área, concuerda con los resultados comportamentales que indican que es la motivación sexual específicamente, y no el despliegue del comportamiento sexual, lo que difiere a lo largo de la adolescencia.

Debido a que en hembras adultas una disminución experimental en la expresión de ER- α en mPOA reduce el comportamiento y la motivación sexual (Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2012), se esperaba encontrar un incremento en la expresión de ER- α desde la adolescencia media a la adolescencia tardía y adultez que acompañe el aumento en la motivación sexual que ocurre entre estas etapas. Sin embargo, los cambios en expresión de ER- α evidenciados a lo largo del desarrollo no fueron los esperados. En este sentido, se reporta que la expresión de ER- α fue mayor en la adolescencia tardía que en la adultez, períodos en los cuales la motivación sexual es alta, y fue intermedia en la adolescencia media, cuando la expresión de la motivación sexual es menor (Figura 16). Estos resultados sugieren que a pesar de que la expresión de ER- α en mPOA varía entre la adolescencia y la adultez, la maduración de la motivación sexual durante la adolescencia no depende de un aumento en la expresión de ER- α en las regiones cerebrales que modulan este comportamiento.

De todas maneras, los niveles de expresión de ER- α no necesariamente determinan de forma directa su efecto sobre el comportamiento sexual. Por ejemplo, ER- α ejerce diferentes efectos sobre la expresión del comportamiento sexual según el tipo celular en el que se exprese (Mhyre & Dorsa, 2006) y

según si actúa como receptor nuclear o como receptor de membrana (P. Micevych & Dewing, 2011). Considerando que en la presente tesis no se distinguió entre tipos celulares ni se consideró la localización subcelular del receptor al momento de cuantificarlo, es posible que existan diferencias en estos aspectos a lo largo de la adolescencia. Esta consideración resulta especialmente relevante dado que resultados de Mohr, Falcy, Laham, Wong, & Micevych (2019) muestran que a pesar de que la cantidad de ARNm que codifica para ER- α en astrocitos del hipotálamo de ratones hembra no varía entre pre-púberes, post-púberes y adultas, la cantidad de ER- α localizados en la membrana de estas células y los efectos del estradiol actuando sobre los mismos aumenta con la edad. Es posible, entonces, que detrás de los valores de expresión reportados a lo largo de la adolescencia, existan patrones diferentes de expresión de ER- α para diferentes tipos celulares y/o diferencias en la proporción de estos receptores actuando en la membrana, lo que podría dar lugar a una respuesta diferencial al estrógeno entre edades que se refleje en diferencias en la motivación sexual.

Por otra parte, no puede descartarse que a lo largo de la adolescencia existan cambios en los efectos del estrógeno mediados por ER- α que se asocian a diferencias en la funcionalidad del receptor. Esto es especialmente relevante si se considera que la expresión de la motivación sexual en ratas ciclantes depende fuertemente de la progesterona actuando sobre su receptor intracelular, PR (Shaila K. Mani et al., 2006; Shailaja K. Mani et al., 1994; Ogawa, Olazábal, Parhar, & Pfaff, 1994), cuya expresión es inducida por el estrógeno ligado a receptores ER- α nucleares (Harris et al., 2002; Sá et al., 2013). Previamente se ha reportado que el incremento de la expresión de PR en el mPOA en respuesta a la administración de estradiol, en hembras ovariectomizadas 5 días antes, aumenta con la edad entre la adolescencia media, tardía y adultez (Quadros & Wagner, 2008). Esto indica que la capacidad de ER- α de inducir la expresión de PR se incrementa a lo largo de la adolescencia. Esto podría deberse a múltiples factores independientes al nivel de expresión de ER- α , dado que la capacidad de este receptor de actuar como factor de transcripción frente a la unión de estrógeno puede verse influenciado por cambios en la afinidad receptor-hormona (Brown, Macluskey, Shanabrough, & Naftolin, 1990), cambios en la expresión de diferentes variantes de *splicing* de ER- α (Mott & Pak, 2013), y/o a cambios en los niveles de co-activadores/co-represores que acompañan su acción a nivel transcripcional (Frasor, Danes, Funk, & Katzenellenbogen, 2005; Lonard & O'Malley, 2007), entre otros.

En conclusión, a pesar de que el aumento de la motivación sexual en la adolescencia no se acompañó por un aumento la expresión de ER- α , sí podría acompañarse por cambios en la funcionalidad del receptor, la cual varía según el tipo celular en el que se exprese, la localización intracelular en la que se encuentre y la presencia de diferentes factores que modulan su capacidad como factor de

transcripción. Para adquirir mayor conocimiento al respecto, sería interesante comparar la expresión cerebral de ER- α a lo largo de la adolescencia en diferentes tipos celulares, así como evaluar la expresión de PR inducida por el estradiol durante la fase de proestro tardío de hembras en diferentes etapas de la adolescencia.

Expresión de ER- α en mPOA luego de la exposición repetida a estradiol durante la adolescencia media

En cuanto a la regulación de la expresión de ER- α inducida por el estradiol, el tratamiento diario con 2,5 μ g de estradiol durante los 3 días posteriores a la apertura vaginal en la rata hembra ciclante no modificó la expresión de ER- α en mPOA a los 4-7 días de finalizado el tratamiento (Figura 22). Estos resultados son de especial relevancia, dado que actualmente se considera que el efecto de los estrógenos sobre la expresión de ER- α difiere según el tipo de tratamiento, la edad en la cual se realiza y el área cerebral a analizar (Pfaus et al., 2015), y los efectos a corto plazo en hembras en etapas tempranas de la adolescencia no han sido previamente reportados. En ratas adultas ovariectomizadas, se han reportado tanto disminuciones (Zhou et al., 1995) como ausencia de cambio (Chakraborty, Hof, Ng, & Gore, 2003) en la expresión de ER- α en mPOA frente al tratamiento con estradiol. Por otro lado, mientras que un tratamiento con estradiol previo a la apertura vaginal induce un aumento de la expresión de ER- α en VMNvl (Devidze et al., 2005), este tratamiento en hembras adultas disminuye la expresión de ER en la misma región cerebral de manera dosis dependiente (Lauber et al., 1991). En conjunto con estos antecedentes, los resultados de la presente tesis resaltan la complejidad de la regulación por parte del estradiol sobre la expresión de su receptor ER- α , lo cual dificulta predecir el efecto de un tratamiento hormonal en la expresión de éste.

De todas formas, el hecho de que no se observaran cambios en la expresión de ER- α en mPOA luego de 4-7 días de finalizado el tratamiento hormonal, no necesariamente implica que éstos no ocurran a un mayor lapso temporal. En este sentido, se ha reportado que hembras ciclantes tratadas con estradiol previo a la apertura vaginal no se diferencian de hembras tratadas con aceite en la expresión de ER- α en mPOA durante la adolescencia media, pero presentan una expresión aumentada del receptor en esta área cerebral durante la adultez (Ceccarelli et al., 2007). La regulación de la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas del gen que codifica para ER- α (Gagnidze, Weil, & Pfaff, 2010), que han sido previamente reportados luego de la exposición a estradiol (Schwarz et al., 2010), podría explicar un posible efecto a mayor plazo temporal del tratamiento con esta hormona. Sería interesante evaluar si el

tratamiento utilizado en el presente estudio modifica la expresión cerebral de ER- α a mayores plazos temporales, y si induce modificaciones epigenéticas en el gen que codifica para el receptor.

Por otra parte, el hecho de que el tratamiento con estradiol no haya modulado la expresión de ER- α en mPOA 4-7 días luego de finalizado, indica que el mecanismo mediante el cual esta exposición hormonal aumentó la motivación sexual no involucró un incremento en los niveles de expresión de ER- α en mPOA. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que la exposición repetida a estradiol haya causado un aumento en la motivación sexual mediante un incremento en la sensibilidad comportamental a estrógenos, como hipotetizamos. En este sentido, el tratamiento puede haber aumentado la sensibilidad a estrógenos mediante cambios en la expresión de otros receptores de estrógeno que no consideramos en el presente estudio como, por ejemplo, los receptores específicos de membrana o ER- β (P. Micevych & Sinchak, 2013, 2018). Por otro lado, es posible también que el tratamiento hormonal no aumente los niveles de expresión de ER- α , pero sí aumente la sensibilidad a estrógenos mediante cambios en la funcionalidad del receptor (Frasor et al., 2005; Lonard & O'Malley, 2007; Mott & Pak, 2013; Quadros & Wagner, 2008), por ejemplo, aumentando su capacidad de inducir la expresión de PR o variando su localización intracelular, como se discutió anteriormente. Nuevos estudios son necesarios para evaluar si el aumento en la motivación sexual inducido por un tratamiento repetido con estradiol durante la adolescencia media que reportamos en el presente estudio se relaciona con un aumento en la sensibilidad comportamental a estrógenos, mediada por cambios en la funcionalidad de ER- α .

CONCLUSIONES

La adolescencia es un período complejo del desarrollo caracterizado por múltiples cambios que persisten y modulan al individuo adulto. El presente estudio valida resultados previos y caracteriza por primera vez el desarrollo de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia de la rata hembra naturalmente ciclante. Los resultados, que indican que la motivación sexual aumenta entre la adolescencia media y la adolescencia tardía, resaltan la importancia del estudio fragmentado de la adolescencia, un período que suele estudiarse como si tuviese un carácter homogéneo. Dado que la expresión del comportamiento sexual durante la interacción con un macho no varía a lo largo de la adolescencia, los resultados de la presente tesis también destacan la importancia del estudio de la motivación sexual mediante pruebas motivacionales específicas, demostrando como las mismas pueden aportar información que no se refleja en el despliegue del comportamiento sexual durante una interacción.

Una de las principales diferencias entre hembras en adolescencia media y adolescencia tardía es el número de exposiciones a picos pre-ovulatorios de estrógenos que experimentaron. Los resultados de la presente tesis, que evidencian que al simular el número de exposiciones a estradiol de hembras en adolescencia media a los experimentados por hembras en adolescencia tardía se aumenta la expresión de la motivación sexual, sugieren que esta diferencia podría subyacer la maduración de la motivación sexual que ocurre entre estas dos etapas.

Por otra parte, a pesar de que la expresión de motivación sexual de ratas adultas depende de la expresión de ER- α en regiones cerebrales del circuito que regula este comportamiento como mPOA y VMNv, los resultados de la presente tesis indican que el incremento de la motivación sexual que ocurre naturalmente a lo largo de la adolescencia, así como el aumento inducido por la mayor exposición a estradiol durante la adolescencia media, no están mediados por un cambio en la expresión de este receptor en tales áreas cerebrales. De todas formas, considerando la importancia del efecto del estrógeno actuando sobre ER- α en la motivación sexual (Snoeren et al., 2015; Spiteri et al., 2012), resulta relevante, mediante nuevos estudios, indagar la posibilidad de que existan diferencias en la funcionalidad de ER- α durante la adolescencia de la rata hembra ciclante, independientes de su nivel de expresión, y si estos son regulados por la exposición a estradiol.

En sumatoria, los resultados de la presente tesis dejan en evidencia la complejidad de la estrecha interacción entre el sistema endócrino y nervioso durante el período de la adolescencia. A su vez, sugieren que tal interacción modula el proceso madurativo de un comportamiento afiliativo fundamental para el éxito reproductivo de un individuo, como lo es el comportamiento sexual, que comienza a expresarse durante la adolescencia. A pesar de que los mecanismos mediante los cuales las hormonas gonadales modulan el circuito neural responsable de la motivación sexual, y median así el desarrollo de este comportamiento, permanecen poco conocidos, la presente tesis presenta una primera aproximación a dilucidarlos. En este sentido, los resultados reportados, que proponen un papel importante de la exposición repetida a estrógeno en la maduración de la motivación sexual, abren una ventana de posibles estudios necesarios para dilucidar el mecanismo mediante el cual esto sucede y así acercarnos a una comprensión global de este comportamiento.

PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos, se proponen las siguientes perspectivas de trabajo:

- Cuantificar las concentraciones de estrógeno y progesterona en sangre, tanto en la mañana como la noche de proestro del ciclo estral, y comparar tales niveles entre hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas, así como entre hembras en adolescencia media tratadas con estradiol y aceite.
- Cuantificar la expresión de ER- α en astrocitos y neuronas de mPOA mediante inmunofluorescencia y comparar tal expresión en hembras en adolescencia media, adolescencia tardía y adultas.
- Cuantificar la expresión de PR en diferentes regiones del circuito neural que regula la expresión del comportamiento sexual y comparar su expresión en hembras en adolescencia media, tardía y adultas y entre hembras en adolescencia media tratadas con estradiol y tratadas con aceite.
- Evaluar posibles diferencias de marcas epigenéticas en el gen que codifica para ER- α en el mPOA de hembras en adolescencia media, tardía y adultas, así como en hembras en adolescencia medias tratadas con estradiol y aceite.
- Determinar si un tratamiento farmacológico con un antagonista del receptor ER- α durante la adolescencia retrasa la maduración de la motivación sexual en hembras en adolescencia tardía.

BIBLIOGRAFÍA

- Ågmo, A. (2014). Animal models of female sexual dysfunction: Basic considerations on drugs, arousal, motivation and behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *121*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.10.003>
- Ågmo, A., Turi, A. L., Ellingsen, E., & Kaspersen, H. (2004). Preclinical models of sexual desire: Conceptual and behavioral analyses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *78*(3), 379–404. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.013>
- 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., Fernández-Guasti, A., Ferreño, M., & Ferreira, A. (2011). Coexpression of sexual behavior and maternal aggression: The ambivalence of sexually active mother rats toward male intruders. *Behavioral Neuroscience*, *125*(3), 446–451. <https://doi.org/10.1037/a0023085>
- Agrati, D., Ferreño, M., Marin, G., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Fernández-Guasti, A., & Ferreira, A. (2016). Previous and recent maternal experiences modulate pups' incentive value relative to a male without affecting maternal behavior in postpartum estrous rats. *Journal of Physiology Paris*, *110*(3), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.002>
- 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)
- Armas, M., Marín, G., Uriarte, N., & Agrati, D. (2021). Increase in sexual motivation throughout adolescence in the cycling female rat. *Developmental Psychobiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/dev.22162>
- Barfield, R. J., Wilson, C., & McDonald, P. G. (1975). Sexual behavior: Extreme reduction of postejaculatory refractory period by midbrain lesions in male rats. *Science*, *189*(4197), 147–149. <https://doi.org/10.1126/science.1138372>
- 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)
- Beach, F. A., Etkin, W., & Rasquin, P. (1942). Importance of Progesterone to Induction of Sexual Receptivity in Spayed Female Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *51*(3), 369–371. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13979>
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*, *159*(7), 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>
- Blaustein, J. D., & Erskine, M. S. (2002). Feminine Sexual Behavior : Cellular Integration of Hormonal and Afferent Information in the Rodent Forebrain. In *Hormones, Brain and Behavior*.
- Brooks, H. L., & Lindsey, M. L. (2018). Guidelines for authors and reviewers on antibody use in physiology studies. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *314*(4), H724–H732. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00512.2017>
- Brown, T. J., Macluskey, N. J., Shanabrough, M., & Naftolin, F. (1990). Comparison of Age- and Sex-Related Changes in Cell Nuclear Estrogen-Binding Capacity and Progestin Receptor Induction in the Rat Brain. *Endocrinology*, *126*(6), 2965–2972. <https://doi.org/10.1210/endo-126-6-2965>
- Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*,

- (48), 1–8. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
- Calipari, E. S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D. M., Cahill, M. E., Ribeiro, E., ... Nestler, E. J. (2017). Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms13877>
- Castles, C. G., Oesterreich, S., Hansen, R., & Fuqua, S. A. W. (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62(2–3), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(97\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(97)00023-X)
- Catanese, M., & Vandenberg, L. (2018). Developmental estrogen exposures and disruptions to maternal behavior and brain: effects of ethinyl estradiol, a common positive control. *Hormones and Behavior*, 101, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.013>
- 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>
- Chakraborty, T. R., Hof, P. R., Ng, L., & Gore, A. C. (2003). Stereologic Analysis of Estrogen Receptor Alpha (ER α) Expression in Rat Hypothalamus and Its Regulation by Aging and Estrogen. *Journal of Comparative Neurology*, 466(3), 409–421. <https://doi.org/10.1002/cne.10906>
- Champagne, F. A., Weaver, I. C. G., Diorio, J., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2006). Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology*, 147(6), 2909–2915. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1119>
- 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>
- Clark, A. S., Pfeifle, J. K., & Edwards, D. A. (1981). Ventromedial hypothalamic damage and sexual proceptivity in female rats. *Physiology and Behavior*, 27(4), 597–602. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90228-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90228-6)
- Cornil, C. (2018). On the role of brain aromatase in females – Why are estrogens produced locally when they are available systemically? *Journal of Comparative Physiology*, 204(1), 31–49. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1224-2>. On
- Das, R., Banerjee, S., & Shapiro, B. (2013). Extensive Sex- and/or Hormone-Dependent Expression of Rat Housekeeping Genes. *Endocr Res.*, 38(2), 105–111. <https://doi.org/10.3109/07435800.2012.723294>
- Della Seta, D., Farabollini, F., Dessì-Fulgheri, F., & Fusani, L. (2008). Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology*, 149(11), 5592–5598. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0113>
- Devidze, N., Mong, J. A., Jasnow, A. M., Kow, L.-M., & Pfaff, D. W. (2005). Sex and estrogenic effects on coexpression of mRNAs in single ventromedial hypothalamic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(40), 14446–14451. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507144102>
- DiBenedictis, B., Olugbemi, A., Baum, M., & Cherry, J. (2014). Ventral Striatum Impair Opposite-Sex Urinary Odor. *Behavioral Brain Research*, 1(0), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.024>
- Döhler, K. D., & Wuttke, W. (1974). Serum LH, FSH, Prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, 94(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1210/endo-94-4-1003>
- Dominguez, R., & Micevych, P. (2010). Estradiol Rapidly Regulates Membrane Estrogen Receptor Levels in Hypothalamic Neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(38), 12589–12596. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1038-10.2010>
- 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>
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: Impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Developmental Psychobiology*, 45(3), 153–162. <https://doi.org/10.1002/dev.20025>
- 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)
- Ferguson, R. E., Carroll, H. P., Harris, A., Maher, E. R., Selby, P. J., & Banks, R. E. (2005). Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*, 5(2), 566–571. <https://doi.org/10.1002/pmic.200400941>
- Ferreño, M., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Ferreira, A., & Agrati, D. (2018). Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats. *Physiology and Behavior*, 188(October 2017), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.002>
- Flanagan-Cato, L. M. (2000). Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(4), 309–329. <https://doi.org/10.1006/frne.2000.0204>
- Frasor, J., Danes, J. M., Funk, C. C., & Katzenellenbogen, B. S. (2005). Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: Mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13153–13157. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502782102>
- French, D., Fitzpatrick, D., & Law, O. T. (1972). Operant investigation of mating preference in female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(2), 226–232. <https://doi.org/10.1037/h0033535>
- Friemel, C. M., Spanagel, R., & Schneider, M. (2010). Reward sensitivity for a palatable food reward peaks during pubertal developmental in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00039>
- Gagnidze, K., Weil, Z. M., & Pfaff, D. W. (2010). Histone modifications proposed to regulate sexual differentiation of brain and behavior. *BioEssays*, 32(11), 932–939. <https://doi.org/10.1002/bies.201000064>
- García-Horsman, S. P., Ágmo, A., & Paredes, R. G. (2008). Infusions of naloxone into the medial preoptic area, ventromedial nucleus of the hypothalamus, and amygdala block conditioned place preference induced by paced mating behavior. *Hormones and Behavior*, 54(5), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.07.011>
- Geary, N., & Asarian, L. (1999). Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiology and Behavior*, 67(1), 141–147. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00060-8)
- 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>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hansen, S. (1977). Mounting behavior and receptive behavior in developing female rats and the effect of social isolation. *Physiology and Behavior*, 19(6), 749–752. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90310-9)
- Harris, H. A., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (2002). Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER α and ER β , in estrogen target tissues in vivo through the use of an ER α -selective ligand. *Endocrinology*, 143(11), 4172–4177. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220403>
- 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>
- Hlinak, 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)
- Hlinák, Z. (1985). Oestradiol and progesterone treatment and precopulatory behaviour in female rats ovariectomized at different ages. *Physiologia Bohemoslovaca*, *34*(4), 373–380. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2932756>
- 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/10.1016/j.yfrne.2013.10.004>.
- Inoue, S., Yang, R., Tantry, A., Davis, C. ha, Yang, T., Knoedler, J. R., ... Shah, N. M. (2019). Periodic Remodeling in a Neural Circuit Governs Timing of Female Sexual Behavior. *Cell*, *179*(6), 1393–1408.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.025>
- Jenkins, W. J., & Becker, J. B. (2003). Dynamic increases in dopamine during paced copulation in the female rat. *European Journal of Neuroscience*, *18*(7), 1997–2001. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02923.x>
- Jennings, K. J., & de Lecea, L. (2020). Neural and hormonal control of sexual behavior. *Endocrinology*, *161*(10), 1–13. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa150>
- Jones, S. L., Farrell, S., Gardner Gregory, J., & Pfaus, J. G. (2013). Sensitization of sexual behavior in ovariectomized rats by chronic estradiol treatment. *Hormones and Behavior*, *64*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.012>
- Jones, S. L., Gardner Gregory, J., & Pfaus, J. G. (2015). RU486 facilitates or disrupts the sensitization of sexual behaviors by estradiol in the ovariectomized Long-Evans rat: Effect of timecourse. *Hormones and Behavior*, *75*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.07.015>
- Jones, S. L., Germé, K., Graham, M. D., Roy, P., Gardner Gregory, J., Rosenbaum, S., ... Pfaus, J. G. (2015). Vagino-cervical stimulation attenuates the sensitization of appetitive sexual behaviors by estradiol benzoate in the ovariectomized rat. *Hormones and Behavior*, *75*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.003>
- Jones, S. L., & Pfaus, J. G. (2014). Sensitization of sexual behaviors in ovariectomized Long-Evans rats is induced by a subthreshold dose of estradiol benzoate and attenuated by repeated copulation. *Hormones and Behavior*, *66*(4), 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.009>
- Klein, Z. A., Padow, V. A., & Romeo, R. D. (2010). The effects of stress on play and home cage behaviors in adolescent male rats. *Developmental Psychobiology*, *52*(1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/dev.20413>
- Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, *29*(14), 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- 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>
- Kurian, J. R., Forbes-Lorman, R. M., & Auger, A. P. (2007). Sex difference in Mecp2 expression during a critical period of rat brain development. *Epigenetics*, *2*(3), 173–178. <https://doi.org/10.4161/epi.2.3.4841>
- Lauber, A. H., Mobbs, C. V., Muramatsu, M., & Pfaff, D. W. (1991). Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*, *129*(6), 3180–3186. <https://doi.org/10.1210/endo-129-6-3180>
- Levin, E. R. (2018). Membrane estrogen receptors signal to determine transcription factor function. *Steroids*, *132*(October), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.10.014>
- Li, C. H., & Tam, P. K. S. (1998). An iterative algorithm for minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognition Letters*, *19*(8), 771–776. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(98\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(98)00057-9)

- Li, R., & Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: Re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sciences*, *92*(13), 747–751. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.02.014>
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2007). Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation. *Molecular Cell*, *27*(5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.012>
- Long, N., Long, B., Mana, A., Le, D., Nguyen, L., Chokr, S., & Sinchak, K. (2017). Tamoxifen and ICI 182,780 activate hypothalamic G protein- coupled estrogen receptor 1 to rapidly facilitate lordosis in female rats Nathan. *Hormones and Behavior*, *89*, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.12.013>
- Lynn, D. A., & Brown, G. R. (2010). The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Developmental Psychobiology*, *52*(8), 731–739. <https://doi.org/10.1002/dev.20468>
- Mani, Shaila K., Reyna, A. M., Jian, Z. C., Mulac-Jericevic, B., & Conneely, O. M. (2006). Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Molecular Endocrinology*, *20*(6), 1322–1332. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0466>
- Mani, Shailaja K., Blaustein, J. D., Allen, J. M. C., Law, S. W., O'Malley, B. W., & Clark, J. H. (1994). Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology*, *135*(4), 1409–1414. <https://doi.org/10.1210/endo.135.4.7925102>
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, *62*, 609–614. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>
- Matsuda, K. I. (2014). Epigenetic changes in the estrogen receptor α gene promoter: Implications in sociosexual behaviors. *Frontiers in Neuroscience*, *8*(OCT), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00344>
- Mazzucco, C. A., Walker, H. A., Pawluski, J. L., Lieblich, S. E., & Galea, L. A. M. (2008). ER α , but not ER β , mediates the expression of sexual behavior in the female rat. *Behavioural Brain Research*, *191*(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.016>
- McDonald, P. G., & Meyerson, B. J. (1973). The effect of oestradiol, testosterone and dihydrotestosterone on sexual motivation in the ovariectomized female rat. *Physiology and Behavior*, *11*(4), 515–520. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(73\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(73)90038-3)
- McEwen, B. (2019). Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*, 2785–2801.
- McEwen, B., & Alves, S. (1999). Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews*, *20*(3), 279–307. [https://doi.org/0163-769X/99/\\$03.00/0](https://doi.org/0163-769X/99/$03.00/0)
- 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)
- McHenry, J. A., Otis, J. M., Rossi, M. A., Robinson, J. E., Kosyk, O., Miller, N. W., ... Stuber, G. D. (2017). Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nature Neuroscience*, *20*(3), 449–458. <https://doi.org/10.1038/nn.4487>
- Meaney, M. J., & Stewart, J. (1981). A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, *29*(1), 34–45. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(81\)80149-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(81)80149-2)
- Meerts, S. H., Anderson, K. S., Farry-Thorn, M. E., Johnson, E. G., & Taxier, L. (2017). Prepubertal ovariectomy modulates paced mating behavior but not sexual preference or conditioned place preference for mating in female rats. *Physiology and Behavior*, *171*, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.012>
- Mehta, C. R., & Patel, N. R. (1983). A Network Algorithm for Performing Fisher's Exact Test in $r \times c$

- Contingency Tables. *Journal of the American Statistical Association*, 78(382), 427–434.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1983.10477989>
- Meijs-Roelofs, H. M. A., Uilenbroek Th., J. J., De Greef, W. J., De Jong, F. H., & Kramer, P. (1975). Gonadotrophin and steroid levels around the time of first ovulation in the rat. *Journal of Endocrinology*, 67(2), 275–282. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0670275>
- Mhyre, A. J., & Dorsa, D. M. (2006). Estrogen activates rapid signaling in the brain: Role of estrogen receptor α and estrogen receptor β in neurons and glia. *Neuroscience*, 138(3), 851–858.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.019>
- Micevych, P., & Dewing, P. (2011). Membrane-initiated estradiol signaling regulating sexual receptivity. *Frontiers in Endocrinology*, 2(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00026>
- Micevych, P., Eckersell, C., Holland, K., & Smith, A. (1996). Induction of CCK mRNA levels in the limbic-hypothalamic circuit: Time course and site-specific effects of estrogen. *Journal of Neurobiology*, 30(4), 465–479. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199608\)30:4<465::AID-NEU3>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199608)30:4<465::AID-NEU3>3.0.CO;2-1)
- Micevych, P., & Meisel, R. (2017). Integrating Neural Circuits Controlling Female Sexual Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>
- Micevych, P., Mermelstein, P., & Sinchak, K. (2017). Estradiol Membrane-Initiated Signaling in the Brain Mediates Reproduction. *Trends in Neurosciences*, 40(11), 654–666.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.09.001>
- Micevych, P., & Sinchak, K. (2013). Temporal and concentration-dependent effects of oestradiol on neural pathways mediating sexual receptivity. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(11), 1012–1023.
<https://doi.org/10.1111/jne.12103>
- Micevych, P., & Sinchak, K. (2018). Extranuclear signaling by ovarian steroids in the regulation of sexual receptivity. *Hormones and Behavior*, 104, 48. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.05.001>
- Micevych, Paul, & Sinchak, K. (2008). Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.016>
- Mohr, M. A., Falcy, B. A., Laham, B. J., Wong, A., & Micevych, P. (2019). Neuroprogesterone synthesis in hypothalamic astrocytes is associated with a pubertal increase in membrane ER α levels, 042635, 1–25. <https://doi.org/10.1101/833434>
- Mohr, M. A., Wong, A. M., Tomm, R. J., Soma, K. K., & Micevych, P. (2019). Pubertal development of estradiol-induced hypothalamic progesterone synthesis. *Hormones and Behavior*, 111(November), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.12.007>
- Mott, N. N., & Pak, T. R. (2013). Estrogen signaling and the aging brain: context-dependent considerations for postmenopausal hormone therapy. *ISRN Endocrinology*, 2013, 814690.
<https://doi.org/10.1155/2013/814690>
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D. W., Kaplitt, M. G., & Ogawa, S. (2006). RNAi-mediated silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviours. *PNAS*, 103(27), 10456–10460.
<https://doi.org/www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603045103>
- Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 242–257.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>
- Ogawa, S., Olazábal, U. E., Parhar, I. S., & Pfaff, D. W. (1994). Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *Journal of Neuroscience*, 14(3 II), 1766–1774.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-03-01766.1994>
- Olster, D. H., & Blaustein, J. D. (1988). Progesterone facilitation of lordosis in male and female Sprague-Dawley rats following priming with estradiol pulses. *Hormones and Behavior*, 22(3), 294–304.
[https://doi.org/10.1016/0018-506X\(88\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0018-506X(88)90002-5)

- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental Psychobiology*, 14(4), 327–332. <https://doi.org/10.1002/dev.420140405>
- Parsons, B., Maclusky, N. J., Krey, L., Pfaff, D. W., & McEwen, B. S. (1980). The temporal relationship between estrogen-inducible progesterin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology*, 107(3), 774–779. <https://doi.org/10.1210/endo-107-3-774>
- Parsons, B., Rainbow, T. C., MacLusky, N. J., & McEwen, B. S. (1982). Progesterin receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 2(10), 1446–1452. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-10-01446.1982>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain* (6th Edition). London, UK: Elsevier.
- Peña, C. J., Neugut, Y. D., & Champagne, F. A. (2013). Developmental timing of the effects of maternal care on gene expression and epigenetic regulation of hormone receptor levels in female rats. *Endocrinology*, 154(11), 4340–4351. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1595>
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.013>
- Perrot-Sinal, T. S., Davis, A. M., & McCarthy, M. M. (2001). Developmental sex differences in glutamic acid decarboxylase (GAD65) and the housekeeping gene, GAPDH. *Brain Research*, 922(2), 201–208. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03167-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03167-5)
- Perry, A. N., Westenbroek, C., & Becker, J. B. (2013). Impact of pubertal and adult estradiol treatments on cocaine self-administration. *Hormones and Behavior*, 64(4), 573–578. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.08.007>
- Pfaff, D. (1970). Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: Specificity of effects and individual patterns of response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 74(3), 349–358. <https://doi.org/10.1037/h0020532>
- Pfaff, D., Kow, L., Loose, M., & Flanagan-Cato, L. (2008). Reverse engineering the lordosis behavior circuit. *Hormones and Behavior*, 54(3), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.03.012>
- Pfaff, D., Montgomery, M., & Lewis, C. (1977). Somatosensory determinants of lordosis in female rats: Behavioral definition of the estrogen effect. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association. <https://doi.org/10.1037/h0077305>
- Pfaus, J. G., Jones, S. L., Flanagan-Cato, L. M., & Blaustein, J. D. (2015). *Female Sexual Behavior. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00050-8>
- 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>
- Pose, S., Zuluaga, M. J., Ferreño, M., Agrati, D., Bedó, G., & Uriarte, N. (2019). Raising overlapping litters: Differential activation of rat maternal neural circuitry after interacting with newborn or juvenile pups. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(9). <https://doi.org/10.1111/jne.12701>
- Quadros, P. S., & Wagner, C. K. (2008). Regulation of progesterone receptor expression by estradiol is dependent on age, sex and region in the rat brain. *Endocrinology*, 149(6), 3054–3061. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1133>
- Rainbow, T. C., Parsons, B., MacLusky, N. J., & McEwen, B. S. (1982). Estradiol receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei. *Journal of Neuroscience*, 2(10), 1439–1445. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-10-01439.1982>
- Ruxton, G. D., & Beauchamp, G. (2008). Time for some a priori thinking about post hoc testing. *Behavioral Ecology*, 19(3), 690–693. <https://doi.org/10.1093/beheco/arn020>
- Sá, S., Pereira, P., Malikov, V., & Madeira, M. (2013). Role of estrogen receptor α and β in the induction

- of progesterone receptors in hypothalamic ventromedial neurons. *Neuroscience*, 238, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.023>
- Salamone, J. D., Correa, M., Yohn, S., Lopez Cruz, L., San Miguel, N., & Alatorre, L. (2016). The pharmacology of effort-related choice behavior: Dopamine, depression, and individual differences. *Behavioural Processes*, 127, 3–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.02.008>
- Sander, H., Wallace, S., Plouse, R., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2019). Ponceau S Waste: Ponceau S Staining for Total Protein Normalization Hannah. *Anal Biochem*, (15), 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010>
- Schulz, K. M., & Sisk, C. L. (2016). The organizing actions of adolescent gonadal steroid hormones on brain and behavioral development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 70, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.036>
- Schwarz, J. M., Nugent, B. M., & McCarthy, M. M. (2010). Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*, 151(10), 4871–4881. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0142>
- Shughrue, P. J., Bushnell, C. D., & Dorsa, D. M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: A comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*, 131(1), 381–388. <https://doi.org/10.1210/endo.131.1.1612018>
- Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor alpha and beta mRNA in rat CNS. *J Comp Neurol*, 388(4), 507–525.
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, 2nd ed. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, 2nd ed. New York, NY, England: Mcgraw-Hill Book Company.
- 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>
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(3–4), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>
- Snoeren, E. (2018). Female Reproductive Behavior. In L. Coolen & D. Grattan (Eds.), *Neuroendocrine Regulation of Behavior. Current Topics in Behavioral Neurosciences*. (pp. 289–320). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/7854_2018_68
- Snoeren, E., Antonio-Cabrera, E., Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., & Pfaff, D. W. (2015). Role of Oestrogen a Receptors in Sociosexual Behaviour in Female Rats Housed in a Seminatural Environment *Neuroendocrinology*, (14), 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)
- Sodersten, P., & Eneroth, P. (1981). Serum levels of oestradiol-17beta and progesterone in relation to sexual receptivity in intact and ovariectomized rats. *Journal of Endocrinology*, 89, 45–54. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0890045>
- 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)
- Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Ribeiro, A., Pfaff, D., & Agmo, A. (2010). Estrogen-Induced Sexual Incentive Motivation , Proceptivity and Receptivity Depend on a Functional Estrogen Receptor _ in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus but Not in the Amygdala. *Neuroendocrinology*, 91, 142–154. <https://doi.org/10.1159/000255766>
- Spiteri, T., Ogawa, S., Musatov, S., Pfaff, D. W., & Ågmo, A. (2012). The role of the estrogen receptor α in the medial preoptic area in sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity, anxiety, and wheel running in female rats. *Behavioural Brain Research*, 230(1), 11–20.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.01.048>

- 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)
- Thor, D. H., & Holloway, W. R. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22(6), 587–590. <https://doi.org/10.3758/BF03333916>
- 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)
- Tobiansky, D. J., Roma, P., Hattori, T., Will, R., Nutsch, V., & Dominguez, J. (2013). The medial preoptic area modulates cocaine-induced activity in female rats Daniel. *Behavioral Neuroscience*, 127(2), 293–302. <https://doi.org/10.1037/a0031949>.
- Tobiansky, D. J., Will, R. G., Lominac, K. D., Turner, J. M., Hattori, T., Krishnan, K., ... Dominguez, J. M. (2016). Estradiol in the Preoptic Area Regulates the Dopaminergic Response to Cocaine in the Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmacology*, 41(7), 1897–1906. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.360>
- Tominna, R., Chokr, S., Feri, M., Chuon, T., & Sinchak, K. (2019). Plasma membrane G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) mediates rapid estradiol facilitation of sexual receptivity through the orphanin-FQ-ORL-1 system in estradiol primed female rats. *Hormones and Behavior*, 112(March), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.04.004>
- Vandenbergh, J. G. (1976). Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46(2), 451–453. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0460451>
- Varlinskaya, E., & Spear, L. (2006). Ontogeny of Acute Tolerance to Ethanol-Induced Social Inhibition in Sprague–Dawley Rats. *Alcohol Clin Exp Res.*, 30(11), 1833–1844. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- 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>
- Vetter-O’Hagen, C. S., & Spear, L. P. (2012). Hormonal and physical markers of puberty and their relationship to adolescent-typical novelty-directed behavior. *Developmental Psychobiology*, 54(5), 523–535. <https://doi.org/10.1002/dev.20610>
- Walker, D. M., Bell, M. R., Flores, C., Gulley, J. M., Willing, J., & Paul, M. J. (2017). Adolescence and reward: Making sense of neural and behavioral changes amid the chaos. *Journal of Neuroscience*, 37(45), 10855–10866. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1834-17.2017>
- Yang, L. Y., & Clemens, L. G. (1996). Relation of intromissions to the female’s postejaculatory refractory period in rats. *Physiology and Behavior*, 60(6), 1505–1511. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(96\)00314-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00314-9)
- Yoest, K. E., Quigley, J. A., & Becker, J. B. (2018). Rapid effects of ovarian hormones in dorsal striatum and nucleus accumbens. *Hormones and Behavior*, 104(February), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.002>
- Zakharova, E., Wade, D., & Izenwasser, S. (2009). Sensitivity to cocaine conditioned reward depends on sex and age. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(1), 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.11.002>
- Zar, J. H. (2014). Spearman Rank Correlation: Overview. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat05964>
- Zhang, D., Yang, S., Yang, C., Jin, G., & Zhen, X. (2008). Estrogen regulates responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to cocaine. *Psychopharmacology*, 199(4), 625–635. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1188-6>

Zhou, Y., Shughrue, P., & Dorsa, D. (1995). Estrogen Receptor Protein is Differentially Regulated in the Preoptic Area of the Brain and in the Uterus during the Rat Estrous Cycle. *Neuroendocrinology*, (61), 276–283.