

Desarrollo del comportamiento sexual de la rata hembra durante la adolescencia y sus bases neurales



Lic. Gabriella Marin Mirande

Tesis de Maestría
PEDECIBA-Biología
Neurociencias
2021

Orientadora: Dra. Daniella Agrati

**Sección Fisiología y Nutrición
Laboratorio de Experimentación Animal
Facultad de Ciencias**



RESUMEN

Las ratas hembras comienzan a expresar comportamiento sexual durante la adolescencia, período de transición entre la infancia y la etapa adulta en el cual los sistemas neurales que lo regulan aún están en desarrollo. Se desconoce cómo es la expresión de este comportamiento a lo largo de la adolescencia y el procesamiento neural del macho como estímulo sexual. Sobre esta base nos preguntamos si, como consecuencia de la maduración de sistemas neurales y endócrinos durante la adolescencia, la expresión de este comportamiento y la activación de los circuitos que lo subyacen difiere entre hembras adolescentes y adultas. Para responder estas preguntas, en primer lugar, evaluamos la expresión del comportamiento sexual, así como de la exploración social y el juego, comportamientos típicos de la adolescencia, durante una interacción con macho (estímulo sexual) y con una hembra (estímulo social) de ratas sexualmente activas durante la adolescencia media y tardía y en la etapa adulta. No detectamos diferencias en la expresión de la mayoría de los componentes del comportamiento sexual durante la interacción con un macho entre las edades. Sin embargo, las hembras en adolescencia media exhibieron una mayor exploración social y juego en comparación con las adultas, indicando que éstas exhiben un perfil conductual único durante la interacción sexual con un macho. Por otra parte, la expresión de los comportamientos típicos de la adolescencia frente al estímulo sexual fue menor que frente al estímulo social, evidenciando un predominio de la expresión del comportamiento sexual sobre el social durante la interacción con un macho. De forma interesante, si bien el comportamiento sexual no difirió entre las edades, en experimentos previos determinamos que la motivación sexual de las hembras en adolescencia media es menor que la de las adultas sugiriendo un procesamiento neural diferente del macho entre ambas edades. Por este motivo, en una segunda etapa, comparamos la expresión de la proteína c-Fos, como índice de activación neural, en áreas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (sistema general de recompensa) y áreas límbico-hipotalámica asociadas a la expresión del comportamiento sexual, de hembras en adolescencia media y adultas expuestas a un macho, a una hembra o en ausencia de estímulo. Observamos que la exposición al macho incrementó la expresión de c-Fos en algunas áreas específicas del circuito sexual en ambas edades. Sin embargo, en otras áreas de este circuito y del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico el macho indujo un incremento en la expresión de c-Fos únicamente en las ratas adolescentes. Esta expresión fue significativamente mayor en adolescentes respecto a adultas en la corteza prefrontal medial y la corteza orbitofrontal, áreas vinculadas al procesamiento de estímulos reforzadores, que se encuentran inmaduras durante la adolescencia. Esta variación de activación de áreas límbico-hipotalámicas y del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico entre adolescentes y adultas frente a un macho, indica un procesamiento neural diferente del mismo entre ambas edades. Los hallazgos de esta tesis aportan a la comprensión del desarrollo de un comportamiento social de gran importancia para la especie.

AGRADECIMIENTOS

A Danita, por acompañarme desde el inicio en mi camino, estimulándome y mostrándome que yo puedo. Mis gracias infinitas por haberme dado la oportunidad y el empujón para animarme a dedicarme a esto que disfruto con pasión. Y muy especialmente a tu infinita, muy infinita paciencia y generosidad conmigo. Sin dudas, una mentora de ciencia y de vida fuera de serie.

A Magda por todas las noches que el bioterio no resulto tan solitario, y se convirtió en un diván de charla y reflexión.

A mis amigos científicos Wallito, Tony y Vane, por el aliento y por la comprensión y el consuelo cuando parecía que todo salía mal.

A Annabelis, por haber gestado este grupo de hijas y nietas *raticientíficas* de la motivación, del cual orgullosamente formo parte.

A mis amigos, "los transportistas de la ciencia" que me llevaron, esperaron y trajeron especialmente en la pandemia para hacer un "fortis", llevar y traer muestras y alcanzar el preciado N.

A Perman, por haberme regalado su hermoso trabajo e ilustrar esta tesis.

A los financiadores que nos permitieron llevar adelante esta investigación, y que, personalmente me permitieron dedicarme de forma casi exclusiva a ella. PEDECIBA, ANII, y CAP.

Y siempre a la abuela Nelly por todo.



ÍNDICE

RESUMEN	1
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
ABREVIACIONES	7
MARCO GENERAL	8
1. ANTECEDENTES	9
1.1. COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LA RATA HEMBRA	9
1.2. BASES NEUROENDÓCRINAS DEL COMPORTAMIENTO Y DE LA MOTIVACIÓN SEXUAL DE RATAS HEMBRAS ADULTAS	12
1.3. ADOLESCENCIA: COMPORTAMIENTO Y MADURACIÓN NEURAL	16
1.4. ADOLESCENCIA: MOTIVACIÓN Y COMPORTAMIENTO SEXUAL	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	22
HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS Y PREDICCIONES	23
OBJETIVOS	23
PREDICCIONES	24
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
5. METODOLOGÍA	27
5.1. ANIMALES Y SU MANEJO	27
5.2. PRUEBAS COMPORTAMENTALES	28
5.2.1. INTERACCIONES SOCIAL Y SEXUAL	28
5.2.2. EMISIÓN DE USV EN RESPUESTA A UN MACHO O UNA HEMBRA	30
5.3. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA	31

5.3.1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO	31
5.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA	31
5.3.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE C-FOS	32
5.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	34
5.4.1. EXPERIMENTO I: COMPORTAMIENTO DE HEMBRAS ADOLESCENTES Y ADULTAS DURANTE UNA INTERACCIÓN CON UN MACHO O CON UNA HEMBRA ADULTA	34
5.4.2. EXPERIMENTO II: EXPRESIÓN DE C-FOS EN ÁREAS NEURALES IMPLICADAS EN LA MOTIVACIÓN SEXUAL DE HEMBRAS ADOLESCENTES Y ADULTAS	36
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
5.6.1. EXPERIMENTO I	37
5.6.2. EXPERIMENTO II	38

6. RESULTADOS **39**

6.1. EXPERIMENTO I: COMPORTAMIENTO DE HEMBRAS ADOLESCENTES Y ADULTAS DURANTE UNA INTERACCIÓN CON UN MACHO O CON UNA HEMBRA ADULTA	39
6.1.1 COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LAS RATAS HEMBRAS	39
FRENTE A UN MACHO SEXUALMENTE ACTIVO	39
FRENTE A UNA HEMBRA ADULTA NO SEXUALMENTE ACTIVA	42
6.1.2. CONDUCTAS DE EXPLORACIÓN SOCIAL Y JUEGO	44
FRENTE A UN MACHO SEXUALMENTE ACTIVO	44
FRENTE A UNA HEMBRA ADULTA SEXUALMENTE ACTIVA	44
6.1.3. RESUMEN DE PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES	46
6.2. EXPERIMENTO II: EXPRESIÓN DE C-FOS EN ÁREAS NEURALES IMPLICADAS EN LA MOTIVACIÓN SEXUAL DE HEMBRAS ADOLESCENTES Y ADULTAS	47
6.2.1-EXPRESIÓN DE C-FOS EN ÁREAS LÍMBICO-HIPOTALÁMICAS VINCULADAS AL COMPORTAMIENTO SEXUAL	47
NÚCLEO VENTROMEDIAL DEL HIPOTÁLAMO (NVMVL)	47
AMÍGDALA MEDIAL (AMI ME)	47
ÁREA PREÓPTICA MEDIA VENTRAL (APOM)	48
6.2.2-EXPRESIÓN DE C-FOS EN ÁREAS DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOLÍMBICO Y DE LA AMÍGDALA BASOLATERAL	48
NÚCLEO ACCUMBENS (NACC) <i>CORE Y SHELL</i>	48
CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL CINGULADA (CPFM CING)	49
CPF PRELÍMBICA (CPF PRELIMB)	49
CPF INFRALÍMBICA (CPF INFRALIMB)	50
CORTEZA ORBITOFRONTAL (COF)	53
AMÍGDALA BASOLATERAL (AMI BL)	53
6.2.3-EMISIÓN DE USV	54
6.2.4. RESUMEN DE PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES	56

7. DISCUSIÓN **57**

7.1. PERFIL COMPORTAMENTAL ÚNICO DE HEMBRAS EN ADOLESCENCIA MEDIA DURANTE LA INTERACCIÓN SEXUAL	57
7.2. ALTA EXPRESIÓN DE LAS MOTIVACIONES SEXUAL Y SOCIAL DURANTE LA ADOLESCENCIA TARDÍA	60
7.3. AUMENTO DE C-FOS EN NVMVL Y AMIME ANTERIOR, ÁREAS CLAVES DEL CIRCUITO SEXUAL, EN HEMBRAS ADOLESCENTES Y ADULTAS FRENTE A UN MACHO	61
7.4. INCREMENTO DE C-FOS EN EL APOM DE HEMBRAS ADOLESCENTES FRENTE A UN MACHO	63
7.5. AUMENTO DE C-FOS EN ÁREAS DEL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO Y LA AMI BL ÚNICAMENTE EN HEMBRAS ADOLESCENTES EXPUESTAS A UN MACHO	65
7.6. ¿QUÉ MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS PUEDEN ESTAR POR DETRÁS DEL PATRÓN DE ACTIVACIÓN NEURONAL DIFERENCIAL DE ACUERDO A LA EDAD DE LAS HEMBRAS?	67
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	71
10. REFERENCIAS	73

ABREVIACIONES

Adol m – Adolescencia media

Adol t- Adolescencia tardía

Adult - Adultez

Ami BL - Amígdala basolateral

Ami Me - Amígdala medial

APOm- Área preóptica media

COF- Corteza orbitofrontal

CPFm - Corteza prefrontal medial

CPFm cing- Región cingulada de la corteza prefrontal medial

CPFm infralimb- Región infralímbica de la corteza prefrontal medial

CPFm prelimb- Región prelímbica de la corteza prefrontal medial

DA: Dopamina

DPN: días pos-natales

E: estrógenos

Eje HHO: Eje hipotalámico-hipofisario-ovárico

NAcc core- Región *core* del núcleo accumbens

NAcc shell- Región *shell* del núcleo accumbens

NVM- Núcleo ventromedial del hipotálamo

NVM vl- Región ventrolateral del núcleo ventromedial del hipotálamo

OVX: ovariectomizadas

P: progesterona

ROI: región de interés

USV: vocalizaciones ultrasónicas

MARCO GENERAL

Esta tesis de Maestría se enmarca en una línea de investigación que busca profundizar en la comprensión de las bases neuroendócrinas y de los factores que modulan la expresión del comportamiento sexual, comportamiento social de gran relevancia para las especies. Entre estos factores, la influencia del grado de desarrollo de las hembras en la expresión de esta conducta ha sido pobremente estudiada. La adolescencia representa un periodo de la vida crítico en el cual los mamíferos transitan cambios que culminan en la expresión del perfil comportamental típico de adultos. Es durante esta etapa en la cual se desarrollan conductas de gran relevancia biológica, como lo es el comportamiento sexual. Entendemos que aportar conocimiento sobre cómo se desarrolla este comportamiento, cómo cambia el valor de estímulos sociales y sexuales, así como acerca de las bases neurales que subyacen este cambio es de suma importancia para profundizar en la comprensión de este período único del desarrollo y en la complejidad del control de los comportamientos sociales en los mamíferos.

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto FCE_1_2017_1_136603 y parte de los resultados de la misma forman parte de un artículo científico publicado: Armas, M., **Marín, G.**, Uriarte, N., & Agrati, D. (2021). Increase in sexual motivation throughout adolescence in the cycling female rat. *Developmental Psychobiology* <https://doi.org/10.1002/dev.22162> (**Anexo**).

1. ANTECEDENTES

1.1. Comportamiento sexual de la rata hembra

Las ratas hembras presentan un ciclo estral que se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro, en función de los cambios fisiológicos, anatómicos y conductuales vinculados al desarrollo del ciclo ovárico (Levine, 2015). Durante una breve ventana temporal de aproximadamente 12-20 horas (proestro tardío-estro temprano), las ratas expresan comportamiento sexual. La expresión de este comportamiento es el resultado de la compleja interacción entre hormonas ováricas esteroideas (principalmente estrógenos (E) y progestágenos (P)), sus receptores y mecanismos celulares en áreas claves del sistema nervioso central (González-Flores et al., 2017; James G. Pfaus et al., 2014).

Tradicionalmente la conducta sexual en las hembras es estudiada a partir de inducir la actividad sexual en hembras ovariectomizadas (OVX) mediante la administración secuencial de E y P. Estos tratamientos hormonales producen un perfil conductual muy similar al observado en el estro natural (J. Pfaus et al., 2015). Si bien el empleo de hembras OVX tratadas con hormonas facilita el estudio del comportamiento sexual en el laboratorio, ya que homogeniza las condiciones de trabajo, este estado de actividad sexual es aún artificial, por lo que se pierde parte de la riqueza de la regulación ejercida por diferentes factores en condiciones fisiológicas naturales. Por este motivo, es importante, a su vez, estudiar las bases neuroendócrinas del comportamiento sexual de la hembra, así como los factores que lo regulan, en condiciones de ciclicidad ovárica natural.

El despliegue del comportamiento sexual de la hembra es extremadamente activo (McClintock & Adler, 1978). Como se muestra en la figura 1, este comportamiento se caracteriza por una secuencia temporal de conductas voluntarias de la hembra que captan la atención del macho e incentivan su búsqueda (como solicitudes, *hops & darts*, posturas de presentación y *ear wiggling*), seguidas por un comportamiento receptivo reflejo, postura de lordosis, que adquiere frente a la presión realizada por el macho en los flancos y la región perivaginal durante la monta (Beach, 1976; Stern & Johnson, 1989). La diferencia en la regulación de la expresión de estos comportamientos llevó a dividirlos en componentes sexuales proceptivos y receptivos. Mientras que las **conductas proceptivas** son voluntarias y suelen presentarse en una secuencia flexible y variable entre los distintos individuos, las **conductas receptivas** son fuertemente estereotipadas y reflejas (Beach, 1976; James G. Pfaus et al., 2014).



Figura 1. Comportamiento sexual. Se muestra la secuencia de olfateo anogenital y monta del macho, que se acompaña de la adquisición de una postura de presentación y lordosis por parte de la hembra.

El comportamiento sexual de la hembra es un comportamiento fuertemente motivado y el despliegue de conductas proceptivas, se ha utilizado como indicador de su estado motivacional (Erskine, 1989; J G Pfaus et al., 1999). Sin embargo, es posible estudiar el valor de incentivo (motivacional) sexual que adquiere el macho durante el período de actividad sexual de las hembras en pruebas específicas para evaluar motivación, es decir que no se basan en los componentes propios de la ejecución del comportamiento (Ventura-Aquino & Paredes, 2017). Por ejemplo, las hembras aprenden

a presionar una palanca y son capaces de atravesar una barrera electrificada para ganar acceso al macho (McDonald & Meyerson, 1973). A su vez, prefieren a un macho sexualmente activo respecto a una hembra o a un macho castrado (Agrati et al., 2008; Clark et al., 2004).

Otro aspecto de la expresión del comportamiento sexual de la hembra que puede ser útil para estudiar las respuestas motivacionales-emocionales asociadas a éste es la emisión de vocalizaciones ultrasónicas (USV) de 50 kHz, señales acústicas que forman parte de la comunicación durante interacciones sociales y que las ratas emiten en el contexto sexual (Barfield & Thomas, 1986). En este sentido, las USVs de 50 kHz reflejan altos niveles de excitación conductual y se asocian principalmente con un estado emocional positivo, observándose no solo en la cópula sino también en el juego y en otras interacciones sociales positivas (Burgdorf et al., 2008). Si bien en la arena sexual no es posible diferenciar las vocalizaciones emitidas por cada individuo, el número de USV emitidas por la hembra luego de una breve interacción, sin contacto físico, con un macho ha sido propuesto como índice de su estado motivacional (McGinnis & Vakulenko, 2003).

La fuerte base motivacional del comportamiento sexual, así como su vinculación a estados emocionales particulares, refleja la complejidad del circuito neural que lo subyace, que abarca sistemas motivacionales generales además de áreas de control específicas (Micevych & Meisel, 2017; J. Pfaus et al., 2015).

1.2. Bases neuroendócrinas del comportamiento y de la motivación sexual de ratas hembras adultas

Como se ilustra en la figura 2, el circuito que controla la expresión del comportamiento sexual en la rata hembra es complejo e involucra áreas límbico-hipotalámicas claves como el núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM), en particular su región ventrolateral (NVMvl), el área preóptica media (APOm) y la amígdala medial (Ami Me), que han sido extensamente implicadas en el control de los aspectos proceptivos y receptivos de éste (Micevych & Meisel, 2017). A su vez, se ha implicado la conexión de estas estructuras, a través del APOm con el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico como un sistema motivacional general, en aquellos aspectos motivados del comportamiento sexual de la hembra (Micevych & Meisel, 2017; James G. Pfaus et al., 2014).

El **NVMvl**, y en particular las neuronas glutamatérgicas que allí se encuentran, ha sido propuesto como responsable de la expresión de la postura de lordosis y de componentes proceptivos del repertorio sexual de las hembras. En este sentido, se ha evidenciado que implantes de E en esta región de hembras OVX facilitan la lordosis, en tanto que, las lesiones producen una drástica disminución en la ejecución de esta postura y de otros comportamientos proceptivos (D. W. Pfaff, 1980). También se ha evidenciado que estimular los receptores glutamatérgicos en esta área en hembras OVX tratadas con esteroides sexuales lleva a una inhibición de estas conductas (James G. Pfaus et al., 2006), mientras que la administración de antagonistas de estos receptores las facilitan en hembras OVX tratadas exclusivamente con E (Kow et al., 1985; McCarthy et al., 1991).

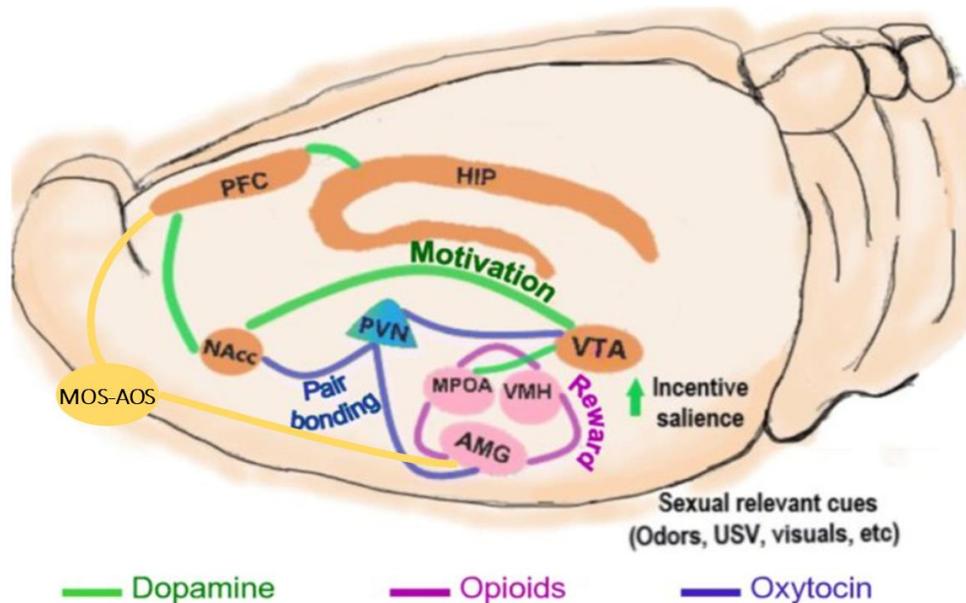


Figura 2. Modelo representativo del circuito sexual de la rata hembra. Se representan las áreas límbico-hipotalámicas más relevantes (MPOA: área preóptica media, VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo y AMG: amígdala) y su conexión con el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (VTA: área tegmental ventral. NAcc: núcleo accumbens, PFC: corteza prefrontal). En amarillo se agregaron al esquema original las entradas olfatorias del MOS: sistema olfatorio principal y el AOS: sistema olfatorio accesorio. HIP: hipocampo, PVN: núcleo paraventricular. *Adaptado de Ventura-Aquino et al., 2018.*

Otra estructura ampliamente implicada en los aspectos receptivos y más recientemente en los proceptivos de la conducta sexual es el **APOm**. Lesiones bilaterales en APOM disminuyen las conductas proceptivas (solicitudes y *hops & darts*), interrumpen la copula controlada por la hembra, e incrementan la copula en hembras que no pueden regular su cadencia (Hoshina et al., 1994; Whitney, 1986). En contraparte, la estimulación eléctrica de APOM inhibe la lordosis, por lo que se ha postulado que las hormonas esteroideas podrían desinhibir la lordosis reduciendo la actividad del APOM. Esta área estaría inhibiendo la ejecución de la lordosis (James G. Pfaus et al., 2006), pero promovería la expresión de conductas proceptivas (Graham & Pfaus, 2012). Es así que el NVMvl y el APOM, estructuras límbico-hipotalámicas que contienen receptores para E y P, regularían el patrón temporal de expresión de los componentes sexuales proceptivos

y receptivos. En línea con esto, se ha propuesto que los esteroides sexuales aumentan la sensibilidad intrínseca del APOm a señales sexuales del macho, a través de ajustar las propiedades de codificación de su olor (McHenry et al., 2017).

La **Ami Me** es otra área clave para la expresión de los comportamientos proceptivos y receptivos, a la cual se le atribuye un rol principal en el procesamiento de estímulos olfativos del macho. Así, lesiones de la Ami Me reducen el despliegue de lordosis y de conductas proceptivas, así como el condicionamiento de lugar vinculado a la actividad sexual (Afonso, Lehmann, et al., 2009; García-Horsman et al., 2008; Mascó & Carrer, 1984). La Ami Me recibe información de feromonas proveniente del bulbo olfatorio accesorio (Keller et al., 2009), y proyecta a varios núcleos incluido el NVMvl y el APOm (Keller et al., 2009; Kevetter & Winans, 1981; Richard B. Simerly, 2002). Debido a la importancia de los estímulos olfativos del macho para la motivación sexual de las hembras, Rudzinskis y colaboradores (2019) (Rudzinskis et al., 2019) proponen a la Ami Me, en particular a su región dorsal, como un centro integrador de la información sensorial sexual relevante con el estado de *arousal* o alerta generalizada, que caracteriza la búsqueda sexual.

Se ha propuesto que éstas, y otras estructuras límbico-hipotalámicas importantes para la expresión del comportamiento sexual se conectan a través del APOm con el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, promoviendo de esta forma las conductas sexuales motivadas (Micevych & Meisel, 2017; James G. Pfaus et al., 2014). El **sistema dopaminérgico mesocorticolímbico** está integrado principalmente por las proyecciones dopaminérgicas desde el área tegmental ventral hacia la corteza prefrontal medial (CPFm), el núcleo accumbens (NAcc) y el tubérculo olfatorio. Este sistema ha sido propuesto como un sistema motivacional general, ya que el mismo está implicado en la regulación de los aspectos motivacionales –entendidos como aquellos procesos que regulan la búsqueda y proximidad con estímulos con valor de incentivo- de numerosos

comportamientos (K C Berridge & Robinson, 1998; Mogenson et al., 1980; Pereira & Morrell, 2011).

La dopamina (DA) se ha implicado en la motivación sexual, tanto en aspectos anticipatorios como en su ejecución. Se ha evidenciado un aumento de DA en el **NAcc** de hembras si se les permite regular la cópula (Becker et al., 2001), luego de recibir una intromisión (Jenkins & Becker, 2003), o cuando interactúan con un macho a través de una barrera (J.G. Pfaus et al., 1995). Por otra parte, tanto el tratamiento agudo con cocaína como el crónico con anfetaminas, que incrementan la disponibilidad de DA en el sistema mesocorticolímbico (Pierce & Kalivas, 1997; Tobiansky et al., 2016), aumentan la expresión de conductas sexuales motivadas de hembras adultas (Afonso, King, et al., 2009; Clark et al., 2004; Graham & Pfaus, 2010).

Si bien ha sido menos estudiada en relación al comportamiento sexual, la **CPFm** ha sido implicada en el despliegue de conductas sexuales complejas que implican la interacción con el macho. Afonso y colaboradores (Afonso et al., 2007) mostraron que lesionar la CPFm de hembras en proestro produce una disminución en la frecuencia y duración de varias conductas como, las solicitudes y los *hops & darts*, mientras que no se observaban cambios en la respuesta de lordosis. Por lo que, esta región estaría implicada en comportamientos que impliquen un patrón motor complejo que orienta la atención del macho hacia la hembra, y determinan el éxito del encuentro.

En el mapeo del circuito neural que controla el comportamiento sexual ha sido ampliamente utilizado como marcador de activación neuronal el nivel de expresión de genes de expresión temprana o sus productos como la **proteína c-Fos**. Se ha propuesto que la proteína c-Fos es uno de los marcadores más sensible para determinar activación neuronal asociada a actividad social (Perkins et al., 2017). Así, se ha reportado aumento en la expresión de c-Fos en regiones cerebrales ricas en receptores E como APOm, los núcleos de la estría terminalis, el NVMvl y la Ami Me, así como en áreas no estrogénicas como el cuerpo estriado, la neocorteza y el tálamo, en respuesta a la estimulación

producida por la intromisión y la eyaculación, y la estimulación del cérvix vaginal tanto en hembras OVX tratadas con hormonas ováricas, como en ciclanes naturales (James G. Pfau & Heeb, 1997).

En conjunto estudios de activación neural vinculada a la estimulación sexual, así como estudios de lesión y estimulación de estas áreas, han permitido caracterizar el circuito neural que media la expresión del comportamiento sexual en hembras adultas (Figura 2). Sin embargo, hasta el día de hoy desconocemos cómo es el comportamiento sexual, así como los circuitos neurales que lo median durante la adolescencia, cuando éste comienza a expresarse.

1.3. Adolescencia: comportamiento y maduración neural

La adolescencia en mamíferos es un periodo de transición entre la infancia y la etapa adulta caracterizado por cambios significativos en funciones cognitivas, toma de riesgo y procesos motivacionales y emocionales. Durante este período los individuos adquieren las habilidades y características conductuales típicas de la vida adulta (Schulz & Sisk, 2016). Estos cambios conductuales reflejan la maduración de sistemas cognitivos, emocionales y motivacionales como consecuencia de la remodelación de los circuitos neurales que los conforman y que incluyen poda sináptica, muerte neuronal (Spear, 2000) y cambios en sistemas de neurotransmisores, entre otros (Andersen et al., 2000; Teicher et al., 1995).

En la rata se puede definir el comienzo de la adolescencia aproximadamente en el día 21 de vida, luego del destete, extendiéndose hasta el día 60, si bien la definición de sus límites temporales varía en función de los autores. Según, Holden & Blaustein (Holder & Blaustein, 2014, 2017) la adolescencia en la rata puede dividirse, de acuerdo

al grado de desarrollo, en adolescencia temprana (21 al 34 días pos-natal (DPN)), adolescencia media (35 al 46 DPN) y adolescencia tardía (47 al 59 DPN), como se esquematiza en la figura 3. Más aún, en función del grado de desarrollo de la CPFm, Brendhouse y Andersen consideran al período entre el día 60-90 de vida como adultez emergente y a la etapa adulta en sí a partir del día 90 de vida (Brenhouse & Andersen, 2011).

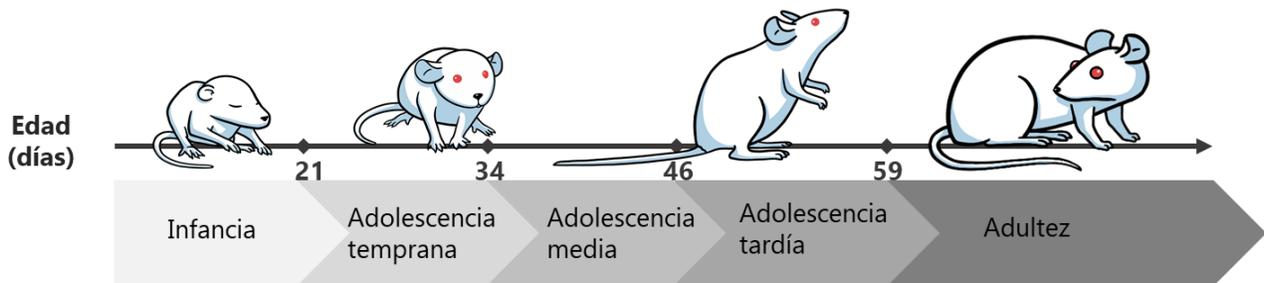


Figura 3. Etapas del desarrollo en ratas.

Durante la adolescencia los individuos, presentan un aumento en las interacciones sociales dirigida a sus pares, la toma de riesgo, la búsqueda de estímulos novedosos y exhiben conductas impulsivas (Spear, 2000) en comparación con la etapa adulta. En esta línea, son numerosos los estudios que muestran que durante esta etapa del desarrollo los individuos exhiben mayor ingesta de comida palatable, y un aumento del esfuerzo por acceder a comida como recompensa (Marshall et al., 2017, 2020). A su vez, sus interacciones sociales se caracterizan por altos niveles de juego, un comportamiento que está prácticamente ausente en el repertorio adulto y que presente en la infancia y la adolescencia (Panksepp, 1981). Este perfil conductual único de la adolescencia ha sido atribuido a que los circuitos neurales que los controlan aún están en desarrollo, entre ellos, el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Doremus-Fitzwater et al., 2010; Simon & Moghaddam, 2015; Spear, 2000; Teicher et al., 2002).

El **sistema dopaminérgico mesocorticolímbico** es uno de los que sufre una extensa remodelación durante la adolescencia, incluyendo un aumento de las fibras de proyección y cambios tanto en las concentraciones de DA y de la expresión de sus receptores. Es así que se ha documentado una mayor expresión de receptores de DA en la CPFm y en el cuerpo estriado durante la juventud y la adolescencia, reduciéndose significativamente hacia el inicio de la vida adulta (Andersen et al., 2000; Benes et al., 2000; Drzewiecki et al., 2016; Insel et al., 1990; Teicher et al., 1995). Esta remodelación también es acompañada por una mayor sensibilidad a los efectos de fármacos psicoestimulantes que actúan en este sistema (Brenhouse & Andersen, 2008). Esta mayor sensibilidad a psico-estimulantes se ha vinculado a cambios en los receptores D1 en la CPFm, ya que su bloqueo durante la adolescencia la disminuye (Brenhouse et al., 2008), mientras que la sobreexpresión de este receptor en ratas adultas recapitula las tendencias comportamentales manifestadas en la adolescencia, incluyendo la sensibilidad aumenta a las pistas asociadas a drogas (Simon & Moghaddam, 2015; Sonntag et al., 2014). La CPFm, a su vez, sufre grandes cambios en volumen, poda sináptica y organización dendrítica durante la adolescencia (por revisión ver Brenhouse & Andersen, 2011).

De forma interesante, se ha propuesto que el procesamiento neural de estímulos con valor de incentivo difiere del observado en los individuos adultos, probablemente como consecuencia de una vía de procesamiento motivacional complementaria al sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Simon & Moghaddam, 2015). En este sentido, durante la adolescencia media el estriado dorsal y la corteza orbitofrontal (**COF**) participan en el procesamiento de la recompensa (Sturman & Moghaddam, 2011b, 2012). Así, durante la búsqueda de una recompensa la actividad de neuronas de la COF disminuye en ratas adultas, pero aumenta en las adolescentes, (Sturman & Moghaddam, 2011b).

Otra estructura que sufre una reorganización importante durante la adolescencia es la amígdala (Ahmed et al., 2015; Hodgson et al., 2020; Juraska & Willing, 2017). Se ha reportado que esta reestructura incluye un incremento en la conectividad entre la amígdala y otras estructuras límbicas como el NAcc y el hipotálamo (Zoratto et al., 2018). A su vez, durante la adolescencia se modifica la conectividad entre la Amígdala, y en particular la amígdala basolateral (**Ami BL**), y la CPFm y la COF. La Ami BL ha sido implicada en el control de los comportamientos sociales (Sajdyk & Shekhar, 1997; Truitt et al., 2007) y posee un papel fundamental en los procesos de aprendizaje vinculados a reforzadores (Beyeler et al., 2016; Maren, 2016), y en particular, aquellos mediados por feromonas que poseen un valor de incentivo innato (Beny & Kimchi, 2014). Las conexiones recíprocas entre la CPFm, la COF y la Ami BL siguen madurando durante la adolescencia (Cunningham et al., 2002; Verwer et al., 1996) y se ha postulado que las aferencias desde la CPFm a la Ami BL durante este período mediarían el mayor interés social de las ratas adolescentes en relación a las adultas (por revisión ver Ferrara et al., 2021).

En conjunto esta evidencia indica que algunas áreas y circuitos neurales implicados en la regulación del comportamiento sexual aún están madurando durante la adolescencia; como ser el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, la CPFm, la COF y la conexión de éstos con la Ami BL.

1.4. Adolescencia: motivación y comportamiento sexual

Si bien muchos de los cambios neurales y comportamentales que ocurren durante la adolescencia no dependen de efectos hormonales, el aumento de los esteroides sexuales durante la pubertad, como consecuencia de la activación del eje hipotálamo-hiposifisario-ovárico (HHO), tiene un papel importante en la organización y

el refinamiento de circuitos que responderán a hormonas y estímulos sociales durante la vida adulta, incluyendo aquellos que regulan el comportamiento sexual. En este sentido, en condiciones naturales el comportamiento sexual de la rata se inicia durante la adolescencia, luego de la maduración del eje HHO (Holder & Blaustein, 2014; Södersten, 1975). Las ratas hembras comienzan a expresar ciclicidad ovárica y receptividad sexual alrededor del día 41 de vida luego de la apertura vaginal (aproximadamente 35 DPN)(Holder & Blaustein, 2014).

Las hembras son capaces de ejecutar el patrón de comportamiento sexual mucho antes de que surjan espontáneamente. En este sentido, se observó que el tratamiento con E y P puede inducir comportamiento sexual de forma precoz (19 PDN) (Beach, 1976; Södersten, 1975), sugiriendo que el circuito que lo control se encuentra, aunque sea, parcialmente maduro. Sin embargo, suministrar esteroides sexuales a hembras prepúberes OVX induce conductas consumatorias (lordosis) pero no proceptivas (Hlišák, 1986; Österlund et al., 1998); evidenciando que la maduración de los circuitos que controlan la expresión del comportamiento sexual no está completa aún. Se ha postulado que las hormonas ováricas durante la adolescencia activamente feminizan el comportamiento social y reproductor, siendo necesaria la maduración de los circuitos neurales para la activación del comportamiento reproductor (Field & Pellis, 2008; Pellis, 2002; Pellis et al., 2018).

Varios trabajos reportan que alrededor del día 41 de vida las hembras naturalmente ciclantes expresan componentes proceptivos y receptivos durante la interacción con un macho (Armas et al., 2021), si bien no se ha caracterizado aún si esta interacción difiere a la expresada por hembras adultas. En nuestro laboratorio observamos que hembras en adolescencia tardía, aproximadamente de 50 días de vida, exhiben un comportamiento sexual similar al de las adultas, pero el mismo se acompaña

de una mayor exploración social del macho, y probablemente juego (Agrati et al., 2018). El juego es una conducta muy recompensante (Achterberg et al., 2016; Achterberg & Vanderschuren, 2020) que se incrementa desde la edad juvenil hacia la adolescencia media, momento a partir del cual la aparición de esta conducta empieza a espaciarse hasta expresarse de forma mínima cerca del día 60 de vida (Panksepp, 1981). La mayor parte de las interacciones entre pares de ratas juveniles y adolescentes se considera juego social; e incluyen una variedad de despliegues motores muchas veces exagerados o repetitivos que se asemejan a patrones conductuales presentes en las interacciones sexuales o agresivas de los individuos adultos (Panksepp et al. 1984; Pellis and Pellis 2009; Vanderschuren et al. 1997). Muchas de las interacciones de juego social comienzan con un individuo aproximándose y solicitando a otro, usualmente frotando el hocico en el cuello o nuca del compañero (*pouncing*). Esto es seguido de persecución, lucha, acicalamiento social o *pinning* en el cual uno de los individuos yace en el suelo sobre su espalda con el otro individuo sobre él (Vanderschuren et al., 1997).

Teniendo en cuenta que tanto la exploración social como el juego son mayores durante la adolescencia media, entre los días 32 y 40 de vida (Panksepp, 1981), es posible que la motivación social de las hembras durante la adolescencia media interfiera con la expresión de su motivación sexual cuando éstas están sexualmente activas, promoviendo la expresión de exploración social y juego sobre el despliegue conductas sexuales proceptivas. Apoyando esta idea, estudios previos de nuestro laboratorio, utilizando el modelo de preferencia macho vs hembra y de emisión de USV en respuesta a un macho, muestran que las hembras en adolescencia media sexualmente activas poseen menor motivación sexual que las hembras en adolescencia tardía y adultas (Armas et al., 2021). A partir de estos resultados es posible esperar que las hembras sexualmente activas en adolescencia media expresen más motivación social que sexual durante la interacción con un macho, mostrando mayor frecuencia de exploración social

y juego y menor de conductas proceptivas en relación a hembras en etapas más avanzadas de la adolescencia y adultas.

Estudiar cómo es la expresión del comportamiento sexual durante una interacción con un macho en hembras en adolescencia media presenta un problema adicional asociado a que muchas de las conductas sexuales proceptivas son similares en su expresión a conductas de juego. Por ejemplo, la postura de presentación (Poole & Fish, 1975) y las solicitudes (Thor & Holloway, 1984) se expresan tanto en el comportamiento sexual como en el juego. Con el fin de discriminar entre componentes comportamentales sexuales y sociales, sería importante determinar cómo es la interacción social de una hembra en adolescencia media con un individuo adulto sin valor sexual y probar si ésta difiere de la observada en una interacción con un macho.

Además de entender cómo es el comportamiento sexual durante la adolescencia, y la relevancia de los componentes sociales propios de la edad en esta expresión, sería interesante ahondar en el circuito neural que regula el valor de incentivo sexual del macho para las ratas adolescentes. Por ejemplo, determinar cómo es la activación neuronal en áreas claves del circuito sexual frente a un macho en hembras adolescentes y adultas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes planteados se desprende que conocemos poco acerca de la ontogenia de la motivación y del comportamiento sexual a lo largo de la adolescencia, y desconocemos, a su vez, si las expresiones de otras motivaciones sociales típicas de este periodo del desarrollo interfieren en su expresión. De igual forma, se desconoce si los sustratos neurales que median el valor de un macho para una

hembra sexualmente activa, parte de los cuales están aún en desarrollo durante la adolescencia, son comunes entre ratas adolescentes y las adultas.

Sobre esta base proponemos la siguiente hipótesis:

Hipótesis

Como consecuencia del desarrollo de los circuitos neurales que regulan la motivación y el comportamiento sexual durante la adolescencia, la expresión de este comportamiento y la activación de los circuitos neurales que lo subyacen, difieren entre ratas hembras adolescentes y adultas.

3. OBJETIVOS Y PREDICCIONES

Objetivos

1. Determinar si el comportamiento sexual de ratas hembras ciclantes difiere a lo largo de la adolescencia y en relación a la etapa adulta, y determinar si éste se asocia al despliegue de comportamientos sociales típicos de la adolescencia.

2. Determinar si la activación neuronal en el circuito asociado a la expresión de la motivación y el comportamiento sexual frente a un estímulo sexual difiere entre hembras sexualmente activas adolescentes y adultas.

Predicciones

En base a los antecedentes, hipótesis y objetivos planteados se desprenden las siguientes predicciones:

1. El comportamiento sexual de ratas hembras durante la adolescencia difiere respecto a la etapa adulta, acompañándose de componentes de juego y exploración social; siendo esta diferencia mayor en etapas más tempranas de la adolescencia.
2. La activación neuronal en áreas del circuito que regula la motivación y el comportamiento sexual en respuesta a un macho difiere entre ratas hembras adolescentes y adultas, en particular en aquellas áreas que se encuentran aún en desarrollo durante la adolescencia como las cortezas prefrontales mediales y orbitofrontal y la amígdala basolateral.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Con el fin de caracterizar la evolución de la expresión del comportamiento sexual a lo largo de la adolescencia (**objetivo 1**), comparamos el comportamiento de ratas hembras adolescentes y adultas (90-110 DPN) en una prueba de interacción sexual con un macho sexualmente activo. Seleccionamos 2 edades dentro de la adolescencia para analizar: adolescencia media (entre 39 y 43 DPN) y tardía (entre 49 y 53 DPN) basadas en la clasificación de Holder & Blustein (Holder & Blaustein, 2014, 2017) y en experimentos previos de nuestro laboratorio que muestran diferencias en la motivación sexual entre estas edades (Armas et al., 2021).

Para determinar el grado de co-expresión de componentes del comportamiento social típico de la adolescencia durante la cópula, así como la expresión de componentes proceptivos durante la interacción social, cuantificamos el juego y la

exploración social de acuerdo a Vanderschuren y colaboradores durante la interacción con un macho (Vanderschuren et al., 1997), y comparamos el comportamiento de las hembras en esta interacción con el expresado en una interacción con una hembra no sexualmente activa.

Con el fin de determinar si la activación neural en el circuito motivacional sexual difiere entre ratas hembras adolescentes y adultas (**objetivo 2**) analizamos la expresión de la proteína c-Fos en áreas específicas del circuito motivacional sexual luego de una breve interacción sin contacto físico con un macho sexualmente activo (estímulo sexual), con una hembra no sexualmente activa (estímulo social) y en ausencia de estímulos. Seleccionamos trabajar con hembras en adolescencia media, ya que este grupo de adolescentes, y no aquellas en adolescencia tardía, difirió de las adultas en dos pruebas motivacionales: emisión de USV en respuesta a una interacción sexual/social y preferencia macho vs. hembra (Armas et al., 2021).

Como modelo de interacción sin contacto físico, decidimos utilizar la prueba de emisión de USV luego de la interacción con un macho sexualmente activo o una hembra no sexualmente activa (McGinnis & Vakulenko, 2003), debido a las siguientes razones:

1. el comportamiento de las hembras en adolescencia media y adultas en éste difiere (Armas et al., 2021),
2. permite evaluar la respuesta conductual de emisión de USV junto con la actividad neuronal,
3. brinda la posibilidad de evaluar de forma independiente la actividad neural frente al macho y frente a la hembra, y
4. permite una interacción con poco contacto físico, evitando aspectos aversivos de la cópula asociados a las intromisiones (Hardy & DeBold, 1972; Paredes & Vazquez, 1999) y la expresión de c-Fos dependiente de la estimulación somato-sensorial vinculada a la monta y la intromisión (Cibrian-Llenderal et al., 2010; Georgescu et al.,

2009; Parada et al., 2010; J. G. Pfaus et al., 1996; James G. Pfaus, 2021). En relación a este último punto, dada la diferencia de tamaño entre las hembras en adolescencia media y las adultas, esta estimulación puede diferir significativamente entre ambos grupos etarios, impactando en el comportamiento de las hembras y en el grado de actividad de las áreas analizadas.

Decidimos cuantificar la expresión de la proteína c-Fos como índice de activación neural debido a que esta herramienta ha sido muy útil en la identificación de áreas implicadas en diferentes aspectos del comportamiento sexual de la hembra en múltiples estudios (J. G. Pfaus et al., 1997; J. G. Pfaus et al., 2015). Dentro de las áreas implicadas en el control de la conducta sexual y debido a su relevancia (Micevych & Meisel, 2017; J. Pfaus et al., 2015); seleccionamos analizar áreas límbico-hipotalámicas claves como el NVMvl, el APOm y la Ami Me y del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico como NAcc (regiones shell y core) y la CPFm. A su vez, debido a la importancia que se le ha atribuido a la COF en la regulación de conductas motivadas durante la adolescencia (Simon & Moghaddam, 2015) y a la inmadurez de la conexión entre la CPFm, la COF y la Ami BL (Cunningham et al., 2002; Verwer et al., 1996) incluimos estas estructuras en el análisis.

5. METODOLOGÍA

5.1. Animales y su manejo

Las ratas hembras y machos (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) fueron criadas en un ambiente con temperatura y humedad controlados ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ and 50–70%, respectivamente) bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (ciclo de oscuridad 15:00-3:00) en el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias. Las hembras adolescentes y adultas fueron mantenidas en grupos de 5 y 4 respectivamente. La conformación de los grupos experimentales, así como el número de animales por grupos se describen en detalle en la **sección 5.4 Procedimientos experimentales**.

La apertura vaginal de las adolescentes fue monitoreada diariamente desde el día 33 de vida (Caligioni, 2009). El ciclo estral de todas las hembras se siguió a partir de la observación del exudado vaginal matinal (Cora et al., 2015; Marcondes et al., 2002) empezando el día de la apertura vaginal para adolescentes, y entre los días 80-90 de vida para las adultas. En el caso de las hembras adultas, las mismas fueron utilizadas luego de presentar por lo menos 2 ciclos estrales regulares. Esto no fue posible en las hembras adolescentes debido a la irregularidad de sus ciclos estrales (Södersten, 1975). El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a la ley uruguaya para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Ley 18.611) y el protocolo experimental fue aprobado por el CEUA de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República (número de protocolo 240011 -000941-17).

5.2. Pruebas comportamentales

5.2.1. Interacciones social y sexual

Las interacciones social y sexual se evaluaron en una arena circular de plexiglás (90 cm de diámetro). La hembra experimental fue colocada en la arena permitiéndosele explorar por 5 minutos, luego de los cuales se introdujo un macho adulto sexualmente activo (interacción sexual) o una hembra adulta no sexualmente activa (interacción social). En ambos tipos de interacciones se registró durante 10 minutos el comportamiento de la hembra y del animal estímulo. De acuerdo a Agrati y

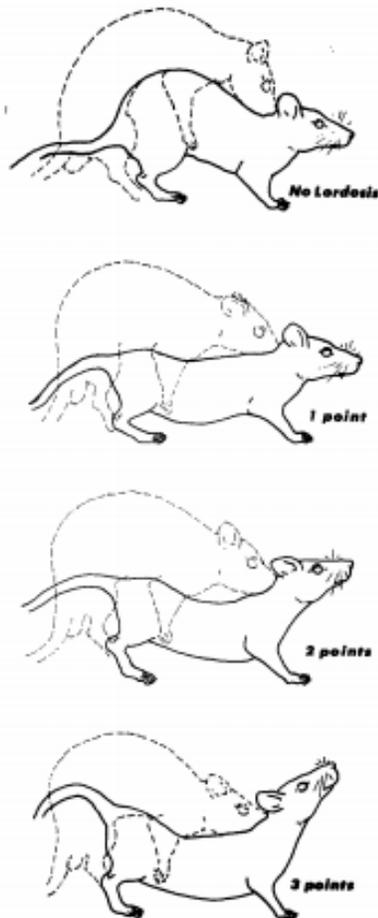


Figura 4: Intensidad de lordosis en respuesta a monta.

Tomada de *Hardey & De Bold, 1972.*

colaboradores (2018) registramos los siguientes componentes del comportamiento sexual de las hembras: número de posturas de lordosis en respuesta a la monta, *hops & darts* (desplazamientos cortos en las cercanías del macho que, terminan usualmente en una postura corporal rígida) y posturas de presentación (cambio postural sin desplazamiento con congelamiento en posición agazapada con las orejas orientas hacia atrás) (Agrati et al., 2019; Hardy & DeBold, 1972). Como se muestra en la figura 4, se cuantificó la intensidad de las posturas de lordosis utilizando una escala de tres puntos de acuerdo al grado de curvatura alcanzada en la dorsoinflexión espinal (Hardy & DeBold, 1972) (Hardy & DeBold,1972). Se calculó la intensidad de lordosis media por hembra (suma del puntaje de intensidad de todas las lordosis/número total de lordosis). Además, se registró la latencia a la presentación de postura de lordosis y *hops &darts*, adjudicándose un

tiempo de latencia igual al tiempo total de la prueba (600 segundos) en las situaciones en que no se ejecutó la conducta. Con el objetivo de evaluar la receptividad sexual, se calculó el cociente de lordosis como el número de lordosis sobre el número de montas (se consideraron las montas con y sin intromisión, así como las montas con eyaculación).

Dado que las ratas adolescentes pueden presentar conductas de juego y mucha investigación social durante ambos tipos de encuentros, se contabilizaron el número de olfateos corporales (en la nuca, y en las región dorsal o ventral del individuo estímulo), olfateos anogenitales, así como el número de *crawling over* (investigación del animal estímulo por la región dorsal con al menos dos patas encima) y *crawling under* (investigación o cruce por debajo de la región ventral) (Vanderschuren et al., 1997; Willey & Spear, 2012). Probablemente debido al tamaño y a la diferencia de edad entre la hembra experimental y el estímulo social, observamos que los parámetros característicos del juego entre pares como el *pinning* y el *poucing* (Trezza et al., 2010) no se presentaron o lo hicieron en baja frecuencia. Por lo tanto, basándonos en los análisis preliminares de la interacción social, evaluamos ambos tipos de *crawling* como juego, por ser los componentes de este comportamiento más frecuentes. En todos los grupos y en ambas condiciones (interacciones social y sexual), los olfateos corporales y anogenitales siguieron el mismo patrón de expresión (tanto en la estadística descriptiva como analítica) por lo que expresamos su suma como una única variable definida como investigación social.

El comportamiento sexual del macho fue evaluado como el número de montas (con y sin intromisión) y eyaculaciones, junto a sus respectivas latencias. En ambas interacciones el número de olfateos anogenitales realizados por el animal estímulo fue registrado.

5.2.2. Emisión de USV en respuesta a un macho o una hembra

La emisión de USV por las hembras luego de una breve interacción sexual (con macho sexualmente activo) o social (con hembra adulta no sexualmente activa) fue evaluada usando el modelo propuesto por (McGinnis & Vakulenko, 2003) y validado en nuestro laboratorio (Armas et al., 2021). El modelo consiste en un compartimiento de acrílico (38cm ancho x38cm largo x40cm altura) recubierto de viruta en el piso con una rejilla deslizable vertical que divide el recinto en dos compartimientos iguales.

Las hembras experimentales se habitúan al modelo por 15 minutos durante 4 días consecutivos previo a la prueba, para evitar la neofobia. El día de la prueba, la hembra experimental fue colocada en el modelo, y luego de una habituación al mismo de 30 min., se introdujo junto a la rejilla divisoria a un macho sexualmente activo (estimulo sexual), a la hembra no sexualmente activa (estimulo social) o únicamente a la rejilla divisoria (ausencia de estímulo). La rejilla permite la interacción visual, olfativa, auditiva y semitáctil entre la pareja de animales, impidiendo el contacto corporal. Pasados 8 minutos de interacción, el animal estímulo fue retirado del cuarto experimental junto con la rejilla. Se registró durante 5 minutos el número de emisiones USV de la hembra experimental con un micrófono *Ultra Sound Gate* (Avisoft Recording Software) ubicado en la parte superior del modelo. La grabación de USV se analizó con el software Avisoft-SAS Lab Pro (Avisoft Bioacustics). Se clasificaron las USV de acuerdo a Brudzynski (2013) en dos categorías principales (50kHz y 20 kHz) según el rango de frecuencia emitido.

5.3. Técnica inmunohistoquímica

5.3.1. Preparación del tejido

Sesenta minutos después de la interacción (como se detalla en Procedimiento Experimental en la sección 5.4.2). Las ratas se anestesiaron con tiopental (80mg/kg) y se perfundieron de forma transcardíaca con solución buffer-fosfato salina heparinizada (PBS con heparina 200 ml adultas y 100 ml adolescentes), seguida de solución de paraformaldehído al 4% (paraformaldehído PAF 4%, 400 ml adultas/ 200 ml adolescentes). El cerebro se removió y sumergió para su pos-fijación en una solución de PAF al 4% overnight, seguido de una solución de sacarosa al 15% y luego otra al 30% para criopreservar el tejido. Los cerebros se congelaron en isopentano a -80°C y se almacenaron a -80°C. Se realizaron cortes del cerebro de las áreas de interés de 40 µm de espesor, y se guardaron *free float* en solución *antifreeze* -20°C. Una serie de cortes por animal se utilizó para la inmunohistoquímica, mientras que la serie adyacente se coloreó por la técnica de Nissl para la identificación de las áreas (Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2007).

5.3.2. Inmunohistoquímica

La expresión de la proteína c-Fos fue determinada por inmunohistoquímica en cortes *free floating*. Dichos cortes fueron procesados siguiendo el protocolo de Pose y colaboradoras (2019) (Pose et al., 2019). Los cortes se incubaron primeramente con peróxido de hidrogeno para inactivar las peroxidasas endógenas, y posteriormente en solución con suero de caballo y albumina sérica bovina con el fin de evitar el bloqueo inespecífico. Las rodajas fueron incubadas en anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de cabra contra proteína c-Fos de humanos sc-52-G, Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA) diluido 1 en 2600 durante 36 hs a 4 °C. Posteriormente los cortes fueron

incubados en anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal de caballo biotinizado, Vector Laboratories, California, USA) dilución 1 en 200 por 3 hs, y en última instancia se incubaron junto al complejo AB para amplificar la señal durante 3 hs y se visualizaron con la solución conteniendo DAB y níquel en un tiempo estimado de 2,5 min. Ambos procedimientos finales se realizaron de acuerdo a las indicaciones de los kits comerciales de Vector Laboratories (California, USA). El tejido fue lavado repetidas veces en solución amortiguadora previo a cada incubación y luego del revelado. Finalmente, los cortes se montaron para identificación y cuantificación de las diferentes áreas. Un mismo ensayo incluyó cortes de todos los grupos experimentales y un pocillo control negativo (incubado sin anticuerpo primario).

5.3.3. Análisis de la expresión de c-Fos

Las regiones del cerebro se visualizaron y seleccionaron usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i 241, con un aumento de 10x y se fotografiaron las áreas de interés con una cámara digital Nikon DS-5Mc-U2, utilizando el software Nikon NisElements 3.1 Advanced Research. Para optimizar la detección, análisis y conteo de células positivas para c-Fos, las imágenes fueron convertidas a 8 bits con el software ImageJ –FIJI (Schindelin et al., 2012). Una célula fue marcada como positiva para c-Fos cuando la inmunoreactividad era nuclear (verificado visualmente), el tamaño del núcleo se encontraba entre 10 y 150 μm , aproximadamente circulares (radio entre 0,6 y 1,0 μm) y superaba un determinado umbral de densidad óptica calculado en relación con la reactividad total de la región de interés (ROI), determinado mediante el algoritmo de intermodos del programa (Prewitt & Mendelsohn, 1966). El número de células positivas para c-Fos fue reportado como la media entre el número de células en ambos lados del cerebro cuantificada para cada área.

Las áreas analizadas fueron: Corteza prefrontal medial: CPFm prelimb, CPFm cing, CPm infralimb, y COF, NAcc: regiones *shell* y *core*, APOm, el NVMvl y amígdala: región

anterior medial (Ami Me) en sus subregiones ventral y dorsal y basolateral (Ami BL). Como se muestra en la figura 5, las alturas anteroposteriores seleccionadas para ser analizadas y los tamaños y posiciones de las ROI se identificaron según el atlas estereotáxico "The rat brain in stereotaxic coordinates" (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*, n.d.). Estos fueron: CPF: 3,24mm desde Bregma (Cingulada, prelímbica e infralímbica ROI= 1,8mm² y orbitofrontal: ROI= 3,35mm²); NAcc: 1,68 mm desde Bregma (*Core* ROI= 0,18mm² y *Shell* ROI= 0,125mm²); APOm: -0,36mm desde Bregma (APOm ROI = 0,9mm²); Ami: -2,52 mm desde Bregma (Ami BL ROI = 0,375 mm², Ami Me ROI = 0,225 mm²) y VMHvl -2,52 mm desde Bregma (VMHvl ROI=0,252mm²). Debido a que el conteo de los ROI dorsal y ventral de la Ami Me tuvo tendencias descriptivas y analíticas similares, se sumaron, se analizaron y se muestran como un único conteo de la Ami Me.

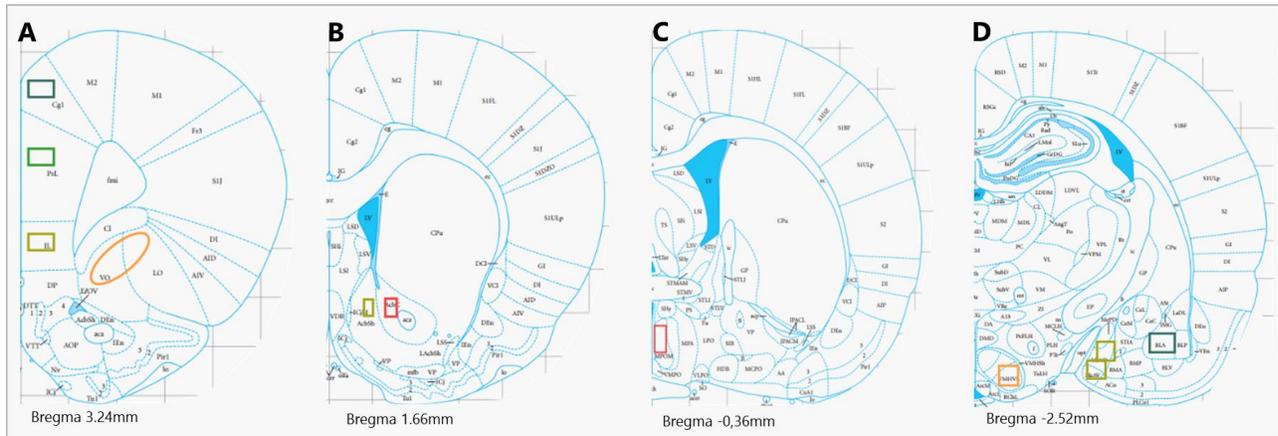


Figura 5. Representación de regiones analizadas. A: Corteza prefrontal medial (trazos en verde) y orbitofrontal (trazo naranja) (bregma 3,24mm), B: Núcleo accumbens regiones *Shell* (trazo verde) y *core* (trazo rojo) (bregma 1,66mm), C. área preóptica media (bregma -0.36) y D. amígdala regiones medial (trazos en verde claro) y basolateral (trazo en verde oscuro) y núcleo ventromedial del hipotálamo región ventrolateral (trazo naranja) (bregma -2,53). *Imágenes de Paxino & Watson (2007).*

5.4 Procedimientos experimentales

5.4.1. Experimento I: Comportamiento de hembras adolescentes y adultas durante una interacción con un macho o con una hembra adulta

Las hembras adolescentes y adultas, dentro de los rangos etarios establecidos (en base a (Tirelli et al., 2003)), que mostraron un exudado vaginal matinal de proestro fueron probadas brevemente con un macho 2 a 3 hs luego de apagadas las luces y solo aquellas que presentaron una lordosis en respuesta a una monta fueron utilizadas. Esta prueba se realizó ya que en el caso de las hembras adolescentes un exudado vaginal de proestro puede no asociarse a un estado de actividad sexual (Södersten, 1975; observaciones propias). A continuación, las hembras fueron sometidas a una prueba de emisión de USV con un macho (estímulo sexual) o una hembra adulta (estímulo social), e inmediatamente finalizada esta prueba fueron probadas en la arena sexual con el mismo estímulo utilizado en la prueba anterior: macho sexualmente activo o hembra no sexualmente activa (como se muestra en la Figura 6). En esta tesis analizamos el comportamiento en las pruebas de interacción social o sexual, el análisis de las USV fue realizado por Magdalena Armas en su tesina de grado y se presenta en el artículo anexado (Armas et al., 2021).

Los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente forma: adolescencia media (Adol m) 39-43 DPN ($41,7 \pm 1,3$ días de edad) interacción con un macho sexualmente activo (n=11) o interacción con hembra adulta no sexualmente activa (n=10), adolescencia tardía (Adol t) 49-53 DPN ($50,6 \pm 1,4$ días de edad) interacción con un macho sexualmente activo (n=10) o interacción con hembra adulta no sexualmente activa (n=9) y adultas 90-120 DPN ($101,3 \pm 20,6$ días de edad)

interacción con un macho sexualmente activo (n=12) o interacción con hembra adulta no sexualmente activa (n=11).

Con el fin de mantener una relación lo más estable posible entre la diferencia de tamaño del macho y de la hembra en las interacciones sexuales, se utilizaron machos de menor edad y peso ($375\text{g} \pm 48\text{g}$) con las hembras adolescentes y machos de mayor edad y peso ($511\text{g} \pm 49\text{g}$) con las hembras adultas. Todos los machos fueron entrenados para eyacular en menos de 15 min.

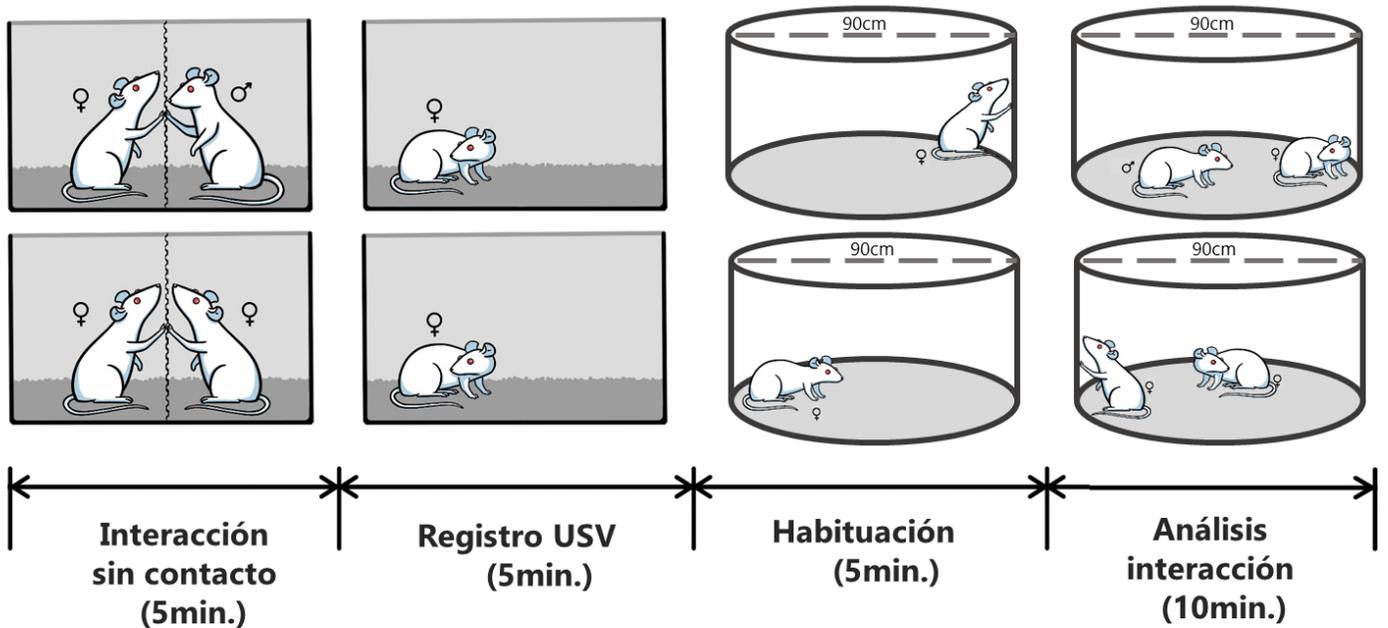


Figura 6: Protocolo del experimento I. Los dibujos superiores representan a los grupos interacción con un macho sexualmente activo y los inferiores a los grupos interacción con una hembra adulta no sexualmente activa.

5.4.2. Experimento II: Expresión de c-Fos en áreas neurales implicadas en la motivación sexual de hembras adolescentes y adultas

A las hembras adolescentes y adultas, dentro de los rangos etarios establecidos (en base a (Tirelli et al., 2003)), que mostraron un exudado vaginal matinal de proestro se les realizó una estimulación manual breve (menos de 90 seg.) en los flancos y la región perivaginal 2 a 3 horas luego de iniciado el ciclo de oscuridad para confirmar el proestro conductual y evitar contacto con un macho previo a la prueba. La estimulación brindada fue uniforme en todos los grupos. Solo aquellas hembras que expresaron conducta proceptiva o lordosis frente a esta estimulación fueron utilizadas. Este protocolo se realizó debido a que un número elevado de hembras en adolescencia media que presentan exudado vaginal de proestro no se encuentran sexualmente activas (Södersten, 1975); observaciones propias).

A continuación, las hembras fueron trasladadas al cuarto experimental y permanecieron en la caja de prueba durante 30 min., luego de los cuales se introdujo un macho sexualmente activo (Grupo Macho: Adol m: n=8 y Adultas: n=9), una hembra no sexualmente activa (Grupo Hembra: Adol m: n=8 y Adultas: n=8) o no se introdujo estímulo (Grupo Control: Adol m: n=7 y Adultas: n=9). Luego de los 8 min. de interacción, se retiraron los estímulos y la rejilla o solo la última en caso de los grupos "ausencia de estímulo". Inmediatamente, se registró el número de USV emitido por la hembra durante 5 min, luego de los cuales se retiró la experimentadora del cuarto y las hembras permanecieron sin ser molestadas hasta completar 60 min. Finalizado este lapso temporal, la receptividad sexual fue confirmada con la respuesta de lordosis en respuesta a la monta de un macho y las hembras fueron anestesiadas con tiopental (80 mg/kg, ip) y sus cerebros procesados para la técnica inmunohistoquímica para la detección de c-Fos (Figura 7).

El registro y posterior cuantificación de la emisión de USV por parte de las hembras experimentales fue utilizado como un indicador de la respuesta conductual diferencial de hembras adolescentes y adultas frente al macho.

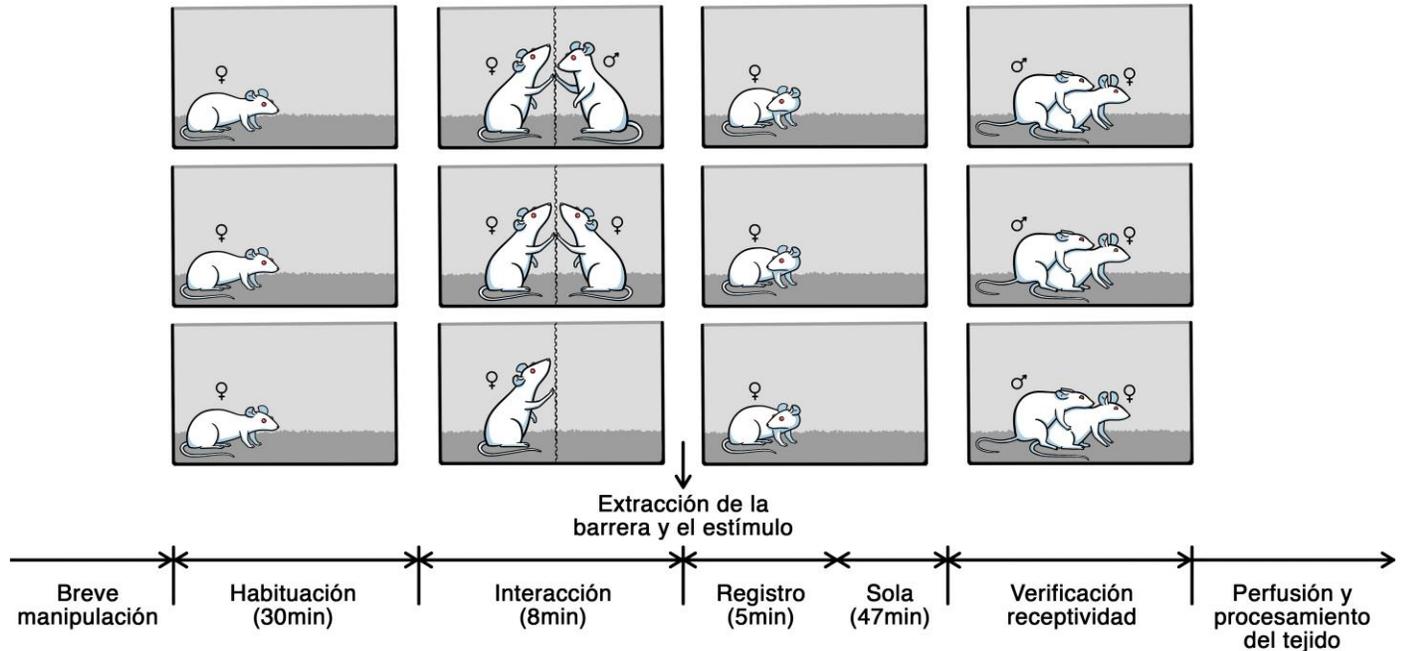


Figura 7. Protocolo del experimento II. Los dibujos superiores representan a la interacción con un macho sexualmente activo, los dibujos medios a la interacción con la hembra adulta no sexualmente activa y los dibujos inferiores a la ausencia de estímulos.

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. Experimento I

Los datos comportamentales no presentaron distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) ni homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) por lo que fueron analizados con pruebas no paramétricas de acuerdo a Siegel & Castellan (Siegel & Castellan, 1988). Para comparar los comportamiento sexual y social entre las edades de las hembras se utilizó el análisis de varianzas de Kruskal Wallis seguido de la prueba pos hoc de Dunn con corrección de Bonferroni (Ruxton & Beauchamp, 2008). Para

comparar variables presentes en la interacción sexual y en la social dentro de una misma edad se utilizó la prueba U de Mann Whitney.

Se utilizó la prueba exacta 2x2 de Fisher para comparar número de hembras que expresaron determinado comportamiento entre grupos. Los datos comportamentales se expresan como medianas y rangos intercuartiles y los del peso y la edad como media \pm error estándar.

5.6.2. Experimento II

La variable número de células c-Fos+ por región no presentó distribución normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) ni homogeneidad de varianzas entre grupos (prueba de Levene) en la mayoría de las áreas y los grupos analizadas hasta el momento están compuestos por un N pequeño (aproximadamente 6), por lo que esta variable fue analizada mediante pruebas no paramétricas de acuerdo a Siegel & Castellan (Siegel & Castellan, 1988). Para comparar la expresión de c-Fos entre condiciones (control, hembra y macho) dentro de un grupo etario se utilizó el análisis de varianzas de Kruskal Wallis seguido de la prueba pos hoc de Dunn con corrección de Bonferroni (Ruxton & Beauchamp, 2008). Para comparar el número de neuronas c-Fos+ en una misma condición entre adolescentes y adultas se utilizó la prueba U de Mann Whitney.

Los mismos análisis se utilizaron para comparar la emisión de USV entre condiciones y entre edades. Los datos se expresan como medianas y rangos intercuartiles.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento I: Comportamiento de hembras adolescentes y adultas durante una interacción con un macho o con una hembra adulta

6.1.1 Comportamiento sexual de las ratas hembras

Frente a un macho sexualmente activo

Durante la interacción con un macho, todas las hembras presentaron altos niveles de receptividad sexual (Figura 8A). Sin embargo, la intensidad de lordosis difirió entre grupos ($H_{(2)} = 11,81$, $p < 0,01$, ANOVA de Kruskal Wallis), observándose una menor intensidad en las hembras en adolescencia media con respecto a tardía ($Z_{(11,10)} = 2,55$, $p = 0,032$, prueba pos hoc de Dunn para comparaciones por pares) y adultas ($Z_{(11,12)} = 3,27$, $p < 0,01$; Figura 8B).

El despliegue de comportamientos proceptivos (número de posturas de presentación y *hops & darts*, Figura 9) no difirió entre los grupos (posturas de presentación: $H_{(2)} = 3,503$, $p = 0,17$ y *hops & darts*: $H_{(2)} = 0,56$, $p = 0,75$).

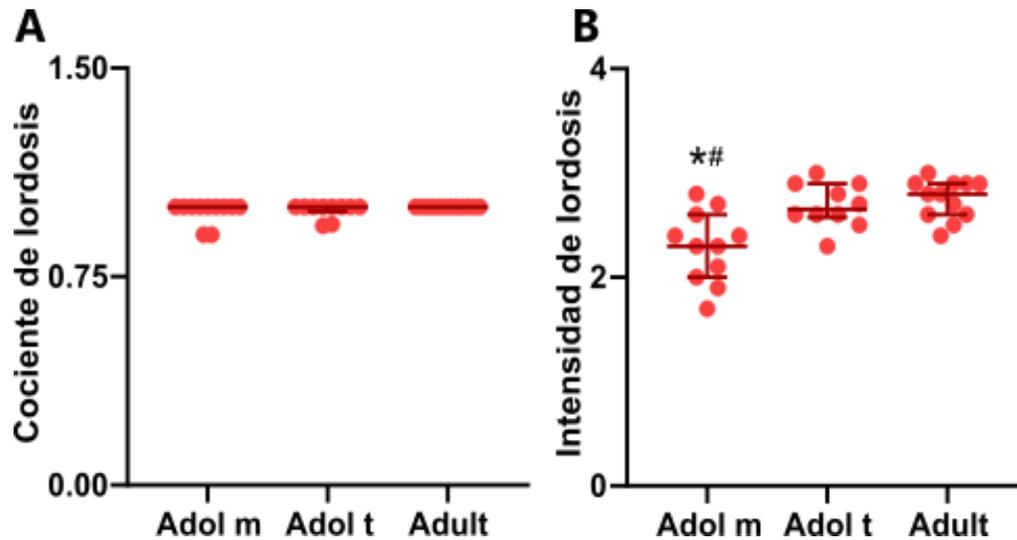


Figura 8. Receptividad sexual. Cociente de lordosis (panel A) e intensidad de la lordosis (panel B) de ratas hembras en adolescencia media (Adol m) y tardía (Adol t) y en adultas (Adult). Los datos se expresan como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo, n=10-12 por grupo, *:p<0,05 vs. Adult y #: p<0,05 vs. Adol t, Prueba pos hoc de Dunn para comparaciones por pares.

Como se muestra en la tabla 1, la latencia a la expresión de la postura de lordosis difirió entre grupos ($H_{(2)} = 12,242$, $p < 0,01$), observándose una mayor latencia durante la adolescencia media en comparación con la adultez ($Z_{(11,12)} = 3,42$, $p = 0,02$), mientras que detectamos una tendencia con respecto a la adolescencia tardía ($Z_{(11,10)} = 2,32$, $p = 0,06$). En tanto, no se detectó diferencia entre grupos en el tiempo al despliegue de las conductas proceptivas ($H_{(2)} = 2,21$, $p = 0,33$).

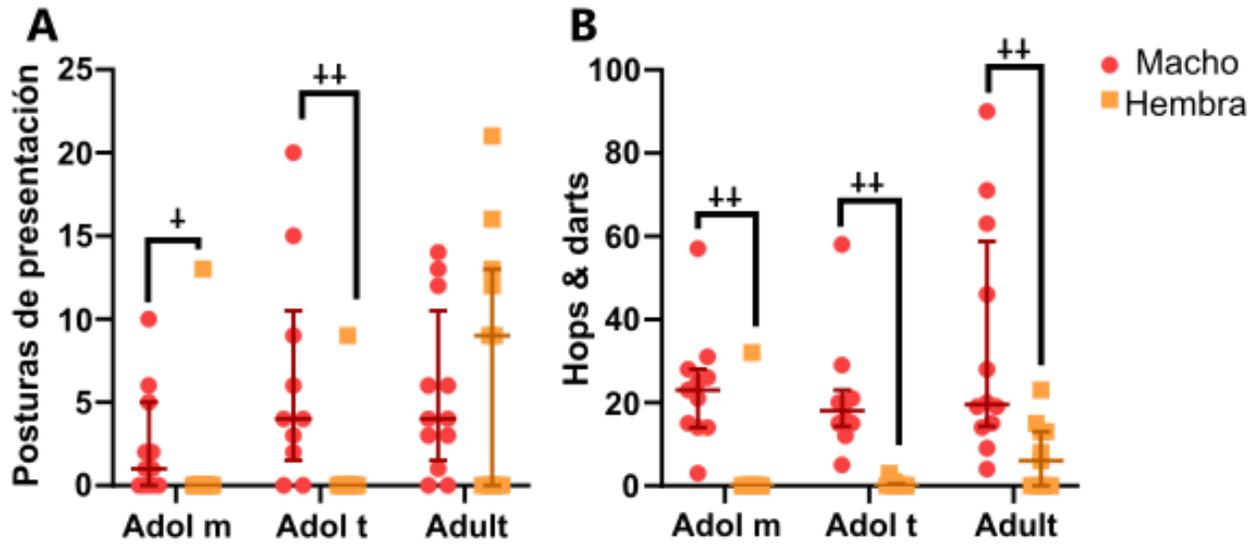


Figura 9. Proceptividad sexual. Número de conductas proceptivas expresadas por ratas hembras en adolescencia media (Adol m), adolescencia tardía (Adol t) y adultas (Adult) durante la interacción con un macho sexualmente activo (Macho: círculos rojos) o una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra: cuadrados naranjas). En el panel A se muestra el número de posturas de presentación y en el panel B el número de *hops & darts*. Los datos se expresan como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo, n=10-12 por grupo, † sobre barra p<0,05 entre estímulos y †† sobre barra p<0,01 entre estímulos, prueba U de Mann Whitney.

Tabla 1. Latencias (s) al despliegue de conductas sexuales y de juego de ratas hembras adolescentes o adultas frente a un macho sexualmente activo

	Adolescencia media	Adolescencia tardía	Adultas
Proceptiva	26,62 (14,56-101,1)	15,50 (11,80-27,99)	24,8 (13,14-36,93)
Lordosis	90,31 (27,46-133,43) *	15,27 (13,62-27,44)	13,56 (4,86-23,79)
Juego	49,72 (33,82-526,85) **	600 (64,52-600)	600 (600-600)

Datos expresados en medianas (RIC), *: p<0,05 y **: p<0,01 vs. Adultas, prueba pos hoc de Dunn para comparaciones por pares entre los grupos etarios.

Si bien el comportamiento sexual proceptivo de las hembras no difirió, el macho modificó su comportamiento según la edad de las hembras; presentando mayor latencia a la monta en presencia de hembras en adolescencia medias (latencia en segundos: Adol m: 52,2 (15,9-135,8), Adol t: 15,0 (13,3-27,1) y Adult: 13,2 (4,7-20,1); Adol m vs. Adult: $Z_{(11,12)}=3,14$, $p<0,01$ y vs. Adol t: $Z_{(11,10)}=2,07$, $p=0,1$). Como muestra la tabla 2, el número de olfateos anogenitales ($H_{(2)}=3,91$, $p=0,14$), de montas ($H_{(2)}=4,73$ $p=0,09$) y de eyaculaciones ($H_{(2)}=1,38$, $p= 0,50$), así como la latencia a la misma ($H_{(2)}=1,70$, $p= 0,43$), no difirió entre los machos que interactuaron con hembras de diferentes edades.

Tabla 2. Número de conductas sexuales y exploratorias de los machos sexualmente activos al interactuar con ratas hembras adolescentes o adultas

	Adolescencia media	Adolescencia tardía	Adulta
Montas	10 (6-12)	11,5 (9,75-13,5)	15 (7,75-18)
Eyaculación	1 (1-1)	1 (0-2)	1 (0-1)
Olf. anogenitales	16 (14-22)	10,5 (3,75-17,5)	18 (6,75-36)

Datos expresados en medianas (RIC), $p=NS$ para los ANOVAs de Kruskal Wallis.

Frente a una hembra adulta no sexualmente activa

Las ratas sexualmente activas también realizaron comportamientos proceptivos durante la interacción con una hembra adulta no sexualmente activa. Sin embargo, mientras que el 55% de las hembras adultas (6/11) exhibió conductas proceptivas frente al estímulo hembra, solo el 22% (2/9) de las adolescentes tardías y el 10% (1/10) de las adolescentes medias desplegó estas conductas (Adol m vs. Adult: $p=0,04$, Prueba exacta

de Fisher). En este sentido, la expresión de posturas de presentación difirió entre los grupos etarios ($H_{(2)} = 6,91$, $p = 0,03$, Figura 9A) y se detectó una tendencia a diferir en el despliegue de *hops & darts* ($H_{(2)} = 5,37$, $p = 0,07$, Figura 9B). El análisis entre grupos relevó que las hembras adultas tendieron a expresar más posturas de presentación ante la hembra estímulo que las ratas adolescentes (vs. Adol m: $Z_{(10,11)} = 2,25$, $p = 0,07$ y vs. Adol tardía: $Z_{(9,11)} = 2,25$, $p = 0,07$).

Al analizar en detalle la expresión de conductas proceptivas hacia una hembra no sexualmente activa, observamos que la mayoría de los comportamientos proceptivos fueron precedidos por exploración olfativa por parte de la hembra estímulo (en menos de dos segundos entre exploración olfativa y respuesta proceptiva): porcentaje del total de proceptivas en Adol. m 77,7%, Adol. t 61,5% y Adult. 62,3%. De forma interesante, a pesar de que los comportamientos proceptivos expresados por las hembras difirieron entre edades, la exploración olfatoria realizada por la hembra estímulo (Adol. m.: 36,0 (32-57,8), Adol. t: 41,0 (33-42,5) y Adult.: 34,0 (29-44)) no difirió entre las edades ($H_{(2)} = 3,18$, $p = 0,2$).

Todos los grupos expresaron un número mayor de *hops & darts* en presencia del macho que en presencia de la hembra (Adol. m $U_{(11,10)} = 10$, $p < 0,01$, Adol. t $U_{(10,9)} = 0$, $p < 0,01$ y Adult $U_{(12,11)} = 16,50$, $p < 0,01$, Figura 9B). Por otra parte, las hembras adolescentes, pero no las adultas, realizaron más posturas de presentación frente al macho que frente a la hembra (Adol. m: $U_{(11,10)} = 29$, $p = 0,03$, Adol. t: $U_{(10,9)} = 15,50$, $p < 0,01$, Adult $U_{(11,12)} = 65$, $p = 0,96$, Figura 9A).

6.1.2. Conductas de exploración social y juego

Frente a un macho sexualmente activo

Las ratas hembras en adolescencia media realizaron un mayor número de comportamientos de investigación social (suma del número de olfateos anogenitales y corporales) que las adultas ($Z_{(11,12)}=3,58, p<0,01$, Figura 10A). A su vez, las hembras en adolescencia media expresaron juego con menor latencia ($Z_{(11,12)}=3,84, p<0,01$, tabla 1) y un en mayor número ($Z_{(11,12)}=3,74, p<0,01$, Figura 10B) en comparación con las hembras adultas.

La expresión de comportamientos de juego de las ratas en adolescencia tardía no difirió de la adolescencia media ($Z_{(11,10)} = 1,73, p= 0,25$) ni de las adultas ($Z_{(10,12)} = 1,89, p=0,18$). Sin embargo, el número de individuos que llevaron a cabo comportamientos de juego fue mayor en el grupo adolescencia tardía que en el grupo adulto (Adol. t: 4/10 vs. Adult.: 0/12, $p=0,03$, Prueba exacta de probabilidad de Fisher), y menor que en la adolescencia media (Adol. t: 4/10 vs. Adol. m:10/12, $p=0,05$, Prueba exacta de probabilidad de Fisher), sugiriendo un perfil de expresión intermedio en las hembras en adolescencia tardía con respecto al resto de las edades.

Frente a una hembra adulta sexualmente activa

Durante la interacción social, ambos grupos de ratas adolescentes realizaron mayor investigación social (Adol m: $Z_{(10,11)}=4,37, p<0,01$ y Adol t $Z_{(9,11)}=2,52, p=0,04$, Figura 10A) y juego (Adol m $Z_{(10,11)}=4,62, p<0,01$ y Adol t $Z_{(9,11)}=2,92, p=0,01$, Figura 10B) que las hembras adultas. Sin embargo, la latencia a la aparición de ambos comportamientos no difirió entre las edades (latencia a investigación social: $H_{(2)}=3,51, p=0,17$ y latencia al juego: $H_{(2)}= 4,84 p=0,09$).

Al comparar la investigación social y el juego de las hembras ante un estímulo sexual (macho) y un estímulo social (hembra), observamos que las ratas de los tres grupos etarios realizaron un mayor número de comportamientos de investigación social de la hembra estímulo que del macho (Adol. m: $U_{(10,12)} = 0$, $p < 0,01$, Adol. t $U_{(9,10)} = 0$, $p < 0,01$ y Adult $U_{(11,12)} = 2,5$, $p < 0,01$, Figura 10A). De igual forma, todas las hembras expresaron un mayor número de comportamientos de juego durante la interacción social en comparación con la interacción sexual (Adol m: $U_{(10,12)} = 0$, $p < 0,01$, Adol t $U_{(9,10)} = 3,5$, $p < 0,01$ y Adult $U_{(11,12)} = 24$, $p < 0,01$, Figura 10B).

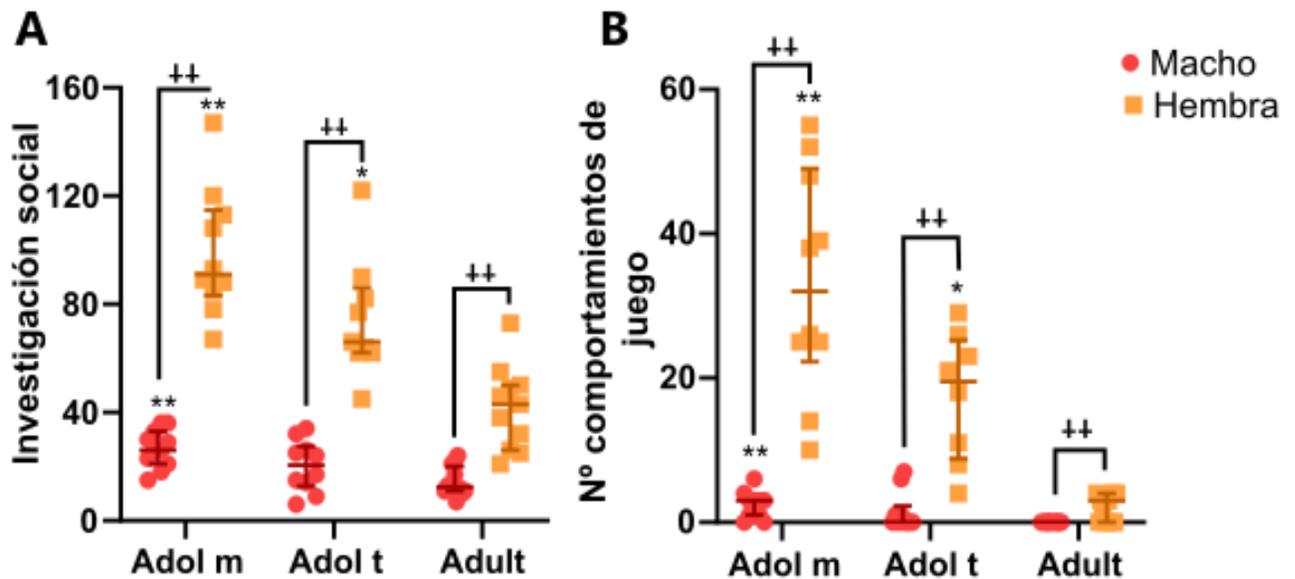


Figura 10. Número de comportamientos de investigación social y juego. Número de comportamientos de investigación social (panel A) y de juego (panel B), expresado por ratas hembras en adolescencia media (Adol m), adolescencia tardía (Adol t) y adultas (Adult) durante la interacción con un macho sexualmente activo (Macho: círculos rojos) o una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra: cuadrados naranjas). Datos expresados como medianas (RIC) y cada punto representa un individuo, $n=9-11$ por grupo. **: $p < 0,01$ y *: $p < 0,05$ vs. Adult, Prueba pos hoc de Dunn para comparaciones por pares entre edades, y ++ sobre barra: $p < 0,01$ entre estímulos, prueba U de Mann Whitney.

6.1.3. Resumen de principales resultados y conclusiones

- Durante la interacción con un macho sexualmente activo, el comportamiento sexual de las ratas adolescentes no difirió del de las adultas. Sin embargo, las hembras en adolescencia media expresaron una mayor cantidad de comportamientos de investigación social y de juego, indicando un patrón único de interacción con el macho de este grupo etario.
- De acuerdo a lo esperado, durante una interacción social, ambos grupos de hembras adolescentes exhibieron una mayor cantidad de comportamientos de investigación social y de juego que las hembras adultas.
- La cantidad de comportamientos de investigación social y de juego de las hembras en adolescencia media fue menor durante la interacción con un macho que durante la interacción con una hembra. De forma opuesta, la cantidad de *hops & darts* y posturas de presentación exhibida por ambos grupos de hembras adolescentes fue mayor frente al macho que frente a la hembra. En conjunto, estos resultados indican que durante la adolescencia la expresión del comportamiento sexual predomina sobre la expresión del comportamiento social durante la cópula, y que las conductas proceptivas desplegadas poseen un carácter sexual.

6.2. Experimento II: Expresión de c-Fos en áreas neurales implicadas en la motivación sexual de hembras adolescentes y adultas

6.2.1-Expresión de c-Fos en áreas límbico-hipotalámicas vinculadas al comportamiento sexual

Núcleo ventromedial del hipotálamo (NVMvl)

La figura 11 ilustra el patrón de expresión de c-Fos en esta región en cortes de hembras representativas de ambos grupos etarios y de las tres condiciones experimentales. Como se desprende de ésta, en las hembras adolescentes, la interacción con el macho se asoció a una mayor expresión de c-fos en NVMvl en contraposición a la condición control ($Z_{(7,6)}=2,41$, $p=0,05$, Figura 12A), pero no en relación a la hembra ($Z_{(7,6)}=0,49$, $p>0,99$). Por otra parte, en las hembras adultas la interacción con un macho incrementó el número de células c-Fos positivas (células c-Fos+) en NVMvl en relación a las restantes dos condiciones (vs. hembra: $Z_{(6,6)}=2,47$, $p=0,04$ y vs. control: $Z_{(6,9)}=2,42$, $p=0,05$ Figura 12A).

La expresión de c-Fos no difirió entre edades en ninguna de las tres condiciones (macho: $U_{(7,6)}=20$, $p=0,95$, hembra $U_{(6,6)}=8$, $p=0,13$ y control $U_{(6,9)}=25,5$, $p=0,88$).

Amígdala medial (Ami Me)

La figura 12B muestra que la interacción con el macho aumentó la expresión de células c-Fos en la Ami Me de las hembras adolescentes con respecto a la ausencia de estímulo, control ($Z_{(7,6)}=3,04$, $p<0,01$). Mientras que en hembras adultas, la exposición a un macho incrementó significativamente la expresión de c-Fos tanto en relación a la condición hembra ($Z_{(6,6)}=2,6$, $p=0,02$) como a la condición control ($Z_{(6,9)}=3,18$, $p<0,01$).

La expresión c-Fos no difirió entre edades en ninguna de las 3 condiciones (macho: $U_{(6,7)}=9$, $p=0,10$, hembra $U_{(6,6)}=8$, $p=0,13$ y control $U_{(6,6)}=17$, $p=0,27$).

Área preóptica media ventral (APOm)

Como se muestra en la figura 12 C, durante la adolescencia media se detectó un mayor número de células que expresan c-Fos+ en el APOm luego de la interacción con un macho en comparación con una hembra (vs. hembra: $Z_{(6,5)}=2,57$, $p=0,03$, mientras que vs. control no se alcanzó la significancia: $Z_{(6,5)}=1,87$, $p=0,18$). Por otra parte, no detectamos diferencias en el número de células c-Fos+ en el APOm de hembras adultas entre las condiciones ($H_{(2)}=0,15$, $p=0,94$).

Al comparar la expresión de c-Fos entre edades, la interacción con el macho elevó el número de células c-Fos+ en las adolescentes en comparación con las adultas ($U_{(6,8)}=8$, $p=0,04$). No se detectaron diferencias entre las edades en las restantes condiciones (hembra: $U_{(6,5)}=9,5$, $p=0,36$ y control: $U_{(6,5)}=11$, $p=0,54$).

6.2.2-Expresión de c-Fos en áreas del sistema dopaminérgico mesolímbico y de la amígdala basolateral

Núcleo accumbens (Nacc) *core* y *shell*

Durante la adolescencia no se detectaron diferencias en la expresión de c-Fos en el Nacc *core* entre las condiciones ($H_{(2)}=2,32$, $p=0,33$, Fig 13A). Sin embargo, las adolescentes expresaron un mayor número de células c-Fos+ en el Nacc *shell* luego de la exposición a un macho en comparación con una hembra (macho vs. hembra $Z_{(7,7)}=2,49$, $p=0,04$, no alcanzándose la significancia en machos vs. control $Z_{(7,7)}=1,99$, $p=0,14$, Figura 13B).

No encontramos diferencias significativas entre las condiciones experimentales (macho, hembra y control) durante la etapa adulta en ambas regiones del NAcc (*core*: $H_{(2)}=1,63$, $p=0,46$ y *shell*: $H_{(2)}=2,55$, $p=0,29$, Figura 13AyB). Del mismo modo en la comparación entre edades no emergieron diferencias en ninguna de las condiciones estudiadas.

Corteza Prefrontal Medial cingulada (CPFm cing)

Tanto en los grupos de adolescentes como en los de adultas, la región cingulada de la CPFm no presentó cambios significativos en la expresión de c-Fos entre las tres condiciones (Adol media: control- 10,5 (6,3-14,0), hembra- 9,5 (8,6-17,1), macho- 16,5 (16-26,3); $H_{(2)}=3,03$, $p=0,22$ y Adult: control- 12,0 (11,5-16), hembra- 18,5 (13,5-20,5), macho- 19,0 (16,6-21,4); $H_{(2)}=1,79$, $p=0,43$). Tampoco se encontraron diferencias entre las edades ante una misma condición (macho: $U_{(6,7)}=11,9$ $p=0,84$, hembra: $U_{(6,6)}=11,5$, $p=0,33$ y control: $U_{(7,6)}=17,5$ $p=0,65$).

CPF prelímbica (CPF prelimb)

Como se aprecia en la figura 13C, durante la adolescencia la interacción con el macho generó un incremento del número de células c-Fos+ con respecto al encuentro con la hembra (hembra: $Z_{(7,6)}=2,91$, $p=0,01$, sin alcanzar la significancia respecto al control: $Z_{(7,6)}=2,08$, $p=0,11$). No observamos diferencias en la expresión de c-Fos entre las situaciones estudiadas en las hembras adultas ($H_{(2)}=1,66$, $p=0,46$).

La expresión de c-Fos luego de la interacción con un macho fue mayor en hembras adolescentes que en las adultas ($U_{(7,6)}=5$, $p=0,02$).

CPF Infralímbica (CPF infralimb)

Las tres condiciones (macho, hembra y control) tendieron a diferir en las hembras adolescentes ($H_{(2)}=4,83$, $p=0,09$, Fig. 13D). En la etapa adulta tampoco se detectaron diferencias entre las situaciones experimentales ($H_{(2)}=0,64$, $p=0,75$). La comparación entre las edades no reveló diferencias entre ellas (macho: $U_{(6,7)}=9$, $p=0,10$, hembra: $U_{(6,6)}=14$, $p=0,58$ y control: $U_{(6,6)}=16$, $p=0,79$, Figura 13D).

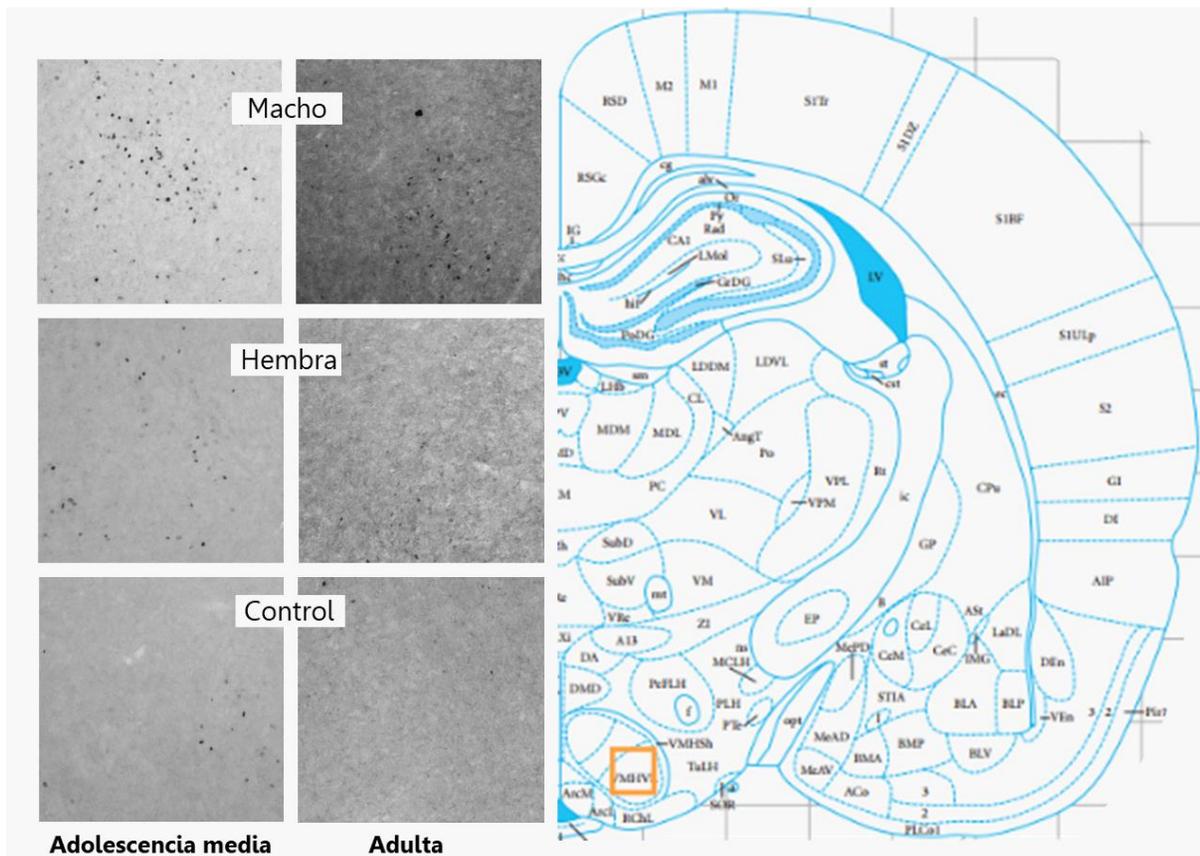


Figura 11. Expresión de c-Fos en NVMvl. Microfotografías representativas de la expresión de c-Fos en NVM vl de ratas hembras en adolescencia media y adultas, luego de la interacción con un macho sexualmente activo (Macho), una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra) o en ausencia de estímulo (Control). En el panel izquierdo se muestra una composición con ROI de hembras representativas de cada grupo y en el panel derecho se muestra la altura antero-posterior en relación a Bregma y el tamaño y ubicación de la ROI en el cuál se cuantificó la expresión de c-Fos.

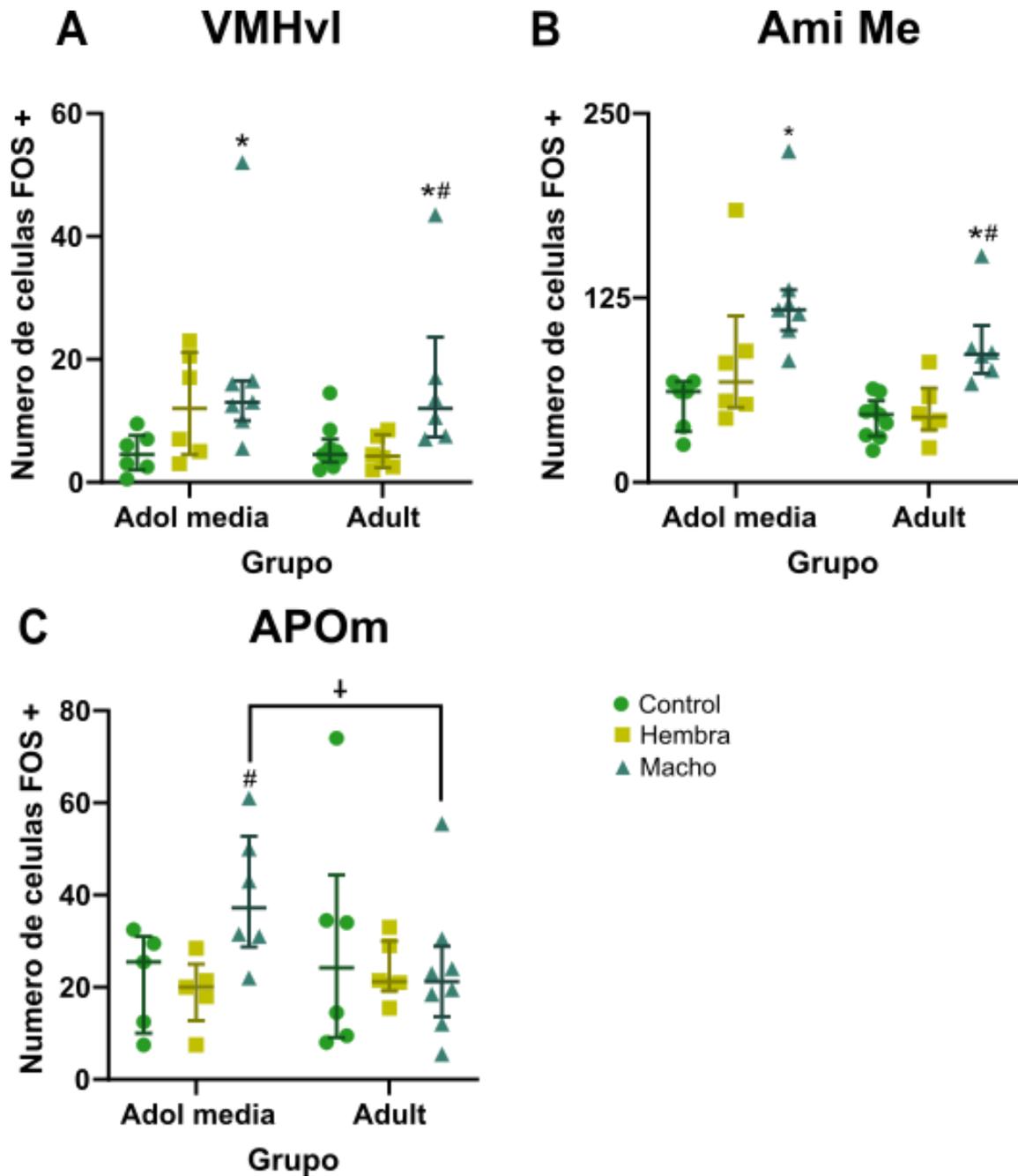


Figura 12. c-Fos en NVMvl, Ami Me y APOm . Número de células c-Fos+ en el NVM vl (panel A), en el APOm (panel B) y Ami Me (panel C) en ratas hembras en adolescencia media (Adol media) y adultas (Adult), luego de la interacción con un macho sexualmente activo (Macho: triángulos azules), una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra: cuadrados lima) o en ausencia de estímulo (Control: círculos verdes). Los datos se expresan como medianas (RIC) y los puntos representan los valores individuales, *: $p < 0,05$ vs control y #: $p < 0,05$ vs hembra, prueba pos hoc de Dunn para comparaciones entre pares, y † sobre barra $p < 0,05$ entre edades, prueba U de Mann Whitney.

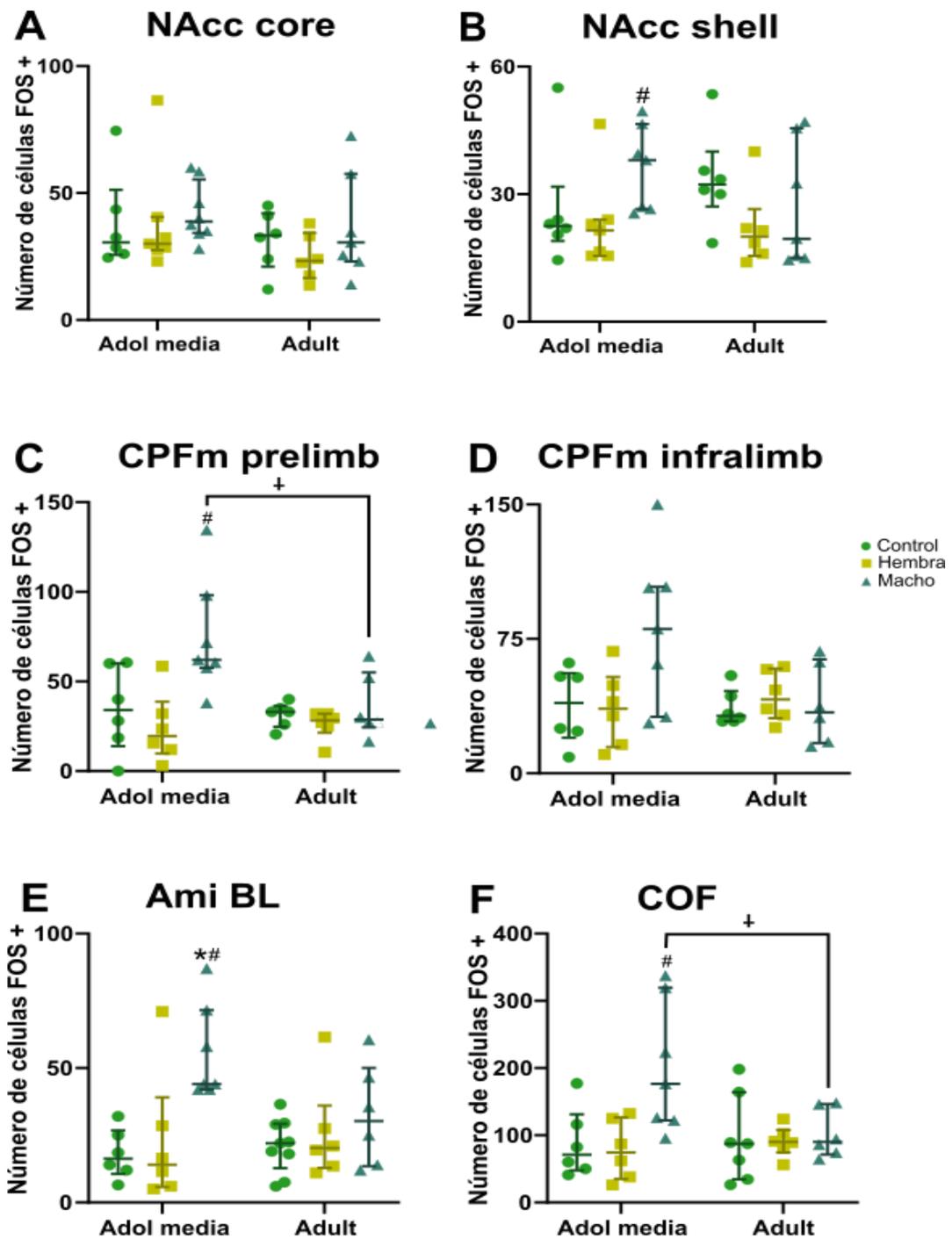


Figura 13. c-Fos en NAcc, CPFm, Ami BL y COF. Número de células c-Fos+ en NAcc *core* (panel A) Nacc *shell* (panel B), CPFm prelimb (panel C), CPFm infralimb (panel D), Ami BL (panel E) y COF (panel F) de ratas hembras en adolescencia media (Adol media) y adultas (Adult), luego de la interacción con un macho sexualmente activo (Macho: triángulos azules), una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra: cuadrados limón) o en ausencia de estímulo (Control: círculos verdes). Los datos se expresan como medianas (RIC) y los puntos representan valores individuales, *: $p < 0,05$ vs control y #: $p < 0,05$ vs hembra, prueba pos hoc de Dunn para comparaciones entre pares y + sobre barra: $p < 0,05$ entre edades, prueba U de Mann Whitney.

Corteza orbitofrontal (COF)

La exposición al macho en adolescencia media indujo un aumento de la expresión de c-Fos en la COF con respecto a la interacción con una hembra (hembra: $Z_{(7,6)}=2,37$, $p=0,05$ y una tendencia en relación al control $Z_{(7,6)}=2,26$, $p=0,07$, Figura 13F). No se detectaron diferencias durante la edad adulta para las condiciones estudiadas ($H_{(2)}=0,33$, $p=0,86$, Figura 13F).

Asimismo, el macho generó una mayor expresión de c-Fos en esta región durante la adolescencia que durante la etapa adulta ($U_{(7,6)}=6$, $p=0,04$, Figura 13F). La figura 14, ilustran las diferencias reportadas entre los grupos a partir de microfotografías de las regiones de interés de hembras representativas de cada condición.

Amígdala basolateral (Ami BL)

En las hembras adolescentes, la presencia del macho aumentó significativamente la cantidad de células c-Fos+ en esta región de la amígdala en comparación con las condiciones hembra ($Z_{(7,6)}=2,70$, $p=0,02$) y control ($Z_{(7,6)}=2,65$, $p=0,02$, Figura 13E). No detectamos diferencias en la edad adulta entre las condiciones ($H_{(2)}: 1,04$, $p= 0,61$, Figura 13E).

No encontramos diferencias significativas entre las edades (macho: $U_{(6,7)}=9$ $p=0,09$, hembra: $U_{(6,6)}= 14$ $p= 0,59$ y control: $U_{(6,9)}=22$ $p= 0,61$).

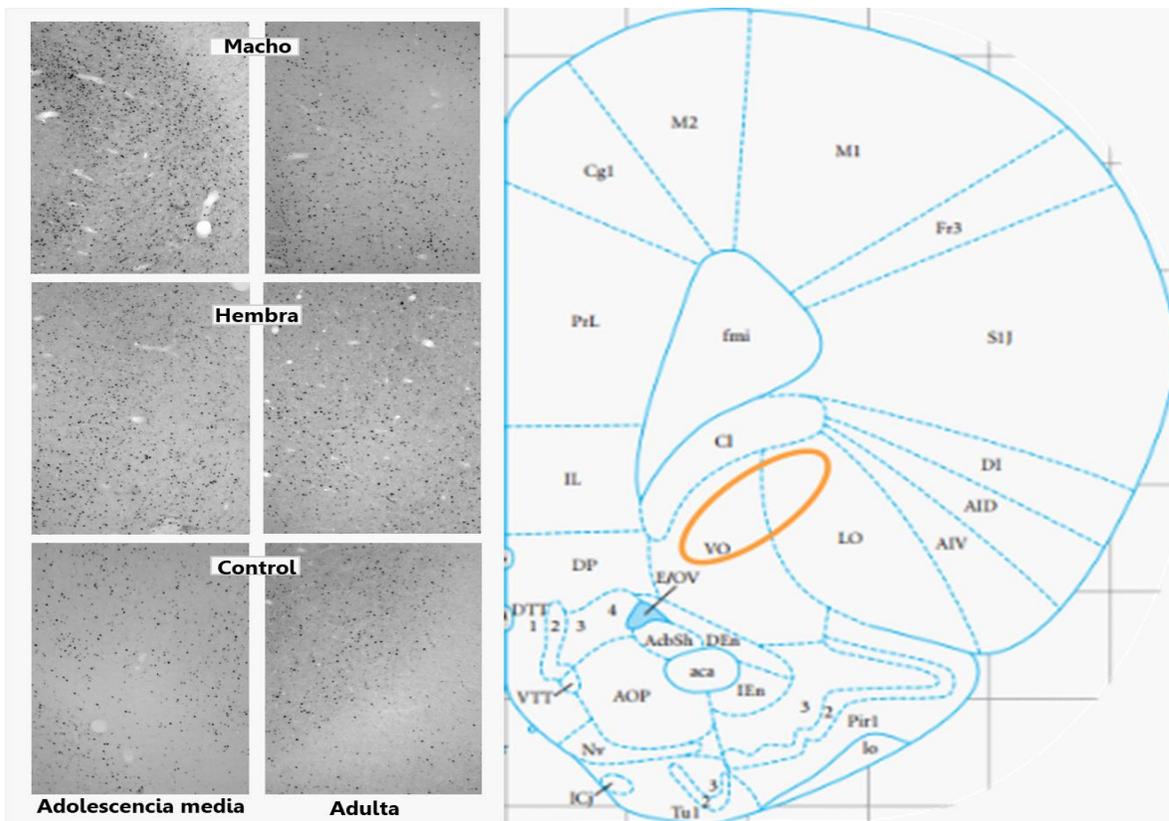


Figura 14. Representación de la expresión de c-Fos en COF. Microfotografías representativas de la expresión de c-Fos en COF de ratas hembras en adolescencia media y adultas, luego de la interacción con un macho sexualmente activo (Macho), una hembra adulta no sexualmente activa (Hembra) o en ausencia de estímulo (Control). En el panel de la izquierda se muestra una composición con ROI de hembras representativas de cada grupo y en el panel derecho se muestra la altura antero-posterior en relación a Bregma y el tamaño y ubicación de la ROI en el cuál se cuantificó la expresión de c-Fos.

6.2.3-Emisión de USV

Luego de una interacción con una hembra adulta no sexualmente activa las ratas adolescentes emitieron un mayor número de USV de 50kHz en comparación con la condición control (hembra vs control: $Z_{(9,7)}=2,64$, $p=0,03$) y tendieron a emitir más luego de la exposición al macho (macho vs control: $Z_{(8,7)}=2,29$, $p=0,07$), no observándose diferencias en la emisión de USV entre ambos estímulos (macho vs hembra: $Z_{(8,9)}=0,29$, $p>0,99$, figura 15).

6.2.4. Resumen de principales resultados y conclusiones

Las ratas hembras en adolescencia media y adultas presentaron un perfil diferente de expresión de la proteína c-Fos y de emisión de USV en respuesta a una interacción breve con un macho:

- En términos generales, mientras que la exposición a un macho incrementó la expresión de c-Fos en el NVMvl y en la Ami Me en ambas edades, el APOm presentó un aumento de c-Fos únicamente en hembras adolescentes.
- A nivel del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y de la Ami BL, la interacción sin contacto físico con un macho incrementó la expresión de c-Fos en el NAcc *Shell*, la Ami BLA, la CPFm prelimb y la COF únicamente en hembras adolescentes.
- El número de células c-Fos+ difirió entre hembras adultas y adolescentes en el APOm, la CPFm y la COF, siendo mayor en las ratas adolescentes.
- Esta activación neuronal diferente en áreas límbico-hipotalámicas y del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico frente a un macho entre hembras adolescentes y adultas, con una intensa activación neuronal en áreas corticales que se encuentran inmaduras durante la adolescencia, indica un procesamiento neural diferente de este estímulo sexual entre ambas edades.

7. DISCUSIÓN

7.1. Perfil comportamental único de hembras en adolescencia media durante la interacción sexual

Contrario a lo esperado, la receptividad sexual fue máxima y el despliegue de conductas proceptivas no difirió en la adolescencia media respecto a la adolescencia tardía y la adultez, indicando que el repertorio sexual exhibido durante la interacción con un macho ya está establecido en edades tempranas. Esta observación concuerda con estudios previos que reportan que hembras ciclantes presentan el primer estro comportamental en respuesta a la estimulación manual al inicio de la adolescencia media (Hansen, 1977; Södersten, 1975). A su vez, en este período se comienza a observar expresión de conductas proceptivas y receptivas en hembras criadas junto a machos (Meaney & Stewart, 1981).

Sin embargo, la menor intensidad de lordosis observada en las ratas en adolescencia media indicaría una falta de maduración del comportamiento sexual y podría deberse a una menor sensibilidad a la presión de los flancos y de la región perineal ejercida por el macho durante la monta (D. Pfaff et al., 1977). En este sentido, los esteroides ováricos, en particular los E, modulan la intensidad de la respuesta de las hembras a la estimulación del macho (Domínguez-Ordóñez et al., 2016; Olster & Blaustein, 1988; D. Pfaff et al., 1977), por lo que podría existir una menor sensibilidad a la acción de los esteroides ováricos en el circuito neural responsable de la lordosis en la adolescencia media (Kow & Pfaff, 1998). Acorde con una posible diferencia en sensibilidad a la estimulación entre las edades, observamos que un número mayor de hembras adultas ejecutó posturas de presentación y *hops & darts* en comparación a las hembras en adolescencia media durante la interacción con el estímulo social. Estas

conductas proceptivas se expresan mayoritariamente en respuesta a una estimulación física (Blaustein, 2008), por lo que es probable que hayan emergido en respuesta a la investigación social y al contacto físico con la hembra estímulo. Debido a que las hembras estímulo no cambiaron su patrón de exploración social entre las edades, esta mayor expresión de posturas de presentación en las hembras adultas podría deberse también a una mayor sensibilidad a la estimulación física, que aún estaría en proceso de maduración durante la adolescencia media.

La conducta sexual de las hembras en adolescencia media, a diferencia de las adultas, se acompañó de juego y una mayor investigación social, comportamientos típicos de la etapa juvenil (Meaney & Stewart, 1981; Panksepp, 1981; Thor & Holloway, 1984; Vanderschuren et al., 1997). Dado que el juego entre pares puede ser considerado una práctica para el despliegue correcto de las conductas durante la vida adulta y que durante el juego las ratas adolescentes exhiben desplazamientos similares a los *hops & darts* (Thor & Holloway, 1984), su expresión en el encuentro sexual podría integrar parte del repertorio de juego de estas hembras. Sin embargo, la ausencia o baja expresión de estas conductas en la interacción con una hembra, estímulo social, contradice esta hipótesis. Por lo tanto, concluimos que durante la adolescencia media las hembras presentan un perfil conductual único durante la interacción sexual caracterizado por la expresión del repertorio sexual completo, y de alta investigación social y juego.

Es importante destacar que, tanto en la adolescencia media, como en los otros grupos etarios, la investigación social y el juego ocurrieron en menor frecuencia durante la interacción sexual en comparación con la interacción social, indicando que, en presencia del macho, estímulo con fuerte valor sexual, el comportamiento sexual es dominante sobre otras motivaciones sociales, incluso durante la adolescencia media. Esta idea está de acuerdo con teorías etológicas que proponen que cuando varias

motivaciones co-existen, sus expresiones se modifican (Anselme, 2007) pudiendo predominar una motivación dominante sobre las otras (McFarland & Sibly, 1975). Acorde a esta línea de pensamiento, la expresión de juego y alta investigación social durante la adolescencia media no interfirió con la expresión del comportamiento sexual de las adolescentes, ya que las conductas proceptivas frente a un macho no difirieron entre los grupos.

Por otra parte, la mayor expresión de *hops & darts* en la interacción sexual en relación con la social en los tres grupos etarios refleja la especificidad sexual de éstas. Sin embargo, la expresión de posturas de presentación no difirió entre las interacciones sexual y social en ratas adultas. Dado que, en la interacción con la hembra adulta no sexualmente activa, observamos que las posturas de presentación se presentaron en respuesta a la exploración de la hembra estímulo, es posible que estas conductas sean conductas más reflejas, que emergen en respuesta a una aferencia sensorial en un sistema sensibilizado por las variaciones endocrinas propias del proestro tardío, mientras que los *hops & darts* tengan un origen motivacional con menor peso reflejo. En este sentido Madalfousek y Hlinák describieron la aparición de las posturas de presentación en la interacción sexual como “la primer fase de la reacción copulatoria” (Madalfousek;Hlinák, 1976).

El comportamiento sexual del macho cambió de acuerdo a la edad de la hembra, presentando una mayor latencia a la monta, y un número menor de montas aquellos machos que copularon con hembras en adolescencia media. Este cambio en la conducta del macho podría indicar una menor atractividad sexual de las hembras, posiblemente debido a el olor de su orina (Brown, 1977; Lydell & Doty, 1972), de la vagina (Merkx et al., 1988), o a su tamaño corporal. La combinación de estos factores junto a una posible

menor emisión de USV de 50 kHz podrían influir negativamente en la atractividad de éstas.

7.2. Alta expresión de las motivaciones sexual y social durante la adolescencia tardía

Las hembras en adolescencia tardía presentaron un patrón conductual intermedio entre los restantes grupos etarios durante las interacciones sexual y social. Así, estas hembras exhibieron una intensidad de lordosis similar a las adultas y mayor a las ratas en adolescencia media en la interacción sexual, al igual que alta motivación sexual en pruebas específicas (Armas et al., 2021). Sin embargo, la investigación social y el juego no variaron con respecto a la adolescencia media en ambos tipos de interacciones, y fueron mayores a los exhibidos por las adultas durante la interacción social. A su vez, en la prueba de emisión de USV observamos que las hembras en adolescencia tardía, al igual que en adolescencia media, emiten un número mayor de vocalizaciones luego de interactuar con una hembra con respecto a las adultas, sugiriendo una mayor motivación social (Armas et al., 2021). En conjunto esta evidencia indica que las hembras en adolescencia tardía presentan un perfil conductual particular de desarrollo, caracterizado tanto por alta motivación sexual y social.

Los niveles de juego y de investigación social mayores en las adolescentes en relación a las adultas concuerdan con reportes que indican que el juego es recompensante (Foulkes & Blakemore, 2016; Spear, 2000) y es máximo durante esta etapa, disminuyendo gradualmente hasta alcanzar niveles bajos en la adultez (Panksepp, 1981). Adicionalmente, Douglas y colaboradores (2004) mostraron que en la adolescencia, pero no en la etapa adulta, los machos desarrollan preferencia condicionada de lugar a ambientes asociados con interacción social (Douglas et al., 2004). A su vez, ratas adolescentes que permanecieron aisladas prefieren un

compartimiento asociado a interacción social a uno asociado a anfetaminas, mientras que los adultos no muestran preferencia (Yates et al., 2013). Estos antecedentes en conjunto con nuestros resultados muestran el fuerte valor de incentivo que posee un estímulo social para ratas adolescentes, incluso cuando éstas se encuentran sexualmente activas.

7.3. Aumento de c-Fos en NVMvl y AmiMe anterior, áreas claves del circuito sexual, en hembras adolescentes y adultas frente a un macho

El incremento en la expresión de c-Fos en el NVMvl y la Ami Me anterior en las hembras sexualmente activas, independientemente de su edad, luego de una breve interacción sin acceso físico con un macho podría reflejar la activación de estas áreas claves para el control del comportamiento sexual de la hembra (Micevych & Meisel, 2017; J. Pfaus et al., 2015; J. G. Pfaus et al., 2010). En este sentido, ambas áreas están fuertemente interconectadas entre sí (N. Canteras et al., 1995; N. S. Canteras et al., 1994), y mientras que la **Ami Me** es responsable de integrar información ambiental y sensorial con el estado interno (Jennings & de Lecea, 2020; R. B. Simerly et al., 1990) y responde a feromonas sexuales (Demir et al., 2020), el **NVMvl** ha sido implicado en el control de la conducta socio-sexual y es considerado el corazón del comportamiento sexual femenino (Micevych & Meisel, 2017; J. Pfaus et al., 2015; J. G. Pfaus et al., 2010).

Tanto la actividad de la Ami Me como del NVMvl en respuesta a estímulos del macho varía a lo largo del ciclo estral. A través de registro de la actividad neuronal, se ha observado que neuronas del NVMvl de ratonas se activan en presencia de un conoespecífico, tanto hembra como macho, sin embargo, la actividad neuronal frente al macho es mayor durante el estro conductual que fuera de este período (Correa et al., 2015; Nomoto & Lima, 2015). Por otra parte, las neuronas de la Ami Me responden preferencialmente a la orina del macho (Bergan et al., 2014a), y aquellas que se activan

(expresan c-Fos) frente a los olores del macho expresan el receptor de estrógeno ER α (Kondo & Sakuma, 2005). La activación de este receptor es crítica para la expresión de la preferencia por el olor de macho de hembras sexualmente activas (Fujiwara et al., 2016).

La mayor expresión de c-Fos en la Ami Me y el NVMvl concuerda con estudios previos que reportan un incremento en de esta proteína luego de la interacción sexual con un macho (por revisión ver (James G. Pfaus & Heeb, 1997), si bien en estos trabajos esta expresión se ha asociado en parte a la estimulación física recibida. Por otra parte, en concordancia con nuestro resultados y con el rol de la Ami Me en el procesamiento de estímulos sexual (Rudzinkas et al., 2019), Hosokawa y Chiba (2007) reportaron que la exposición a viruta de cajas de machos, incrementa la expresión de c-Fos en la Ami Me de hembras adultas sexualmente activas sin experiencia previa (Hosokawa& Chiba, 2007).

De forma interesante, la expresión de c-Fos luego de la exposición a un macho parece ser más específica al estímulo sexual en relación al social en hembras adultas que en adolescentes, ya que únicamente durante la adultez, esta expresión fue significativamente mayor a la asociada a la exposición a una hembra. Este resultado concuerda con reportes previos en los cuales, a través de registro electrofisiológico de neuronas del NVMvl, evidenciaron un aumento del número de neuronas que responden a un macho pero no a una hembra en ratonas sexualmente activas (Bergan et al., 2014b; Nomoto & Lima, 2015).

Esta especificidad hacia el estímulo sexual en área relevantes para la expresión de este comportamiento podría asociarse al mayor valor de incentivo sexual que posee el macho para hembras adultas en relación a las adolescentes (Armas et al., 2021). Apoyando esta idea, en el presente experimento observamos que la emisión de USV de 50 kHz frente al macho tendió a ser mayor en las hembras adultas en comparación con las adolescentes.

7.4. Incremento de c-Fos en el APOm de hembras adolescentes frente a un macho

En contraparte a lo observado en el NVMvl y la Ami Me anterior, la interacción con el macho indujo un incremento de c-Fos en el **APOm** con respecto a lo observado luego la interacción con una hembra durante la adolescencia, pero no durante la adultez. Este resultado sugiere que existe un procesamiento diferencial del estímulo macho de acuerdo a la edad, que podría asociarse al procesamiento sensorial del macho, probablemente olfativo, o podría responder a aferencias regulatorias desde centros superiores (como se discutirá en la próxima sección).

Debido a que el APOm se ha postulado como un nodo de salida del circuito sexual límbico-hipotalámico (incluyendo a la Ami Me y al NVMvl) hacia el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, la expresión de c-Fos en las adolescentes expuestas a un macho podría reflejar este procesamiento. En este sentido, McHenry et al., 2017a mostraron que en el APOm de ratonas vírgenes en proestro una proporción mayor de neuronas se activa frente al olor de macho que de hembra. Estos autores reportaron, a su vez, que esta mayor respuesta neuronal es dependiente de E y P. A partir de estos experimentos, se propone que las hormonas esteroideas ajustan las propiedades de codificación del olor a macho en APOm, aumentando la sensibilidad intrínseca de esta área al mismo durante la fase de actividad sexual (McHenry et al., 2017a).

La mayor expresión de c-Fos en el APOm de las hembras adolescentes frente al macho podría ser consecuencia del procesamiento del olor del macho, y también podría indicar el valor motivacional sexual de éste, ya que esta área actúa como nodo de conexión con el sistema mesocorticolímbico promoviendo conductas de acercamiento (McHenry et al., 2017a Micevych & Meisel, 2017; James G. Pfaus et al., 2015). Esta última idea es congruente con la mayor expresión de c-Fos observada en la región shell del NAcc en respuesta a un macho en las hembras adolescentes (discutido en la próxima

sección). Sin embargo, siguiendo esta línea de pensamiento, esperábamos observar una mayor expresión de c-Fos en las hembras adultas respecto a las adolescentes. En este sentido, la relevancia del APOm para las respuestas motivacionales de hembras adultas se sustenta en estudios que muestran que su lesión reduce la preferencia sexual por un macho en ratas (Whitney, 1986) y la activación optogenética de sus neuronas aumenta su preferencia en ratonas (McHenry et al., 2017a). Estos estudios que destacan la relevancia del APOm en hembras adultas, junto con resultados propios que muestran que las ratas adultas exhiben mayor motivación sexual que las adolescentes (Armas et al., 2021), sugieren que la mayor expresión de c-Fos en adolescentes en relación a adultas no refleja un mayor valor motivacional del estímulo macho. Probablemente este resultado se asocie a que el APOm de las adolescentes procesa de forma diferente los estímulos provenientes del macho como consecuencia de que está aún en desarrollo. En este sentido, Armas (2021) mostró que la expresión del receptor de estrógeno ER α en el APOm de hembras sexualmente activas cambia a lo largo de la adolescencia, y Quadros y Wagner (2008) reportaron un aumento del efecto inductor de receptores de P del E en esta área desde la adolescencia media a la adultez.

Por otra parte, es posible que la mayor expresión de c-Fos en el APOm, e incluso del NAcc, de las adolescentes luego de la interacción con un macho responda al rol que juega esta área en la regulación de las interacciones sociales. Hu y colaboradores (2021) identificaron en la AmiMe neuronas responsables de promover el reforzamientos positivo producto de la interacción social, que proyectan a APOm y promueven, de esta forma, la liberación de DA en el Nacc (Hu et al., 2021). De forma interesante, durante la realización de los experimentos observamos que las hembras adolescentes interactuaban más, a través de la rejilla, con el macho que con la hembra (observación no cuantificada aún). Debido a que las adolescentes parecen mostrar un mayor interés social, y que durante el juego se observó una mayor cantidad de neuronas c-Fos+ en el APOm y el Nacc en adolescentes que en adultas (Perkins et al., 2017; Varlinskaya et al.,

2013), es posible considerar que la expresión c-Fos en estas regiones sea producto de la mayor interacción social. Sería interesante analizar el comportamiento de las hembras experimentales y los conspecíficos durante la interacción con el fin de determinar si esta interacción difirió entre los grupos etarios.

Más allá de la dificultad en interpretar la activación neuronal diferencial en APOm de acuerdo a la edad, el hecho de que esta área sea considerada un nodo de los circuitos de regulación del juego, las interacciones sociales y el comportamiento sexual, y que la misma esté aun madurando durante este período, garantiza profundizar en su estudio.

7.5. Aumento de c-Fos en áreas del sistema mesocorticolímbico y la Ami BL únicamente en hembras adolescentes expuestas a un macho

Inesperadamente, pero en concordancia con el mayor número de células c-Fos+ en el APOm, la exposición al macho se asoció a un aumento en la expresión de c-Fos en áreas del sistema mesocorticolímbico como el NAcc *Shell*, la CPFm prelímbica y la OF, así como en Ami BL únicamente en las adolescentes. Estas estructuras se interconectan entre sí, participando en el procesamiento de estímulos con valor de recompensa (Kent C Berridge et al., 2016), y han sido implicadas en el control de la conducta sexual (Micevych & Meisel, 2017; James G. Pfaus et al., 2015).

Las aferencias desde la CPFm al NAcc *Shell* han sido implicadas en las conductas de búsqueda de recompensa (Kent C Berridge et al., 2016; Kelley & Berridge, 2002), y se reportó que bloquear la transmisión glutamatérgica desde la CPFm al NAcc reduce la exploración de sustrato con olor a macho, mientras que no tiene efectos en las conductas receptivas (Chiang & Park, 2020). En línea con esto, la transmisión

glutamatérgica hacia NAcc, se da en respuesta a la monta en la región *Core*, mientras que la región *Shell* la antecede, evidenciando su carácter anticipatorio (Moore et al., 2019). Asimismo, se ha reportado que neuronas del NAcc *Shell* se activan en presencia de pistas olfativas de un individuo del sexo opuesto pero no del mismo sexo (Ago et al., 2015; Lehmann et al., 2013). Esta evidencia sustenta una mayor activación neural en hembras sexualmente activas frente a un macho en la región *Shell* del NAcc y la CPFm.

De forma similar, una mayor expresión de c-Fos en NAcc *Shell*, y Ami BL fue reportada por Moncho-Bogani & colaboradores (2005) en hembras que nunca habían sido expuestas a olor de macho, luego de permitirles explorar sustrato con su olor, que es un estímulo incondicionado recompensante para las hembras sexualmente activas (Moncho-Bogani et al., 2005). Esta activación se ha asociado al papel que juegan el NAcc y la Ami BL en los procesos de condicionamiento recompensante (Maren, 2016), por lo que la expresión de c-Fos en estas áreas en las adolescentes frente a un macho podría reflejar un proceso de aprendizaje vinculado a la exposición a feromonas sexuales (Lanuza et al., 2008).

Por otra parte, las aferencias desde la CPFm a la Ami BL experimentan durante la adolescencia un reforzamiento sináptico y este fenómeno ha sido vinculado al mayor interés social, característico de la adolescencia (Ferrara et al., 2021). Asimismo, se ha reportado que lesionar la Ami en etapas tempranas reduce la sociabilidad y altera la conducta sexual en macacos hembra durante la interacción con un macho (Moadab et al., 2017). La relevancia de la CPFm y la Ami BL en el procesamiento de la motivación social, y los elevados niveles de juego y exploración social en las hembras adolescentes, apoyan el aumento de la activación neuronal en estas áreas, observada en la presente tesis.

Además del aumento en los niveles de c-Fos en áreas clásicas vinculadas al sistema de recompensa y al condicionamiento a reforzadores como el NAcc *Shell*, la

CPFm y la Ami BL, en las adolescentes expuestas a un macho, detectamos elevada activación neural en la COF, que se diferenció de lo observado en adultas. Este resultado es congruente con reportes que le atribuyen un rol a la COF en el procesamiento de estímulos recompensante durante la adolescencia (Simon & Moghaddam, 2015).

Esta evidencia, en conjunto, sugiere que la activación de estas estructuras probablemente se asocie al procesamiento motivacional de los estímulos del macho, principalmente los olfativos. Sin embargo, llama la atención que estas áreas no mostrarán activación neuronal significativa frente al macho en la edad adulta.

7.6. ¿Qué mecanismos neuroendócrinos pueden estar por detrás del patrón de activación neuronal diferencial de acuerdo a la edad de las hembras?

Como se mencionó anteriormente la diferencia entre adolescentes y adultas podría deberse a que estas áreas, fuertemente interconectadas entre sí, aún no están maduras en la adolescencia media, particularmente las áreas corticales. Por otra parte, las hembras adolescentes y adultas difieren en la exposición previa a picos de E y P, hormonas que generan cambios organizacionales en el sistema nervioso durante la adolescencia y que modifican de forma específica área vinculadas a la función reproductiva (Sisk & Foster, 2004).

Uno de los cambios que ocurre durante la adolescencia es la reestructuración de procesos excitatorios e inhibitorios que conectan la CPFm y la Ami BL. En este sentido, (Ferrara et al., 2021) observaron que la maduración de la CPFm a lo largo de la adolescencia se asocia a un aumento progresivo de la inhibición que está ejerce sobre la Ami BL, que sería responsable de la reducción de las interacciones sociales hacia la adultez. Por lo que el estado de desarrollo de la CPFm de las hembras adolescentes

(Kalsbeek et al., 1988), junto con la falta de inhibición de la Ami BL podría mediar la mayor activación de estas áreas en comparación a las adultas. Estas variaciones en la conectividad entre áreas de individuos adolescentes y adultos pueden subyacer el procesamiento neural diferente del valor de incentivo de recompensas. Así, Simon y Moghaddam (2015) plantean que una misma salida comportamental puede asociarse a un patrón de activación neural diferente en ratas de diferentes edades (Simon & Moghaddam, 2015). Por ejemplo, Struman y Moghaddam, reportaron que ratas adolescentes y adultas que exhiben un comportamiento de búsqueda de recompensa similar presentan un cambio en la actividad neural de la COF opuesto, reduciéndose en adultas y aumentando en adolescentes (Struman & Moghaddam, 2011a). De forma similar, Varlinskaya y Spears (2013) reportaron que ratas adolescentes y adultas exhiben un patrón de activación c-Fos diferente en función del contexto; mientras que en una interacción social las adolescentes muestran un aumento de la actividad en la amígdala central y la Ami BL respecto al aislamiento, las adultas muestran una activación del NAcc y de la COF en aislamiento respecto a la interacción social (Varlinskaya et al., 2013). Estos estudios, junto con nuestros resultados que muestran una elevada expresión de c-Fos en áreas implicadas en el procesamiento motivacional en adolescentes que presentan menor motivación sexual, sugieren que los cambios en activación neural durante la adolescencia y la adultez pueden tener diferentes consecuencias funcionales. Es posible entonces que con la maduración del sistema mesocorticolímbico emerjan nuevos patrones de inervación entre las estructuras corticales y subcorticales, que al establecerse permitan la concordancia entre la actividad de este sistema y la conducta típica de animales adultos.

La diferencia más notable en la actividad neuronal entre ambos grupos etarios se observó en áreas corticales que están inmaduras durante la adolescencia media como la CPFm prelímb y la COF. De forma interesante, Balfour y colaboradores (2006) reportaron que eferencias desde la CPFm prelímb regulan fuertemente la influencia de la actividad

sexual sobre el área tegmental ventral, el NAcc, el APOm y la Ami BL, de machos luego de la cópula (Balfour et al., 2006). Este estudio abre la posibilidad de que, en las hembras adolescentes, la actividad de una CPFm (y probablemente una COF) inmadura, a través de sus eferencias a las áreas mencionadas, impacte el funcionamiento del circuito neural sexual y la expresión de la motivación sexual.

Finalmente, las hembras adolescentes y adultas difieren entre sí en el número de picos pre-ovulatorios de E por los que han transitado, debido a que las hembras en adolescencia median han estado expuestas a un máximo de dos picos de E, mientras que las adultas a un número notoriamente mayor. La relevancia de esta diferencia en exposición estrogénica radica en que los esteroides gonadales producen efectos organizacionales en el cerebro durante la adolescencia (Sisk & Foster, 2004) y a que las sucesiones de picos de E aumentan la sensibilidad del circuito sexual a su efecto (Armas et al., 2021; Jennings & de Lecea, 2020; Jones & Pfau, 2014). Sobre esta base, es posible que las diferencias observadas entre edades en la actividad neuronal en los circuitos neurales sensibles a E se deban a que éstos no culminaron su maduración en la adolescencia.

Cabe destacar que la interacción con una hembra no produjo una activación diferencial en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico de acuerdo a la edad. Este resultado llamó nuestra atención, debido a que la adolescencia se caracteriza por un elevando interés por las interacciones sociales (Panksepp et al., 1984; Spear, 2000), y a que se ha reportado que las interacciones de juego aumentan la expresión de c-Fos en el NAcc, la CPF, la COF y la amígdala (van Kerkhof et al., 2013). La ausencia de activación neuronal asociada a la interacción con una hembra en relación a la situación control en ratas adolescentes podría deberse a que la interacción ocurrió a través de una rejilla, pero también a la diferencia etaria entre la hembra experimental (adolescencia media) y la estímulo (adulta). Las interacciones sociales disminuyen en la adultez (Panksepp et al.,

1984; Spear, 2000) y como se mencionó previamente, observamos una baja interacción entre la hembra adolescente experimental y la adulta experimental (observación no sistematizada). Por este motivo, es posible que la ausencia de interés por parte de la hembra adulta, haya impactado en la activación neuronal de las adolescentes. Sería interesante determinar cómo es la expresión de c-Fos en áreas del sistema general de recompensa de hembras en adolescencia media interactuando con hembras desconocidas de su misma edad en el modelo.

8. CONCLUSIONES

A partir del análisis de los comportamientos sexual y social a lo largo de la adolescencia concluimos que la ciclicidad ovárica que comienza durante la adolescencia media, es acompañada por el patrón conductual acorde a la maduración sexual durante la interacción con un macho, indicando que estas hembras se encuentran sexualmente motivadas y son capaces de expresar máxima receptividad sexual frente al macho. Sin embargo, tanto la intensidad de la respuesta de lordosis, como el comportamiento en pruebas motivacionales específicas, indican que esta maduración no es completa. A su vez, en esta edad de transición hacia la vida adulta, aún durante la interacción sexual emergen conductas de juego e investigación social propias de la edad, generando un patrón comportamental único.

Las diferencias en las respuestas comportamentales de hembras adultas y en adolescencia media hacia un macho descritas en esta tesis y en trabajos previos (Armas et al., 2021) concuerdan con la activación neuronal diferencial de acuerdo a la edad que observamos en áreas límbico-hipotalámicas y del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico frente a un macho. Esto apunta a un procesamiento diferencial del valor de incentivo sexual del macho de acuerdo a la edad. La marcada activación en las

hembras adolescentes de neuronas en la CPFm y la COF, áreas neurales que están en proceso de maduración y que inervan áreas bajas del circuito sexual, podría mediar la expresión de c-Fos en todo el circuito neural sexual durante la adolescencia.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados comportamentales que muestran una menor motivación sexual y mayor expresión de comportamiento social durante la cópula de las hembras en adolescencia media, sería interesante explorar la preferencia de estas hembras por interactuar con un conespecífico de su misma edad sin valor sexual vs. un macho sexualmente activo en un modelo que permita su libre elección. Este experimento será realizado en el marco del proyecto CSIC I+D 2017: *Aumento de la motivación sexual a lo largo de la adolescencia en la rata hembra: incremento en la sensibilidad a estrógenos como posible mecanismo responsable* actualmente en ejecución.

A partir de los resultados de expresión de c-Fos surgen perspectivas a corto y mediano-largo plazo. A corto plazo, se analizará un número mayor de animales por grupo (a partir de tejido procesado ya disponibles) y un número mayor de áreas (incluyendo a los núcleos de la estría terminales y las subregiones cortical y medial posterodorsal de la amígdala) para reafirmar las conclusiones presentadas. A su vez, se analizará parte del patrón de USV emitidas durante la interacción entre las hembras experimentales y los animales estímulo, así como la movilidad de ambos animales (contamos con las grabaciones de USV y filmaciones de las interacciones), con el fin de profundizar en las diferencias en el tipo de interacción y su posible asociación al patrón de activación neural registrado.

A mediano-largo plazo, debido a la marcada activación neuronal en la CPFm prelímbica y la COF, sería interesante analizar el patrón de activación neuronal, así como el comportamiento de hembras adolescentes y adultas con inactivación transitoria de estas cortezas. Asimismo, se considera explorar si el patrón de activación neuronal de hembras adolescente luego de la exposición a un macho es similar al observado luego de una exposición a una hembra no sexualmente activa del mismo rango etario.

10. REFERENCIAS

- Achterberg, E. J. M., Van Kerkhof, L. W. M., Servadio, M., Van Swieten, M. M. H., Houwing, D. J., Aalderink, M., Driel, N. V., Trezza, V., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2016). Contrasting Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Motivational Properties of Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology*, *41*(3), 858–868. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.212>
- Achterberg, E. J. M., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2020). Treatment with low doses of nicotine but not alcohol affects social play reward in rats. *International Journal of Play*, *9*(1), 39–57. <https://doi.org/10.1080/21594937.2020.1720121>
- Afonso, V. M., King, S., Chatterjee, D., & Fleming, A. S. (2009). Hormones that increase maternal responsiveness affect accumbal dopaminergic responses to pup- and food-stimuli in the female rat. *Hormones and Behavior*, *56*(1), 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.003>
- Afonso, V. M., Lehmann, H., Tse, M., Woehrling, A., & Pfaus, J. G. (2009). Estrogen and the Neural Mediation of Female-Male Mounting in the Rat. *Behavioral Neuroscience*, *123*(2), 369–381. <https://doi.org/10.1037/a0014121>
- Afonso, V. M., Sison, M., Lovic, V., & Fleming, A. S. (2007). Medial Prefrontal Cortex Lesions in the Female Rat Affect Sexual and Maternal Behavior and Their Sequential Organization. *Behavioral Neuroscience*, *121*(3), 515–526. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.3.515>
- Ago, Y., Hasebe, S., Nishiyama, S., Oka, S., Onaka, Y., Hashimoto, H., Takuma, K., & Matsuda, T. (2015). The female encounter test: A novel method for evaluating reward-seeking behavior or motivation in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *18*(11). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv062>
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., & Ferreira, A. (2008). The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behavioral Neuroscience*, *122*(5), 998–1004. <https://doi.org/10.1037/a0012585>
- Agrati, D., MacHado, L., Delgado, H., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., & Ferreira, A. (2019). Sexual behaviour of the female rat during late adolescence: Effect of chronic cocaine treatment. *Behavioural Pharmacology*, *30*(5), 396–404. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000451>
- Ahmed, S. P., Bittencourt-Hewitt, A., & Sebastian, C. L. (2015). Neurocognitive bases of

emotion regulation development in adolescence. In *Developmental Cognitive Neuroscience* (Vol. 15, pp. 11–25). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2015.07.006>

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)

Anselme, P. (2007). Some conceptual problems with the classical theory of behaviour. *Behavioural Processes*, *75*(3), 259–275.
<https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2007.02.027>

Armas, M., Marín, G., Uriarte, N., & Agrati, D. (2021). Increase in sexual motivation throughout adolescence in the cycling female rat. *Developmental Psychobiology*, dev.22162. <https://doi.org/10.1002/DEV.22162>

Balfour, M. E., Brown, J. L., Yu, L., & Coolen, L. M. (2006). Potential contributions of efferents from medial prefrontal cortex to neural activation following sexual behavior in the male rat. *Neuroscience*, *137*(4), 1259–1276.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.013>

Barfield, R. J., & Thomas, D. A. (1986). The Role of Ultrasonic Vocalizations in the Regulation of Reproduction in Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *474*(1), 33–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb27996.x>

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)

Becker, J. B., Rudick, C. N., & Jenkins, W. J. (2001). The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *Journal of Neuroscience*, *21*(9), 3236–3241. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03236.2001>

Benes, F. M., Taylor, J. B., & Cunningham, M. C. (2000). Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *10*(10), 1014–1027. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007552>

Beny, Y., & Kimchi, T. (2014). Innate and learned aspects of pheromone-mediated social behaviours. *Animal Behaviour*, *97*, 301–311.

<https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2014.09.014>

Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014a). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *ELife*, *3*. <https://doi.org/10.7554/elife.02743>

Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014b). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *ELife*, *2014*(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.02743.001>

Berridge, K C, & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research. Brain Research Reviews*, *28*(3), 309–369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858756>

Berridge, Kent C, Kringelbach, M. L., Arbor, A., & Hospital, W. (2016). Pleasure Systems of the Brain. *Neuron*, *86*(3), 646–664. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>.Pleasure

Beyeler, A., Namburi, P., Glober, G. F., Simonnet, C., Calhoon, G. G., Conyers, G. F., Luck, R., Wildes, C. P., & Tye, K. M. (2016). Divergent routing of positive and negative information from the amygdala during memory retrieval. *Neuron*, *90*(2), 348. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.03.004>

Blaustein, J. D. (2008). Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: Lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annual Review of Psychology*, *59*, 93–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093556>

Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2008). Delayed extinction and stronger reinstatement of cocaine conditioned place preference in adolescent rats, compared to adults. *Behavioral Neuroscience*, *122*(2), 460–465. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.460>

Brenhouse, H. C., & Andersen, S. L. (2011). Developmental trajectories during adolescence in males and females: A cross-species understanding of underlying brain changes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(8), 1687–1703. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.013>

Brenhouse, H. C., Sonntag, K. C., & Andersen, S. L. (2008). Transient D1 dopamine receptor expression on prefrontal cortex projection neurons: Relationship to enhanced motivational salience of drug cues in adolescence. *Journal of Neuroscience*, *28*(10), 2375–2382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5064-07.2008>

Brown, R. E. (1977). Odor preference and urine-marking scales in male and female rats: Effects of gonadectomy and sexual experience on responses to conspecific odors. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *91*(5), 1190–1206.

<https://doi.org/10.1037/h0077394>

- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(3), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfaus, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic Vocalizations of Rats (*Rattus norvegicus*) During Mating, Play, and Aggression: Behavioral Concomitants, Relationship to Reward, and Self-Administration of Playback. *Journal of Comparative Psychology*, *122*(4), 357–367. <https://doi.org/10.1037/a0012889>
- Caligioni, C. S. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *SUPPL. 48*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *348*(1), 41–79. <https://doi.org/10.1002/CNE.903480103>
- Canteras, N., Simerly, R., & Swanson, L. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *360*(2), 213–245. <https://doi.org/10.1002/CNE.903600203>
- Chiang, V. S. C., & Park, J. H. (2020). Glutamate in Male and Female Sexual Behavior: Receptors, Transporters, and Steroid Independence. In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.589882>
- Cibrian-Llenderal, T., Tecamachaltzi-Silvaran, M., Triana-Del Rio, R., Pfaus, J. G., Manzo, J., & Coria-Avila, G. A. (2010). Clitoral stimulation modulates appetitive sexual behavior and facilitates reproduction in rats. *Physiology & Behavior*, *100*(2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.02.015>
- 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>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *43*(6), 776–793.

<https://doi.org/10.1177/0192623315570339>

- Correa, S. M., Newstrom, D. W., Warne, J. P., Flandin, P., Cheung, C. C., Lin-Moore, A. T., Pierce, A. A., Xu, A. W., Rubenstein, J. L., & Ingraham, H. A. (2015). An estrogen-responsive module in the ventromedial hypothalamus selectively drives sex-specific activity in females. *Cell Reports*, *10*(1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.011>
- Cunningham, M. G., Bhattacharyya, S., & Benes, F. M. (2002). Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: Implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *Journal of Comparative Neurology*, *453*(2), 116–130. <https://doi.org/10.1002/cne.10376>
- Demir, E., Li, K., Bobrowski-Khoury, N., Sanders, J. I., Beynon, R. J., Hurst, J. L., Kepecs, A., & Axel, R. (2020). The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. *Nature*, *578*(7793), 137–141. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1967-8>
- Domínguez-Ordóñez, R., García-Juárez, M., Lima-Hernández, F. J., Gómora-Arrati, P., Blaustein, J. D., Etgen, A. M., & González-Flores, O. (2016). Estrogen receptor α and β are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats. *Hormones and Behavior*, *86*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2016.08.010>
- Doremus-Fitzwater, T. L., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2010). Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain and Cognition*, *72*(1), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2009.08.008>
- 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>
- Drzewiecki, C. M., Willing, J., & Juraska, J. M. (2016). Synaptic number changes in the medial prefrontal cortex across adolescence in male and female rats: A role for pubertal onset. *Synapse*, *70*(9), 361–368. <https://doi.org/10.1002/syn.21909>
- 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)
- Ferrara, N. C., Trask, S., & Rosenkranz, J. A. (2021). Maturation of amygdala inputs regulate shifts in social and fear behaviors: A substrate for developmental effects of

- stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 125, 11–25.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.021>
- Field, E. F., & Pellis, S. M. (2008). The brain as the engine of sex differences in the organization of movement in rats. *Archives of Sexual Behavior*, 37(1), 30–42.
<https://doi.org/10.1007/s10508-007-9270-4>
- Foulkes, L., & Blakemore, S. J. (2016). Is there heightened sensitivity to social reward in adolescence? *Current Opinion in Neurobiology*, 40, 81–85.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.06.016>
- Fujiwara, M., Nitta, A., & Chiba, A. (2016). Regulation of sexual odor preference by sex steroids in the posterodorsal medial amygdala in female rats. *Hormones and Behavior*, 82, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.05.007>
- 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>
- Georgescu, M., Sabongui, C., Del Corpo, A., Marsan, L., & Pfaus, J. G. (2009). Vaginal stimulation induces Fos in glutamate neurons in the ventromedial hypothalamus: Attenuation by estrogen and progesterone. *Hormones and Behavior*, 56(4), 450–456. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.07.014>
- González-Flores, O., Hoffman, K. L., Delgadillo, J. A., Keller, M., & Paredes, R. G. (2017). Female Sexual Behavior in Rodents, Lagomorphs, and Goats. In *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition* (Vol. 1, pp. 59–82). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00002-X>
- Graham, M. D., & Pfaus, J. G. (2010). Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(2), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.08.012>
- Graham, M. D., & Pfaus, J. G. (2012). Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(4), 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.06.020>
- 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)

- Hardy, D. F., & DeBold, J. F. (1972). Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *78*(3), 400–408. <https://doi.org/10.1037/H0032536>
- Hlišák, Z. (1986). Estradiol plus progesterone treatment and precopulatory behavior in prepubertally ovariectomized female rats: Dose-response relationships. *Hormones and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(86\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(86)90036-X)
- Hodgson, A. R., Richmond, C., Tello, J., & Brown, G. R. (2020). Suppression of ovarian hormones in adolescent rats has no effect on anxiety-like behaviour or c-fos activation in the amygdala. *Journal of Neuroendocrinology*, *32*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1111/jne.12897>
- Holder, M. K., & Blaustein, J. D. (2014). Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(1), 89–110. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.004>
- Holder, M. K., & Blaustein, J. D. (2017). Developmental time course and effects of immunostressors that alter hormoneresponsive behavior on microglia in the peripubertal and adult female mouse brain. *PLoS ONE*, *12*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171381>
- Hoshina, Y., Takeo, T., Nakano, K., Sato, T., & Sakuma, Y. (1994). Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, *61*(2), 197–204. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90160-0)
- Hosokawa, N., & Chiba, A. (2007). Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Research*, *1175*(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.071>
- Hu, R. K., Zuo, Y., Ly, T., Wang, J., Meera, P., Wu, Y. E., & Hong, W. (2021). An amygdala-to-hypothalamus circuit for social reward. *Nature Neuroscience*, *24*(6), 831–842. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00828-2>
- Insel, T. R., Miller, L. P., & Gelhard, R. E. (1990). The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-d-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*, *35*(1), 31–43. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90117-M](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90117-M)
- 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 (United States)*, *161*(10), 1–13.
<https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa150>
- Jones, S. L., & Pfau, 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>
- Juraska, J. M., & Willing, J. (2017). Pubertal onset as a critical transition for neural development and cognition. In *Brain Research* (Vol. 1654, Issue Pt B, pp. 87–94). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.012>
- Kalsbeek, A., Voorn, P., Buijs, R. M., Pool, C. W., & Uylings, H. B. M. (1988). Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *269*(1), 58–72. <https://doi.org/10.1002/cne.902690105>
- Keller, M., Baum, M. J., Brock, O., Brennan, P. A., & Bakker, J. (2009). The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, *200*(2), 268–276.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.020>
- Kelley, A. E., & Berridge, K. C. (2002). The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *Journal of Neuroscience*, *22*(9), 3306–3311.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-09-03306.2002>
- Kevetter, G. A., & Winans, S. S. (1981). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala." *Journal of Comparative Neurology*, *197*(1), 81–98. <https://doi.org/10.1002/cne.901970107>
- Kondo, Y., & Sakuma, Y. (2005). The medial amygdala controls the coital access of female rats: A possible involvement of emotional responsiveness. *Japanese Journal of Physiology*, *55*(6), 345–353. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.RP001105>
- Kow, L. M., Harlan, R. E., Shivers, B. D., & Pfaff, D. W. (1985). Inhibition of the lordosis reflex in rats by intrahypothalamic infusion of neural excitatory agents: Evidence that the hypothalamus contains separate inhibitory and facilitatory elements. *Brain Research*, *341*(1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91468-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91468-4)
- Kow, L. M., & Pfaff, D. W. (1998). Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system.

Behavioural Brain Research, 92(2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(97\)00189-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(97)00189-7)

Lanuza, E., Novejarque, A., Martínez-Ricós, J., Martínez-Hernández, J., Agustín-Pavón, C., & Martínez-García, F. (2008). Sexual pheromones and the evolution of the reward system of the brain: the chemosensory function of the amygdala. *Brain Research Bulletin*, 75(2–4), 460–466. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2007.10.042>

Lehmann, M. L., Geddes, C. E., Lee, J. L., & Herkenham, M. (2013). Urine Scent Marking (USM): A Novel Test for Depressive-Like Behavior and a Predictor of Stress Resiliency in Mice. *PLOS ONE*, 8(7), e69822. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0069822>

Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Fourth Ed, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0>

Lydell, K., & Doty, R. L. (1972). Male rat odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Hormones and Behavior*, 3(3), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(72\)90033-5](https://doi.org/10.1016/0018-506X(72)90033-5)

Madalfousek ;Hlinák. (1976). SEXUAL BEHAVIOUR OF THE FEMALE LABORATORY RAT: INVENTORY, PATTERNING, AND MEASUREMENT. *Θησαυρίσματα*, 13(1), 258–283.

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>

Maren, S. (2016). Parsing Reward and Aversion in the Amygdala. *Neuron*, 90(2), 209–211. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.04.011>

Marshall, A. T., Liu, A. T., Murphy, N. P., Maidment, N. T., & Ostlund, S. B. (2017). Sex-specific enhancement of palatability-driven feeding in adolescent rats. *PLoS ONE*, 12(7), e0180907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180907>

Marshall, A. T., Munson, C. N., Maidment, N. T., & Ostlund, S. B. (2020). Reward-predictive cues elicit excessive reward seeking in adolescent rats. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 45. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100838>

Mascó, D. H., & Carrer, H. F. (1984). Pathways conducting amygdaloid influence on feminine sexual behavior in the rat. *Behavioural Brain Research*, 11(3), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(84\)90212-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(84)90212-2)

- McCarthy, M. M., Curran, G. H., & Feder, H. H. (1991). Excitatory amino acid modulation of lordosis in the rat. *Neuroscience Letters*, *126*(1), 94–97. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90380-C](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90380-C)
- McClintock, M. K., & Adler, N. T. (1978). The Role of the Female During Copulation in Wild and Domestic Norway Rats (*Rattus Norvegicus*). *Behaviour*, *67*(1–2), 67–95. <https://doi.org/10.1163/156853978x00260>
- 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)
- McFarland, D. J., & Sibly, R. M. (1975). The behavioural final common path. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *270*(907), 265–293. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1975.0009>
- 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., McElligott, Z. A., Budygin, E. A., Rubinow, D. R., & Stuber, G. D. (2017). Hormonal gain control of a medial preoptic area social reward circuit. *Nature Neuroscience*, *20*(3), 449. <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)
- Merkx, J., Slob, A. K., & Van Der Werff Ten Bosch, J. J. (1988). Vaginal bacterial flora partially determines sexual attractivity of female rats. *Physiology and Behavior*, *44*(1), 147–149. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90359-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90359-9)
- Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. In *Frontiers in Systems Neuroscience* (Vol. 11, p. 42). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00042>
- Moadab, G., Bliss-Moreau, E., Bauman, M. D., & Amaral, D. G. (2017). Early amygdala or hippocampus damage influences adolescent female social behavior during group formation. *Behavioral Neuroscience*, *131*(1), 68–82. <https://doi.org/10.1037/bne0000181>

- Mogenson, G. J., Jones, D. L., & Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, *14*(2–3), 69–97. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(80\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0301-0082(80)90018-0)
- Moncho-Bogani, J., Martinez-Garcia, F., Novejarque, A., & Lanuza, E. (2005). Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 2186–2189. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04036.x>
- Moore, K. M., Oelberg, W. L., Glass, M. R., Johnson, M. D., Been, L. E., & Meisel, R. L. (2019). Glutamate Afferents From the Medial Prefrontal Cortex Mediate Nucleus Accumbens Activation by Female Sexual Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00227>
- Nomoto, K., & Lima, S. Q. (2015). Enhanced male-evoked responses in the ventromedial hypothalamus of sexually receptive female mice. *Current Biology*, *25*(5), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.048>
- 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)
- Österlund, M., G.J.M. Kuiper, G., Gustafsson, J.-Å., & Hurd, Y. L. (1998). Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research*, *54*(1), 175–180. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00351-3](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00351-3)
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental Psychobiology*, *14*(4), 327–332. <https://doi.org/10.1002/dev.420140405>
- Panksepp, J., Siviy, S., & Normansell, L. (1984). The psychobiology of play: Theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *8*(4), 465–492. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90005-8)
- Parada, M., Chamas, L., Censi, S., Coria-Avila, G., & Pfaus, J. G. (2010). Clitoral stimulation induces conditioned place preference and Fos activation in the rat. *Hormones and Behavior*, *57*(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2009.05.008>
- Paredes, R. G., & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioural Brain Research*, *105*(1), 117–127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553695>

- Pellis, S. M. (2002). Sex differences in play fighting revisited: Traditional and nontraditional mechanisms of sexual differentiation in rats. *Archives of Sexual Behavior, 31*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1023/A:1014070916047>
- Pellis, S. M., Himmler, B. T., Himmler, S. M., & Pellis, V. C. (2018). Rough-and-Tumble Play and the Development of the Social Brain: What Do We Know, How Do We Know It, and What Do We Need to Know? In *The Neurobiology of Brain and Behavioral Development*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804036-2.00012-1>
- Pereira, M., & Morrell, J. I. (2011). Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of Neuroendocrinology, 23*(11), 1020–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x>
- Perkins, A. E., Woodruff, E. R., Chun, L. E., Spencer, R. L., Varlinskaya, E., & Deak, T. (2017). Analysis of c-Fos induction in response to social interaction in male and female Fisher 344 rats. *Brain Research, 1672*, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.07.022>
- 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, 91*(1), 134–145. <https://doi.org/10.1037/H0077305>
- Pfaff, D. W. (1980). Estrogens and Brain Function. In *Estrogens and Brain Function*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8084-9>
- Pfaus, J. G., Ismail, N., & Coria-Avila, G. A. (2010). Sexual Motivation. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience, 201–209*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00205-0>
- Pfaus, J. G., Kleopoulos, S. P., Mobbs, C. V., Gibbs, R. B., & Pfaff, D. W. (1993). Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Research, 624*(1–2), 253–267. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90085-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90085-2)
- Pfaus, J. G., Marcangione, C., Smith, W. J., Manitt, C., & Abillamaa, H. (1996). Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: Modulation by steroid hormones. *Brain Research, 741*(1–2), 314–330. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00985-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00985-7)
- Pfaus, J., Jones, S. L., Flanagan-Cato, L. M., & Blaustein, J. D. (2015). Female Sexual Behavior. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set, 2*, 2287–

2370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00050-8>

- Pfaus, J.G., Damsma, G., Wenkstern, D., & Fibiger, H. C. (1995). Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Research*, *693*(1–2), 21–30. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00679-K](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00679-K)
- Pfaus, J G, Smith, W. J., & Coopersmith, C. B. (1999). Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. I. A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones. *Hormones and Behavior*, *35*(3), 224–240. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1516>
- Pfaus, James G. (2021). Neuroelectrical Activity and Sexual Stimulation: Deconstructing a Tower of Babel. *Archives of Sexual Behavior*. <https://doi.org/10.1007/s10508-021-02001-z>
- Pfaus, James G., & Heeb, M. M. (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Research Bulletin*, *44*(4), 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(97\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(97)00219-0)
- Pfaus, James G., Jones, S. L., Flanagan-Cato, L. M., & Blaustein, J. D. (2014). Female Sexual Behavior. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Vol. 2, Issue December, pp. 2287–2370). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00050-8>
- Pfaus, James G., Manitt, C., & Coopersmith, C. B. (2006). Effects of pelvic, pudendal, or hypogastric nerve cuts on Fos induction in the rat brain following vaginocervical stimulation. *Physiology and Behavior*, *89*(5), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.07.022>
- Phillips-Farfán, B. V., & Fernández-Guasti, A. (2007). c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. *Physiology and Behavior*, *91*(5), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.024>
- Pierce, R. C., & Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews*, *25*(2), 192–216. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00021-0)
- Poole, T. B., & Fish, J. (1975). An investigation of playful behaviour in *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* (Mammalia). *Journal of Zoology*, *175*(1), 61–71. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb01391.x>
- 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), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jne.12701>
- Prewitt, J. M. S., & Mendelsohn, M. L. (1966). THE ANALYSIS OF CELL IMAGES*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 128(3), 1035–1053. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1965.TB11715.X>
- Rudzinkas, S. A., Williams, K. M., Mong, J. A., & Holder, M. K. (2019). Sex, Drugs, and the Medial Amygdala: A Model of Enhanced Sexual Motivation in the Female Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00203>
- Ruxton, G. D., & Beauchamp, G. (2008). *Forum Time for some a priori thinking about post hoc testing*. <https://doi.org/10.1093/beheco/arn020>
- Sajdyk, T. J., & Shekhar, A. (1997). Excitatory amino acid receptors in the basolateral amygdala regulate anxiety responses in the social interaction test. *Brain Research*, 764(1–2), 262–264. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00594-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00594-5)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- 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>
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2nd ed. In *Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2nd ed.* McGraw-Hill Book Company.
- Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C., & Muramatsu, M. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 294(1), 76–95. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>
- Simerly, Richard B. (2002). Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 25, pp. 507–536). Annu Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745>

- 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>
- Södersten, P. (1975). Receptive behavior in developing female rats. *Hormones and Behavior, 10*(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(75\)90001-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(75)90001-X)
- Sonntag, K. C., Brenhouse, H. C., Freund, N., Thompson, B. S., Puhl, M., & Andersen, S. L. (2014). Viral over-expression of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex increase high-risk behaviors in adults: Comparison with adolescents. *Psychopharmacology, 231*(8), 1615–1626. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3399-8>
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 24*(4), 417–463.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Stern, J. M., & Johnson, S. K. (1989). Perioral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology, 103*(3), 269–280. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.103.3.269>
- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2011a). Reduced Neuronal Inhibition and Coordination of Adolescent Prefrontal Cortex during Motivated Behavior. *Journal of Neuroscience, 31*(4), 1471–1478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4210-10.2011>
- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2011b). The neurobiology of adolescence: changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 35*(8), 1704–1712.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.003>
- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2012). Striatum processes reward differently in adolescents versus adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(5), 1719–1724.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1114137109>
- 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. *Brain Research. 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)

- Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., & Navalta, C. P. (2002). *Developmental neurobiology of childhood stress and trauma Psychiatric Clinics of North America* 25(2), 397-426. 25, 2002.
- The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*. (n.d.). Retrieved July 1, 2021, from <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-374121-9>
- 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., Will, R. G., Lominac, K. D., Turner, J. M., Hattori, T., Krishnan, K., Martz, J. R., Nutsch, V. L., & 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>
- Trezza, V., Baarendse, P., & Vanderschuren, L. (2010). The Pleasures of Play: Pharmacological Insights into Social Reward Mechanisms Viviana. *Trends Pharmacol Sci.*, 31(10), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.06.008>
- Truitt, W. A., Sajdyk, T. J., Dietrich, A. D., Oberlin, B., McDougale, C. J., & Shekhar, A. (2007). From anxiety to autism: Spectrum of abnormal social behaviors modeled by progressive disruption of inhibitory neuronal function in the basolateral amygdala in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 191(1), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0674-y>
- van Kerkhof, L. W. M., Trezza, V., Mulder, T., Gao, P., Voorn, P., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats. *Brain Structure and Function* 2013 219:4, 219(4), 1181–1211. <https://doi.org/10.1007/S00429-013-0558-Y>
- Vanderschuren, L. J., Niesink, R. J., & Van Ree, J. M. (1997). The neurobiology of social play behavior in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(3), 309–326. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00020-6)

- Varlinskaya, E. I., Vogt, B. A., & Spear, L. P. (2013). Social Context Induces Two Unique Patterns of c-Fos Expression In Adolescent and Adult Rats. *Developmental Psychobiology*, *55*(7), 684. <https://doi.org/10.1002/DEV.21064>
- 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>
- Verwer, R. W. H., Van Vulpen, E. H. S., & Van Uum, J. F. M. (1996). Postnatal development of amygdaloid projections to the prefrontal cortex in the rat studied with retrograde and anterograde tracers. *Journal of Comparative Neurology*, *376*(1), 75–96. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961202\)376:1<75::AID-CNE5>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<75::AID-CNE5>3.0.CO;2-L)
- Whitney, J. F. (1986). Effect of medial preoptic lesions on sexual behavior of female rats is determined by test situation. *Behavioral Neuroscience*, *100*(2), 230–235. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.100.2.230>
- Willey, A. R., & Spear, L. P. (2012). Development of anticipatory 50kHz USV production to a social stimuli in adolescent and adult male Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, *226*(2), 613–618. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.001>
- Yates, J. R., Beckmann, J. S., Meyer, A. C., & Bardo, M. T. (2013). Concurrent choice for social interaction and amphetamine using conditioned place preference in rats: Effects of age and housing condition. *Drug and Alcohol Dependence*, *129*(3), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.02.024>
- Zoratto, F., Altabella, L., Tistarelli, N., Laviola, G., Adriani, W., & Canese, R. (2018). Inside the developing brain to understand teen behavior from rat models: Metabolic, structural, and functional-connectivity alterations among limbic structures across three pre-adolescent stages. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00208>