

lek. Wiktor Bogacki-Rychlik

Parametryzacja neurobehawioralnych składowych aktywności seksualnej samców szczurów w kontekście badań podstawowych i przedklinicznych.

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Michał Biały

Katedra i Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 2022 r.

Słowa kluczowe

22-kHz, 50-kHz, behawior seksualny, szczur, wokalizacja ultradźwiękowa

Keywords

22-kHz, 50-kHz, rat, sexual behavior, ultrasonic vocalization

Nazwy i numery projektów badawczych

Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach projektów:

1. Rola układu serotonergicznego w zjawisku postejakulacyjnej wokalizacji ultradźwiękowej u samców szczura laboratoryjnego - mierzenie właściwości nagradzających ejakulacji
(1MA/NM4/16) – kierownik projektu
2. Badanie roli aktywacji receptora 5-HT₇ w powstawaniu postejakulacyjnej wokalizacji ultradźwiękowej 22-kHz u samców szczura. Rola receptora 5-HT₇ w indukcji stanów lękowych.
(1MA/NM1/17) – kierownik projektu
3. Porównanie roli receptora 5-HT_{1a} i 5-HT₇ w modelu warunkowania do miejsca CPP oraz udział receptora 5-HT₇ w wygaszaniu śladów pamięciowych.
(1MA/NM4/18/18) – kierownik projektu
4. Wpływ stresu środowiskowego w trakcie krytycznych faz rozwoju OUN na kształtowanie apetytywnych reakcji motywacyjnych u szczura laboratoryjnego na modelu behawioru seksualnego. Projekt Młodego Badacza, kierownik projektu:
(1MA/5/M/MB/N/20/20) – kierownik projektu

Dedykacje

Zawarty w tym opracowaniu zestaw publikacji stanowi ułożoną chronologicznie całość publikacyjną z okresu 2019-2022. Jest ona również bezpośrednią kontynuacją prowadzonych na tym samym modelu badań z okresu pracy działalności w kole naukowym w latach 2015-2018. Wszystkie eksperymenty zostały zaprojektowane i wykonane w pracowni behawioralnej Katedry i Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego prowadzonej przez dr hab. Michała Białego. Model opiera się na parametryzacji wokalizacji ultradźwiękowej emitowanej przez samca szczura w trakcie zachowań socjoseksualnych. W głębszej perspektywie czasowej stanowią bezpośrednią kontynuację badań behawioralnych związanych z regulacją procesów seksualnych u szczurów, rozpoczętą przez dr Józefa Becka w latach 60-tych XX wieku, a następnie kontynuowane jako cykl badawczy dr hab. Michała Białego dotyczący badań nad układem motywacji w kontekście reakcji seksualnych u szczurów. Badania te stanowiły element programu badawczego profesora Andrzeja Trzebskiego skoncentrowanego na fizjologii układu autonomicznego. *Chciałbym dlatego podziękować wszystkim wspomniałym fizjologom naszej Katedry, których badania stały się inspiracją dla prezentowanych w cyklu prac, a także mam nadzieję wielu następnych.*

Szczególnie pragnę podziękować mojemu promotorowi, a przede wszystkim nauczycielowi Panu dr hab. n. med. Michałowi Białemu za przekazaną wiedzę, warsztat i pasję.

Na końcu chciałbym podziękować mojej życiowej i naukowej partnerce Annie, za to, że jest nieustającą inspiracją w dążeniu do bycia lepszym badaczem.

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

1. Bialy, M., **Bogacki-Rychlik, W.**, Przybylski, J., and Zera, T. (2019). The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13, 257. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00257.
IF = 2,512 PM = 100
2. **Bogacki-Rychlik, W.**, Rolf, M., and Bialy, M. (2021). Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations and Sexual Motivation: Characteristic Pattern of Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15, 722456-722456. doi: 10.3389/fnbeh.2021.722456
IF = 3,558 PM = 100
3. **Bogacki-Rychlik, W.**, Wrona, A., and Bialy, M. (2022). A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound Separation During the Sociosexual Vocal-Non-contact Model in Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 16. doi: 10.3389/fnbeh.2022.910591.
IF= 3,558 PM=100

Wszystkie prace zostały opublikowane i są zamieszczone w rozprawie doktorskiej w wersji oryginalnej (format PDF).

Spis treści

Słowa kluczowe	2
Keywords	2
Nazwy i numery projektów badawczych	3
Dedykacje	4
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	5
Streszczenie w języku polskim	7
Streszczenie w języku angielskim	8
Wykaz stosowanych skrótów	9
Wykaz tabel i rycin	12
Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl	13
Założenia i cel pracy	34
PUBLIKACJA NR 1	36
Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J., and Zera, T. (2019). The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders. <i>Frontiers in Behavioral Neuroscience</i> 13, 257. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00257.	
PUBLIKACJA NR 2	47
Bogacki-Rychlik, W., Rolf, M., and Bialy, M. (2021). Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations and Sexual Motivation: Characteristic Pattern of Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile. <i>Frontiers in Behavioral Neuroscience</i> 15, 722456-722456. doi: 10.3389/fnbeh.2021.722456	
PUBLIKACJA NR 3	59
Bogacki-Rychlik, W., Wrona, A., and Bialy, M. (2022). A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound Separation During the Sociosexual Vocal-Non-contact Model in Rats. <i>Frontiers in Behavioral Neuroscience</i> 16. doi: 10.3389/fnbeh.2022.910591.	
Podsumowanie i wnioski	73
Bibliografia	78
Opinia Komisji Etycznej	105
Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji	111

Streszczenie w języku polskim

Celem niniejszej pracy jest teoretyczne wprowadzenie do zachowań seksualnych samców szczura jako modelu w badaniach biomedycznych i przedklinicznych. Klasyczne parametry behawioralne porównano z rozwijającą się dyscypliną skupiającą się na ultradźwiękowej wokalizacji szczurów (USV). Podczas wysoce apetytywnych zachowań socjoseksualnych możliwe jest wykrycie wszystkich sklasyfikowanych do tej pory podtypów ultradźwięków należących do dwóch głównych grup, tzw. 50-kHz i 22-kHz. Dobrze zbadane neurobehawioralne podłoże zachowań seksualnych w zestawieniu z wiedzą na temat właściwości emisji akustycznej szczurów pozwala na wykorzystanie parametrów ultradźwiękowych i seksualnych w formie parametru zbiorczego. Takie podejście zapewnia większą dokładność w opisie procesów biologicznych w eksperymentach i rozszerza możliwości zastosowania modeli wykorzystujących szczura brunatnego. W pierwszym artykule z tej serii przedstawiono klasyczne parametry zachowań seksualnych i ich zmiany odpowiadające progresji stanów patologicznych w modelach przedklinicznych.

Drugi artykuł z tej serii zawiera wyniki eksperymentów opartych na fazie przygotowawczej zachowań seksualnych i wokalizacji ultradźwiękowej, w niej występującej. Wyniki stanowią rozwinięcie modelu zachowań przygotowawczych poprzez precyzyjną manualną analizę widma ultradźwiękowego każdego z osobników. Została wykazana pozytywna korelacja pomiędzy poziomem motywacji seksualnej samców szczurów a liczbą emitowanych przez nie sygnałów o częstotliwości 50 kHz. Dodatkowo, przedstawiono specyficzny wzorzec podtypów ultradźwięków emitowanych przez szczury, charakteryzujący się brakiem istotnych różnic międzyosobniczych. W rezultacie pozwala to na wykorzystanie 50-kHz wokalizacji fazy przygotowawczej jako wiarygodnego wskaźnika poziomu motywacji socjoseksualnej.

Trzeci artykuł z tej serii opisuje nową metodę separacji ultradźwięków emitowanych podczas interakcji socjoseksualnych. Stanowi on rozwinięcie wcześniej opisanej metody analizy liczby bezkontaktowych erekcji (NCE) poprzez dodanie parametru USV. Technika ta pozwala na dokładniejszy pomiar podniecenia seksualnego zarówno samca, jak i samicy. Ponadto stwarza ona możliwość wykorzystania USV o częstotliwości przejściowej między 50 a 22 kHz jako parametru policzalnego i przypisywanego indywidualnie. Ten rodzaj ultradźwięków może być przydatny do pomiaru stanów frustracji u szczurów podczas interakcji seksualnych i innych typów kontaktów społecznych. Odpowiednie zastosowanie przedstawionych protokołów może służyć jako funkcjonalne narzędzie w badaniach psychofarmakologicznych, neuropsychiatrycznych i neurologicznych, endokrynologicznych i innych modelach badań przedklinicznych, a także w eksperymentach fizjologicznych dotyczących zachowań seksualnych.

Streszczenie w języku angielskim

The purpose of the present study is to provide a theoretical introduction to the sexual behavior of the male rat as a model in biomedical and preclinical research. Classical behavioral parameters are compared with the emerging discipline focused on rat ultrasonic vocalization (USV). During highly appetitive sociosexual behavior, it is possible to detect all ultrasound subtypes classified so far belonging to two main groups, so-called 50-kHz, and 22-kHz. The well-studied neurobehavioral substrate of sexual behavior juxtaposed with the knowledge of acoustic emission properties of rats enables the use of ultrasound and sexual parameters in the form of a compiled parameter. This approach provides increased accuracy in describing biological processes in experiments and expand the applicability of models using the brown rat. The first article in the series presents classical parameters of sexual behavior and their changes corresponding with the progression of pathological conditions in preclinical models.

The second article of the series includes results from the experiments based on the anticipatory phase of sexual behavior and the ultrasonic vocalization which occurs during this phase. Results advance the model of anticipatory behavior by the precise manual analysis of the ultrasonic spectrum of each emitting individual. There has been demonstrated a positive correlation between the level of sexual motivation of male rats and the number of 50-kHz signals emitted by them. Additionally, there is presented a specific pattern in subtypes of ultrasounds emitted by rats, characterized by the lack of significant inter-concomitant differences. Taking together, it enables to use of the 50-kHz anticipatory vocalization as a reliable indicator of the sociosexual motivation level.

The third article of the series describes the new method of ultrasounds separation emitted during sociosexual interactions. It develops a previously described method, of analyzing the number of non-contact erections (NCE), by adding the USV parameter. This technique allows for more accurate measuring of the sexual arousal of both the male and the female. Furthermore, it implicates the possibility of using the USV of the transient frequency between 50-kHz and 22-kHz as a quantifiable and individual-assigned parameter. This type of ultrasound can be useful in measuring frustrate-like states in rats during sexual interactions and other types of social encounters. Adequate application of presented protocols could serve as a functional tool in psychopharmacological, neuropsychiatric and neurological, endocrinological, and other models of preclinical research, as well as in physiological experiments on sexual behavior.

Wykaz stosowanych skrótów:

22-kHz – wokalizacja w paśmie około 22 kiloherców

22PE- wokalizacja w paśmie ok 22-kHz w okresie poejakulacyjnym (ang. *Post-Ejaculatory*)

50-kHz -wokalizacja w paśmie około 50 kiloherców

5-HT- serotonina

5-HT1A – receptor serotoninowy 1A

ACTH – hormon adrenokortykotropowy (ang. *Adrenocorticotropic Hormone*)

Adr – adrenalina

BNST – jądro łożyskowe prążka krańcowego (ang. *Bed Nucleus of the Stria Terminalis*)

CB- kannabinoidy

CC- ang. *Complex-Composite, podtyp złożonych ultradźwięków*

CPP – warunkowana preferencja miejsca ang. *Conditioned Place Preference*

D1 – receptor dopaminergiczny D1

D2 - receptor dopaminergiczny D2

DA - dopamina

DHT - 5 α -Dihydrotestosteron

EEG – elektroencefalografia (ang. *Electroencephalography*)

EL – latencja ejakulacji (ang. *Ejaculation Latency*)

GABA - kwas gamma-aminomastowy (ang. *gamma-aminobutyric acid*)

Glu – glutaminian

IL – latencja intromisji (ang. *Intromission Latency*)

IR – proporcja intromisji do wszystkich kryć (ang. *intromission ratio*)

LH – hormon luteinizujący (ang. *Luteinizing Hormone*)

MeA – przyśrodkowe jądro ciała migdałowatego (ang. *Medial Amygdala*)

ML – latencja mountingu (ang. *Mount Latency*)

MPOA – Przyśrodkowe pole przedwzrokowe (ang. *Medial Preoptic Area*)

MPOA/AH – (ang. *Medial Preoptic Area/Anterior Hypothalamus*)

MRI – tomografia rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Imaging*)

NA- noradrenalina

NAcc – jądro półleżące (ang. *Nucleus Accumbens*)

NCE – ang. *Non-Contact Erection*

NCEL – ang. *Latency to first Non-Contact Erection*

NI – liczba intromisji (ang. *Number of Intromission*)

NM – liczba mountingów (ang. *Number of Mounting*)

No.NCE – liczba erekcji bezkontaktowych (ang. *Number of Non-Contact Erections*)

nPGI – jądro olbrzymiokomorowe (ang. *Nucleus Paragigantocellularis*)

NR – jądra szwu (ang. *Raphe Nuclei*)

oś HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*)

OUN-ośrodkowy układ nerwowy

Oxy – oksytocyna

PAG – istota szara okołowodociągowa (ang. *Periaqueductal Gray*)

PEI – okres poejakulacyjny (ang. *Postejaculatory Interval*)

PEIL–ang. *Post-Ejaculatory Intromission Latency*

PEIM- ang. *Post-Ejaculatory Mounting Latency*

PTSD – zespół stresu pourazowego (ang. *Post-Traumatic Stress Disorder*)

PVN – jądro okołokomorowe (ang. *Paraventricular Nucleus*)

SAA – sterydy anaboliczno-androgenowe

SARM – selektywny modulator receptora androgenowego (ang. *Selective Androgen Receptor Modulator*)

SERM - selektywny modulator receptora estrogenowego (ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator*)

SNRI - Inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny (ang. *Serotonin Norepinephrine Reuptake Inhibitor*)

SSRI – selektywny inhibitor zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*)

T – testosteron

TLPD – trójcykliczne leki przeciwdepresyjne

USV – wokalizacja ultradźwiękowa (ang. *Ultrasonic Vocalization*)

V – wazopresyna

VMH- jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza (ang. *Ventro-Medial-Hypothalamus*)

VOC-NCE- ang. *Vocal-Non-Contact Erection*

VTA – pole brzuszne nakrywki (ang. *Ventral Tegmental Area*)

Wykaz tabel i rycin:

Tabela 1: Zestawienie tabelaryczne obejmujące czynniki kluczowe dla odpowiedzi seksualnej wraz z modelami w badaniach biomedycznych i przedklinicznych, w których są wykorzystywane.

Tabela 2: Zestawienie najważniejszych klasycznych parametrów behawioralnych mierzonych w poszczególnych fazach aktywności seksualnej, oraz modelu NCE.

Tabela 3: Uprozczone zróżnicowanie omawianych składowych w różnych fazach aktywności seksualnej.

Rycina 1. Przykładowe zarejestrowane sygnały ultradźwiękowe w naszej pracowni.

Rycina 2: Uproszczony schemat obrazujący rozpiętość zastosowania wokalizacji ultradźwiękowej szczurów w badaniach psychofarmakologicznych.

Rycina 3: Schemat obrazujący typowo rejestrowane ultradźwięki w trakcie aktywności seksualnej z podziałem na tzw. 50- i 22-kHz.

Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl

W prezentowanym cyklu artykułów podjęto próbę parametryzacji zachowań emocjonalno-motywacyjnych w oparciu o wokalizację ultradźwiękową i połączenia ich z innymi parametrami behawioralnymi opisującymi aktywność seksualną samca szczura (*Rattus norvegicus*). Powiązanie tego typu umożliwia zastosowanie parametru ultradźwiękowego do opisu zmian fizjologicznych i patologicznych przy opisie aktywności szczura wędrownego w prowadzonych badaniach przedklinicznych i podstawowych. Celowość tego powiązania usprawiedliwiona jest wykorzystaniem szczura jako podstawowego zwierzęcia modelowego w przedklinicznych badaniach w naukach medycznych, a także rosnącym, bardzo dużym zainteresowaniem tematem wokalizacji ultradźwiękowej. Parametryzacja różnych aspektów aktywności seksualnej możliwa jest dzięki stosunkowo wysokiej powtarzalności zachowania seksualnego w warunkach laboratoryjnych. Wynika to z konserwatywnego ewolucyjnie charakteru organizacji strukturalno-czynnościowej układów neuronalnych regulujących zachowania seksualne (Beach, 1947; Pfaus i wsp., 2003; Hull i Rodriguez-Manzo 2017), zapewniających tym samym wiarygodną homologicznie translacyjność wyników. Jednocześnie zachowania seksualne samców szczurów i związane z nimi parametry pozostają na tyle wrażliwe, że możliwe jest wykorzystanie ich zmian w modelowaniu procesów chorobowych i obiektywizacji efektów farmakologicznych m.in. w przypadku patologii układu krążenia, zaburzeń metabolicznych, modelach nefropatycznych, chorobach wątroby oraz neuropatologiach. Całość predysponuje behawior seksualny samca szczura, do bycia cennym narzędziem przedklinicznym.

Poniżej przedstawiono w sposób skrótowy najważniejsze założenie umożliwiające wprowadzenie do tematu, oraz uzasadniające sens przeprowadzonych badań wchodzących w skład cyklu publikacji. Ponadto, celem tego wstępu było uzasadnienie rozwijania modelu behawioru seksualnego samca szczura o parametr wokalizacyjny.

Każdy z wzorców behawioralnych zdefiniować można, jako skoordynowaną, złożoną reakcję biologiczną zwierzęcia w odpowiedzi na zewnętrzną i wewnętrzną stymulację możliwą do rozpoznania przez obserwatora, którym jest osobnik tego samego lub obcego gatunku. Szczegółowiej, w przypadku zachowań seksualnych ssaków (a w szerszym kontekście wszystkich kręgowców) na ekspresję tej formy behawioralnej wpływają (Crews i Moore 1986; Pfaus i wsp., 2001):

- wrodzona i kształtowana w okresach krytycznych konstytucja strukturalna układów neuronalnych

- procesy przebudowy neuroplastycznej zależne od doświadczenia w tym doświadczeń seksualnych
- optymalna neurotransmisja w układach sterujących i regulujących składowe seksualne, w tym w układzie motywacji
- endogenna stymulacja hormonalna
- endogenna rytmika biologiczna dodatkowo regulowana przez czynniki zewnętrzne
- bodźce wyzwalające o charakterze atraktantów seksualnych
- wysoce specyficzne gatunkowo czynniki socjalne
- fizjologiczna odpowiedź wykonawcza (efektorowa)

Współdziałanie powyższych składowych w ostatecznym rozrachunku prowadzi do obserwowalnych behawioralnie reakcji mierzonych poszczególnymi parametrami seksualnymi (liczbowo wyrażanymi wartościami tych zachowań). W tym kontekście dane uzyskiwane drogą analiz biochemicznych i molekularnych, strukturalno-obrazowych oraz czynnościowo-odbiorczych wraz z widocznym obrazem behawioralnym stanowią dopełniające się kontinuum reakcyjności fizjologicznej.

W odniesieniu do przedstawionych założeń podstawowych i przy wykorzystaniu współczesnego spektrum technik pomiarowych, badanie behawioru seksualnego może służyć do parametryzacji procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, badań farmakologicznych, a także modelowania zjawisk progresji patologicznej takich jak m.in.:

1. Ontogenezy OUN, swoistej i nieswoistej adaptacji neuroplastycznej w okresie pre-, perinatalnej i postnatalnej (z okresem neonatalnym) (Segarra i wsp. 1991; Hermans i wsp. 1993; Gerardin i wsp., 2005; Ferraz i wsp., 2015), w tym w modelach toksykologii farmakologicznej (Yasuhara i wsp., 2005; Olvera-Hernandez i wsp., 2019) i środowiskowej (Dalsenter i wsp., 2006; Lee i wsp., 2006; Jones i wsp., 2011)
2. Zmian adaptacyjnych w trakcie nabywania doświadczenia seksualnego w modelach uwzględniających m.in. warunkowanie klasyczne, instrumentalne (Beck i Bialy 1993a; Anagnostaras i wsp., 1998), pamięć stanów emocjonalnych i farmakologie środków oddziałujących na asocjacje pamięciowe (Bialy i wsp., 1992; Bialy i Kaczmarek 1996; Rydz i wsp., 1997; Bialy i wsp., 2000; 2010; Quintana i wsp., 2018; Jean i wsp., 2021; Sanna i wsp., 2019; 2022) a także wpływu innych doświadczeń w tym doświadczeń lękowych i modeli PTSD (Ennaceur i wsp., 2006; Hawley i wsp., 2013; Meraz-Medina i wsp., 2017;). Zaliczyć tu możemy także modele fetysyzacji (Pfaus i wsp., 2013).

3. Regulacji neurotransmisyjnej, w tym najważniejszego układu wbudzeniowo-hamującego dopamina-serotonina (Cagiano i wsp., 1989; Melis i Argiolas 1995; Beck i wsp., 2002; de Jong i wsp., 2005; Sanna i wsp. 2020), oraz innych pomocniczych układów: noradrenaliny i adrenaliny (McIntosh i Barfield 1984; Mos i wsp., 1991, Gulia i wsp., 2002; Snoeren i wsp., 2012), GABA (Agmo i wsp., 1987; Dorfman i wsp., 2006; Rodriguez-Manzo i Canseco-Alba, 2017), wazopresyny (DiBenedictis i wsp., 2020), oksytocyny (Melis i wsp., 2007; Succu i wsp., 2008; Oti i wsp., 2021), opioidów (Bialy i wsp., 2014; Olivier i wsp., 2017) glutaminianu (Chiang i Park 2020), kanabinoidów (Canesco-Alba i Rodriguez-Manzo 2015, 2019) oraz modeli farmakologicznych uzależnień (Pfaus i wsp., 2010; Karlsson i wsp. 2015;).

4. Parametryzację aktywności struktur układu motywacji takich jak: pole brzuszne nakrywki, jądro pólężące czy przyśrodkowe pole przedwzrokowe (VTA-N.Acc-MPOA) (Sanna i wsp., 2020). Przedkliniczna standaryzacja poziomu afektu, poziomu pobudliwości ośrodkowej i odpowiedzi emocjonalnej zwierząt, w tym wpływ zaburzeń (z komponentą zaburzeń motywacyjnych) afektywnych (jedno- i dwubiegunowych), psychotycznych i innych na funkcje seksualne, w tym efekty uboczne terapii TLPD, SSRI, SNRI (Oosting i wsp., 2016; Canpolat i wsp., 2022), leków przeciwpsychotycznych (Zhang i wsp., 2007, 2011).

5. Regulacji przez hormony płciowe w kontekście stymulacji struktur efektorowych, oddziaływania ośrodkowego (Vagell i McGinnis 1998; Bialy i Sachs 2002; Bialy i wsp., 2011;) z ich wpływem kształtowania preferencji i wzorców płciowych (Gladue i Clemens 1982; Henley i wsp., 2011;). Porównawczych badań farmakologicznych z użyciem sterydów anaboliczno-androgenicznych (Phillips-Farfan i wsp., 2008; Kim i Wood, 2014), swoistych agonistów i antagonistów receptorów androgenowych i estrogenowych (SARM, SERM) (Jones i wsp., 2009; Morimoto i wsp., 2017).

6. Roli rytmiki sezonowej i okołodobowej sterowanej przez endogenne zegary neuronalne w generowaniu wzorców pokwitaniowych (Lang i wsp., 1984), godowych i kopulacyjnych (Landry i i wsp., 2012; Ramirez-Renteria i wsp., 2020). Badanie sprzężenia endogennej rytmiki z układem hormonalnym (oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalna): modulacja LH (Paup i wsp., 1975; Shulman i Spritzer 2014), ACTH i glikokortykosteroidy (Segarra i wsp., 1991; Retana-Marquez i wsp., 1998). Deprywacja lub hiperstymulacja przez czynniki regulujące endogenne osie: deprywacja senna (Andersen i Tufik, 2002; Amini i wsp., 2020; Wibowo i wsp., 2020), wpływ światła i temperatury (Fantie i wsp., 1984; Blumberg i wsp., 1987; Parikh i wsp., 2021).

7. Odbiór i percepcja bodźców inicjujących zachowania godowe, poszukiwawcze, inicjujące i podtrzymujące kopulację (Sachs i Bialy, 2000). Kanały sensoryczne dla odbioru atraktantów i percepcji wzorców stymulujących (układ węchowy, vomeronasalny, słuchowy, czuciowy, smakowy)

(Bialy i Beck 1993b; Cavalcante i wsp. 2006; Caquineau i wsp., 2012; Fujiwara i Chiba, 2018).
Farmakologia substancji o potencjalnej lub znanym charakterze feromonowym i proseksualnym
(Kobayashi i wsp., 2011, 2013; Singh i wsp., 2012 Estrada-Reyes i wsp., 2019). Oraz modele
preferencji seksualnej zależne od czynników wrodzonych i nabytych. (Van de Poll i Van Dis 1979;
Olvera-Hernandez i wsp., 2015; Kondo i Hayashi, 2021)

8. Rola czynników społecznych takich jak hierarchizacja, nieswoiste seksualnie środowiskowe czynniki
wzbogacające (Urakawa i wsp., 2014), rola przewlekłego stresu wraz z wpływem na oś HPA (Gorzalka
i wsp., 1998; Renata-Marquez i wsp., 2003;). Rola doświadczeń społecznych w kształtowaniu
tożsamości płciowej i efektywności kopulacyjnej (Ward i Reed, 1985; Molenda-Figueira i wsp. 2017;
Kelestimur i wsp., 2021).

9. Odpowiedzi równowagowej układu autonomicznego m.in. z erekcją zależną od aktywacji
przywspółczulnej i współczulnie regulowanej ejakulacji (Giuliano i wsp., 1996, 1997; Coolen i wsp.,
2004). Mechanizmy erekcji regulowane na poziomach ośrodkowych (rdzeniowe i ponadrdzeniowe)
(Sachs i wsp., 1994; Melis i Argiolas, 2011), miejscowe odpowiedzi sterowane przez zmiany napięcia
układów naczyniowych i mięśniowych, cytofizjologia procesów regulacji autonomicznej ciśnienia w
obrębie struktur prącia (Hull i wsp., 1994; Bialy i wsp., 1996). Patofizjologia zaburzeń erekcji,
mechanizmy przedwczesnego wytrysku (Waldinger i Olivier 2005; Olivier i wsp., 2006; Olayo-Lortia i
wsp., 2014; Clement i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2020) i ich farmakologia (Snoeren i wsp., 2012;
Rodriguez-Manzo i Canseco-Alba, 2015). Aspekty fizjologii motorycznej reakcji efektorowej (Beck i
Bialy, 2000).

10. Modele chorób z dominującą tzw. komponentą metaboliczną, wpływającą na co najmniej jeden z
wymienionych powyżej układów. Należą tutaj nieswoiste neurodegeneracje, modele chorób
wątroby, zaburzenia o charakterze nefropatii, zaburzenia hormonalne, modele cukrzycowe (w tym
mikro- i makroangiopatie, oraz neuropatie cukrzycowe) (McVary i wsp., 1997; Tikhonova i wsp., 2005;
Faulkner i wsp., 2015; Babaei-Balderlou i Khazali 2016; Novati i wsp., 2018; Nguyen i wsp., 2021; Nna
i wsp., 2021) zaburzenia odżywiania i efekty diet restrykcyjnych (Bogacki-Rychlik i wsp., 2019; Jesus i
wsp., 2022). Substancje o charakterze dodatków żywnościowych, suplementów (Suresh i Prakash,
2012; Adebayo i wsp., 2019).

	Czynniki podstawowe dla powstawania reakcji seksualnych:	Model dla podstawowych badań fizjologicznych i patofizjologicznych:	Zastosowanie w modelach przedklinicznych:
1	Wrodzone pętle neuronalne (zachowania wrodzone)	Badanie rozwoju w okresie prenatalnym i perinatalnych okresach krytycznych	Zaburzenia embriogenezy, efekty transmisji wewnątrzmacicznej, modele toksykologiczne
2	Adaptacja neuroplastyczna (nabywanie doświadczenia socjoseksualnego)	Procesy warunkowania klasycznego i instrumentalnego, CPP pamięć emocjonalna mediatory procesów plastyczności	Farmakologiczna inhibicja/aktywacja procesów zapamiętywania, Modele lękowe i PTSD, fetyszycacja
3	Fizjologiczna (prawidłowa) aktywność układów neuroprzekaźnikowych mózgu	Neurochemia układów: DA, 5-HT, NA, Adr, V, Oxy, Glu, opioidów, CB	Badania psychofarmakologiczne, swoiste i nieswoiste neurodegeneracje ośrodkowe
4	Reakcje emocjonalno-motywacyjne	Układ motywacji (VTA-NAcc-MPOA) responsywność emocjonalna (ciało migdałowe) centralna oś wzbudzeniowa (układy pniowo-wzgórzowo-korowe)	Zaburzenia afektywne jedno- i dwubiegunowe i ich farmakoterapia, modele anhedonii, farmakologia leków przeciwpsychotycznych
5	Endogenne stymulacja hormonalna	Obwodowy i ośrodkowy efekt działania hormonów płciowych efekty hormonalne w aktywacji wzorców płciowych i reakcji seksualnych	Farmakologia: SAA, SARM, SERM Dysfunkcje hormonalne na tle patologii gonad

6	Rytmika biologicznych zegarów endogennych wraz ze środowiskowymi zmiennymi regulatorowymi	Fizjologia jąder podwzgórzowych rytm dobowy, rytm roczny regulacja osi HPA, wpływ UV, temperatury	Deprywacja snu, zaburzenia rytmu dobowego, modele dysregulacji farmakologicznej i środowiskowej
7	Bodźce stymulujące (atraktanty)	Układu zmysłów: węchowy i vomeronasalny, wzrokowy, słuchowy, czuciowy. odpowiedź na poziomie receptorowym (obwodowym)-transdukcja sygnału, integracja podkorowa i korowa	Modele selektywnych deprywacji zmysłowej, związki o charakterze feromonów i afrodyzjaki, powstawanie preferencji seksualnych
8	Środowiskowe Czynniki socjalne	Mechanizmy interakcji i hierarchizacji społecznej zjawisko afiliacji i agresji wpływ nieswoistych bodźców środowiskowych	Uwarunkowany społecznie stres wraz z wpływem na oś HPA
9	Fizjologiczna odpowiedź struktur efektorowych	Mechanizm erekcji, ejakulacji (obwodowe i ośrodkowe) cytofizjologia układów nerwowo-naczyniowych wzorce ruchowe krycia	Zaburzenia erekcji, przedwczesny wytrysk, neuropatie autonomicznych włókien obwodowych

Tabela 1: Zestawienie tabelaryczne obejmujące czynniki kluczowe dla odpowiedzi seksualnej wraz z modelami w badaniach biomedycznych i przedklinicznych, w których są wykorzystywane. W tabeli pominięto punkt 10 zestawienia ze względu na plejotropowy efekt wymienionych patologii obejmujący kilka z podstawowych czynników dla reakcji seksualnych.

Od strony neuroanatomicznej reakcje seksualne samców szczura regulowane są przez szereg połączonych ze sobą obszarów mózgu. Dla jasności, podzielone zostały na ośrodki o dominującym wkładzie w powstawanie pobudzenia seksualnego (ang. *sexual arousal*) oraz motywacji seksualnej (ang. *sexual motivation*).

Do struktur bezpośrednio zaangażowanych w powstawanie pobudzenia seksualnego (którego miarą jest erekcja prącia) należą:

MeA (przyśrodkowe jądro ciała migdałowatego) (Kondo i Arai, 1995; Bialy i Sachs, 2002, Kondo i Sachs, 2002) wraz z BNST (jądro łożyskowe prążka krańcowego) (Emery i Sachs, 1976; Liu i wsp., 1997), kompleksy PVN (jądro okołokomorowe podwzgórza) i VMH (jądra brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza) (Simerly i wsp., 1990; Harding i McGinnis, 2003), a także pniowe nPGI (jądro olbrzymiokomórkowe), NR (jądra szwu) oraz PAG (istota szara okołowodociągowa) (Yells i wsp., 1992; Murphy i wsp., 2001) Ponadto sterujące z poziomu rdzenia ośrodki erekcji i ejakulacji.

Struktury związane silnie z motywacją seksualną:

MPOA (przyśrodkowe pole przedwzrokowe) (McGinnis i Kahn, 1997; Dominguez i Hull, 2005; Paredes, 2003) oraz VMH (brzuszno-przyśrodkowe jądra podwzgórzowe) (Hull i wsp., 2002; Hull i Dominguez, 2007), znajdujące się w śródmózgowiu VTA (pole brzuszne nakrywki) i jego połączenia z NAcc (jądro półleżące), a także pozostałe połączenia układu mezolimbicznego i mezokortykalnego. Struktury te aktywowane są w szeregu zachowań motywacyjnych.

Do innych struktur istotnych dla aktywności seksualnej zaliczyć możemy przede wszystkim ośrodki wzbudzenia ogólnego, z których kluczowe jest jądro olbrzymiokomórkowe (Pfaff i wsp. 2012). Ponadto, ze względu jednak na wspomnianą ilość czynników wpływających na powstawanie wzorców, struktury nieswoiste aczkolwiek często o krytycznym znaczeniu, obejmują znaczną część struktur układu motoryki, drogi transmisji i integracji układów sensorycznych (w tym struktury korowe), oraz ośrodki regulacji autonomicznej.

Seksualne parametry behawioralne:

Początek współczesnych badań związanych z zachowaniami seksualnymi w modelach zwierzęcych można przypisać pracom eksperymentalnym z początku XX wieku. Dotyczą one głównie regulacji cyklu rujowego u samic (Joseph i McLean, 1922). Artykuły z lat 30-tych, zawierały już protokoły doświadczalne zapoczątkowujące współczesną, wiarygodną standaryzację badań w modelu szczurzym (Anderson, 1936; Beach, 1938). Rozwinięcie modelu przyniosły eksperymenty Franka Beach' a z wykorzystaniem tych protokołów (Beach, 1942a,b), dodatkowo wskazując na istnienie niezależnych ośrodków OUN sterujących odrębnymi fazami aktywności seksualnej (Beach, 1942c; Beach i Jordan, 1956). Konsekwentnie Beach i jego współpracownicy, w poszukiwaniu pętli neuronalnych sterujących zachowaniem seksualnym, zainteresowali się oddziaływaniem hormonów

płciowych na OUN (Beach, 1946; Beach i Holtz-Tucker, 1949). Otworzyło to możliwości powiązania strukturalno-czynnościowego pomiędzy działaniem struktur OUN a obserwowalnymi efektami behawioralnymi.

Zapoczątkowane przez Beach'a eksperymentalne podejście do problematyki behawioru seksualnego doprowadziło do wyszczególnienia jego elementarnych części składowych i parametryzacji tego zachowania (Larsson, 1956; Sachs i Barfield, 1976; Sachs, 1978; Pfaus i wsp., 1990). Podstawowy podział faz aktywności seksualnej wyróżnia: fazę przygotowawczą (ang. *anticipatory*), inicjację kopulacji (ang. *initiation*), kopulację (ang. *copulation*), oraz okres poejakulacyjny (ang. *postejaculatory interval*).

W typowym układzie eksperymentalnym faza pierwsza przygotowawcza rozpoczyna się od wpuszczenia samca do klatki, w której pod koniec tej fazy (zwykle po upływie 5 minut) umieszczana jest receptywna samica. W ciągu tego czasu samiec aktywnie eksploruje przestrzeń klatki, czemu mogą towarzyszyć wspięcia na tylnych kończynach (ang. *rearing*). Faza ta kończy się wraz z wpuszczeniem samicy. W fazie tej można obserwować wokalizację w paśmie 50-kHz, której liczebność narasta wraz z nabywaniem doświadczenia seksualnego i pamięci stanów emocjonalnych opartych o nagradzające właściwości kontaktów socjoseksualnych (Bialy i wsp., 2000).

Faza inicjacji kopulacji rozpoczyna się od pojawienia się samicy (wpuszczeniem jej do klatki przez eksperymentatora), a kończy rozpoczęciem krycia. W tym czasie zwierzęta badają się nawzajem. Dla samca szczura ważne są bodźce zapachowe pochodzące od samicy (typowo samiec obwąchuje okolice ano-genitalne samicy, badając jej receptywność), jak również zachowania samicy, które wskazują na jej pobudzenie seksualne; wyróżnia się w zachowaniu samicy charakterystyczne wzorce ruchowe (przeskakiwanie i zamieranie w bezruchu, strzyżenie uszami) i wokalne (Sachs i Barfield, 1976). Równoległe do mierzenia parametrów aktywności samców, istnieje możliwość opisu behawioru samicy. Ze względu na ograniczoną objętość opracowania ich parametry nie są dokładnie dyskutowane. Warto jednak zauważyć, że parametry dzielone są na związane z receptywnością (fizjologiczny potencjał do zapłodnienia, związany z hormonalnym przygotowaniem układu rozrodczego), oraz proceptywnością (rozumianą jako behawioralne sygnały odbierane przez samca, informujące, że samica jest receptywna). Receptywność w warunkach eksperymentalnych mierzona jest poprzez obserwację występowania lordozy czyli wygięcia grzbietowego (ang. *lordosis*). Kluczowym parametrem opisującym zachowanie receptywne jest częstość występowania lordozy (procent występowania lordozy) we wszystkich próbach podczas krycia czy stymulacji mechanicznej boków. Może być weryfikowana dodatkowo przez histologiczny wymaz pobierany z pochwy samicy oraz mierzenie bioimpedancji pochwy (Chesney i wsp., 2020). Do proceptywności zaliczamy

parametry określane jako m.in. strzyżenie uszami (ang. *ear-wiggling*), „podskoki” często w formie „przeskoków” nad samcem (ang. *hopping*), szybkie „zrywy/ucieczki” (ang. *darting*). (Hliniak i Madlafousek, 1977). Częstość występowania lordozy koreluje pozytywnie z zachowaniami proceptywnymi, stąd u samic aktywność seksualną możemy opisywać tym jednym parametrem (Pfaff, 2017).

Bodźce docierające od samicy prowadzą obok wzrostu ogólnego pobudzenia i motywacji seksualnej oraz do kluczowego dla możliwości kopulacji wzrostu podniecenia seksualnego. W konsekwencji, po osiągnięciu hipotetycznie zakładanego progu inicjacyjnego, do rozpoczęcia krycia. Krycie (ang. *mounting*) może być jedynie motoryczną reakcją „wspinania się” na samicę z wykonywanymi szybkimi ruchami miednicą lub wspinaniem się połączonym z erekcją prącia i penetracją pochwy (ang. *intromission*). Szczury naiwne seksualnie oraz te z obniżoną motywacją seksualną mają znacząco wydłużoną fazę inicjacji kopulacji (Beach, 1942; Sachs i Barfield, 1976; Biały i wsp., 2000). Inicjacja zachowań seksualnych mierzona latencją mountingu czy latencją intromisji wydaje się być niezależnym elementem zachowań w stosunku do samej kopulacji (Beach i Jordan, 1956; Sachs, 1978; Dewsbury, 1979; Pfaus i i wsp., 1990).

Faza kopulacyjna w warunkach fizjologicznych trwa od kilku do kilkunastu a czasami kilkudziesięciu minut do osiągnięcia ejakulacji. Samce szczurów w trakcie dłuższej trwającej sesji są w stanie wykonać wiele serii kopulacyjnych tzn. osiągnąć kilka ejakulacji. Stanowi to możliwość prowadzenia doświadczeń w niedyskutowanym tutaj modelu wyczerpania seksualnego (Rodriguez-Manzo i Fernandez-Guasti, 1994, 2003; Estrada-Reyes i wsp., 2009; Garduno-Gutierrez i wsp., 2013). W trakcie jednej serii kopulacyjnej dochodzi typowo do kilkunastu kryć, z których części towarzyszy intromisja. U szczurów intromisja trwa krótko - zwykle poniżej sekundy, po czym samiec przygotowuje się do kolejnego krycia. Warunkiem niezbędnym do wystąpienia intromisji jest skoordynowana odpowiedź motoryczna mountingu z odruchowymi erekcjami. W trakcie krycia samiec wskakuje na grzbiet samicy, ściskając jej korpus przednimi łapami. Receptywna samica pod wpływem nacisku pogłębia krzywiznę lędźwiową, zwiększając dostęp genitalny, są to wspomniane wcześniej lordozy. W tym czasie samiec wykonuje kilka pozorowanych, gwałtownych (do 40 ms pomiędzy pchnięciami) ruchów miednicą przy niepełnej erekcji. Jeżeli dojdzie do kontaktu genitalnego, następuje wypełnienie ciał jamistych oraz ciała gąbczastego prącia krwią z naczyniorozszerzającym udzialem tlenu azotu pochodzenia śródbłonkowe i z zakończeń nerwowych przy następczym skurczem mięśni poprzecznie prążkowanych (m. *bulbospongiosus*, m. *ischiocavernosus*). Skutkuje to gwałtowną w przebiegu, pełną erekcją. Skoordynowanie tych procesów umożliwia wprowadzenie prącia do pochwy. Jest to widoczne eksperymentalnie, jako pogłębiony (do 400 ms) ruch miednicą. Jeżeli doszło do wystąpienia erekcji i konsekwentnie

intromisji, samiec oddziela się od samicy (najczęściej towarzyszy temu odblokowanie ucisku boków samicy i odskoczenie do tyłu. Następnie samiec aktywnie zmniejsza stopień erekcji poprzez wylizywanie prącia (ang. *genital grooming*). Po intromisji obserwowana jest przerwa trwająca od kilkudziesięciu sekund do kilku minut, po której następuje kolejna seria mountingów aż do następnej skutecznej intromisji. Po ok. 2-20 intromisjach dochodzi do ejakulacji. Zjawisko to widoczne jest dla obserwatora jako pogłębiona, dłużej trwająca intromisja (około 2s) i zwolnienie uścisku boków samicy z charakterystycznym rozłożeniem przednich kończyn na boki. Sama kopulacja opisywana jest dodatkowo przez trzy grupy parametrów, stosunkowo słabo ze sobą skorelowanych (Sachs, 1978; Pfaus i i wsp., 1990). Wskazuje to na odrębność pętli neuronalnych uczestniczących w ekspresji opisywanych przez nie elementów kopulacji. Pierwsza grupa opisuje efektywność kopulacji i należą tutaj takie parametry jak latencja ejakulacji (EL - czas od pierwszej intromisji do ejakulacji) oraz długość przerw pomiędzy intromisjami (III). Druga grupa reprezentowana przez liczbę intromisji potrzebnych do osiągnięcia ejakulacji (NI- liczba intromisji) opisuje poziom stymulacji genitalnej potrzebnej do osiągnięcia ejakulacji. Trzecia grupa, określa możliwości wystąpienia intromisji i zmienia się wraz z zaburzeniami erekcji. Kluczowy parametrem jest tutaj parametr IR (ang. *intromission ratio*) określający stosunek liczby intromisji (NI), do łącznej sumy mountingów (NM) i intromisji:
$$IR = \frac{NI}{NM+NI}.$$

Pierwszy okres poejakulacyjny trwa zwykle ok. 5 minut (4-10 minut). Jeżeli szczur osiąga kilka ejakulacji, kolejne okresy poejakulacyjne ulegają wydłużeniu (Sachs i Barfield, 1976). Okres ten podzielono umownie na tzw. refrakcję bezwzględną i względną (Beach i Holtz-Tucker, 1949). W okresie refrakcji bezwzględnej współwystępuje z wokalizacją ultradźwiękową w paśmie 22-kHz. Słabe bodźce bólowe, które zwykle aktywują kopulację (Barfield i Sachs, 1968) nie skracają tego okresu. Natomiast te same bodźce aktywujące są efektywne w reaktywowaniu kopulacji po zaprzestaniu wokalizacji w paśmie 22-kHz. Stąd umownie przyjmuje się ten okres, jako okres refrakcji względnej (Sachs i Barfield, 1976). W okresie refrakcji bezwzględnej samiec oddala się od samicy, a jego aktywność motoryczna maleje często do zaniechania poruszania się, natomiast w okresie refrakcji względnej aktywność motoryczna i poszukiwawcza samca narasta (Dewsbury, 1967). Koniec okresu poejakulacyjnego wyznaczany jest przez pierwszą intromisję (czasami może to być mounting) po ejakulacji, prowadząc do rozpoczęcia następnego cyklu kopulacyjnego. Kopulujący samiec w ciągu jednej sesji jest w stanie osiągnąć do 8, czasami do 10 ejakulacji (Larsson, 1956; Sachs i Barfield, 1976; Oliver i wsp., 2022).

Zależność erekcji od kontekstu, Model NCE:

Ze względu na złożoność fizjologiczną zjawiska erekcji, do parametryzowania tego odruchu u szczurów, zaproponowano kilka modeli odzwierciedlających odmienne pętle neuronalne sterujące tym odruchem, zależne od różnych kontekstów behawioralnych oraz zróżnicowanej regulacji hormonalnej (Sachs, 2000). Przykładowo:

- U szczurów erekcja w trakcie kopulacji (intromisja) sterowana jest przez MPOA a efektywnie przywracana jest po kastracji terapią opartą o testosteron i estradiol (Meisel i wsp., 1984)
- Erekcje bez-kontaktowe (ang. *non-contact erection*) będące odpowiednikiem ludzkich erekcji psychogennych, stanowią model erekcji związanych z podnieceniem seksualnym, w większym stopniu zależą od MeA i androgenów (T i DHT) a nie estradiolu (Biały i Sachs, 2002; Kondo i Sachs, 2002; Cooke i wsp., 2003).
- Erekcje wywoływane eksperymentalną stymulacją czuciową okolic okołogenitalnych (ang. *ex-copula*) a hamowane przez wyższe piętra OUN, gdyż po przecięciu rdzenia kręgowego znacząco łatwiej jest je wywołać (Hart i wsp., 1983; Meisel i Sachs, 1980), przywracane są po kastracji poprzez terapię androgenami (T i DHT) ale nie estradiolem (Meisel i wsp., 1984)
- Erekcje spontaniczne u szczurów bez uchwytnych źródeł stymulacji zależą od stymulacji neuronów wydzielających oksytocynę z neuronów znajdujących się w jądrze przykomorowym podwzgórza (PVN) (Melis i Argiolas, 2021).

W celu uzyskania modelu erekcji bez-kontaktowych u szczurów Benjamin Sachs zaproponował model tzw. klatki NCE (ang. *Non-Contact Erection*) (Sachs i wsp., 1994). Wykorzystuje się ją jako narzędzie pozwalające mierzyć w postaci odrębnego parametru ilość erekcji bez-kontaktowych u szczurów, jednocześnie modyfikując modalności sensoryczne docierające do zwierzęcia. Daje to możliwość kontrolowania środowiska sensorycznego kluczowego dla podniecenia seksualnego. Model NCE rozbudowaliśmy w celu oceny wokalizacji ultradźwiękowej (Biały i wsp., 2019) a następnie indywidualnej analizy wokalizacji ultradźwiękowej emitowanej przez samca i samicę (praca nr 3 w prezentowanym cyklu).

Faza aktywności seksualnej + model NCE	Nazwa parametru wraz mierzoną wartością	Definicja
1. Faza przygotowawcza (<i>Anticipatory phase</i>)	Wspięcia (ang. <i>Rearing</i>) (n)	liczba wspięć na tylnych łapach
	Zmiany poziomu klatki (ang. <i>Bilevel/Multilevel change</i>) (n)	Ilość przejść pomiędzy różnymi poziomami wielopoziomowej klatki
	Czas obwąchiwania (ang. <i>Sniffing</i>) (s)	Czas obwąchiwania, w zależności od modelu możliwe rozróżnienie m.in. zapachów atraktantowych od innych
	Czas aktywnej eksploracji (s)	Pomiar całkowitej aktywności motorycznej samca
2. Inicjacja kopulacji (<i>Initiation of copulation</i>):	Latencja mountingu (ML) (ang. <i>Mount Latency</i>) (s)	Czas od wpuszczenia samicy do pierwszego krycia
	Latencja intromisji (IL) (ang. <i>Intromission Latency</i>) (s)	Czas od wpuszczenia samicy do pierwszego krycia efektywnego (z intromisją)
3. Kopulacja (<i>Copulation</i>):	Latencja ejakulacji (EL) (ang. <i>Ejaculation Latency</i>) (s), III - (ang. <i>Inter Intromission Interval, brak polskiego odpowiednika</i>) (s)	Czas od pierwszej intromisji do pierwszej ejakulacji Długość przerwy pomiędzy intromisjami Oba parametry odzwierciedlają tzw. efektywność kopulacji
	Liczba intromisji (NI) (ang. <i>Number of Intromissions</i>) (n)	Liczba intromisji określająca stopień stymulacji genitalnej potrzebnej do osiągnięcia ejakulacji
	IR (ang. <i>Intromission ratio, brak polskiego odpowiednika</i>) (n)	Określa prawdopodobieństwo wystąpienia erekcji, liczona ze wzoru: $IR = NI / (NM + NI)$.
4. Okres Po ejakulacyjny (PEI)	Latencja intromisji po ejakulacji (PEIL) (ang. <i>Post-Ejaculatory Intromission latency</i>) (s)	Czas mierzony od ejakulacji do pierwszej intromisji w następnym cyklu

(ang. <i>Postejaculatory Interval</i>)		
	Latencja mountingu po ejakulacji (PEIM) (ang. <i>Post-Ejaculatory Mounting Latency</i>) (s)	Czas mierzony od ejakulacji do pierwszego mountingu w następnym cyklu
Model Noncontact (NCE)	No. NCE (ang. Number of Non-Contact Erections) (n)	Liczba erekcji bez kontaktowych w trakcie jednej sesji
	NCEL (ang. first Non-Non-Contact Erection Latency) (s)	Czas do wystąpienia pierwszej erekcji bez kontaktowej

Tabela 2: Zestawienie najważniejszych klasycznych parametrów behawioralnych mierzonych w poszczególnych fazach aktywności seksualnej, oraz modelu NCE. Rozszerzenie tabeli w kontekście przedklinicznym wraz z dokładnym opisem zastosowania stanowi treść publikacji 1 z cyklu.

Problematyka wzbudzeniowa:

Ze względu na trwające w literaturze rozbieżności terminologiczne używane do opisu behawioru seksualnego, a także pewne niezgodności panujące w środowisku (Agmo, 2011) warto zdefiniować używane przez nas pojęcia.

W pracach posługujemy się pojęciem „sexual arousal”, które za Sachsem (Sachs, 2000) definiujemy jako pewien umowny poziom wzbudzenia struktur specyficznych dla reakcji seksualnych, umożliwiających przeprowadzenie tych procesów. Wzbudzenie seksualne rozumiemy więc jako całość procesów aktywacji, specyficznych dla reakcji seksualnych struktur OUN, prowadzących do odpowiedzi ze strony autonomicznych układów efektorowych uczestniczących w kopulacji (Sachs 2000). W praktyce, zjawisko najprościej jest zaobserwować w postaci widocznej erekcji. Polskim odpowiednikiem angielskiego pojęcia „sexual arousal” jest „wzbudzenie seksualne” lub „podniecenie seksualne”, przy czym to ostatnie ze względu na pewną niezgrabność semantyczną (w języku polskim „podniecenie” rozumiane jest jako seksualne) nie jest tutaj używane.

W przeciwieństwie do angielskiego terminu „sexual arousal” – wzbudzenia seksualnego, angielskie termin „general arousal” dotyczy poziomu responsywności zwierzęcia w odpowiedzi na bodźce, w tym inne niż seksualne, i może być obrazowany np. poprzez typowe zmiany w zapisie elektroencefalograficznym (EEG). Z fizjologicznego punktu widzenia determinujące „general arousal”

są centralne ośrodki wzbudzeniowe (pniowo-wzgorzowo-korowe) umożliwiające utrzymanie poziomu czuwania adekwatnego do istniejącej sytuacji. Odpowiedni poziom wzbudzenia ogólnego (ang. *general arousal*), jest w tej sytuacji nadrzędnym warunkiem możliwości osiągnięcia podwyższonego poziomu wzbudzenia seksualnego. Jednakże w trakcie obserwacji behawioralnej można wyodrębnić składowe wzbudzenia ogólne np. poprzez mierzenie aktywności motorycznej samca niezwiązanej z samicą (stymulowanych przez bodźce nie będące atraktantami seksualnymi np. jedzenie, zapach obcych osobników tej samej płci), lub poprzez substancje farmakologiczne działające przeciwnie na wzbudzenie ogólne i seksualne (np. psychostymulanty zwiększające aktywność eksploracyjną przy zaburzeniu erekcji, lub modulatory układu 5-HT_{1A} zmniejszające aktywność eksploracyjną przy krótszej latencji intromisji i ejakulacji).

Pojęcie motywacji ma wiele różnych definicji w zależności od eksperymentalnego modelu bazowego. Z behawioralnego punktu widzenia motywację seksualną zdefiniować można jako prawdopodobieństwo zaobserwowania reakcji umożliwiającej dążenie do wystąpienia interakcji seksualnych. Przedstawiając obrazowo różnicę pomiędzy tymi dwoma procesami: motywację seksualną określilibyśmy słowem „chcieć”, a miarą byłaby reakcja instrumentalna (Konorski, 1969; Beck, 1971) i współwystępująca u szczurów emocjonalna komponenta w fazie przygotowawczej - wokalizacja w paśmie 50-kHz (praca nr 2 cyklu) zależna od pamięci stanów emocjonalnych i właściwości nagradzających kontaktów seksualnych (Bialy i wsp. 2000). Wzbudzenie seksualne (*sexual arousal*) określilibyśmy z kolei słowem „móc”, odzwierciedlającą reakcję ze strony układu autonomicznego pojawiającą się po ekspozycji na dochodzące bodźce o charakterze seksualnym.

Ścisłe rozróżnianie tych procesów nie jest powszechne w literaturze naukowej, wymaga więc doprecyzowania parametrów opisujących te dwa zjawiska. Jednym z założeń przewodnich cyklu publikacji było więc przeprowadzenie analizy USV emitowanej przez szczury, pozwalającej na rozróżnienie ultradźwięków emitowanych w trakcie reakcji poszukiwawczej związanej z motywacją seksualną oraz wokalizacji związanej z testem behawioralnym badającym podwyższony poziom lub fluktuacje wzbudzenia seksualnego.

	GA	SA	SM
Faza przygotowawcza	H	L	H
Kopulacja	H	H	H
Okres poejakulacyjny	I	I	I
VOC-NCE	H	H	H

Tabela 3: Uprozczone zróżnicowanie omawianych składowych w różnych fazach aktywności seksualnej. H – poziom wysoki, L-niski, I – zmienny w trakcie; GA -wzbudzenie ogólne, SA- wzbudzenie seksualne, SM -motywacja seksualna (od niskiego od wysokiego) (z publikacji 3 cyklu, zmodyfikowana).

Wokalizacja ultradźwiękowa u szczurów (USV):

Najstarsze doniesienia o możliwości wykorzystywania ultradźwięków przez szczury pochodzą z lat 40 XX wieku. W tym czasie, ze względu na ograniczenia technologiczne udowodniono jedynie zdolność szczurów do odbierania sygnałów między 20-kHz a 60-kHz (Gould i Morgan, 1941, 1942; Gourevitch i Hack, 1966). Pierwsza udana rejestracja emisji u szczurów została zaprezentowana przez Andersona w 1954 r. (Anderson, 1954), natomiast u myszy w 1956 r. (Zippelius i Schleidt, 1956). Lata 60-te przyniosły wzrost ilości publikacji, do czego przyczynił się rozwój technik rejestracji ultradźwiękowych opartych o systemy detekcji nietoperzy (tzw. bat-detectors) (Pye i Finn, 1964). Umożliwiły one opisanie wokalizacji u wielu gatunków gryzoni i innych małych ssaków: myszy (*Mus musculus*) (Allin i Banks 1971; Bell i wsp., 1972), chomika syryjskiego (*Mesocricetus auratus*) (Okon, 1971), gerbili (Elwood, 1979) i innych gryzoni (Sewell, 1970; Begg, 1976).

W przypadku szczurów doświadczenia wykazały istnienie wokalizacji u osesków w okresie krytycznego kształtowania homeiothermi, wskazując na silną komponentę autonomicznej odruchowości, wyzwalanej przez swoiste bodźce: termiczne, czuciowe, zapachowe (Allin i Banks, 1971; Oswalt i Meier, 1975). Jednocześnie uwidoczniono to wrodzoną, aczkolwiek zróżnicowaną

osobniczo zdolność do emisji ultradźwiękowej (Whitney, 1970; Bell i wsp., 1972; Graham i Letz, 1979). Doświadczenia tego okresu wskazały również na możliwość funkcji komunikacyjnej wokalizacji szczurów w przypadku osesków (Allin i Banks, 1972; Bell i wsp., 1974; Conely i Bell, 1978; Hofer i Shair, 1978).

Całość doprowadziła do wyodrębniania równoległych, komplementarnych podejść w użyciu modeli zwierzęcych w badaniach nad wokalizacją. Do najpopularniejszych z nich zaliczamy:

- USV u osesków i form młodocianych zarówno szczurów jak i myszy, wskazując na wokalizację jako parametr w trakcie reakcji poszukiwawczych i afiliacyjnych w układach matka – potomstwo (Walker i wsp., 2003; Barron i Gilbertson, 2005; Saucier i wsp., 2008; Shair i wsp., 2015; Tesdahl i wsp., 2017; Guma i wsp., 2021).

- USV form dorosłych innych gryzoni niż szczury, myszy (Burke i wsp., 2018; Warren i wsp., 2018; Fyke i wsp., 2021; Kikusui i wsp., 2021; Caruso i wsp., 2022), gerbili (Holman i wsp., 1991, 1995; Zaytseva i wsp., 2019, 2020; Yu i wsp., 2020) i różnych gatunków chomika (Floody i wsp., 1987, 2009; Keesom i wsp., 2015; Rendon i wsp., 2015).

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, cytowane w dalszej części pracy odnoszą się do wokalizacji ultradźwiękowej emitowanej przez dorosłe szczury. Szczegółowy opis wyników doświadczeń przy użyciu innych modeli gatunkowych wykracza poza ramy tego opracowania warto jednak zwrócić uwagę, że ze względu na zakładaną wysoką homologię ewolucyjną struktur uczestniczących w generowaniu wzorców neurobehawioralnych pomiędzy różnymi gatunkami gryzoni, stanowią one komplementarne źródło wiedzy (Sales i Pye, 1974; Fernandez-Vargas, 2018).

Stosując ośrodkowe podania farmakologiczne, Brudzynski (2015) zaproponował prosty podział wokalizacji szczurów na dwa podstawowe typy. Uwzględnia on subiektywną komponentę emocjonalną szczurów towarzyszącą emisji. I tak, stymulacja cholinergiczną karbacholem w podaniu podwzgórzowym (MPOA/AH) inicjowała wokalizację w paśmie 22-kHz (Brudzynski & Bihari 1990; Brudzynski i wsp., 1991; Brudzynski, 1994). Wokalizacja ta została również zaobserwowana w trakcie zachowań agresywnych (Sales, 1972; Vivian i Miczek, 1993), indukcji bólu (Calvino i wsp., 1996; Naito i wsp., 2006; Burgdorf i wsp., 2019), a także pod wpływem gwałtownych uderzeń powietrza w nozdrza szczura (ang. air-puff) (Inagaki i Mori 2014; Browning i wsp., 2017). Z tego względu utożsamiana jest z reakcjami awersyjnymi.

Z kolei obwodowe i ośrodkowe podania agonistów układu dopaminergicznego nasilały ekspresję w paśmie 50-kHz, podczas gdy antagonizacja zmniejsza intensywność tej wokalizacji (Brudzynski i wsp. 2011; Williams i Undieh 2016; Silkstone i Brudzynski, 2020). Emisja 50-kHz towarzyszy takim

reakcjom jak m.in: zachowania agresywne (Burgdorf i wsp., 2009; Burke i wsp., 2017a), zabawa z eksperymentatorem (Burgdorf i wsp., 2005; Panksepp i Burgdorf 2010; Bombail i wsp., 2021), zabawy u form młodocianych (Lukas i Wöhr, 2015; Seffer i wsp., 2015; Burke i wsp., 2017b), reakcje poszukiwawcze związane z jedzeniem (Brenes i Schwarting, 2014, 2015; Mateus-Pinheiro i wsp., 2014) i nie-seksualne interakcje socjalne (Wöhr i wsp., 2017; Seidisarouei i wsp., 2021), a także wspomniana wokalizacja osesków. Wymienione obserwacje doprowadziły do przypisania wokalizacji 50-kHz pozytywnej komponenty emocjonalnej, natomiast wokalizacji 22-kHz negatywnej (Burgdorf i wsp., 2005; Brudzynski, 2021). Niezależnie jednak od interpretacji psychologicznej oraz socjobiologicznej, do dnia dzisiejszego przeprowadzono szereg eksperymentów farmakologicznych, w których analizowany był parametr wokalizacyjny szczurów. Do przykładowych należą doświadczenia z

-agonistów i antagonistów układu dopaminergicznego w tym leków przeciwpsychotycznych (Brudzynski i wsp., 2012; Ringel i wsp., 2013; Scardochio i Clarke, 2013; Buck i wsp., 2014a; Watson i wsp., 2016; Shimoju i Shibata, 2021)

-innych substancji o dominujących właściwościach psychostymulujących: kokainy (Mutschler i Miczek, 1998; Mu i wsp., 2009; Barker i wsp., 2010; Ma i wsp., 2010; McMurray i wsp., 2013; Williams i Undieh, 2016; Montanari i wsp., 2020), kofeiny (Simola i wsp., 2010), amfetaminy (Hamed i wsp., 2016; Mulvihill i Brudzynski, 2018; Kuchniak i wsp., 2019; Lawson i wsp., 2021; Wöhr, 2021), mefedronu (Philogene-Khalid i wsp., 2017).

-substancji o powinowactwie do receptorów GABA w tym etanolu (Knapp i wsp., 1997; Willey i Spear, 2014; Thakore i wsp., 2016; Mittal i wsp., 2019, 2020; Shahrier i Wada, 2020) i benzodiazepin (Miczek i Vivian 1993; Vivian i wsp., 1994; de Oliveira Guaita i wsp., 2018; Sanchez i wsp., 2022)

- opioidów wraz ze swoistymi antagonistami (Vivian i Miczek, 1991; 1993; Shepherd i wsp., 1992; Haney i Miczek, 1994; Nazarian i wsp., 2001; Covington 3rd i Miczek, 2003; Wöhr i Schwarting, 2009; Avvisati i wsp., 2016; Best i wsp., 2017)

-związków modulujących aktywność układu 5-HT, w tym powszechnie używanych leków przeciwdepresyjnych (Olivier i wsp., 1998; Schreiber i wsp., 1998; Sánchez, 2003; De Vry i wsp., 2004; Bardin i wsp., 2010; Zimmerberg i Germeyan, 2015; Machado Figueiredo i wsp., 2019)

-substancji o działaniu cholinolitycznym (Brudzynski, 1994; Brudzynski i Barnabi, 1996; Schildein i wsp., 2000; Silkstone i Brudzynski, 2019; Rojas-Carvajal i wsp., 2022) i cholinomimetycznym (Simola i wsp., 2014; Swalve i wsp., 2019; Wang i wsp., 2020)

-substancji o powinowactwie do układu adrenergicznego (Hård i wsp., 1988; Blumberg i wsp., 2000; Farrel i Alberts, 2000; Blumberg i wsp., 2002; Krall i wsp., 2005)

-modelach ekspozycji toksykologicznej prenatalnej i perinatalnej (Pocock i wsp., 2002; Blumberg i wsp., 2002; Morales-Navas i wsp., 2020) oraz postnatalnej (Cagiano i wsp., 1987; Varga i wsp., 2015)

Dodatkowo z wykorzystaniem protokołów behawioralnych zaproponowano wykorzystanie USV szczurów jako parametru do opisu szczurzych modeli:

- uzależnień (Maier i wsp., 2010; Williams i Undieh, 2010; Barker i wsp., 2014; Buck i wsp., 2014b; Taracha i wsp., 2015; Chang i wsp., 2019)

- autyzmu (Zhang-James i wsp., 2014; Cezar i wsp., 2018; Scattoni i wsp., 2018; Bigelow i wsp., 2022)

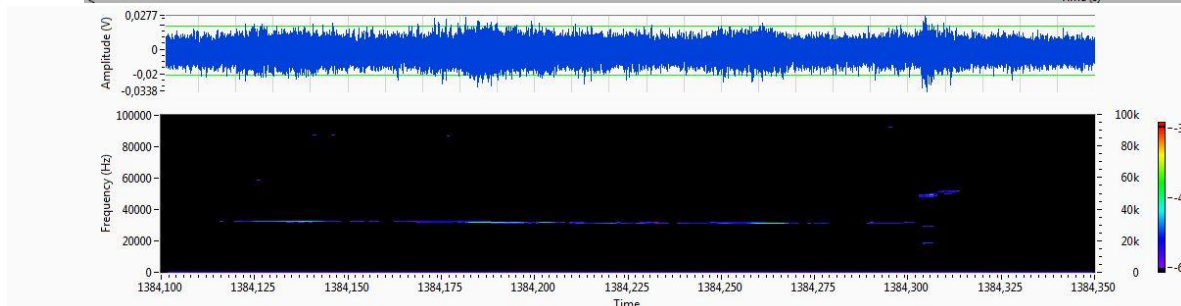
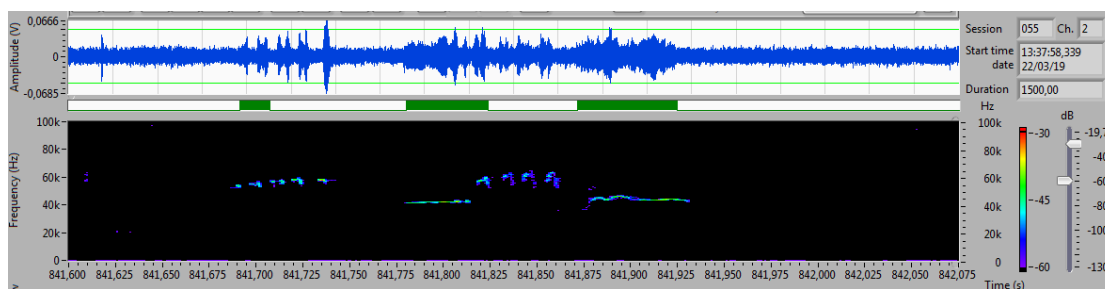
- depresji/lęku/PTSD (Borta i wsp., 2006; Hodgson i wsp., 2008; Yee i wsp., 2012; Willadsen i wsp., 2018; Emmerson i wsp., 2020; Reyes i wsp., 2021)

- choroby afektywnej dwubiegunowej oraz psychoz (Boulay i wsp., 2013; Engelhardt i wsp., 2017; Potasiewicz i wsp., 2019; Krug i wsp., 2020; Kanazawa i wsp., 2021)

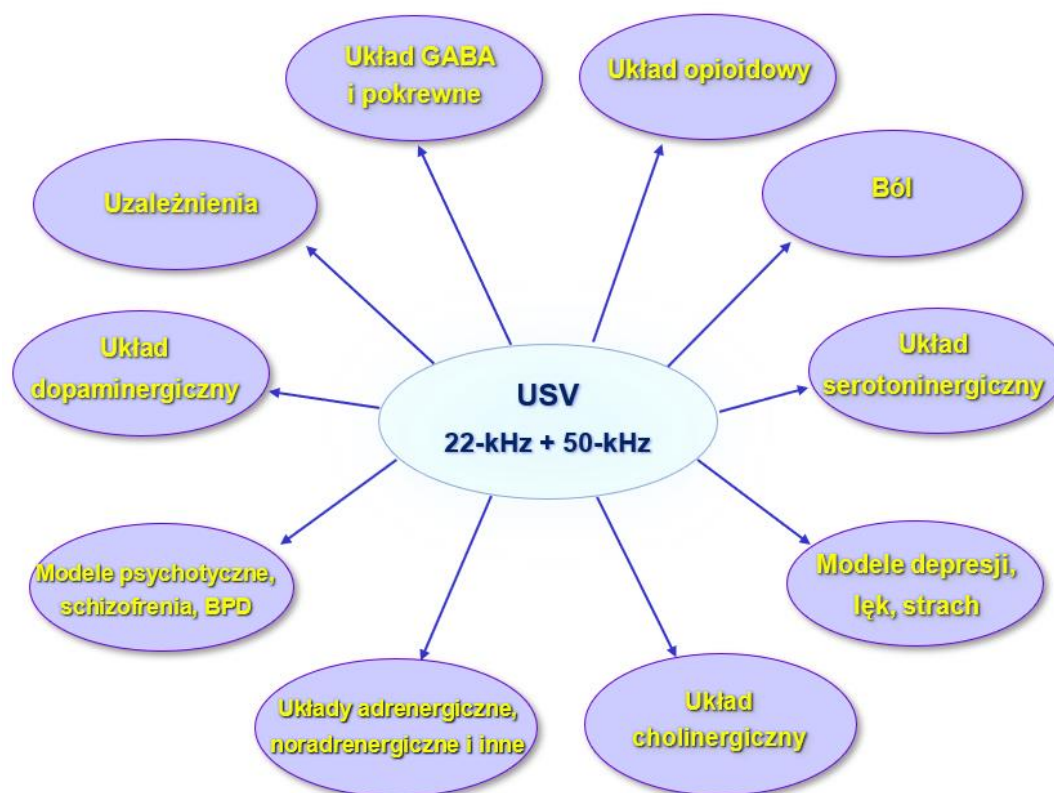
- bólu, w tym modele analgetyczne (Calvino i wsp., 1996; Han i wsp., 2005; Aleman-Laporte i wsp., 2020)

- zaburzeń neurodegeneracyjnych i otępień (Ciucci i wsp., 2008, 2010; Johnson i wsp., 2011; Kelm-Nelson i wsp., 2016).

Całościowo obrazuje to ugruntowana przynależność wokalizacji ultradźwiękowej jako parametru wykorzystywanego w badaniach biomedycznych uzasadniając dalsze prowadzenie badań nad tym zjawiskiem z perspektywy przedklinicznej.



Rycina 1. Przykładowe zarejestrowane sygnały ultradźwiękowe w naszej pracowni. Na górze modulowana częstotliwościowa emisja tzw. 50-kHz, na dole tzw. wokalizacja 22-kHz z modulowanym elementem kończącym. (system rejestracji i analizy Sonotrack R.)



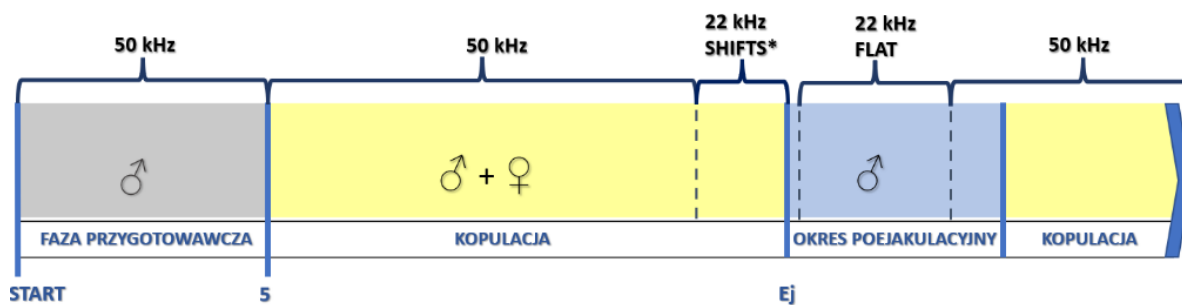
Rycina 2: Uproszczony schemat obrazujący rozpiętość zastosowania wokalizacji ultradźwiękowej szczurów w badaniach psychofarmakologicznych.

USV i behavior seksualny:

W przypadku reakcji socjoseksualnych u szczurów, uwagę badaczy od początku przykuło zjawisko wokalizacji w trakcie okresu poejakulacyjnego. Wokalizacja ta obejmuje ok 3/4 całkowitego czasu pierwszego PEI (Barfield i Geyer, 1972, 1975), co wydaje się korespondować z okresem refrakcji bezwzględnej (Sachs i Barfield 1976). W przeciwieństwie do krótkich (10-50 ms) sygnałów o fluktuujących częstotliwościach w paśmie 40-50-kHz obserwowanych w trakcie innych interakcji, wokalizacja poejakulacyjna (22PE) charakteryzuje się niższą i relatywnie stałą (nie-modulowaną) częstotliwością (około 22-kHz), oraz dłuższym czasem poszczególnych sygnałów (100 ms-3 s). Potwierdziło to prezentowany wcześniej dualizm częstotliwościowy wokalizacji u szczurów, występujący w trakcie interakcji seksualnych i agresywnych (Sales, 1972). Przy czym emisja 22PE zależy od stymulacji hormonalnej (Sachs i wsp., 1973; Parrot i Barfield, 1975; Parrot, 1976), bodźców od proceptywnej samicy (Barfield i Thomas 1986, Sachs i Bialy, 2002), numeru ejakulacji w sesjach wieloejakulacyjnych do wyczerpania seksualnego (Brown, 1979). Otrzymane wyniki skłoniły również badaczy do zaproponowania potencjalnej roli socjobiologicznej emisji 22PE (funkcja komunikacyjna): „desist-contact” (emisja jako unikanie kontaktu socjoseksualnego) (Anisko i wsp., 1978); hipoteza dostrajania seksualnego (McIntosh i wsp., 1978); hipoteza „rywalizacji seksualnej” (wokalizacja w kształtowaniu hierarchii) (Barfield i Thomas, 1986), hipoteza termoregulacyjna (powolny wydech generujący USV jest efektem chłodzenia mózgu) (Blumberg i Moltz, 1987,1988; Blumberg i Alberts, 1991). Żadnej z zaproponowanych hipotez nie udało się udowodnić w sposób dostateczny. Dalsze doświadczenia wskazały na zależność 22PE od stymulacji dopaminergicznej (zmniejszenie emisji pod wpływem agonizacji D2 i w mniejszym stopniu D1) (Cagiano i wsp. 1989, Beck i wsp., 2002). Podobnie agonizacja receptorów 5-HT1A istotnie zmniejsza 22PE, skracając również latencje intromisji i ejakulacji (Mos i wsp., 1991), hamująco również działało ośrodkowe podanie antagonisty receptora GABAA (Fernandez-Guasti i wsp., 1985). Ponadto przeprowadzone przy udziale autora cyklu doświadczenie wykazało, że hamująco na ekspresję działają również zapachy obcych samców (Bialy i wsp., 2016). Całość wyników wskazuje na silną zależność między odpowiedzią ośrodkową występującą w trakcie okresu poejakulacyjnego w tym głównie w czasie okresu refrakcji bezwzględnej, a 22PE. Parametr ten daje więc możliwość analizowania gwałtownych zmian poziomu pobudzenia seksualnego (z definicji okresu refrakcji), jak i poziomu wzbudzenia ogólnego (widoczne jako wspomniane wrzeciona senne w EEG i spadek aktywności samca) (Barfield i Geyer, 1975).

Poza wokalizacją w paśmie 22-kHz interakcje socjoseksualne szczurów obfitują w emisję 50-kHz, występującą we wszystkich fazach aktywności, a także formy pośrednie o modulowanej częstotliwości 50-22-kHz (Bialy i wsp., 2019). Szczegółowy opis wraz z dyskusją tych częstotliwości stanowi treść publikacji 2 i 3.

FAZY AKTYWNOŚCI SEKSUALNEJ:



Rycina 3: Schemat obrazujący typowo rejestrowane ultradźwięki w trakcie aktywności seksualnej z podziałem na tzw. 50- i 22-kHz. (zmodyfikowane z publikacji 3 cyklu).

Doświadczenia prowadzone na modelu behawioru seksualnego są intensywnie rozwijaną dyscypliną w obrębie nauk fizjologicznych, o czym świadczy zarówno ilość artykułów jak i istotny wkład, który wniosły do wiedzy biomedycznej. Jednocześnie parametr wokalizacyjny, który przekroczył klasyczną dyscyplinarność związaną z tematyką etho-komunikacji i psychobiologii zaczął odgrywać ważną rolę w badaniach przedklinicznych. Symultaniczne stosowanie zarówno klasycznych parametrów behawioru seksualnego wraz z parametrem ultradźwiękowym może poszerzyć jakość prowadzonych badań i umożliwić lepsze zrozumienie otrzymywanych wyników. Celem publikacji wchodzących w skład cyklu było więc poprawienie jakości opisu parametru ultradźwiękowego w kontekście reakcji socjoseksualnych, w celu uzyskania lepszej translacyjności wyników.

Założenia i cele pracy

Publikacja 1:

Celem prezentowanej pracy przeglądowej było zaprezentowanie modelu behawioru seksualnego szczura, jako użytecznego narzędzia do prowadzenia podstawowych i przedklinicznych badań biomedycznych. Ze względu na interdyscyplinarność tematyki obejmującej zagadnienia klasycznego behawioryzmu, współczesnej wiedzy fizjologicznej w tym neurofizjologicznej, farmakologii i patologii klinicznej, istnieje konieczność prezentowania podobnych syntez. Ma to o tyle znaczenie, że w dużej ilości prac przeglądowych związanych z behawiorem seksualnym brakuje powiązania między wiedzą podstawową, a modelami chorobowymi. W pracy nacisk położony został na wykorzystanie klasycznych parametrów behawioralnych i wokalizacji ultradźwiękowej w kontekście ich użyteczności w modelach badań przedklinicznych.

Publikacja 2:

Celem przeprowadzonych eksperymentów był dokładny, uwzględniający poszczególne podtypy, opis wokalizacji ultradźwiękowej emitowanej przez samca szczura w celu walidacji przydatności emisji ultradźwiękowej jako parametru użytecznego w podstawowych i przedklinicznych badaniach biomedycznych. W trakcie przeprowadzonych eksperymentów poddano szczegółowej analizie wokalizację w tzw. fazie przygotowawczej (ang. *anticipatory behavior*), badając zależność pomiędzy poziomem motywacji seksualnej, a typem i ilością emitowanych ultradźwięków przez samców. Analiza dotyczyła USV w paśmie ok. 50-kHz, weryfikując przydatność proponowanego literaturowo podziału w obrębie tej grupy w trakcie analizy fazy przygotowawczej. Drugi typ w paśmie ok 22-kHz nie był analizowany ze względu na wysoce sporadyczną częstość jego występowania w trakcie fazy przygotowawczej. Analiza ilościowa sygnałów stanowiła próbę odpowiedzi na pytanie o zależność między wokalizacją w tym paśmie, a poziomem motywacji seksualnej, a także czy istnieje zależność między konkretnym podtypem ultradźwięków pasma 50-kHz a motywacją seksualną. Dodatkowym celem artykułu było porównanie profilu ultradźwiękowego uzyskanego przez dokładną (manualną, nie korzystano z automatycznej obróbki USV) analizę spektrogramów każdego szczura w celu określenia stopnia indywidualizacji zapisu. Jeżeli szczury wokalizowałyby w sposób znacząco różniący się istotnie od siebie, świadczyć by to mogło o indywidualnych charakterze wokalizacji i/lub spekulowanym zróżnicowaniu emocjonalnym

towarzyszącym wokalizacji. Jeżeli wokalizacja wyglądałaby podobnie, prawdopodobnie ma charakter bardziej odruchowy, ale o większym zastosowaniu predykcyjnym w konkretnym kontekście doświadczalnym, a w tym przypadku do mierzenia motywacji seksualnej.

Celem pracy było odpowiedzenie na pytania eksperymentalne:

1) Czy ilość ultradźwięków w fazie przygotowawczej odzwierciedla poziom motywacji seksualnej? 2) Czy ilość któregoś ze specyficznych podtypów ultradźwięków odzwierciedla ten poziom? 3) Czy wokalizacja przygotowawcza ma elementy swoiste dla tej fazy reakcji?

Publikacja 3:

Istotnym problemem w trakcie analizy ultradźwiękowej szczurów jest ustalenie źródła emisji, tzn. przypisanie emitowanych ultradźwięków do emitującego je osobnika. Do tej pory rozwiązaniem tego problemu było: nagrywanie pojedynczych, izolowanych osobników, sedacja jednego ze zwierząt w eksperymencie, próby pisania dedykowanego kodu umożliwiającego analizę wielokierunkowego sygnału przy wykorzystaniu wielu mikrofonów. Ograniczeniem pierwszej i drugiej metody jest deprywacja bodźcowa, szczególnie problematyczna w doświadczeniach socjoseksualnych. W przypadku metody trzeciej, aktualny brak komercyjnej dostępności systemu dedykowanego dla tego rozwiązania uniemożliwia popularyzację metody. Występuje konieczność odrębnego dostosowywania pisanego programu dla poszczególnych systemów rejestracji, obniżając jego stosowalność.

Celem pracy było uzyskanie wydajnej i wiarygodnej metody rozdziału, separacji USV, która pozwalałaby na przyporządkowanie konkretnych typów ultradźwiękowych do osobnika, i korelację tych zmian z innymi badanymi parametrami behawioralnymi. Zastosowano modyfikacje w klatce NCE (nazwanej jako VOC-NCE) stosując ekran akustyczny, dwa mikrofony i analizowano zapisy z tych dwóch źródeł.

PUBLIKACJA NR 1

*The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal
Models of Human Health Disorders.*

Michał Biały

Wiktor Bogacki-Rychlik

Jacek Przybylski

Tymoteusz Żera



The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders

Michał Biały^{1*}, Wiktor Bogacki-Rychlik¹, Jacek Przybylski² and Tymoteusz Zera¹

¹Department of Experimental and Clinical Physiology, Laboratory of Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland, ²Department of Biophysics and Human Physiology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Sanna,
University of Cagliari, Italy

Reviewed by:

Berend Olivier,
Utrecht University, Netherlands
José R. Eguibar,
Meritorious Autonomous University of
Puebla, Mexico

*Correspondence:

Michał Biały
michalbialy@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to
Motivation and Reward,
a section of the journal
Frontiers in Behavioral Neuroscience

Received: 30 July 2019

Accepted: 30 October 2019

Published: 26 November 2019

Citation:

Biały M, Bogacki-Rychlik W,
Przybylski J and Zera T (2019) The
Sexual Motivation of Male Rats as a
Tool in Animal Models of Human
Health Disorders.
Front. Behav. Neurosci. 13:257.
doi: 10.3389/fnbeh.2019.00257

Normal or dysfunctional sexual behavior seems to be an important indicator of health or disease. Many health disorders in male patients affect sexual activity by directly causing erectile dysfunction, affecting sexual motivation, or both. Clinical evidence indicates that many diseases strongly disrupt sexual motivation and sexual performance in patients with depression, addiction, diabetes mellitus and other metabolic disturbances with obesity and diet-related factors, kidney and liver failure, circadian rhythm disorders, sleep disturbances including obstructive sleep apnea syndrome, developmental and hormonal disorders, brain damages, cardiovascular diseases, and peripheral neuropathies. Preclinical studies of these conditions often require appropriate experimental paradigms, including animal models. Male sexual behavior and motivation have been intensively investigated over the last 80 years in animal rat model. Sexual motivation can be examined using such parameters as: anticipatory behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations reflecting the emotional state of rats, initiation of copulation, efficiency of copulation, or techniques of classical (pavlovian) and instrumental conditioning. In this review article, we analyze the behavioral parameters that describe the sexual motivation and sexual performance of male rats in the context of animal experimental models of human health disorders. Based on analysis of the parameters describing the heterogeneous and complex structure of sexual behavior in laboratory rodents, we propose an approach that is useful for delineating distinct mechanisms affecting sexual motivation and sexual performance in selected disease states and the efficacy of therapy in preclinical investigations.

Keywords: sexual motivation, general arousal, sexual arousal, ultrasonic vocalizations, depression, anxiety, metabolic disorders, male behavior

INTRODUCTION

Sexual interaction has been one of the most intensively studied appetitive behaviors over the last 80 years. Copulation differs between species, but detailed investigation of the mechanisms regulating the behavior of one species seems to be important from the perspective of comparative physiological research. Furthermore, effective sexual interactions involve activation of a sequence of behavioral patterns that depend on distinct brain structures, neural networks,

and neurotransmitters. The amygdala (A), bed nucleus of stria terminalis (BNST), medial preoptic area (MPOA), and central tegmental field/subparafascicular nucleus of the thalamus constitute the core central structures. They connect with the dopaminergic mesolimbic, mesocortical, and nigrostriatal tracts, lateral and ventromedial hypothalamus, paraventricular nucleus of the hypothalamus, ventral premammillary nucleus, midbrain periaqueductal gray, nucleus paragigantocellularis of the medulla, and autonomic regions of the spinal cord and regulate sexual motivation, arousal, and copulatory performance. Detailed analysis of neural networks and neurotransmitters in the context of sexual behavior is outlined in several recent reviews (Hull and Rodríguez-Manzo, 2017; Hill and Elias, 2018; Seizert, 2018; Le Moëne and Ågmo, 2019).

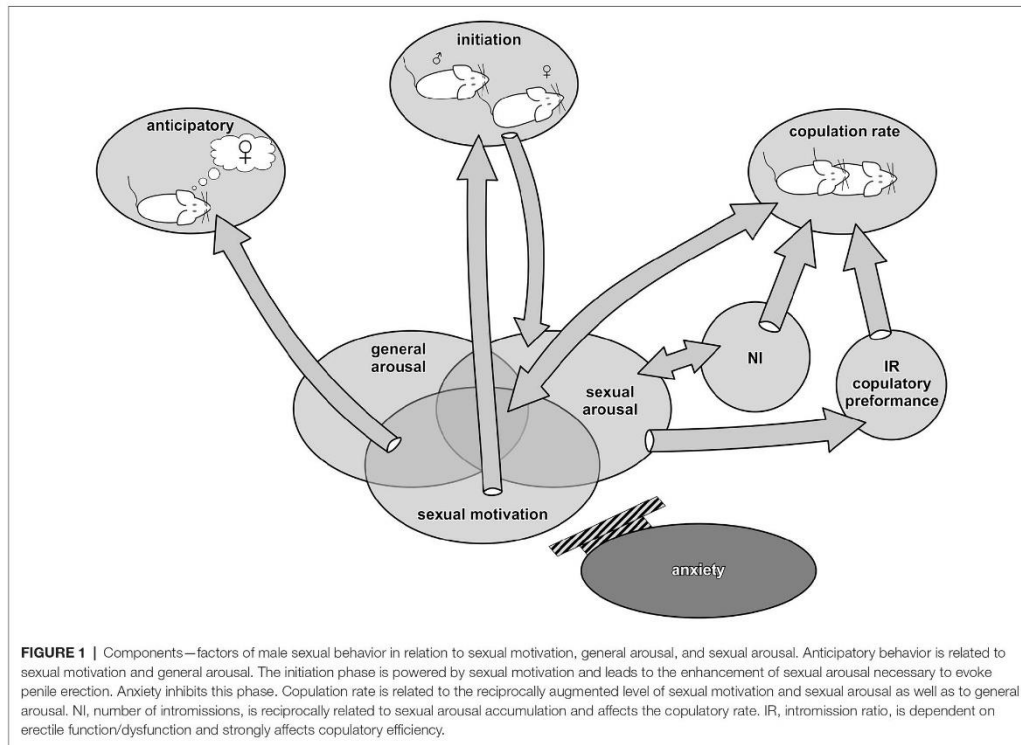
With this background, analysis of the sexual activity of laboratory rodents provides a powerful experimental tool for studying the inheritable traits, endocrine factors, neurotransmitter systems, and neural networks involved in evolutionarily preserved as well as experience-dependent aspects of behavior.

In this review article, we analyze the behavioral parameters describing the sexual motivation and sexual performance of male rats in the context of health disorders in humans. Based on analysis of parameters describing the heterogeneous and complex structure of sexual behavior in laboratory rodents, we propose an approach that is useful for delineating distinct mechanisms affecting sexual motivation and sexual performance in disease states and the efficacy of therapy in preclinical investigations. Furthermore, we argue that this approach could be applied for more precise determination of specific mechanisms involved in abnormal or disturbed sexual behavior in rats that are translationally related to human health disorders. In particular, translational research in rodent models of sexual behavior has provided important insights into the pathomechanisms and pharmacotherapy of clinical conditions that are described in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition (DSM 5) and in the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision (ICD-10), including premature ejaculation, paraphilias, mood and anxiety disorders as well as neurological and metabolic diseases (McVary et al., 1997; Grønli et al., 2005; Giuliano and Clément, 2006; Hawley et al., 2013; Pfaus et al., 2013; Kang et al., 2014; Olayo-Lortia et al., 2014; Sanna et al., 2014; Faulkner et al., 2015; Babaei-Balderlou and Khazali, 2016; Oosting et al., 2016; Ramírez-Rodríguez et al., 2017; Hernández and Fernández-Guasti, 2018; Novati et al., 2018). In this light, we propose that in various rodent models of human disease states, sexual motivation and performance may be differently affected, which is reflected in distinct changes of specific components of male rat sexual behavior. However, this translational potential of animal models of sexual behavior for investigating human disorders should be exploited cautiously, as not all aspects of sexual behavior and health disorders are identical in rats and humans (Le Moëne and Ågmo, 2019). Here, we present an outline of male rat sexual behavior in the context of rodent models of human diseases, which should

be helpful in finding appropriate experimental models for evaluation of pathomechanisms, therapeutic interventions, and alternatives to the current therapies in preclinical studies. Owing to the specificities and differences of male and female sexual motivation and behavior under physiological conditions and in health disorders (Pfaff, 2017; Hill and Elias, 2018), we did not analyze female sexual behavior in the review.

SEXUAL BEHAVIOR AS AN EXPERIMENTAL MODEL

The sexual behavior of male rats consists of the anticipatory stage during which a male searches for a receptive female, followed by an initiation stage during which a male and a female show mutual investigation. At the end of the initiatory stage, rats begin to copulate. Female behaviors, including sex-soliciting behavior, receptivity, and occurrence of the lordosis reflex (measured as % displaying lordosis), influence the initiation stage and copulatory performance, as lordosis allows for intromission. Copulation comprises specific highly stereotypical motor patterns, including mounting, intromission, and ejaculation. Mounting is a pattern when a male lifts his forebody over the female hindquarters, clasping her flanks with his forepaws, and begins a series of rapid shallow movements of the pelvis. When the glans penis detects the vagina, a male can perform rapid erection, with a deeper intravaginal thrust, which is followed by immediate dismounting. This mounting-intromission-dismounting pattern is repeated until ejaculation is achieved. Ejaculation is marked by a long-lasting intromission (about 1–2 s), which a male rat usually achieves after a few to a dozen intromissions. Rats usually copulate for up to eight ejaculations until copulatory satiation (Larsson, 1956; Sachs and Barfield, 1976). During all these stages, rats produce a complex series of ultrasound vocalizations of various frequencies and temporal patterns (Barfield et al., 1979). Furthermore, fully expressed sexual behavior requires both sexual motivation and sexual arousal, which should be treated as two distinct phenomena (Sachs, 2000). Sexual arousal depends on the activation of brain networks within the brainstem that simultaneously control behavioral and autonomic nervous system responses during sexual interaction and is mainly manifested by penile erection, whereas sexual motivation drives and maintains subsequent stages of sexual behavior (Schober et al., 2011; Ågmo, 2011). Differences between sexual motivation and sexual arousal, or more precisely the fact that these processes are not interchangeable or equivalent, can be explained by the analysis of non-copulating male rats or asexual orientation in humans. In healthy non-copulating rats, noncontact erections are present during exposure to the receptive female in spite of the absence of an attempt to copulate, which is especially visible after medial preoptic lesions (Stefanick and Davidson, 1987; Liu et al., 1997; Portillo and Paredes, 2019). Similar dissociation between sexual arousal and sexual motivation can be seen in asexually oriented men. The level of masturbation in healthy asexual men is similar to that in heterosexual counterparts, but with no motivation for either



hetero or homosexual interactions (Brotto et al., 2010; Portillo and Paredes, 2019).

The sexual behavior of a male rat contains both inheritable arousal-activated neuronal networks and networks that are experience-dependent and modified by classical and instrumental conditioning (Pfaus et al., 2001; Hull and Rodriguez-Manzo, 2017). Based on statistical factor analysis of sexual behavior in copulatory experienced rats, five independent components of sexual behavior have been distinguished: anticipatory, initiation, rate of copulation, number of intromissions, and intromission ratio (IR; Sachs, 1978; Pfaus et al., 1990). All five components of sexual interactions are summarized in **Figure 1** and discussed below from the perspectives of sexual motivation, general arousal, and sexual arousal.

Anticipatory Behavior

In standard laboratory procedure, a male rat is usually placed in the experimental chamber for 5 min before introduction of a receptive female (Larsson, 1956). During this time, anticipatory behavior is measured by intensiveness of chamber exploration, number of rearings, or changes of levels in special bi-level apparatus (Mendelson and Gorzalka, 1987; Mendelson and

Pfaus, 1989). In sexually experienced males, intensiveness of exploration with looking for cues from a female co-occurs with intensive ultrasonic vocalizations in the 50-kHz band, termed precontact vocalizations (PVs; Bialy et al., 2000). Ultrasounds emitted by rodents, in addition to olfactory cues, are a signal for identification of individuals (Holy and Guo, 2005; Asaba et al., 2014). Ultrasonic vocalizations in the 50-kHz band reflect the emotional state of rodents and are related to the activation of the nucleus accumbens (Hamed et al., 2016; Mulvihill and Brudzynski, 2018). Ultrasounds also cause rats to react by approaching a sound source (Wöhr and Schwarting, 2007; Pultorak et al., 2016). The number of PVs during the acquisition of sexual experience is related to the level of sexual experience and conditioning to odor cues and conditioning stimuli (CS) from the experimental chamber, and it depends on the rewarding value of sexual contacts (Bialy et al., 2000).

PVs and other elements of anticipatory behavior can be completely suppressed by repeated dopamine D1 receptor activation in the nucleus accumbens without significant effects on subsequent copulatory behavior (Bialy et al., 2010). Furthermore, increase in the number of PVs during the acquisition of sexual experience is inhibited by NMDA antagonists but is not related to the initiation of copulation

measured by mount latency (ML; see below; Bialy et al., 2000). These observations indicate that anticipatory behavior depends on different neural networks than initiation and copulatory behaviors.

In the sexual context, penile erection is treated as an indicator of an elevated level of sexual arousal (Sachs, 2000). However, our studies indicate that penile erection is not observed during anticipatory behavior (Bialy et al., 2000, 2010). This implies that the anticipatory behavior depends on stimulation of the general arousal system and motivation to look for cues related to sexual activity rather than on the sexual arousal itself.

Initiation Behavior

The time between exposure of a male rat to a receptive female and the first mounting determines the length of the initiation stage and is described as ML. When a female is introduced, both male and female show mutual investigation and mutually emit ultrasonic vocalizations. Odor, visual, auditory, and tactile cues enhance both the level of sexual motivation, leading to copulatory behavior, and the level of sexual arousal, making it sufficient to evoke erection and effective intromission (Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). ML depends on sexual motivation enhanced by mutual male-female investigation. In addition to the motivational aspect measured by ML, the latency between the introduction of a female to the first intromission, termed intromission latency (IL), indicates the time required to reach a sufficiently high level of sexual arousal to induce erection (Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). ML is prolonged in sexually naïve males and is significantly shorter in sexually experienced rats. Sexual experience and conditioning to cues from a female or experimental chamber significantly reduce both ML and IL (Larsson, 1959; Dewsbury, 1969; Bialy et al., 2000).

The initiation of copulation is strongly related to sexual motivation, and it is inhibited by an enhanced level of anxiety (Pfaus and Wilkins, 1995; Miwa et al., 2011). Activation of cAMP-response element-binding protein (CREB) in the nucleus accumbens reduces anxiety level and ML, but it has no effect on copulatory efficiency as measured by ejaculation latency (EL; Barrot et al., 2005). Similarly, acute administration of D1 receptor agonist into the nucleus accumbens significantly increases the percentage of sexually naïve males that display mounting, but without an increase in PVs or shortening of EL (Bialy et al., 2010). ML is also dramatically prolonged by lesion of the anterior cingulate cortex (Ágmo et al., 1995), suggestive of a critical role for the nucleus accumbens–anterior cingulate cortex/medial prefrontal cortex network in sexual motivation and initiation of a new behavior (Bialy et al., 2010; Sanna et al., 2017). Sexual motivation can also be described by approach behavior in the sexual incentive motivation test arena (Le Moëne and Ágmo, 2019).

Copulatory Efficiency (Copulatory Rate Factor)

Sexual motivation during copulation controls the behavior directed towards the satisfaction of sexual drive by achieving intromissions and ejaculations. Copulatory efficiency describes the ability to satisfy the sexual drive and depends on sexual

experience (Larsson, 1959; Dewsbury, 1969; Bialy et al., 2000). Simultaneously with sexual motivation, adequate sexual arousal has to be achieved and accumulated to elicit penile erection and ejaculation, which are mediated by activation of the autonomic nervous system (Giuliano and Rampin, 2004).

The most important measure of copulatory efficiency is EL, which describes the time from first intromission to ejaculation. Additionally, copulatory efficiency can be measured by inter-intromission interval (III), which provides the mean time between intromissions before each ejaculation (Sachs and Barfield, 1976; Sachs, 1978).

Acquisition of sexual experience has been shown to involve different neuronal networks in copulatory efficiency and in the initiation of copulation (Bialy et al., 2000, 2010). The key neural network that regulates copulatory rate involves connections between the amygdala, BNST, central tegmental field, and MPOA (Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). MPOA is one of the brain structures in which acquisition of sexual experience leads to an increase in Fos expression, and higher levels of neurotransmitters, receptors, or enzymes and hormones important for regulation of sexual activity (Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). Specifically, it was shown that acquisition of sexual experience is associated with an increase in nitric oxide with higher levels of nitric oxide synthase (Dominguez et al., 2006), glutamate and dopamine (Will et al., 2014), D1 receptor signaling (McHenry et al., 2012) and D2 receptor signaling (Nutsch et al., 2016), and oxytocin receptors (Gil et al., 2013), and an increased number of neurons containing androgen receptors (Swaney et al., 2012). Moreover, acquisition of sexual experience and improvement in copulatory efficiency was shown to involve neuronal plasticity as measured by *c-fos* expression in the parieto-occipital cortex (Bialy et al., 1992; Bialy and Kaczmarek, 1996). Additionally, dopamine and noradrenaline levels in the medial prefrontal cortex correlate with sexual experience (Sanna et al., 2017).

Number of Intromissions

The number of intromissions indicates the level of genital stimulation required to induce ejaculation and describes the accumulation of sexual arousal. The cortico-medial part of the amygdala accumulates arousal in rats (de Jonge et al., 1992), as lesions in this region lead to a dramatic increase in number of intromissions (Harris and Sachs, 1975). Similar effects were observed after BNST lesion (Valcourt and Sachs, 1979). Strong reductions in intromission number were observed after serotonin 5HT1A receptor agonist (Snoeren et al., 2014) and D2 agonist and, less effectively, D1 agonist, but not D4 agonists (Cagiano et al., 1989; Beck et al., 2002; Sanna et al., 2015).

Intromission Ratio

Males display intromissions and/or mounts without intromission from the initiation of copulation to ejaculation. The IR describes the proportion of intromissions to the sum of mounts and intromissions. A low value of this parameter is strongly related to erectile dysfunction, which may be due to a low level of NO synthesis (neuronal and epithelial source),

TABLE 1 | Particular components of male sexual behavior, parameters that describe them and their relation to abnormal sexual motivation, arousal and performance due to psychiatric, cardiovascular, neurologic, endocrine and metabolic health disorder, and additional tests to confirm causes of changes in parameters in the rat models.

Parameter	Possible Cause	Preclinical Models	Additional Tests / Parameters
Anticipatory Behavior – Emotional Value, Reward Value of Previous Contacts			
Lower vs Control			
PVs (No.)		Dysregulation of Rewarding System/Drug Withdrawal/ Anhedonic States/Depressive Like-Behavior [1]	• CPP
Rearing (No.)	↓ Reward	Emotional Memory Dysfunctions [2]	• Instrumental Reaction
Bi-Level (No. of changes)		Sexual Fetishism (Absence of Fetish) [3]	• Glucose Preference Test
Exploration (Distance in meters)			• Forced Swim Test
			• Open Field (General Activity)
Higher vs Control			
	↑ Reward	Drug-Induced Behavior [4]	• CPP
			• Open Field (General Activity)
Initiation Behavior – Motivation Value			
Shorter vs Control			
	↑ Sexual Motivation	Neurodegenerative Hypersexualism [5]	• Open Field (General activity, Time Spent in Center)
		Sexual Fetishism (Presence of Fetish) [3]	
	↓ Level of Anxiety	Low Anxiety Level [6]	• Open Field (Time Spent in Center)
			• CRH/ACTH/ Corticosterone Levels
Longer vs Control			
ML (Mount Latency in sec.)	↓ Sexual Motivation	Anhedonic States [7]	• Medical Examination
		Insulin-Resistance (mice) [8]	• Additional Laboratory Tests for Metabolic Disorders
		HPG Axis Disorders [9]	• Glucose Preference Test
		Depressive-Like Behavior [10]	• Forced Swim Test
		Alcoholism [11]	
		Diabetes Related Neurological Impairment [12]	
	↑ Level of Anxiety	Anxiety Disorders [13]	• Open Field (Time Spent in Center)
			• CRH/ACTH/ Corticosterone Levels
	↓ Preference to Female	Same-Sex Preference/Sex Identity Formation Disruptions (Gender Dysphoria) [14]	• Sexual/Copulatory Preference Test
Copulatory Rate – Efficiency (Motivation) to Achieve Ejaculation(s)			
Shorter vs Control			
	↑ Sexual Experience	Acquisition of Sexual Experience [2]	• Normal or Lower NI
		Sexual Fetishism (Presence of Fetish) [3]	
	↓ Ejaculatory Threshold	Premature Ejaculation [15]	• Lower NI
			• Higher EF
Longer vs Control			
EL (Ejaculation Latency in sec.)	↓ Sexual Motivation	Stress Induced Behavior/Depressive Like-Behavior [16]	• Longer Time Between Intromissions (III)
		Alcoholism [11]	
		HPG Axis Disorders [9]	
		Diabetes Related Neurological Impairment [12]	
	↑ Ejaculatory Threshold	Delayed ejaculation, SSRI Induced Ejaculatory Dysfunction [17]	• Normal III
			• Ex copula mechanically evoked pattern of ejaculation
Number of Intromissions – Accumulation of Sexual Arousal			
Lower vs Control			
NI (No. intromissions)	↓ Ejaculatory Threshold	Premature Ejaculation [18]	• Short EL
		Sexual Fetishism (Presence of Fetish) [3]	
Higher vs Control			
	↓ Arousal Accumulation	Neurodegenerative Diseases [19]	• Normal or Shorter III
			• Higher EL
Intromission Ratio – Erectile Function			
Lower vs Control			
IR (No. intromissions / No. mountings + intromissions)	Erectile Dysfunction	Neuropathy [12]	• ML
		NO synthesis inhibition [20]	• Ex copula test
Higher vs Control			
	Improved Erection	PDE5 Inhibition [21]	• ML
			• Ex copula test

Since sexual behavior depends on specific strain of rats, laboratory environment, nutrition and housing (Hansen et al., 1978; Bialy et al., 2014; Molenda-Figueira et al., 2017; Sanna et al., 2017), changes in specific parameters describing male sexual behavior should be evaluated against values obtained in control groups in a given experimental paradigm. Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropic hormone; CRH, corticotropin-releasing hormone; EF, ejaculation frequency; HPG, hypothalamic-pituitary-gonadal axis; III, inter-intromission interval; PDE5, phosphodiesterase 5; PVs, precontact vocalizations in the 50-KHz band; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor. References in the table: [1] (Pfaus and Phillips, 1991; Van Furth et al., 1994; Barr et al., 1999); [2] (Bialy et al., 2000); [3] (Pfaus et al., 2013); [4] (Florino and Phillips, 1990); [5] (Novati et al., 2018); [6] (Barrot et al., 2005; Miwa et al., 2011); [7] (Pfaus and Phillips, 1991); [8] (Faulkner et al., 2015); [9] (Babaai-Baldenou and Khazali, 2016); [10] (Bialy et al., 2014); [11] (Sadeghzadeh et al., 2018); [12] (McVary et al., 1997); [13] (Hawley et al., 2013; Sanna et al., 2014); [14] (Ramirez-Rodriguez et al., 2017; Hernández and Fernández-Guasti, 2018); [15] (Coolen et al., 1997; Pattij et al., 2005a; Clément et al., 2007; Kang et al., 2013; Olayo-Lortia et al., 2014); [16] (Gronil et al., 2005); [17] (de Jong et al., 2005; Hueleff-Soto et al., 2012); [18] (Coolen et al., 1997; Beck and Bialy, 2000); [19] (Harris and Sachs, 1979; Valcourt and Sachs, 1979; Novati et al., 2018); [20] (Hull et al., 1994; Bialy et al., 1996); [21] (Ferraz et al., 2016).

peripheral neuropathy, or vascular pathology (Hull et al., 1994; Bialy et al., 1996).

Evaluation of copulatory efficiency is critically important in rat models of premature ejaculation. Short ejaculation latencies with a very low number of intromissions (1 or 2 in a copulatory series) were observed in rats treated with 5HT-1A agonist, which can be considered a model of premature ejaculation (Coolen et al., 1997). Another model of premature ejaculation is based on the fact that in sexually experienced rats, there are two extreme endophenotypes. One represents premature ejaculation, with male rats achieving rapid and frequent ejaculations, up to five ejaculations during a short 30-min session of sexual interactions. The other phenotype represents the animal model of retarded ejaculation, with sexually experienced rats achieving only intromissions without any ejaculations during such a session (Pattij et al., 2005a; Waldinger and Olivier, 2005). Such model can be useful for understanding the mechanisms and pharmacological background of premature ejaculation and the role of serotonin receptors, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), and oxytocin receptors (Giuliano and Clément, 2006; Clément et al., 2007, 2012, 2013; Kang et al., 2013, 2014; Oosting et al., 2016) but only in the case when less genital stimulation is required to achieve ejaculation (fewer intromissions). However, findings from our laboratory indicated that the majority of normal male rats were capable of achieving extravaginal ejaculations when mounting a female with a closed vaginal orifice, provided the male rats received sufficient genital stimulation during at least two intromissions preceding the extravaginal ejaculation. Furthermore, this phenomenon was independent of the number of mountings and was present without any pharmacological intervention (Beck and Bialy, 2000).

In addition to the retarded ejaculation model described above, copulatory efficiency and sexual motivation are strongly affected by metabolic disorders, especially type 2 diabetes mellitus (McVary et al., 1997; Faulkner et al., 2015), depressive-like/anhedonic states (Pfaus and Phillips, 1991; Van Furth et al., 1994; Bialy et al., 2014), or high anxiety levels (Hawley et al., 2013; Sanna et al., 2014).

Postejaculatory Behavior

The mechanisms behind the postejaculatory period are relatively poorly understood and involve numerous spinal and supraspinal structures of the central nervous system (Seizert, 2018; Le Moëne and Ágmo, 2019). In the postejaculatory period, all three processes: general arousal, sexual motivation, and sexual arousal, which control the male's behavior are reflected in different parameters. After ejaculation, a male usually moves to one of the corners of a chamber and starts to emit a vocalization in the 22-kHz band. Most of the time, a male does not move when vocalizing. About 2 min after the first ejaculation (and significantly later after the second one), a male starts to explore the experimental chamber, even before termination of the postejaculatory vocalizations (Sachs and Bialy, 2000). This exploratory behavior reflects increasing general arousal but not sexual motivation or sexual arousal. Operant behavior shows that, at this time, male rats very often perform

instrumental reactions—bar-pressing or run in a runway—but that after arriving in the compartment with a female, they evidently escape any socio-sexual contact and show a departure reaction (Beck, 1986; Beck et al., 2002). On the other hand, sexual arousal measured by penile erection occurs later than first exploratory behavior, at least during the first postejaculatory period. Such erection is visible even before the termination of postejaculatory 22-kHz vocalizations, suggesting that sexual arousal increases before a male starts to show interest in a female due to enhanced sexual motivation (Sachs and Bialy, 2000). Sexual motivation and interest in a receptive female appear after the termination of vocalizations. Furthermore, weak painful stimuli that increase sexual motivation in a non-specific way enhance a male's interest in a female and mating, but this is present only after the end of postejaculatory vocalizations (Sachs and Barfield, 1974, 1976). These findings suggest that sexual motivation during postejaculatory ultrasonic vocalizations remains at a very low level. Therefore, after ejaculation, three parameters, latency to the first exploration, latency to the first noncontact erection, and latency to approaching a female, can be treated as measures of general arousal, sexual arousal, and sexual motivation, respectively. The initiation of enhanced sexual motivation later than of enhanced sexual arousal indicates that the postejaculatory interval is not simply the mirror state of the anticipatory and initiation phases of sexual behavior. Ultrasonic postejaculatory vocalizations, on the other hand, reflect, in our opinion, a relaxation state after ejaculation (Bialy et al., 2016). An enhanced level of general arousal and sexual arousal before the termination of postejaculatory vocalizations can be distinguished by spectral analysis of postejaculatory calls. Before the termination of vocalizations, at the time as exploration or noncontact erection take place, some frequency modulations or a shift from about the 45-kHz to the 28–23-kHz band are more often detected, and these differ from the very flat 22-kHz frequency ultrasonic vocalizations at the beginning and middle of the postejaculatory period (Bialy et al., 2019).

Rewarding Value of Sexual Interactions

The rewarding properties of mountings, intromissions, and ejaculations can be evaluated by conditioning procedures. In fact, the process of conditioning in appetitive behavior usually requires several sessions before there are visible effects. Ultrasound vocalizations in the 50-kHz band seem to be the most robust parameter reflecting positive emotional states (Brudzynski, 2007). In this line, high numbers of PVs convey the rewarding value of previous sexual contacts (Bialy et al., 2000). Additionally, conditioning during a second-order procedure (Everitt et al., 1989), conditioned place preference procedure (Camacho et al., 2009; Tenk et al., 2009), and instrumental conditioned reflexes during copulation (Beck, 1971; Beck et al., 2002) are useful in the evaluation of the rewarding value of subsequent events during sexual interactions. In addition, postejaculatory vocalizations—the most of time, extremely flat long-lasting vocalizations in the 22-kHz frequency band—probably reflect abrupt decreases in sexual arousal and a relaxation state following ejaculation. Thus, in this sense, these

22-kHz vocalizations can be used as an additional measure of reduction in sexual arousal and motivation related to the preceding ejaculation (Bialy et al., 2016). Postejaculatory vocalizations usually co-occur with a male's inactivity or grooming. In addition, we found that males vocalize for significantly longer when a female is present in the copulatory chamber after ejaculation (Sachs and Bialy, 2000). Furthermore, such vocalizations are present only in a familiar environment, and cues that increase anxiety level (odor cues from unfamiliar males) significantly reduce such postejaculatory vocalization (Bialy et al., 2016). Moreover, the postejaculatory vocalizations are distinct from shorter low-frequency vocalizations that are produced by a male rat expressing a sexually related frustration state (Bialy et al., 2019).

RAT SEXUAL BEHAVIOR AND HUMAN DISEASES ASSOCIATED WITH SEXUAL DYSFUNCTION

Table 1 summarizes the key components of rat sexual behavior with relevant parameters that describe specific aspects of the behavior (first column). These parameters may be used to quantify disturbances of sexual motivation and performance (second column) that are observed in various rodent models of human diseases (third column). Moreover, additional parameters and tests can be used to further delineate and confirm the underlying causes of abnormal sexual behavior (fourth column), for example, level of anxiety or anhedonia. Furthermore, analysis of these parameters may be useful for evaluation of the efficacy of therapeutic interventions in preclinical investigations.

The translational application of animal models should be exploited cautiously, as not all aspects of sexual behavior and health disorders are identical in rats and humans (Le Moëne and Ágmo, 2019). Additionally, rodent models usually comprise only selected aspects of the complex pathogenesis of neurological, cardiovascular, and metabolic diseases in humans (Zaragoza et al., 2011; Dawson et al., 2018; Lutz, 2018). Even though

the sexual behavior of a male rat is not identical to that seen in humans, neurotransmitters, brain structures, and neuronal networks and the motivational, and consummatory aspects of the sexual behavior seem to be fundamentally similar (Larsson and Ahlenius, 1999; Pattij et al., 2005b; Chan et al., 2008; Georgiadis et al., 2012). Since the sexual behavior of a male rat is well defined in terms behavioral, anatomical, and neurochemical characteristics, investigation of sexual behavior in various rodent models of human diseases provides a translational framework for better recognition of the underlying mechanisms of the sexual dysfunction seen in numerous human health disorders and their potential treatment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MB conceived the study, analyzed the literature, prepared the figure, wrote and revised the manuscript, and secured funding. WB-R analyzed the literature, prepared the table, and wrote the manuscript. JP analyzed the literature, reviewed the manuscript, and secured funding. TZ analyzed the literature, prepared the table, and wrote and revised the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Medical University of Warsaw. The study was carried out with the use of the CePT infrastructure financed by the European Union—the European Regional Development Fund within the Operational Programme “Innovative Economy” for 2007–2013.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marcin Kumosa for technical assistance with preparing **Figure 1**. The first author personally thanks Dr. Józef Beck for introducing him to the subject of the sexual behavior of rats and Prof. Benjamin Sachs for a beautiful time during author's postdoctoral fellowship and many discussions on male rat sexual behavior.

REFERENCES

- Ágmo, A. (2011). On the intricate relationship between sexual motivation and arousal. *Horm. Behav.* 59, 681–688. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.08.013
- Ágmo, A., Villalpando, A., Picker, Z., and Fernandez, H. (1995). Lesions of the medial prefrontal cortex and sexual behavior in the male rat. *Brain Res.* 696, 177–186. doi: 10.1016/0006-8993(95)00852-h
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., and Kikusui, T. (2014). Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* 8:231. doi: 10.3389/fnins.2014.00231
- Babaei-Balderlou, F., and Khazali, H. (2016). Effects of Ghrelin on sexual behavior and luteinizing hormone beta-subunit gene expression in male rats. *J. Reprod. Infertil.* 17, 88–96.
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., and McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Integr. Comp. Biol.* 19, 469–480. doi: 10.1093/icb/19.2.469
- Barr, A. M., Fiorino, D. F., and Phillips, A. G. (1999). Effects of withdrawal from an escalating dose schedule of d-amphetamine on sexual behavior in the male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 597–604. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00156-2
- Barrot, M., Wallace, D. L., Bolanos, C. A., Graham, D. L., Perrotti, L. I., Neve, R. L., et al. (2005). Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102, 8357–8362. doi: 10.1073/pnas.0500587102
- Beck, J. (1971). Instrumental conditioned reflexes with sexual reinforcement in rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 31, 251–252.
- Beck, J. (1986). Effect of visual cues from female on the postejaculatory operant behavior of male rat. *Acta Physiol. Pol.* 37, 207–212.
- Beck, J., and Bialy, M. (2000). The role of mounts and intromissions in triggering ejaculation in rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 60, 29–33.
- Beck, J., Bialy, M., and Kostowski, W. (2002). Effects of D(1) receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal compartment-runway paradigm. *Physiol. Behav.* 76, 91–97. doi: 10.1016/s0031-9384(02)00678-9
- Bialy, M., Beck, J., Abramczyk, P., Trzebski, A., and Przybylski, J. (1996). Sexual behavior in male rats after nitric oxide synthesis inhibition. *Physiol. Behav.* 60, 139–143. doi: 10.1016/0031-9384(95)02272-4
- Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Kasarelo, K., Nikolaev, E., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2016). Modulation of 22-kHz postejaculatory vocalizations

- by conditioning to new place: evidence for expression of a positive emotional state. *Behav. Neurosci.* 130, 415–421. doi: 10.1037/bne0000153
- Bialy, M., and Kaczmarek, L. (1996). c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol. Exp.* 56, 567–577.
- Bialy, M., Kalata, U., Nikolaev-Diak, A., and Nikolaev, E. (2010). D1 receptors involved in the acquisition of sexual experience in male rats. *Behav. Brain Res.* 206, 166–176. doi: 10.1016/j.bbr.2009.09.008
- Bialy, M., Nikolaev, E., Beck, J., and Kaczmarek, L. (1992). Delayed c-fos expression in sensory cortex following sexual learning in male rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 14, 352–356. doi: 10.1016/0169-328x(92)90103-i
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol. Exp.* 79, 1–12. doi: 10.21307/ane-2019-001
- Bialy, M., Rydz, M., and Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav. Neurosci.* 114, 983–990. doi: 10.1037/0735-7044.114.5.983
- Bialy, M., Strefnel, M., Nikolaev-Diak, A., Socha, A., Nikolaev, E., and Boguszewski, P. M. (2014). Sexual performance and precontact 50-kHz ultrasonic vocalizations in WAG/Rij rats: effects of opioid receptor treatment. *Epilepsy Behav.* 39, 66–72. doi: 10.1016/j.yebeh.2014.08.003
- Brotto, L. A., Knudson, G., Inskip, J., Rhodes, K., and Erskine, Y. (2010). Asexuality: a mixed-methods approach. *Arch. Sex. Behav.* 39, 599–618. doi: 10.1007/s10508-008-9434-x
- Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.* 182, 261–273. doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.004
- Cagiano, R., Barfield, R. J., White, N. R., Pleim, E. T., and Cuomo, V. (1989). Mediation of rat postejaculatory 22 kHz ultrasonic vocalization by dopamine D2 receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 53–58. doi: 10.1016/0091-3057(89)90352-3
- Camacho, F. J., Portillo, W., Quintero-Enriquez, O., and Paredes, R. G. (2009). Reward value of intrusions and morphine in male rats evaluated by conditioned place preference. *Physiol. Behav.* 98, 602–607. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.09.012
- Chan, J. S. W., Olivier, B., de Jong, T. R., Snoeren, E. M. S., Kooijman, E., van Hasselt, F. N., et al. (2008). Translational research into sexual disorders: pharmacology and genomics. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 426–435. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.098
- Clément, P., Bernabé, J., Compagnie, S., Alexandre, L., McCallum, S., and Giuliano, F. (2013). Inhibition of ejaculation by the non-peptide oxytocin receptor antagonist GSK557296: a multi-level site of action. *Br. J. Pharmacol.* 169, 1477–1485. doi: 10.1111/bph.12198
- Clément, P., Bernabé, J., Gengo, P., Denys, P., Laurin, M., Alexandre, L., et al. (2007). Supraspinal site of action for the inhibition of ejaculatory reflex by dapoxetine. *Eur. Urol.* 51, 825–832. doi: 10.1016/j.eururo.2006.10.011
- Clément, P., Laurin, M., Compagnie, S., Facchinetti, P., Bernabé, J., Alexandre, L., et al. (2012). Effect of dapoxetine on ejaculatory performance and related brain neuronal activity in rapid ejaculator rats. *J. Sex. Med.* 9, 2562–2573. doi: 10.1111/j.1743-6109.2012.02884.x
- Coolen, L. M., Olivier, B., Peters, H. J., and Veening, J. G. (1997). Demonstration of ejaculation-induced neural activity in the male rat brain using 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Physiol. Behav.* 62, 881–891. doi: 10.1016/s0031-9384(97)00258-8
- Dawson, T. M., Golde, T. E., and Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 21, 1370–1379. doi: 10.1038/s41593-018-0236-8
- de Jong, T. R., Pattij, T., Veening, J. G., Waldinger, M. D., Cools, A. R., and Olivier, B. (2005). Effects of chronic selective serotonin reuptake inhibitors on 8-OH-DPAT-induced facilitation of ejaculation in rats: comparison of fluvoxamine and paroxetine. *Psychopharmacology* 179, 509–515. doi: 10.1007/s00213-005-2186-6
- de Jonge, F. H., Oldenburger, W. P., Louwerse, A. L., and Van de Poll, N. E. (1992). Changes in male copulatory behavior after sexual exciting stimuli: effects of medial amygdala lesions. *Physiol. Behav.* 52, 327–332. doi: 10.1016/0031-9384(92)90279-b
- Dewsbury, D. A. (1969). Copulatory behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim. Behav.* 17, 217–223. doi: 10.1016/0003-3472(69)90004-9
- Dominguez, J. M., Brann, J. H., Gil, M., and Hull, E. M. (2006). Sexual experience increases nitric oxide synthase in the medial preoptic area of male rats. *Behav. Neurosci.* 120, 1389–1394. doi: 10.1037/0735-7044.120.6.1389
- Everitt, B. J., Cador, M., and Robbins, T. W. (1989). Interactions between the amygdala and ventral striatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. *Neuroscience* 30, 63–75. doi: 10.1016/0306-4522(89)90353-9
- Faulkner, L. D., Dowling, A. R., Stuart, R. C., Nillni, E. A., and Hill, J. W. (2015). Reduced melanocortin production causes sexual dysfunction in male mice with POMC neuronal insulin and leptin insensitivity. *Endocrinology* 156, 1372–1385. doi: 10.1210/en.2014-1788
- Ferraz, M. M. D., Quintella, S. L., Parcial, A. L. N., and Ferraz, M. R. (2016). The effects of sildenafil after chronic L-NAME administration in male rat sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 146–147, 13–20. doi: 10.1016/j.pbb.2016.04.004
- Fiorino, D. F., and Phillips, A. G. (1999). Facilitation of sexual behavior in male rats following d-amphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology Berl.* 142, 200–208. doi: 10.1007/s002130050880
- Georgiadis, J. R., Kringelbach, M. L., and Pfäus, J. G. (2012). Sex for fun: a synthesis of human and animal neurobiology. *Nat. Rev. Urol.* 9, 486–498. doi: 10.1038/nrurol.2012.151
- Gil, M., Bhatt, R., Picotte, K. B., and Hull, E. M. (2013). Sexual experience increases oxytocin receptor gene expression and protein in the medial preoptic area of the male rat. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1688–1697. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.02.002
- Giuliano, F., and Clément, P. (2006). Serotonin and premature ejaculation: from physiology to patient management. *Eur. Urol.* 50, 454–466. doi: 10.1016/j.eururo.2006.05.055
- Giuliano, F., and Rampin, O. (2004). Neural control of erection. *Physiol. Behav.* 83, 189–201. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.08.014
- Gronli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sorensen, E., Portas, C. M., et al. (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol. Behav.* 84, 571–577. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.02.007
- Hamed, A., Daszczuk, P., Kurska, M. B., Turzynska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., et al. (2016). Non-parametric analysis of neurochemical effects and Arc expression in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalization. *Behav. Brain Res.* 312, 174–185. doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.042
- Hansen, S., Larsson, K., Carlsson, S. G., and Sourander, P. (1978). The development of sexual behavior in the rat: role of preadult nutrition and environmental conditions. *Dev. Psychobiol.* 11, 51–61. doi: 10.1002/dev.420110109
- Harris, V. S., and Sachs, B. D. (1975). Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain Res.* 86, 514–518. doi: 10.1016/0006-8993(75)90906-3
- Hawley, W. R., Grissom, E. M., Belkin, M. N., James, T. F., and Dohanich, G. P. (2013). Decreased sexual motivation and heightened anxiety in male long-evans rats are correlated with the memory for a traumatic event. *Arch. Sex. Behav.* 42, 659–668. doi: 10.1007/s10508-012-0017-5
- Hernández, A., and Fernández-Guasti, A. (2018). Male rats with same-sex preference show higher immobility in the forced swim test, but similar effects of fluoxetine and desipramine than males that prefer females. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 171, 39–45. doi: 10.1016/j.pbb.2018.05.017
- Hill, J. W., and Elias, C. F. (2018). Neuroanatomical framework of the metabolic control of reproduction. *Physiol. Rev.* 98, 2349–2380. doi: 10.1152/physrev.00033.2017
- Holy, T. E., and Guo, Z. (2005). Ultrasonic songs of male mice. *PLoS Biol.* 3:e386. doi: 10.1371/journal.pbio.0030386
- Hueletl-Soto, M. E., Carro-Juarez, M., and Rodriguez-Manzo, G. (2012). Fluoxetine chronic treatment inhibits male rat sexual behavior by affecting both copulatory behavior and the genital motor pattern of ejaculation. *J. Sex. Med.* 9, 1015–1026. doi: 10.1111/j.1743-6109.2011.02339.x

- Hull, E. M., Lumley, L. A., Matuszewich, L., Dominguez, J., Moses, J., and Lorrain, D. S. (1994). The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacology* 33, 1499–1504. doi: 10.1016/0028-3908(94)90054-x
- Hull, E. M., and Rodríguez-Manzo, G. (2017). “1.01-male sexual behavior,” in *Hormones, Brain and Behavior*, 3rd Edn., eds D. W. Pfaff and M. Joëls (Oxford: Academic Press), 1–57.
- Kang, K. K., Ahn, G. J., Sung, J. H., Kim, S. H., Kim, H., and Lee, S. (2013). Ejaculatory responses are inhibited by a new chemical entity, DA-8031, in preclinical rodent models of ejaculation. *Urology* 81, 920.e13–928.e13. doi: 10.1016/j.urology.2012.12.006
- Kang, K. K., Sung, J. H., Kim, S. H., and Lee, S. (2014). Effect of DA-8031, a novel oral compound for premature ejaculation, on male rat sexual behavior. *Int. J. Urol.* 21, 325–329. doi: 10.1111/iju.12256
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat*. Oxford, England: Almqvist and Wiksell.
- Larsson, K. (1959). Experience and maturation in the development of sexual behavior in male puberty rat. *Behaviour* 14, 101–107. doi: 10.1163/156853959x00027
- Larsson, K., and Ahlenius, S. (1999). Brain and sexual behavior. *Ann. N Y Acad. Sci.* 19, 292–308. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09274.x
- Le Moëne, O., and Ágmo, A. (2019). Modeling human sexual motivation in rodents: some caveats. *Front. Behav. Neurosci.* 13:187. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00187
- Liu, Y. C., Salamone, J. D., and Sachs, B. D. (1997). Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J. Neurosci.* 17, 5245–5253. doi: 10.1523/jneurosci.17-13-05245.1997
- Lutz, T. A. (2018). Considering our methods: methodological issues with rodent models of appetite and obesity research. *Physiol. Behav.* 192, 182–187. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.02.026
- McHenry, J. A., Bell, G. A., Parrish, B. P., and Hull, E. M. (2012). Dopamine D1 receptors and phosphorylation of dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein-32 in the medial preoptic area are involved in experience-induced enhancement of male sexual behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 126, 523–529. doi: 10.1037/a0028707
- McVary, K. T., Rathnau, C. H., and McKenna, K. E. (1997). Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR rat: a role of central neuropathy. *Am. J. Physiol.* 272, R259–R267. doi: 10.1152/ajpregu.1997.272.1.R259
- Mendelson, S. D., and Gorzalka, B. B. (1987). An improved chamber for the observation and analysis of the sexual behavior of the female rat. *Physiol. Behav.* 39, 67–71. doi: 10.1016/0031-9384(87)90345-3
- Mendelson, S. D., and Pfau, J. G. (1989). Level searching: a new assay of sexual motivation in the male rat. *Physiol. Behav.* 45, 337–341. doi: 10.1016/0031-9384(89)90136-4
- Miwa, Y., Nagase, K., Oyama, N., Akino, H., and Yokoyama, O. (2011). Effect of corticotropin-releasing factor receptor antagonist on psychologically suppressed masculine sexual behavior in rats. *J. Sex. Med.* 8, 688–695. doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.02055.x
- Molenda-Figueira, H. A., Bell, M. R., De Lorme, K. C., and Sisk, C. L. (2017). Pubertal pair-housing facilitates adult sexual behavior in male rats. *Dev. Psychobiol.* 59, 111–117. doi: 10.1002/dev.21475
- Mulvihill, K. G., and Brudzynski, S. M. (2018). Individual behavioural predictors of amphetamine-induced emission of 50 kHz vocalization in rats. *Behav. Brain Res.* 350, 80–86. doi: 10.1016/j.bbr.2018.05.009
- Novati, A., Yu-Taeger, L., Gonzalez Menendez, I., Quintanilla Martinez, L., and Nguyen, H. P. (2018). Sexual behavior and testis morphology in the BACHD rat model. *PLoS One* 13:e0198338. doi: 10.1371/journal.pone.0198338
- Nutsch, V. L., Will, R. G., Robison, C. L., Martz, J. R., Tobiansky, D. J., and Dominguez, J. M. (2016). Colocalization of mating-induced fos and d2-like dopamine receptors in the medial preoptic area: influence of sexual experience. *Front. Behav. Neurosci.* 10:75. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00075
- Olayo-Lortia, J., Ferreira-Nuño, A., Velázquez-Moctezuma, J., and Morales-Otal, A. (2014). Further definition on the multiple partner choice arena: a potential animal model for the study of premature ejaculation. *J. Sex. Med.* 11, 2428–2438. doi: 10.1111/jsm.12637
- Oosting, R. S., Chan, J. S. W., Olivier, B., and Banerjee, P. (2016). Vilazodone does not inhibit sexual behavior in male rats in contrast to paroxetine: a role for 5-HT1A receptors? *Neuropharmacology* 107, 271–277. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.045
- Pattij, T., de Jong, T. R., Uitterdijk, A., Waldinger, M. D., Vecning, J. G., Cools, A. R., et al. (2005a). Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *Eur. J. Neurosci.* 22, 724–734. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04252.x
- Pattij, T., Olivier, B., and Waldinger, M. D. (2005b). Animal models of ejaculatory behavior. *Curr. Pharm. Des.* 11, 4069–4077. doi: 10.2174/138161205774913363
- Pfaff, D. W. (2017). *How the Vertebrate Brain Regulates Behavior: Direct From the Lab*. Cambridge, MA and London, England: Harvard University Press.
- Pfau, J. G., Erickson, K. A., and Talianakis, S. (2013). Somatosensory conditioning of sexual arousal and copulatory behavior in the male rat: a model of fetish development. *Physiol. Behav.* 122, 1–7. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.08.005
- Pfau, J. G., Kippin, T. E., and Centeno, S. (2001). Conditioning and sexual behavior: a review. *Horm. Behav.* 40, 291–321. doi: 10.1006/hbeh.2001.1686
- Pfau, J. G., Mendelson, S. D., and Phillips, A. G. (1990). A correlational and factor analysis of anticipatory and consummatory measures of sexual behavior in the male rat. *Psychoneuroendocrinology* 15, 329–340. doi: 10.1016/0306-4530(90)90058-h
- Pfau, J. G., and Phillips, A. G. (1991). Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behav. Neurosci.* 105, 727–743. doi: 10.1037/0735-7044.105.5.727
- Pfau, J. G., and Wilkins, M. F. (1995). A novel environment disrupts copulation in sexually naive but not experienced male rats: reversal with naloxone. *Physiol. Behav.* 57, 1045–1049. doi: 10.1016/0031-9384(94)00394-k
- Portillo, W., and Paredes, R. G. (2019). Motivational drive in non-copulating and socially Monogamous Mammals. *Front. Behav. Neurosci.* 13:238. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00238
- Pultorak, J. D., Kelm-Nelson, C. A., Holt, L. R., Blue, K. V., Ciucci, M. R., and Johnson, A. M. (2016). Decreased approach behavior and nucleus accumbens immediate early gene expression in response to Parkinsonian ultrasonic vocalizations in rats. *Soc. Neurosci.* 11, 365–379. doi: 10.1080/17470919.2015.1086434
- Ramirez-Rodriguez, R., Tecamachaltzi-Silvaran, M. B., Diaz-Estrada, V. X., Chena-Becerra, F., Herrera-Covarrubias, D., Paredes-Ramos, P., et al. (2017). Heterosexual experience prevents the development of conditioned same-sex partner preference in male rats. *Behav. Processes* 136, 43–49. doi: 10.1016/j.beproc.2017.01.010
- Sachs, B. D. (1978). “Conceptual and neural mechanisms of masculine copulatory behavior,” in *Sex and Behavior: Status and Prospectus*, eds T. E. McGill, D. A. Dewsbury and B. D. Sachs (Boston, MA: Springer), 267–295.
- Sachs, B. D. (2000). Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction and sexual arousal. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 541–560. doi: 10.1016/s0149-7634(00)00022-1
- Sachs, B. D., and Barfield, R. J. (1974). Copulatory behavior of male rats given intermittent electric shocks: theoretical implications. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 607–615. doi: 10.1037/h0036176
- Sachs, B. D., and Barfield, R. J. (1976). “Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat,” in *Advances in the Study of Behavior*, eds J. S. Rosenblatt, R. A. Hinde and E. Shaw (New York: Academic Press), 91–154.
- Sachs, B. D., and Bialy, M. (2000). Female presence during postejaculatory interval facilitates penile erection and 22-kHz vocalization in male rats. *Behav. Neurosci.* 114, 1203–1208. doi: 10.1037/0735-7044.114.6.1203
- Sadeghzadeh, M., Shirpoor, A., Khalaji, N., Naderi, R., Samadi, M., and Rasmi, Y. (2018). The effect of chronic ethanol consumption on sexual motivation and behavior of adult male wistar rats in the copulatory phase. *Addict. Health* 10, 190–197. doi: 10.22122/ahj.v10i3.577
- Sanna, F., Bratzu, J., Piludu, M. A., Corda, M. G., Melis, M. R., Giorgi, O., et al. (2017). Dopamine, noradrenaline and differences in sexual behavior between roman high and low avoidance male rats: a microdialysis study in the medial prefrontal cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 11:108. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00108
- Sanna, F., Contini, A., Melis, M. R., and Argiolas, A. (2015). Role of dopamine D4 receptors in copulatory behavior: studies with selective D4 agonists and antagonists in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 137, 110–118. doi: 10.1016/j.pbb.2015.08.012

- Sanna, F., Corda, M. G., Melis, M. R., Piludu, M. A., Giorgi, O., and Argiolas, A. (2014). Male roman high and low avoidance rats show different patterns of copulatory behaviour: comparison with sprague dawley rats. *Physiol. Behav.* 127, 27–36. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.01.002
- Schober, J., Weil, Z., and Pfaff, D. (2011). How generalized CNS arousal strengthens sexual arousal (and vice versa). *Horm. Behav.* 59, 689–695. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.10.005
- Seizert, C. A. (2018). The neurobiology of the male sexual refractory period. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 92, 350–377. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.06.011
- Snoeren, E. M. S., Veening, J. G., Olivier, B., and Oosting, R. S. (2014). Serotonin 1A receptors and sexual behavior in male rats: a review. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121, 102–114. doi: 10.1016/j.pbb.2013.11.007
- Stefanick, M. L., and Davidson, J. M. (1987). Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol. Behav.* 41, 439–444. doi: 10.1016/0031-9384(87)90078-3
- Swaney, W. T., Dubose, B. N., Curley, J. P., and Champagne, F. A. (2012). Sexual experience affects reproductive behavior and preoptic androgen receptors in male mice. *Horm. Behav.* 61, 472–478. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.01.001
- Tenk, C. M., Wilson, H., Zhang, Q., Pitchers, K. K., and Coolen, L. M. (2009). Sexual reward in male rats: effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Horm. Behav.* 55, 93–97. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.08.012
- Valcourt, R. J., and Sachs, B. D. (1979). Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Bull.* 4, 131–133. doi: 10.1016/0361-9230(79)90068-6
- Van Furth, W. R., Wolterink-Donselaar, I. G., and van Ree, J. M. (1994). Endogenous opioids are differentially involved in appetitive and consummatory aspects of sexual behavior of male rats. *Am. J. Physiol.* 266, 606–613. doi: 10.1152/ajpregu.1994.266.2.R606
- Waldinger, M. D., and Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J. Urol.* 23, 115–118. doi: 10.1007/s00345-004-0493-x
- Will, R. G., Hull, E. M., and Dominguez, J. M. (2014). Influences of dopamine and glutamate in the medial preoptic area on male sexual behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 121, 115–123. doi: 10.1016/j.pbb.2014.02.005
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2007). Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One* 2:e1365. doi: 10.1371/journal.pone.0001365
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., et al. (2011). Animal models of cardiovascular diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:497841. doi: 10.1155/2011/497841

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Bialy, Bogacki-Rychlik, Przybylski and Zera. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PUBLIKACJA NR 2

*Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations
and Sexual Motivation: Characteristic Pattern of
Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile.*

Wiktor Bogacki-Rychlik

Mateusz Rolf

Michał Biały



Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations and Sexual Motivation: Characteristic Pattern of Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile

Wiktor Bogacki-Rychlik[†], Mateusz Rolf and Michal Bialy^{*†}

Laboratory of Centre for Preclinical Research, Department of Experimental and Clinical Physiology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Sanna,
University of Cagliari, Italy

Reviewed by:

Nicola Simola,
University of Cagliari, Italy
Wendy Portillo,
National Autonomous University
of Mexico, Mexico

*Correspondence:

Michal Bialy
michal.bialy@wum.edu.pl;
michalbialy@yahoo.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Motivation and Reward,
a section of the journal
Frontiers in Behavioral Neuroscience

Received: 08 June 2021

Accepted: 03 August 2021

Published: 20 August 2021

Citation:

Bogacki-Rychlik W, Rolf M and
Bialy M (2021) Anticipatory 50-kHz
Precontact Ultrasonic Vocalizations
and Sexual Motivation: Characteristic
Pattern of Ultrasound Subtypes in an
Individual Analyzed Profile.
Front. Behav. Neurosci. 15:722456.
doi: 10.3389/fnbeh.2021.722456

We verified the hypothesis of the existence of forms of individual-specific differences in the emission of anticipatory precontact vocalization (PVs) indicating individualization related to sexual experience and motivation in male rats. Long-Evans males were individually placed in a chamber and 50-kHz ultrasounds were recorded during 5-min periods. In experiment 1, PVs were recorded before the introduction of a female in four consecutive sessions during the acquisition of sexual experience. In experiment 2, PVs were analyzed in three groups of sexually experienced males: with the highest, moderate, and the lowest sexual motivation based on previous copulatory activity. In both experiments, the total number of ultrasounds, as well as 14 different specific subtypes, was measured. The ultrasound profiles for each male were created by analyzing the proportions of specific dominant subtypes of so-called 50-kHz calls. We decided that the dominant ultrasounds were those that represented more than 10% of the total recorded signals in a particular session. The number of PVs was positively correlated with the acquisition of sexual experience and previous copulatory efficiency (measured as the number of sessions with ejaculation). Furthermore, PVs showed domination of the frequency modulated signals (complex and composite) as well as flat and short with upward ramp ultrasounds with some individual differences, regardless of the level of sexual motivation. The results show a characteristic pattern of PVs and confirm the hypothesis that the number of PVs is a parameter reflecting the level of sexual motivation.

Keywords: 50-kHz ultrasonic vocalizations, anticipatory behavior, male rats, sexual experience, sexual motivation, ultrasound subtypes

INTRODUCTION

Ultrasonic vocalization is one of the most intensively studied components of social behavior in rodents. In rats, two main types of ultrasonic vocalization (USV) can be distinguished based on the dominant frequency of the signal: 22-kHz and 50-kHz (Sales and Pye, 1974; Barfield et al., 1979; Brudzynski, 2015, 2021). The first is characterized by long-lasting flat calls (up to 3 s in duration) with a relatively narrow frequency range around 22-kHz (Barfield and Geyer, 1972). In the frustration state (situation of the absence of expected appetitive reinforcement), these calls can

be frequency modulated (20–35 kHz) with the preceding element at a frequency of about 45-kHz (Geyer et al., 1978; Bialy et al., 2019b). The so-called 50-kHz USV includes shorter ultrasounds (typically lasting up to several tens of milliseconds) with frequencies from 30–35 to 80-kHz. Signals of such calls, after undergoing Fourier transformations, display various shapes with 14 different subtypes (Wright et al., 2010). The rats emit 50-kHz USV during different elements of behavior related to their high arousal states (Bell, 1974; Berz et al., 2021) such as: socio-sexual interactions including copulation (Barfield et al., 1979; Bialy et al., 2000; Burgdorf et al., 2008), fighting (Sales, 1972; Burke et al., 2017), playing (Reinhold et al., 2019), and even tickling by the experimenter (Burgdorf et al., 2005; Panksepp, 2005). Additionally, pharmacologically induced high levels of general arousal [related to movement activity and sensory sensitization associated with increased level of wakefulness during activation of the gigantocellular reticular nucleus and associated structures (Pfaff, 2017)] result in the expression of 50-kHz vocalizations with a strong positive correlation between the number of 50-kHz ultrasounds emitted and the level of activation of the dopaminergic and noradrenergic pathways (Brudzynski, 2007, 2015; Wright et al., 2012; Simola, 2015; Hamed et al., 2016; Simola and Costa, 2018; Kuchniak et al., 2019).

Contrary to 50-kHz USV and according to the arousal hypothesis, 22-kHz USV occurs during abrupt decreases of arousal (Bell, 1974) and in this case can reflect a relaxation state after ejaculation (Bialy et al., 2016) or a safety signal during aversive conditioning (Jelen et al., 2003).

Although USV is accompanied by certain behavioral situations, the question about the function of 50-kHz vocalizations is still open. One hypothesis assuming a non-semiotic communicative character of vocalization was proposed by Sales and Pye in 1974. An alternative hypothesis postulated that USV can simply be artifacts associated with breathing patterns in rodents (Blumberg and Alberts, 1991). Some researchers have also suggested that it is possible to accurately assess a rat's emotional state based on the profile of the signals emitted (Brudzynski, 2015; Simola and Granon, 2019).

In this context, the phenomenon of USV can be considered as a complex central response containing an easily measurable autonomic reflex component (objective component) along with a co-occurring mental constituent (subjective component) that is difficult to measure. While the precise division between subjective and objective emotional components is not easy to establish, an accurate behavioral analysis may assess the proportion between them. To categorize some aspects of behavior as a reflection of subjective mental processes, it is necessary to demonstrate individual differences in USV expression. This form of individualization in the case of USV emission was shown in mice (Holy and Guo, 2005; Arriaga and Jarvis, 2013; Asaba et al., 2014; Chabout et al., 2015; Zala et al., 2020).

Moreover, Matsumoto et al. (2016) revealed that rats have the potential ability to discriminate calls emitted by their own vs. conspecific. Based on electrophysiological measurements, authors showed an independent reaction of different groups of neurons in the dorsal amygdala (area of the

lateral amygdaloid nucleus) responded specifically to own vs. conspecific ultrasounds calls.

Furthermore, rats seem to be able to diminish the emission of USV while playing hide-and-seek with humans when hiding themselves which requires being quiet even when having an elevated level of arousal (Reinhold et al., 2019). Such results provide a possible approach for the conscious use of USV by rats.

In sexual behavior, 50-kHz vocalization can be observed during anticipation, during the initiation of copulation, during the copulatory performance, and during the late phase of the postejaculatory interval (Barfield et al., 1979; Bialy et al., 1996, 2019b). Furthermore, the medial preoptic area and the nucleus accumbens—the neuronal circuits important in sexual activity (Hull et al., 2002) are involved in 50-kHz emissions (Fu and Brudzynski, 1994), also during sexual activity (Gao et al., 2019; Karigo et al., 2021), and anticipatory sexual behavior (Bialy et al., 2010). The anticipatory precontact 50-kHz vocalization (PVs) is convenient for the analysis of individual male vocalizations related to general arousal along with sexual motivation (Bialy et al., 2019a). The usefulness of this model derives, from the possibility, to separately analyze the ultrasounds emitted by the male in a conveniently short period (absence of the female provides a single source of USV). It allows describing the factors that trigger and modify individual vocalization in an appetitive state. Furthermore, it can also be a convenient parameter in the experimental models based on the acquisition of socio-sexual experience and extinction reactions, facilitate recognition of crucial cues regulating acquisition/extinction reactions. It is due to the direct relationship of PVs with the memory of emotional state, copulatory efficiency, and reward value of preceding socio-sexual interactions (Bialy et al., 2000).

However, this relationship concerns the total number of emitted ultrasounds, while the question of the relationship between the level of sexual motivation and emitted subtypes remains unknown. In the present experiments, we recorded PVs emitted during the acquisition of sexual experience as well as those emitted by sexually experienced males with different levels of copulatory activity. We have classified 50-kHz calls into one of 14 subtypes (Wright et al., 2010) and created individual USV profiles for each male. We compared the profiles thus obtained with the copulatory history of each rat. We would answer whether PVs subtypes profiles have the traits suggesting the uniqueness for each animal. If they have, is there any relation between this emerging inter-individual differentiation and the level of sexual motivation for each animal?

The purpose of this study was to answer the question: are there individual-specific distinctions of 50-kHz vocalization associated with the level of sexual experience and sexual motivation in the ultrasound recordings? If not, what is the general physiological pattern of anticipatory precontact vocalizations in the sexual behavior of the male rat?

MATERIALS AND METHODS

Animals

Long-Evans rats, 6–7 months old, were the subjects in this study.

The choice of animals' age was dictated by the stabilized profile of sexual parameters occurring between 150 and 500 days of their life (allows to omit the first life period with significant fluctuation in levels of sex hormones and corresponding tissue sensitivity) (Larsson, 1956, 1967).

Males and females were housed in separate rooms with a reversed 12-h light-dark cycle (lights switched off at 09:00 h) and at a temperature maintained at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. All of the animals had food and water freely available. The food consisted of standard laboratory chow (experiment 1 and 2) with some enrichment in experiment 2 (cereals, fresh vegetables, and fruits) due to the effort to achieve more natural-like conditions conducive to the emergence of social hierarchies. The males arrived from the Department of Experimental Medicine, Medical University of Silesia, Katowice, from different cohorts for experiments 1 and 2. The males were sexually naïve at the beginning of the experiments and have been described separately in the corresponding experiments.

The females ($N = 20$, 10 in the first and 10 in the second experiment), were housed 2–3 animals per standard laboratory cage (55.6 cm \times 33.4 cm \times 19.5 cm).

The housing conditions of males are described in corresponding "experiment 1 and 2" subsections.

All of the cages were provided with wood shavings and dedicated plastic tubes as enrichment. The ovariectomized females were brought into estrus with a single injection of estradiol benzoate (50 $\mu\text{g}/\text{rat}$ s.c., Sigma-Aldrich) and progesterone (500 $\mu\text{g}/\text{rat}$ s.c., Sigma-Aldrich). Hormones were dissolved in sesame oil and administered at a dose of 0.05 ml per individual. Hormonal injections were given 48–72 h before the test for estradiol and 4–8 h before the test for progesterone. Estrus was induced not more often than once a week and not less often than once every 2 weeks. The females were sexually experienced at the beginning of experiments. During an experimental day, a female copulated with up to two males.

Behavioral Procedures

All of the behavioral tests were conducted between 13:00 and 17:00 h during the dark phase of the light-dark cycle. We maintained at least a 1-week interval between tests to counteract the influence of the sexual exhaustion phenomenon on the sexual parameters, which is particularly important in less active groups of males (Larsson, 1956).

The test chamber was a transparent Plexiglas container (50 cm \times 25 cm \times 30 cm) in experiment 1 and a container made of transparent reinforced polyethylene (39 cm \times 59 cm \times 37 cm) in experiment 2.

Before an experiment, all of the males were acclimated 3–4 times to the experimental chamber for 10 min the first time and then for 5 min in consecutive acclimating sessions.

Acquisition of Sexual Experience

A male was introduced into the experimental chamber and a female was introduced 5 min later. Ultrasounds were recorded during the 5-min period between the introduction of the male and the female to the experimental chamber (precontact anticipatory ultrasonic vocalizations—PVs). The session was

conducted until the first ejaculation and ended just after the male resumed copulatory activity. The maximum duration of a single session was 30 min and the session was terminated after this time.

Ultrasound Analysis and Behavior Recording

Visual recording of behavior was made using the Noldus EthoVision system.

Simultaneous to visual recording, ultrasounds were recorded on the same computer using the Metris Sonotrack system.

The microphone was placed 50 cm above the floor during ultrasonic recording. Spectral analysis of ultrasounds was performed using the Sonotrack software. Each ultrasound was analyzed manually using the Sonotrack cursor and was assigned to one of the 14 subtypes according to the classification proposed by Wright et al. (2010) based on its characteristic shape, complexity, and average frequency.

Each session was independently analyzed by two experienced observers to minimize bias in classification. The most inconclusive results were found between the complex and composite categories. For this reason, we decided to modify the classification and distinguish only 13 subtypes. Therefore, the complex and the composite subtypes were combined into one complex/composite category.

In this classification, subtypes of ultrasounds are defined as: complex/composite, trill, flat-trill, trill with jumps, split, step up, step down, multi-step, flat, short, upward ramp, downward ramp, and inverted U. In ambiguous cases, the ultrasounds were listened to at slow speed to classify them correctly.

Subsequently, we counted the total number of ultrasounds and the proportion of their subtypes emitted by each male. The identification of dominant subtypes in the recording was used to create a simplified code characteristic for each individual. Subtypes accounting for at least 10% of the total number of signals were understood to be dominant. Additionally, a low proportion (less than 10%) of the flat vocalization, which is usually frequently emitted by male rats, was considered as a distinguishing feature. In experiment 1, a characteristic vocalization profile for each male was created based on the dominant subtypes visible in all sessions with vocalizations above 9 USV.

Experiment 1

Males ($N = 17$) were housed 2–3 animals per standard laboratory cage (55.6 cm \times 33.4 cm \times 19.5 cm). All were sexually naïve at the beginning of the experiment. They acquired sexual experience during four consecutive copulatory sessions. Our previous results showed that during four sessions changes in sexual parameters related to the acquisition of sexual experience are most relevant and stabilized around the fifth session (Bialy et al., 2000).

All of the precontact 50-kHz vocalizations (PVs), quantification of every subtype and their percentage share in the total spectrum were analyzed. The sum of PVs was additionally correlated with copulatory efficiency measured as the sum of sessions when the male achieved ejaculation (during sessions 2–4 after the male had his first sexual experience).

One male was excluded from the experiment due to extremely aggressive behavior.

Experiment 2

Males ($N = 20$) were housed in the enriched environment as the group contained up to five animals which supported hierarchization within the group. These special larger cages had a vertical structure with wire sidewalls and a solid base (base dimensions 48 cm \times 80 cm and 142 cm high) and were equipped with three levels of wooden platforms. The males before the experimental test achieved socio-sexual experience during five copulatory training sessions.

After such training, rats achieved a relatively stable level of sexual performance related to sexual experience (Bialy et al., 2000). During each session, the male was placed individually with a receptive female in one cage. Training sessions were terminated after 30 min. As the indicator of copulatory efficiency, we used the number of sessions when males achieved ejaculation(s) (or lack of them) from all five training sessions. Then we divided each male into one of three groups based on their copulatory history.

Alpha males ($N = 8$) ejaculated at least during two sessions, beta males ($N = 7$) ejaculated only once and gamma males ($N = 5$) never ejaculated during the five copulatory sessions.

One week after the last training session, precontact anticipatory ultrasonic vocalizations were recorded. A male was introduced for 5 min into the familiar experimental/training chamber where odor cues from receptive females were present. The scent stimuli were provided by the earlier placement of three randomly selected receptive females for 5 min into the experimental cage. Prior to the introduction of the male, the females were taken out.

Males that emitted less than 10 ultrasounds were excluded from statistical analysis. This criterion was adopted because, in the case of few ultrasounds, a single vocalization showed a disproportionately high percentage of a given subtype of vocalization, which led to a significant error in the interpretation of the results. This criterion was met by a total of three males—one male from each examined group.

Statistics

Data from the acquisition phase (the number of ultrasounds, mount, intromission, and ejaculation latencies) were analyzed by non-parametric Friedman repeated measure ANOVA and Dunn's *post hoc* tests (Experiment 1). The number of ultrasounds in Experiment 2 was analyzed by non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and Mann–Whitney for independent groups. Additionally, in experiment 1, the Spearman test was used to correlate the number of the session with ejaculation(s) with the total number of PVs.

RESULTS

Experiment 1

Number of PVs

The number of PVs (Figure 1) increased significantly in males ($N = 16$) during four consecutive sessions of the acquisition of sexual experience ($Fr = 12.816$, $P < 0.01$ with statistically

significant differences between sessions 1 and 3 ($P < 0.05$), and sessions 1 and 4 ($P < 0.01$). Mount latency decreased significantly ($Fr = 17.591$, $P < 0.001$) with statistically significant differences between sessions 1 and 2 ($P < 0.05$), sessions 1 and 3 ($P < 0.01$) and 1 and 4 ($P < 0.01$). Intromission and ejaculation latencies display no significant differences ($P = 0.0815$ and $P = 0.077$ respectively).

A significant correlation (Spearman $r = 0.5608$, $P < 0.05$, $N = 16$) was found between the number of sessions with ejaculation (sessions 2–4) and the total number of PVs emitted by a male during these sessions (Figure 2).

PVs Subtypes

We counted the percentage of different subtypes when a male vocalized 10 times or more in a session. An analysis of USV subtypes was performed and more than 10 vocalizations occurred the most often in three sessions for the same male (six males) and less frequently: in four sessions (five males), in two sessions (four males), and one male vocalized less than 10 times in all four sessions. Those subtypes that appeared at least 10% in the total pool of male vocalizations were marked as the dominant calls. Table 1 shows those subtypes that predominated in all sessions (100%) and those that occurred in at least two sessions out of three or four (50–75%) sessions and in only one session (25%). The complex/composite and flat (or short or upward ramp) subtypes occurred most frequently. The complex/composite and flat (or short or upward ramp) profile was typical to anticipatory precontact vocalizations regardless of the male's copulatory efficiency as measured by the number of ejaculations achieved during sessions 2–4.

Subtypes of PVs did not differ as a function of the acquisition of sexual experience. The percentage of different subtypes showed a similar level during all four copulatory sessions (Figure 3).

Experiment 2

Number and Subtypes of PVs

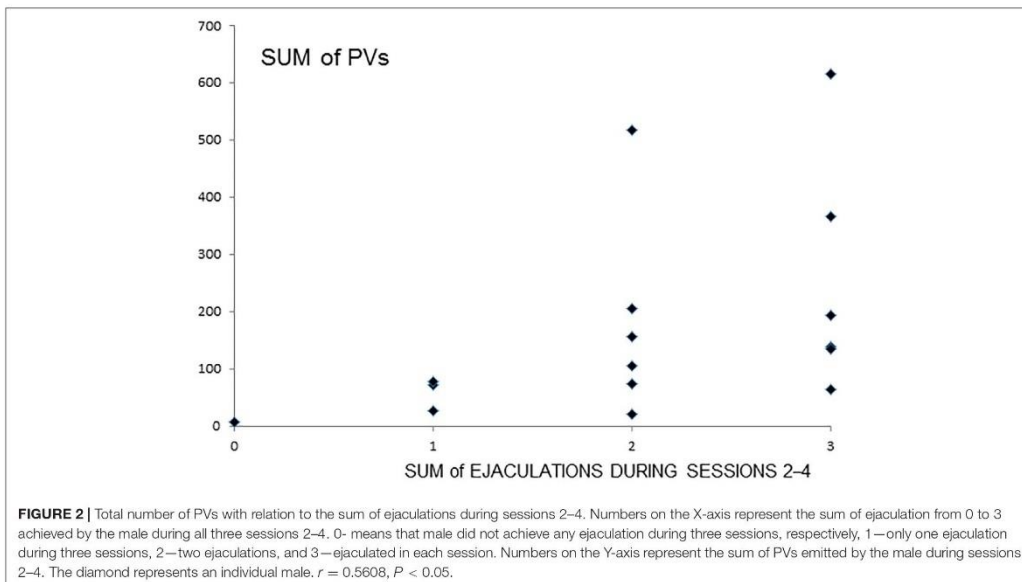
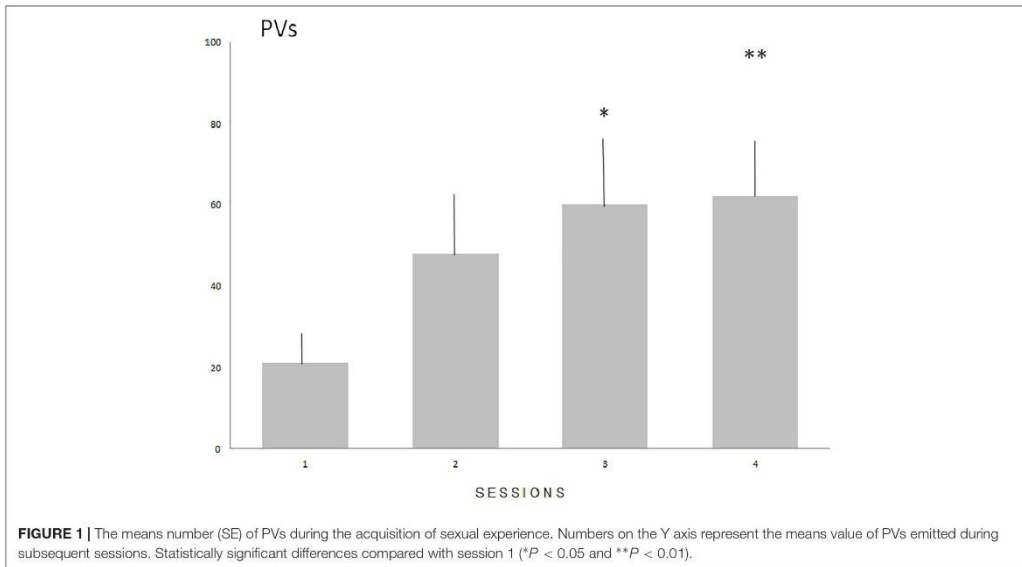
The number of PVs differed significantly between the alpha, beta, and gamma groups [$H(2)$, $N = 17$] = 6.0396, $P < 0.05$. The alpha group vocalized more frequently compared with the gamma group ($P < 0.05$). The beta group did not differ significantly compared with the alpha and gamma groups (Figure 4).

The three most frequent subtypes of ultrasounds detected were: complex/composite (alpha 39.9%, beta 42.4%, and gamma 38% of total ultrasounds), flat (alpha 23.1%, beta 23.8%, gamma 24% of total ultrasounds) and upward ramp (alpha 10.2%, beta 11.5%, gamma 9.2% of total ultrasounds).

There were no statistically significant differences in the percentage of selected subtypes in the total pool of ultrasounds emitted by males when these three groups were compared (Figure 5). Table 2 shows the main ultrasonic subtypes emitted by each male.

DISCUSSION

The results indicate a significant positive relationship between the total number of anticipatory precontact vocalizations and the number of sessions with achieved ejaculation(s). It reveals



an association between the level of socio-sexual motivation and the expression of PVs. Shortening of mount latency—parameter related to sexual motivation (Hull et al., 2002) during the acquisition of sexual experience additionally supports the relation between PVs and sexual motivation.

In two independent groups of rats (experiments 1 and 2), similar patterns of emitted ultrasounds were observed. In all of the males, regardless of their level of sexual motivation or sexual experience, the dominant signals were the frequency modulated complex/composite (CC) signals and the unmodulated flat (F)

TABLE 1 | PVs and ultrasonic subtypes during consecutive sessions.

#	Copulatory status	100%	50–75%	25%	Note
1	3	Sh, UR	F, SU, CC	DR, IU	
2	3	CC, F, Sh	UR	Trills	
3	3	CC, Sh	UR	SU, Trills	Rare flat
4	3	UR, F, CC	Sh, SU	/	
5	3	F, Sh, SD, CC	/	/	
6	3	CC	Trills, UR, Sh	F	
7	2	UR, Sh, F	SD, CC, SU	/	
8	2	CC	Trills, SU, MS	SD, UR, Sh, IU	Rare flat
9	2	CC, Sh, UR	Trills, SU	/	Rare flat
10	2	F, CC	SD, Sh	SU, UR, Trills	
11	2	Trills, CC	/	F, Sh	
12	2	CC, F	/	Trills, SD, Sh	
13	2	F, CC	/	Trills, Sh, UR	
14	1	CC	Sh, UR, Trills, F	MS, SU	
15	1	CC, UR, Trills	/	/	Rare flat
16	0	/	/	/	

Subtypes of ultrasounds are defined as: complex and composite (CC), trill, flat-trill, and trill with jumps (Trills), split (S), step up (SU), step down (SD), multi-step (MS), flat (F), short (Sh), upward ramp (UR), downward ramp (DR), and inverted U (IU). The columns show subtypes emitted always (100%), frequently (50–75%), and sporadically (25%). Within the columns, the order from left to right indicates a decreasing percentage of emitted subtypes.

and, less frequently, the slightly modulated short (Sh) and upward ramp (UR) ultrasounds appeared as co-occurring subtypes. Trills were emitted on an elevated level in experiment 1 only.

Other signals were seen sporadically and rarely exceeded 10% of the total PVs.

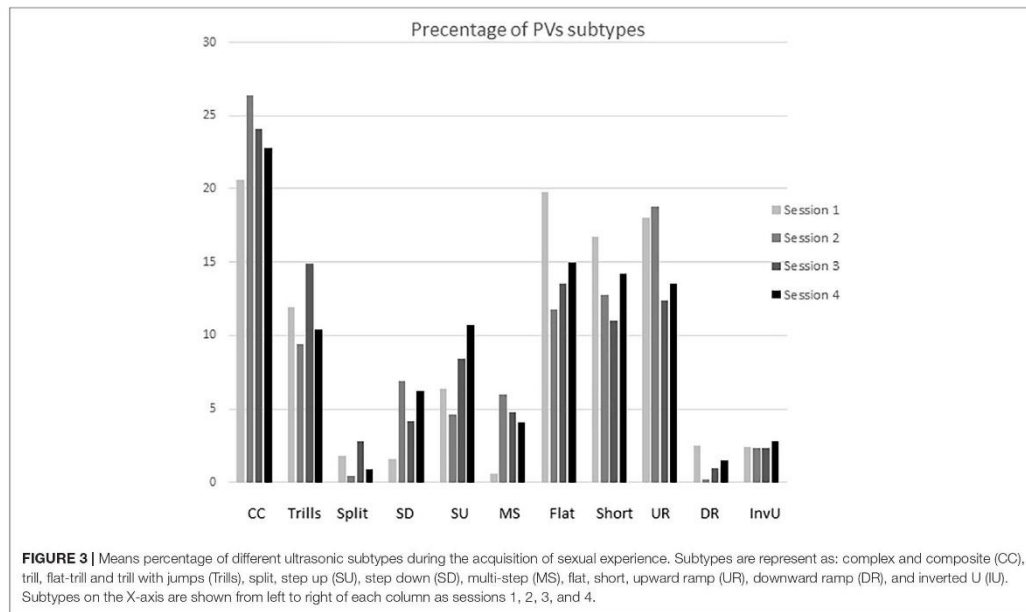
PVs and Sexual Activity

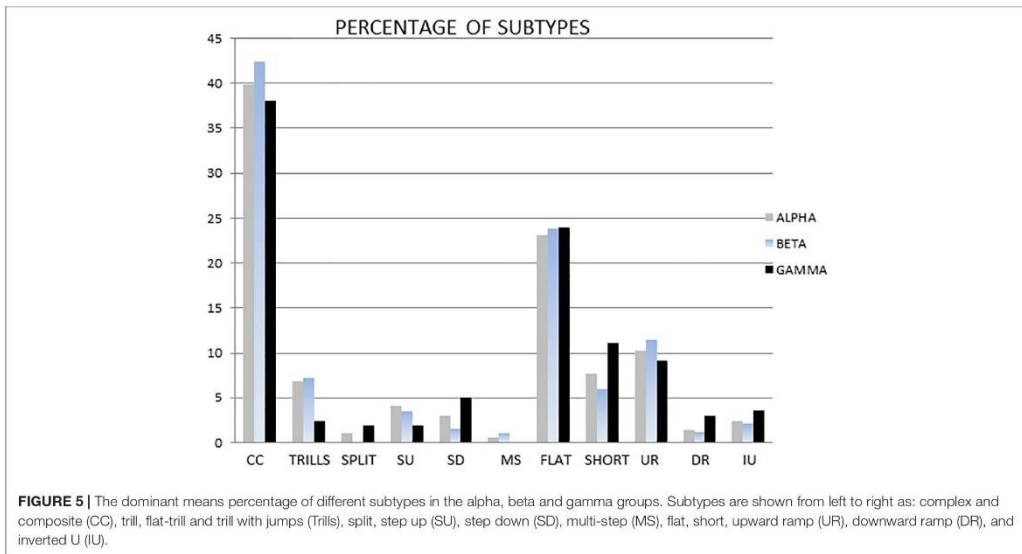
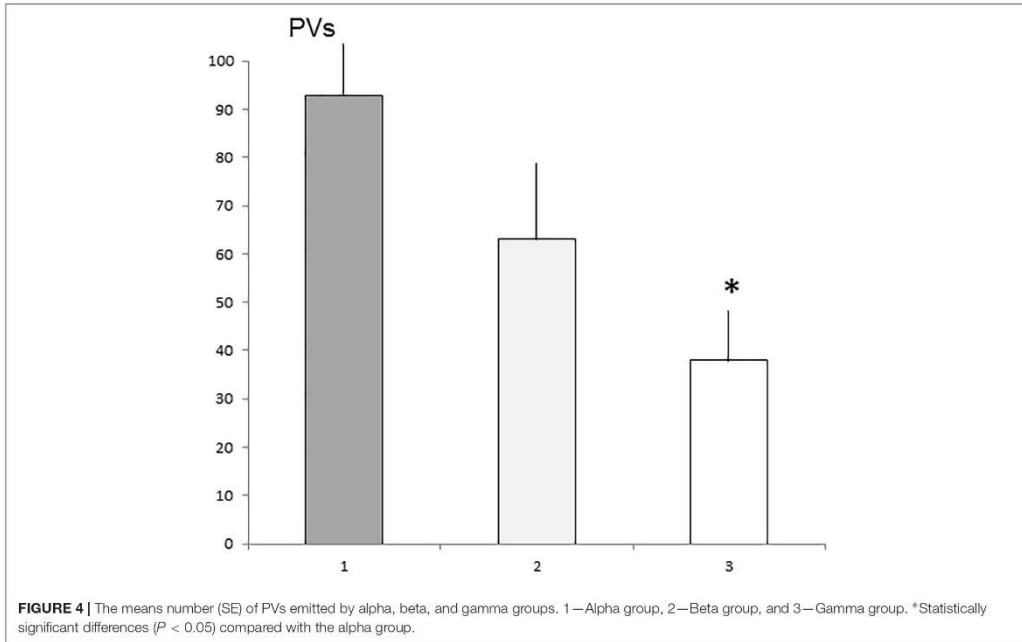
Anticipatory precontact vocalizations depend on the level of sexual activity and reward value of the contacts. In experiment 1, the number of PVs increased during the acquisition of sexual experience.

Moreover, the total number of PVs relates to the number of ejaculations. Ejaculation has the highest reward value compared with other elements of copulatory behavior (Tenk et al., 2009) and, in this context, PVs are related to the reward value of socio-sexual contacts. In experiment 2, the active males vocalized on a significantly higher level compared with much less active or sexually inactive males.

A more detailed explanation of the processes related to anticipatory ultrasonic precontact vocalizations follows. The number of PVs depends on the acquisition of sexual experience, conditioning to odor and background cues, the reward value of contact, NMDA (Bialy et al., 2000), and D1 receptor activity (Bialy et al., 2010).

Blocking of the NMDA receptor (receptor important in neuronal plasticity processes) inhibited changes in PVs during the acquisition of sexual experience but have no significant effect on PVs in sexually experienced males (Bialy et al., 2000). Acquisition of sexual experience and PVs are also related to D1 receptor activity. Surprisingly, peripheral repeated administration of both: antagonist and agonist of D1 receptor inhibited changes in PVs during the acquisition





phase (Bialy et al., 2010) but, D1 receptor agonist had a minor effect on PVs in sexually experienced males (Beck et al., 2002). Repeated D1 receptor agonist injections into

the nucleus accumbens similarly diminished PVs during the acquisition phase and this effect prolonged at least 4 weeks.

TABLE 2 | The individual profiles of emitted ultrasounds.

Male number	Group	Pattern
1	Alpha	CC, Sh, -F
2	Alpha	CC, F
3	Alpha	CC, F
4	Alpha	F, CC
5	Alpha	CC, F, UR
6	Alpha	CC, F, Sh, UR
7	Alpha	CC, F, UR
8	Beta	F, CC
9	Beta	CC, UR, F
10	Beta	CC, T -F
11	Beta	CC -F
12	Beta	CC, UR, F
13	Beta	F, CC
14	Gamma	F, CC, UR, SD
15	Gamma	F, CC
16	Gamma	CC, UR, -F
17	Gamma	CC, Sh, F

In columns, the order from left to right indicates decreasing percentage. Individual vocalization patterns based on the dominant subtypes of individual males appear in the last column of the table. The rare occurrence of the flat subtype is also considered as a minus F. Subtypes of ultrasounds are defined as: complex and composite (CC), trills (T), step down (SD), multi-step (MS), flat (F), short (Sh), upward ramp (UR), downward ramp (DR), and inverted U (IU).

Previously, were identified the specific, dopaminergic neuronal group in the nucleus accumbens responding either to appetitive unconditioned and conditioned stimuli that regulating, reward related behavior (Fiorillo et al., 2003). Thus, probably any significant disturbance of their activity: inhibition or overstimulation can be responsible for such attenuation of the acquisition phase and diminishing PVs.

In this context, PVs reflect learning and emotional memory processes. The number of PVs seems to be related to the level of general arousal and sexual motivation rather than to sexual arousal (Bialy et al., 2019a). In addition, social motivation should also be taken into account, as contacts with an anestrous female also has a triggering effect on PVs although at a significantly lower level (Bialy et al., 2000). We can assume that in the present experiments, PVs in low sexually active males were related to social motivation and general arousal rather than sexual motivation. All of these data seem to be consistent and repeatable, enabling the changing number of PVs to be used as a parameter for the functioning of the memory circuits related to the reward system.

PVs and Individualization

We observed individual differences in the percentage of non-dominant (less than 10% of the total spectrum) subtypes as well as in the occasionally very low level of the flat subtype. The composite signals contained within the CC group consisted of a modulated sound of the complex subtype with a directly accompanying sound of the short subtype. The distinction between the two ultrasounds was often only possible after listening to the signal. In some studies, this

type of signal is listed as a “dual-type.” However, due to the high subjectivity in the evaluation between different observers and the inability to listen on different recording systems other than our system, we decided on a common category. The composite subtype calls, consisting of calls other than complex and short components, occurred very rarely. Furthermore, the individual specificity of vocalizations was manifested in different proportions in the short, upward ramp, and flat subtypes. In general, the presented form of individualization seems to be subtle and not easy to use as a behavioral parameter.

This limitation is also related to the fact that a vast majority of inter-individual differentiation can occur within the so-called frequency-modulated non-trill group (split, step down, step up, multistep, downward, and inverted U) Despite their lack of visibility in the profiles after applying our quantitative criterion, variation within these types exists. Each of them is characterized by its specific shape, although their acoustic parameters, such as duration, mean frequencies, or modulation ranges, are heterogeneous. In summary, the observed individualization additionally occurs within the types of ultrasound that occur sporadically, in their exact parameters, and their potential combinations (like syllables).

Nevertheless, given the existence of the presented pattern, we can assume that it reflects a relatively constant emotional state. In this context, large, comparatively easy to visualize deviations from it may indicate significant central changes. The question of a behaviorally relevant reason for the existence of certain forms of individualization remains open.

USV Profiles

The main question, and aim of our experiments, was to answer the question: do changes in the level of PVs related to elevated general arousal and sexual motivation correspond to changes in the profile of the ultrasound subtypes. Qualitative analysis of ultrasound subtypes revealed an existing characteristic vocalization pattern with complex/composite subtypes combined with flat, short, and upward ramp subtypes dominating in the recordings. This model of vocalization appears similar in both sexually inactive and active males. Moreover, it seems constant during consecutive sessions of sexual experience acquisition and sexual motivation influenced the number of PVs but not the subtype profile. In experiment 2, more escalated social hierarchization was evident in the form of an increase in the non-copulatory number of rats (the gamma group). Regardless of this, the pattern of the profiles remained similar.

In our experiments, trills were visible in some sexually moderately active males. They did not change as a function of sexual experience. Probably they are related to the general arousal level but not sexual motivation *per se*. This hypothesis can be supported by the results of experiments with the repeated administration of psychostimulant drug agents (amphetamine and derivatives, apomorphine, cocaine) which evokes the expression of the trills subtype (Wright et al., 2012, 2013; Mulvihill and Brudzynski, 2018). However, the biological context of the expression of this type of vocalization is not entirely

clear. For example, Mahler et al. (2013) observed no difference in the number of trill emissions during the methamphetamine self-administration period and the subsequent extinction period, obtaining an increase only after re-exposure of the animals to the drug.

Furthermore, many authors, due to the simplicity of ultrasonic classification, often cluster all frequency modulated subtypes (Taracha et al., 2012; Brenes and Schwarting, 2015; Mulvihill and Brudzynski, 2018). The lack of correlation between sexual motivation and the profile of PVs could indicate that the specific type of frequency modulated calls presented in our experiments is an innate pattern of general anticipatory activity. In this context, the degree of modulation could represent a continuous behavioral spectrum, with complex/composite subtype domination associated with more physiological situations and the trills subtype domination reflecting highly aroused states. Further research is needed to confirm this hypothesis. Also, the neurobehavioral context of flat, unmodulated subtype is not clear. In these experiments, we observed flat call as one of the dominant types in most rats. However, in few animals, we observed a noticeable decrease of flats calls in profiles (Tables 1, 2). This reduction wasn't related to copulatory status (activity), indicating the involvement of a factor other than socio-sexual motivation. Recently, some authors proposed that this type can be associated with social-coordinating function and alimentary appetitive reactions, including the food approach (Brudzynski, 2021). According to our results, additional data are needed to clarify this issue.

Further Implications

We have shown that the pattern of physiological anticipatory vocalization was relatively constant and persisted from one experimental session to the next. It is worth noting, however, that vocalization can change significantly in some situations. We observed rapid changes in vocalization occurring during a single session with characteristic transitions between the 50-kHz and 22-kHz frequencies during the frustrated states (Bialy et al., 2019b). Using an analogous non-contact model, changes in the vocalization profile across consecutive sessions have also been demonstrated in mice (Zala et al., 2020). Similarly, significant changes during consecutive experimental sessions have been shown repeatedly with addiction models, e.g., morphine (Covington and Miczek, 2003; Hamed and Kursa, 2018), cocaine (Ma et al., 2010), and methamphetamine (Mahler et al., 2013). Another example of such an application is the change in vocalization profiles that have been observed in induced Parkinson's disease in rats where ultrasound flattening occurs as the disease progresses (Ciucci et al., 2009). Individual

vocalization and own vs. foreign recognition can be disturbed in schizophrenic-like symptoms in the rat model (Matsumoto et al., 2016). Furthermore, changes in the vocalization profile occur in the rat model of affective disorders and psychotic states (Nikiforuk et al., 2013; Wendler et al., 2019; Wöhr, 2021) as well as in suggested models of autism (Caruso et al., 2020).

CONCLUSION

We proposed a relatively simple method to discriminate individual characters of ultrasonic vocalization in rats based on dominant subtype ultrasonic vocalizations. Our results indicate a persistent similar vocalization pattern during anticipatory behavior, regardless of the level of socio-sexual motivation or experience. The number of ultrasonic vocalizations but not the different subtypes seems to be the most related to sexual motivation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by First Local Ethical Committee in Warsaw.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WB-R and MB designed and performed experiments, analyzed data, and prepared the manuscript. MR analyzed USV data in experiments 2. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Medical University of Warsaw and the MUW Young Researcher Grant: 1MA/5/M/MB/N/20/20. The study was carried out with the use of the CePT infrastructure financed by the European Union—the European Regional Development Fund within the Operational Program “Innovative Economy” for 2007–2013.

REFERENCES

- Arriaga, G., and Jarvis, E. D. (2013). Mouse vocal communication system: are ultrasounds learned or innate? *Brain Lang.* 124, 96–116. doi: 10.1016/j.bandl.2012.10.002
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., and Kikusui, T. (2014). Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* 8:231. doi: 10.3389/fnins.2014.00231
- Barfield, R. J., and Geyer, L. A. (1972). Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. *Science* 176, 1349–1350. doi: 10.1126/science.176.4041.1349
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., and McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic Vocalizations in Rat Sexual Behavior. *Am. Zool.* 19, 469–480. doi: 10.1093/icb/19.2.469
- Beck, J., Bialy, M., and Kostowski, W. (2002). Effects of D(1) receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal

- compartment-runway paradigm. *Physiol. Behav.* 76, 91–97. doi: 10.1016/s0031-9384(02)00678-9
- Bell, R. W. (1974). Ultrasounds in small rodents: arousal-produced and arousal-producing. *Dev. Psychobiol.* 7, 39–42. doi: 10.1002/dev.420070107
- Berz, A., Pasquini, de Souza, C., Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2021). Limited generalizability, pharmacological modulation, and state-dependency of habituation towards pro-social 50-kHz calls in rats. *Science* 24:102426. doi: 10.1016/j.isci.2021.102426
- Bialy, M., Beck, J., Abramczyk, P., Trzebski, A., and Przybylski, J. (1996). Sexual behavior in male rats after nitric oxide synthesis inhibition. *Physiol. Behav.* 60, 139–143. doi: 10.1016/0031-9384(95)02272-4
- Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Kasarello, K., Nikolaev, E., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2016). Modulation of 22-kHz postejaculatory vocalizations by conditioning to new place: Evidence for expression of a positive emotional state. *Behav. Neurosci.* 130, 415–421. doi: 10.1037/bne0000153
- Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J., and Zera, T. (2019a). The Sexual Motivation of Male Rats as a Tool in Animal Models of Human Health Disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 13:257. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00257
- Bialy, M., Kalata, U., Nikolaev-Diak, A., and Nikolaev, E. (2010). D1 receptors involved in the acquisition of sexual experience in male rats. *Behav. Brain Res.* 206, 166–176. doi: 10.1016/j.bbr.2009.09.008
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019b). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol. Exp.* 79, 1–12. doi: 10.21307/ane-2019-001
- Bialy, M., Rydz, M., and Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav. Neurosci.* 114, 983–990. doi: 10.1037/0735-7044.114.5.983
- Blumberg, M. S., and Alberts, J. R. (1991). On the significance of similarities between ultrasonic vocalizations on infant and adult rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15, 383–390. doi: 10.1016/S0149-7634(05)80031-4
- Brenes, J. C., and Schwarting, R. K. W. (2015). Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats. *Physiol. Behav.* 149, 107–118. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.05.012
- Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.* 182, 261–273. doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.004
- Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 180–192. doi: 10.2174/1570159x13999150210141444
- Brudzynski, S. M. (2021). Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sci.* 11:605. doi: 10.3390/brainsci11050605
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfau, J. G., Brudzynski, S. M., and Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J. Comp. Psychol.* 122, 357–367. doi: 10.1037/a0012889
- Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S. M., Kroes, R., and Moskal, J. R. (2005). Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. *Behav. Genet.* 35, 67–72. doi: 10.1007/s10519-004-0856-5
- Burke, C. J., Kisko, T. M., Pellis, S. M., and Euston, D. R. (2017). Avoiding escalation from play to aggression in adult male rats: The role of ultrasonic calls. *Behav. Process.* 144, 72–81. doi: 10.1016/j.beproc.2017.09.014
- Caruso, A., Ricceri, L., and Scattoni, M. L. (2020). Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 116, 31–43. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.06.011
- Chabout, J., Sarkar, A., Dunson, D. B., and Jarvis, E. D. (2015). Male mice song syntax depends on social contexts and influences female preferences. *Front. Behav. Neurosci.* 9:76. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00076
- Ciucci, M. R., Ahrens, A. M., Ma, S. T., Kane, J. R., Windham, E. B., Woodlee, M. T., et al. (2009). Reduction of dopamine synaptic activity: degradation of 50-kHz ultrasonic vocalization in rats. *Behav. Neurosci.* 123, 328–336. doi: 10.1037/a0014593
- Covington, H. E., and Miczek, K. A. (2003). Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur. J. Pharmacol.* 467, 1–13. doi: 10.1016/S0014-2999(03)01558-9
- Fiorillo, C. D., Tobler, P. N., and Schultz, W. (2003). Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* 299, 1898–1902. doi: 10.1126/science.1077349
- Fu, X. W., and Brudzynski, S. M. (1994). High-frequency ultrasonic vocalization induced by intracerebral glutamate in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 835–841. doi: 10.1016/0091-3057(94)90231-3
- Gao, S. C., Wei, Y. C., Wang, S. R., and Xu, X. H. (2019). Medial Preoptic Area Modulates Courtship Ultrasonic Vocalization in Adult Male Mice. *Neurosci. Bull.* 35, 697–708. doi: 10.1007/s12264-019-00365-w
- Geyer, L. A., Barfield, R. J., and McIntosh, T. K. (1978). Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: II. Treatment of males. *J. Comparat. Physiol. Psychol.* 92, 447–456. doi: 10.1037/h0077487
- Hamed, A., and Kursa, M. B. (2018). Inter-individual differences in serotonin and glutamate co-transmission reflect differentiation in context-induced conditioned 50-kHz USVs response after morphine withdrawal. *Brain Struct. Funct.* 223, 3149–3167. doi: 10.1007/s00429-018-1683-4
- Hamed, A., Daszczuk, P., Kursa, M. B., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., et al. (2016). Non-parametric analysis of neurochemical effects and Arc expression in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalization. *Behav. Brain Res.* 312, 174–185. doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.042
- Holy, T. E., and Guo, Z. (2005). Ultrasonic Songs of Male Mice. *PLoS Biol.* 3:e386. doi: 10.1371/journal.pbio.0030386
- Hull, E. M., Meisel, R. L., and Sachs, B. D. (2002). “1 - Male Sexual Behavior,” in *Hormones, Brain and Behavior*, eds D. W. Pfaff, A. P. Arnold, S. E. Fahrbach, A. M. Etgen, and R. T. Rubin (San Diego: Academic Press), 3–137.
- Jelen, P., Soltysik, S., and Zagrodzka, J. (2003). 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav. Brain Res.* 141, 63–72. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00321-2
- Karigo, T., Kennedy, A., Yang, B., Liu, M., Tai, D., Wahle, I. A., et al. (2021). Distinct hypothalamic control of same- and opposite-sex mounting behaviour in mice. *Nature* 589, 258–263. doi: 10.1038/s41586-020-2995-0
- Kuchniak, K., Wyszogrodzka, E., Chrapusta, S. J., Czarna, M., Michalak, M., Płaźnik, A., et al. (2019). Using anticipatory and drug-evoked appetitive ultrasonic vocalization for monitoring the rewarding effect of amphetamine in a rat model of drug self-administration. *Behav. Brain Res.* 376:112187. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112187
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat*. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Larsson, K. (1967). Testicular hormone and developmental changes in mating behavior of the male rat. *J. Comparat. Physiol. Psychol.* 63, 223–230. doi: 10.1037/h0024358
- Ma, S. T., Maier, E. Y., Ahrens, A. M., Schallert, T., and Duvauvache, C. L. (2010). Repeated intravenous cocaine experience: development and escalation of pre-drug anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav. Brain Res.* 212, 109–114. doi: 10.1016/j.bbr.2010.04.001
- Mahler, S. V., Moorman, D. E., Feltenstein, M. W., Cox, B. M., Ogburn, K. B., Bachar, M., et al. (2013). A rodent “self-report” measure of methamphetamine craving? Rat ultrasonic vocalizations during methamphetamine self-administration, extinction, and reinstatement. *Behav. Brain Res.* 236, 78–89. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.023
- Matsumoto, J., Nishimaru, H., Takamura, Y., Urakawa, S., Ono, T., and Nishijo, H. (2016). Amygdalar Auditory Neurons Contribute to Self-Other Distinction during Ultrasonic Social Vocalization in Rats. *Front. Neurosci.* 10:399. doi: 10.3389/fnins.2016.00399
- Mulvihill, K. G., and Brudzynski, S. M. (2018). Non-pharmacological induction of rat 50 kHz ultrasonic vocalization: Social and non-social contexts differentially induce 50 kHz call subtypes. *Physiol. Behav.* 196, 200–207. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.09.005
- Nikiforuk, A., Kos, T., Fijał, K., Hołuj, M., Rafa, D., and Popik, P. (2013). Effects of the Selective 5-HT7 Receptor Antagonist SB-269970 and Amisulpride on Ketamine-Induced Schizophrenia-like Deficits in Rats. *PLoS One* 8:e66695. doi: 10.1371/journal.pone.0066695
- Panksepp, J. (2005). Beyond a Joke: From Animal Laughter to Human Joy? *Science* 308, 62–63. doi: 10.1126/science.1112066
- Pfaff, D. (ed.) (2017). “Central nervous system arousal fueling instinctive behaviors,” in *How the Vertebrate Brain Regulates Behavior*, (Cambridge: Harvard University Press), 215–226. doi: 10.4159/9780674978751-009

- Reinhold, A. S., Sanguinetti-Scheck, J. I., Hartmann, K., and Brecht, M. (2019). Behavioral and neural correlates of hide-and-peek in rats. *Science* 365, 1180–1183. doi: 10.1126/science.aax4705
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim. Behav.* 20, 88–100. doi: 10.1016/S0003-3472(72)80177-5
- Sales, G. D., and Pye, J. D. (1974). *Ultrasonic communication by animals*. London: Chapman and Hall.
- Simola, N. (2015). Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 164–179. doi: 10.2174/1570159x13999150318113800
- Simola, N., and Costa, G. (2018). Emission of categorized 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats repeatedly treated with amphetamine or apomorphine: Possible relevance to drug-induced modifications in the emotional state. *Behav. Brain Res.* 347, 88–98. doi: 10.1016/j.bbr.2018.02.041
- Simola, N., and Granon, S. (2019). Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology* 159:107420. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.008
- Taracha, E., Hamed, A., Krzysciak, P., Lehner, M., Skórzewska, A., Plaźnik, A., et al. (2012). Inter-individual diversity and intra-individual stability of amphetamine-induced sensitization of frequency-modulated 50-kHz vocalization in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 222, 619–632. doi: 10.1007/s00213-012-2658-4
- Tenk, C. M., Wilson, H., Zhang, Q., Pitchers, K. K., and Coolen, L. M. (2009). Sexual reward in male rats: Effects of sexual experience on conditioned place preferences associated with ejaculation and intromissions. *Hormones Behav.* 55, 93–97. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.08.012
- Wendler, E., de Souza, C. P., Dornellas, A. P. S., Santos, L. E., Ferreira, S. T., Galduróz, J. C. F., et al. (2019). Mania-like elevated mood in rats: Enhanced 50-kHz ultrasonic vocalizations after sleep deprivation. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 88, 142–150. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.07.002
- Wöhr, M. (2021). Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Br. J. Pharmacol.* [Preprint]. doi: 10.1111/bph.15487
- Wright, J. M., Dobosiewicz, M. R. S., and Clarke, P. B. S. (2012). α - and β -Adrenergic Receptors Differentially Modulate the Emission of Spontaneous and Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 808–821. doi: 10.1038/npp.2011.258
- Wright, J. M., Dobosiewicz, M. R. S., and Clarke, P. B. S. (2013). The role of dopaminergic transmission through D1-like and D2-like receptors in amphetamine-induced rat ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology* 225, 853–868. doi: 10.1007/s00213-012-2871-1
- Wright, J. M., Gourdon, J. C., and Clarke, P. B. (2010). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology* 211, 1–13. doi: 10.1007/s00213-010-1859-y
- Zala, S. M., Nicolakis, D., Marconi, M. A., Noll, A., Ruf, T., Balazs, P., et al. (2020). Primed to vocalize: Wild-derived male house mice increase vocalization rate and diversity after a previous encounter with a female. *PLoS One* 15:e0242959. doi: 10.1371/journal.pone.0242959

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Bogacki-Rychlik, Rolf and Bialy. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

PUBLIKACJA NR 3

*A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound
Separation During the Sociosexual Vocal-Non-contact Model
in Rats.*

Wiktor Bogacki-Rychlik

Anna Wrona

Michał Biały



A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound Separation During the Sociosexual Vocal-Non-contact Model in Rats

Wiktor Bogacki-Rychlik, Anna Wrona and Michal Bialy*

Department of Experimental and Clinical Physiology, Laboratory of Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

Ultrasonic vocalization (USV) is one of the measurable behavioral parameters of sociosexual interactions in rats. To precisely and accurately describe the neurobehavioral properties of USV and the potentially related specific emotional responsiveness of animals, we need to know which animals vocalize and what is their exact behavioral and physiological response. To this end, we modified the non-contact cage [non-contact erection model (NCE)] by adding a modification [vocalization-non-contact erection (VOC-NCE)] that makes it possible to assign emitted ultrasonic signals to a particular animal. Typically, the NCE cage consists of two compartments separated by perforated baffles. A male is placed in one section, and a receptive female is placed in the other section. This makes possible the accurate description of sexual parameters related to the cues controlled by the experimenter. In VOC-NCE, we completely separated the male USV from the female USV by three appropriately perforated baffles and located microphones combined with ultrasonic screening. We recorded emission in both typical bands, the so-called 22- and 50-kHz bands, with various subtypes, thus highlighting the utility of our protocol to investigate the sexual dimorphism of vocalization. Similar to the anticipatory model, we showed that emission can occur without acoustic feedback from concomitants during the VOC-NCE test. Therefore, we propose a relatively simple method for assigning individual vocalization. We discuss its usefulness and limitations in assessing vocal differentiation related to sexual parameters, adaptive changes during conditioning procedures, and further applications.

Keywords: ultrasonic vocalization, ultrasound separation, sexual behavior, 22-kHz, 50-kHz, rats

OPEN ACCESS

Edited by:

Luigia Trabace,
University of Foggia, Italy

Reviewed by:

Theresa Kisko,
University of Marburg, Germany
Hideaki Inagaki,
Aichi Medical University, Japan

*Correspondence:

Michal Bialy
michal.bialy@wum.edu.pl;
michalbialy@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to
Motivation and Reward,
a section of the journal
Frontiers in Behavioral Neuroscience

Received: 01 April 2022

Accepted: 21 April 2022

Published: 25 May 2022

Citation:

Bogacki-Rychlik W, Wrona A and
Bialy M (2022) A Protocol
for the Non-invasive Method
of Ultrasound Separation During
the Sociosexual Vocal-Non-contact
Model in Rats.
Front. Behav. Neurosci. 16:910591.
doi: 10.3389/fnbeh.2022.910591

INTRODUCTION

Ultrasonic vocalization (USV) emitted by rats has gained considerable acceptance in recent decades as an applicable parameter in neurobehavioral research (Burgdorf and Panksepp, 2006; Taracha et al., 2012; Potasiewicz et al., 2019; Caruso et al., 2020; Costa et al., 2021). The frequency spectrum of the main emitted signals ranges from 20 kHz to about 70 kHz. The commonly accepted division according to the dominance frequency divides them into two groups, the so-called 22- and 50-kHz bands (Sales and Pye, 1974; Wright et al., 2010; Wöhr and Schwarting, 2013; Brudzynski, 2015),

differing in the accompanying neurobehavioral context of the emission and stimulation of the reward-related neuronal structure of the rat brain (Brudzynski, 2007).

During sociosexual interactions in rats (arousing and highly appetitive situations), we can observe a wide variety of ultrasounds with all subtypes in the 22- and 50-kHz bands (Barfield et al., 1979; Burgdorf et al., 2008; Seffer et al., 2014; Ågmo and Snoeren, 2015; Bialy et al., 2019a; Bogacki-Rychlik et al., 2021).

One of the most significant problems of USV analysis is assigning particular signals to the animal that emitted them. This is necessary for the standardization of USV as a parameter reflecting a specific physiological process taking place during intraindividual interactions. It could only then serve as being fully applicable in preclinical models with a reasonable translational potential. To date, methods allowing this type of distinction are based on an analysis of the anticipatory vocalization of each individual (Bialy et al., 2000; Bogacki-Rychlik et al., 2021), the devocalization of one of the animals (Thomas et al., 1981; White et al., 1990; Matochik et al., 1992; Kisko et al., 2015), the anesthetization of one of them (Maggio and Whitney, 1985), or the use of a complex system based on multisource recording combined with the application of mathematical methods (Sangiamo et al., 2020; Warren et al., 2020).

Each of these methods has specific limitations due to the invasiveness of the procedure, stimuli deprivation of the animals, or a methodology that is hard to apply.

We propose a relatively simple way to distinguish ultrasounds during the so-called vocalization-non-contact erection test (VOC-NCE) in the experiment described here. The non-contact erection test (NCE) and dedicated chamber cage were developed and refined by Benjamin D. Sachs (Sachs et al., 1994; Sachs, 1997). It made it possible to standardize non-contact erections as a behavioral parameter and use them to study mechanisms of sexual arousal through the selective and controlled deprivation of tactile, visual, or olfactory stimuli. The standard NCE procedure was carried out by placing two animals in two distinct compartments separated by three plexiglass partitions with specific perforations. Shifts in the level of perforations between the baffles provided olfactory stimuli without direct contact between the animals. Furthermore, the transparent versus opaque material of the partition gave some (or a reduced) visual stimuli. Also, the exchange of non-specific auditory stimuli (to reach the spectrum heard by humans) was possible due to the movements of the animals. By airflow regulation, the experimenter could control the level of olfactory stimuli perceived by the subjects (Sachs, 1997). Altogether, it provided an opportunity to measure the parameters of sociosexual behavior during the absence of direct tactile stimulation with a controlled level of other classes of stimuli.

We proposed an additional expansion of this method by adding the possibility of analyzing the USV parameter of a particular animal and thus correlate it with other sexual parameters of males and females. We obtained this selectivity by appropriately positioning two microphones (one

in each compartment) and adding a silencing screen above the chambers. Consequently, we isolated the acoustic stream derived from each animal.

Moreover, due to the high research interest in USV during sociosexual interactions, we present in detail our investigative protocol, which is based on rat sexual behavior. We believe that sexual behavior across the rodent order, including typical laboratory models (i.e., mice, gerbils, hamsters, and rats) and their corresponding USV, is controlled by similar mechanisms but differs significantly in the detail. Thus, we hoped that the presented VOC-NCE chamber with the behavioral protocol would help to avoid misinterpretations of the results between different experimental approaches by implementing the possibility of controlling modalities combined with sexual parameters (general arousal, sexual arousal, sexual motivation).

Nevertheless, the primary aim of this model was to obtain a clear USV separation during sociosexual interactions.

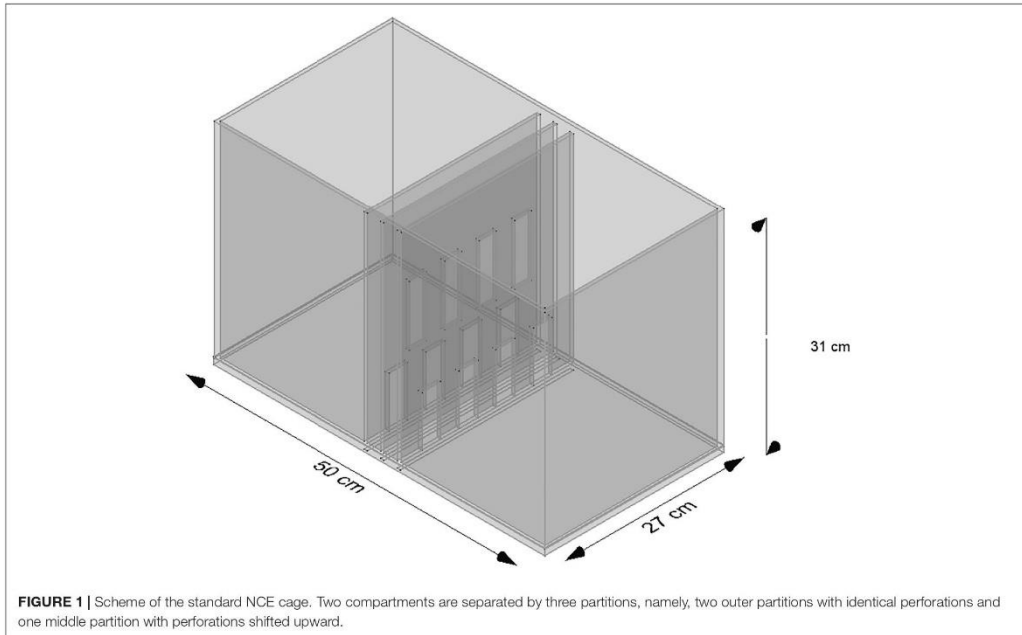
MATERIALS AND EQUIPMENT

Apparatus

The experimental chamber, made of plexiglass, had total dimensions of 50 cm × 31 cm × 27 cm. For the VOC-NCE test, the long axis of the chamber was bisected in the middle of its length by a set of three transparent partitions placed 1 cm apart (Figures 1, 2). The two outer partitions had evenly spaced rectangular perforations (2.5 cm × 7.5 cm) cut out at the bottom. The middle partition had four similar-sized rectangular perforations (2.5 cm × 9 cm), aligned about 3 cm above the perforations of the outer ones (Figure 1). We covered the top of the compartments with a wire grid to prevent the rats from escaping during the experimental trials. To acoustically separate the recording compartments, we mounted an acoustic screen (72 cm × 52 cm × 10 cm) in the central part of the lid, just above the three dividers. The microphones were attached 50 cm above the ground, one on each side, exactly opposite each other (Figures 3–5).

Technical Assumption

In the experiment, we used a cage constructed of poly (methyl methacrylate) (PMMA), also known as plexiglass. The choice of material was dictated by its properties such as low weight, transparency (as PMMA transmits up to 94% of visible light) (Martín-de León et al., 2019), high flexibility (good resistance to cracking compared with polystyrene as used in some systems), and ease of cleaning even at high temperatures (Ali et al., 2015). However, in our experiment, the most important features are related to its sound insulation properties. In this context, PMMA is used in environmental engineering as sound walls to reduce industrial noise (Garai and Guidorzi, 2000), acoustic screens in recording studios, and commercially available isolation systems for animals (such as IVC). In the presented VOC-NCE system, two compartments were separated by three partitions made of plexiglass. This made it possible to obtain sufficient



ultrasonic isolation due to the high acoustic impedance of the material. The main frequency range of the USV of the rats is between 20 kHz to about 70 kHz, so the wave energy is relatively low (comparable with the human audible sound wave range). We decided to leave open each compartment at the top and isolate them by the acoustic splitter screen (covered with polyurethane soundproofing foam). The open construction made it possible to avoid sound artifacts in the recordings generated due to multiple wave reflections. Apart from the ability to reflect, plexiglass has a significant sound absorption parameter, so we could probably create an acoustic shadow in the middle part of the cage (between the outer partitions). The floor of the VOC-NCE cage was not covered by bedding to reduce ultrasonic artifacts.

Methods

Animals and Behavioral Procedures

The subjects of this study were 6-month-old Long-Evans rats (eight males and eight females, weighted 480–570 g and 280–400 g, respectively). The animals were purchased from the Department of Experimental Medicine, the Medical University of Silesia, Katowice. The males and females were housed in separate rooms, with two animals per standard laboratory cage (55.6 cm × 33.4 cm × 19.5 cm, Animalab type IV). Chow and water were freely available. All cages were provided with wood shavings and dedicated plastic tubes as enrichment. The rats were maintained on a 12-h light-dark cycle (lights

switched off at 9:00 p.m.) at a temperature around 22°C. All of the behavioral tests were conducted between 13:00 and 17:00 during the dark phase of the light-dark cycle. The experimental room was illuminated primarily by infrared light, with a total intensity of 25 lux.

The females were bilaterally ovariectomized [under intraperitoneal (IP) injection of ketamine 10 mg/100 g with xylazine 1 mg/100 g] before the experiment and then convalesced for 2 weeks (with analgetic and anti-inflammatory support). Estrus was hormonally induced with a single injection of estradiol benzoate [50 µg/rat subcutaneously (s.c.), Sigma, 48–72 h before the trial] and progesterone (500 µg/rat s.c., Sigma, 4–8 h before the trial). Hormones were dissolved in sesame oil and administered in 0.05 ml doses per individual. The induction was repeated no more than once a week and at least once every 2 weeks. The animals were habituated to the experimenters, to all behavioral procedures, and to the chamber in all versions (for the copulatory and VOC-NCE test). Before the trial phase, all of the animals acquired sexual experience during four preceding training sessions. Training copulatory sessions were performed in the experimental VOC-NCE chamber with the partitions removed. The male was placed for 5 min for acclimation (anticipatory phase), and then an estrus female was introduced for 25 min or up to the first intromission after the first ejaculation.

During the experimental trials, a male was placed in the first compartment for 5 min alone (anticipatory phase) and the recording equipment was switched on. After this time, a female



FIGURE 2 | At the top of the figure are two middle partitions, and at the bottom are two outer partitions. The black opaque versions are alternatives to implement the deprivation of visual cues. The results presented in this study were obtained using the transparent version.

was placed in the second compartment, and the recording process continued for the next 20 min.

Ultrasonic Recording and Analysis

All behavioral procedures were performed in two adjoining rooms. The recording room with the VOC-NCE cage and microphones and infrared camera was acoustically and visually isolated from the observers. A second room was used for observation, registration (computer with hardware), and further analysis. The rats were placed in the recording room during all of the trials while the experimenters stayed in the other room.

This separation isolated unwanted stimuli and reduced background noise generated by the electronic equipment and human activity (to maintain an optimal acoustic environment). The USV was recorded with a Sonotrack System (Sonotrack by Metris ver. 2.2) dedicated to this purpose, which enables recording on up to four independent parallel channels. The system consists of ultrasonic microphones (frequency range 15–125 kHz), with fully compatible hardware and software¹. The microphones were connected by two identical

¹ refer to https://www.metris.nl/en/products/sonotrack/sonotrack_specs/forspecifications.

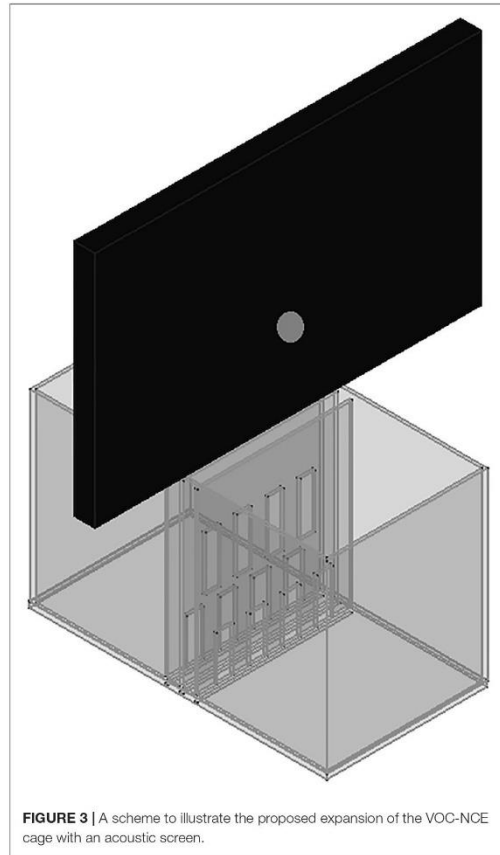


FIGURE 3 | A scheme to illustrate the proposed expansion of the VOC-NCE cage with an acoustic screen.

cables, identical in all conductive parameters. All USV tracks were analyzed and compared manually. After the visual analysis based on spectrogram pictures, analog time windows were listened to, to exclude potential low-energy vestigial ultrasonic leaks.

RESULTS

The acoustic isolation was sufficient to separate all emitted ultrasonic calls and assign them to each animal. We analyzed the records from the male (channel 1) and female (channel 2) compartments obtained during non-contact sessions. Vocalizations were very intensive (hundreds of particular signals per track), and both males and females vocalized in all of the main types of ultrasounds. We presented some arbitrarily chosen samples of ultrasounds from two random records (Figures 6–9). The only criterion for selection was our intention to demonstrate various types in both 50- and 22-kHz frequencies. The visible



FIGURE 4 | The photograph of the VOC-NCE located in the behavioral recording room (the frontal view). For clarity, cables have been unplugged from the microphones, and the covering grid was removed.

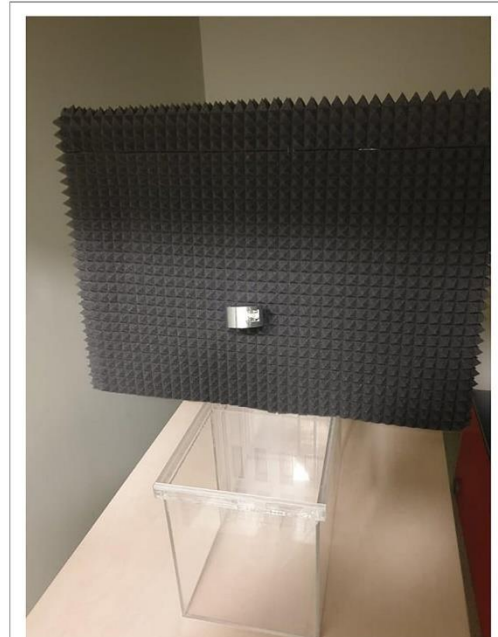


FIGURE 5 | The photograph of the VOC-NCE located in the behavioral recording room (the oblique view). For clarity, cables have been unplugged from the microphones, and the covering grid was removed.

color differentiation of the software was intentionally applied to improve the overall clarity. The timeline of the corresponding spectrograms was precisely adjusted to each other to reveal sufficient separation.

DISCUSSION

Our results indicate that the proposed VOC-NCE procedure is sufficient to separate vocalizations emitted by two individuals during sociosexual interaction. We have demonstrated that partitions with appropriately located perforations, combined with simple acoustic isolations, are sufficient to entirely reduce the ultrasonic stream while maintaining a flow of other stimuli. In the conducted sexual vocal-non-contact tests, emissions of USV were very intensive in the situation with reduced acoustic feedback, which implies the dominative role of cues other than auditory in initiating and maintaining USV. Therefore, this relatively simple model provides an opportunity to prioritize incentive modalities, crucial for emission during encounters. Moreover, it makes it possible to describe sex-dependent features in the spectrograms obtained due to reliable matching to the male or female. Furthermore, the presented

separation should be useful for assigning an individual USV profile to other physiological parameters occurring during sexual behavior.

Expanding the NCE Test

In the classical procedure presented by Benjamin D. Sachs, the visual analysis of behavior enables the parameterization of sexual arousal (by latency to first non-contact erection as well as the number of non-contact erections) (Sachs et al., 1994; Sachs, 1997), sexual preferences (Kondo and Hayashi, 2021), sociosexual motivation (latency to start and duration of perforation sniffing), and general arousal (number of rearing, total locomotor activity). The experimental non-contact chamber provides visual contact (when the baffles are transparent), exchange of olfactory stimuli due to perforations (olfactory cues could also be reduced or enhanced by pumping air in or out), and non-specific acoustic cues as a result of animal movements (mainly in the human audible range). The previous experiments have shown that olfactory cues are sufficient and the most important to evoke non-contact erections (Sachs, 1997; Kondo et al., 1999) in mechanisms related to the medial amygdala activity (Bialy and Sachs, 2002; Kondo and Sachs,

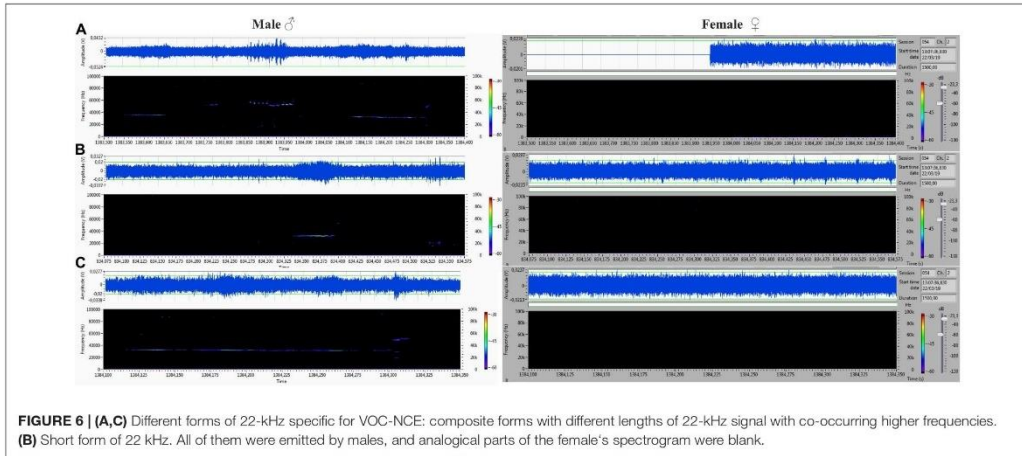


FIGURE 6 | (A,C) Different forms of 22-kHz specific for VOC-NCE: composite forms with different lengths of 22-kHz signal with co-occurring higher frequencies. **(B)** Short form of 22 kHz. All of them were emitted by males, and analogical parts of the female's spectrogram were blank.

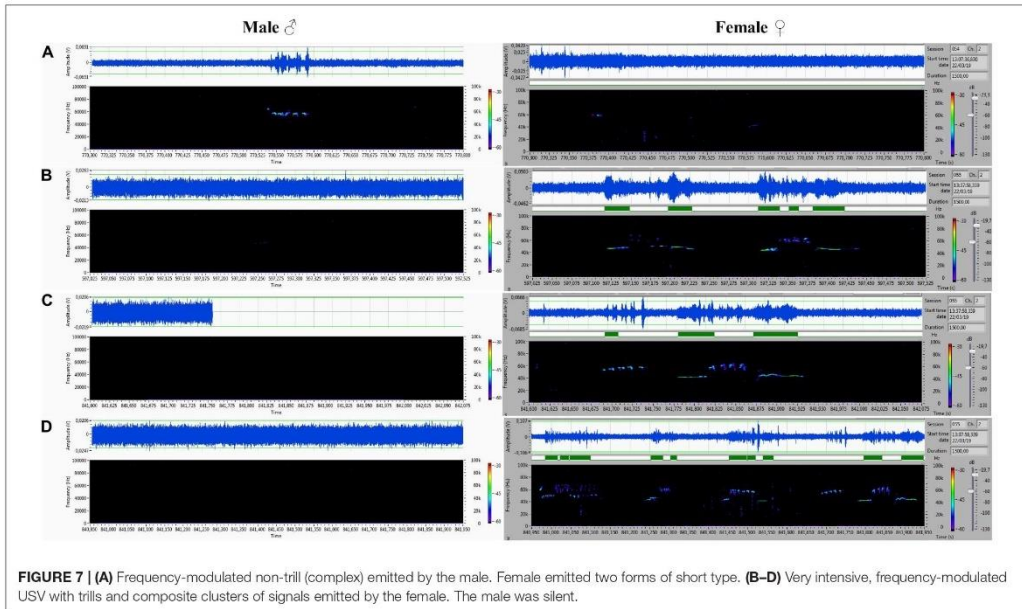


FIGURE 7 | (A) Frequency-modulated non-trill (complex) emitted by the male. Female emitted two forms of short type. **(B–D)** Very intensive, frequency-modulated USV with trills and composite clusters of signals emitted by the female. The male was silent.

2002; Bialy et al., 2011). Other stimuli appear to be less relevant in inducing a non-contact erection and sexual arousal in rats (Sachs, 1997). We can also modify the level of sexual arousal *via* the hormonal status of the female or male (Sachs et al., 1994; Manzo et al., 1999; Fernández-Vargas, 2018). Taken together, VOC-NCE gives opportunities to investigate USV during sociosexual activity in a more precise and selective established cue/sensory environment.

Ultrasonic Vocalization During VOC-NCE, Anticipatory, Copulation, and Postejaculatory Period: Behavioral Protocols

USV in the VOC-NCE Test

We started to measure the vocalization phase of the VOC-NCE test after 5 min of the anticipatory period with the introduction of

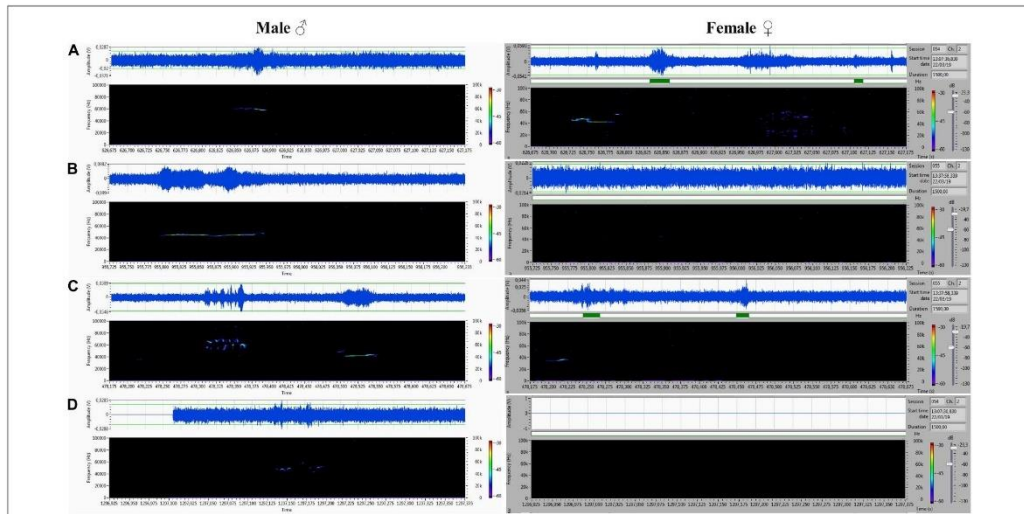


FIGURE 8 | (A–D) Various forms included flat-type, multistep, and step down on the male’s side. On the female’s side, the ultrasonic spectrum is distinctly different. All ultrasounds can be unambiguously assigned to the emitter.

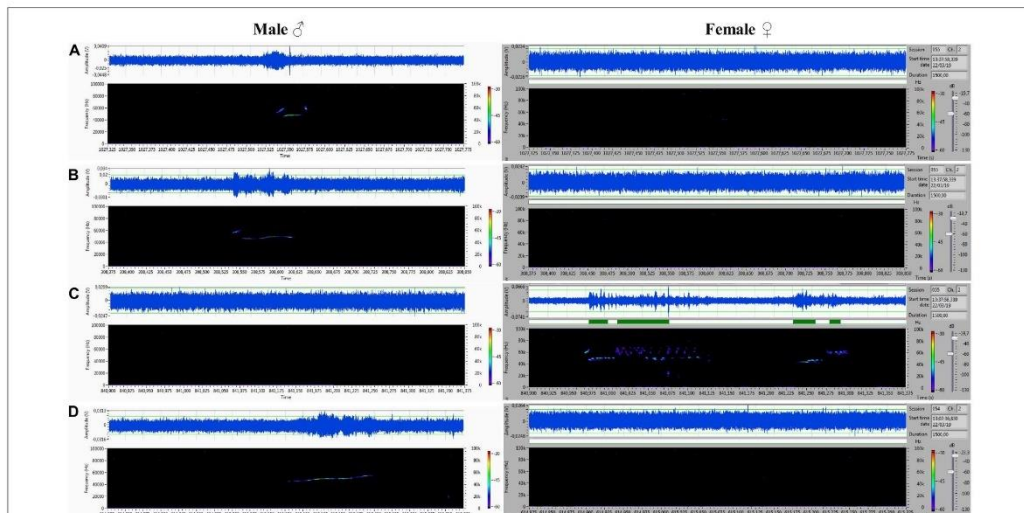
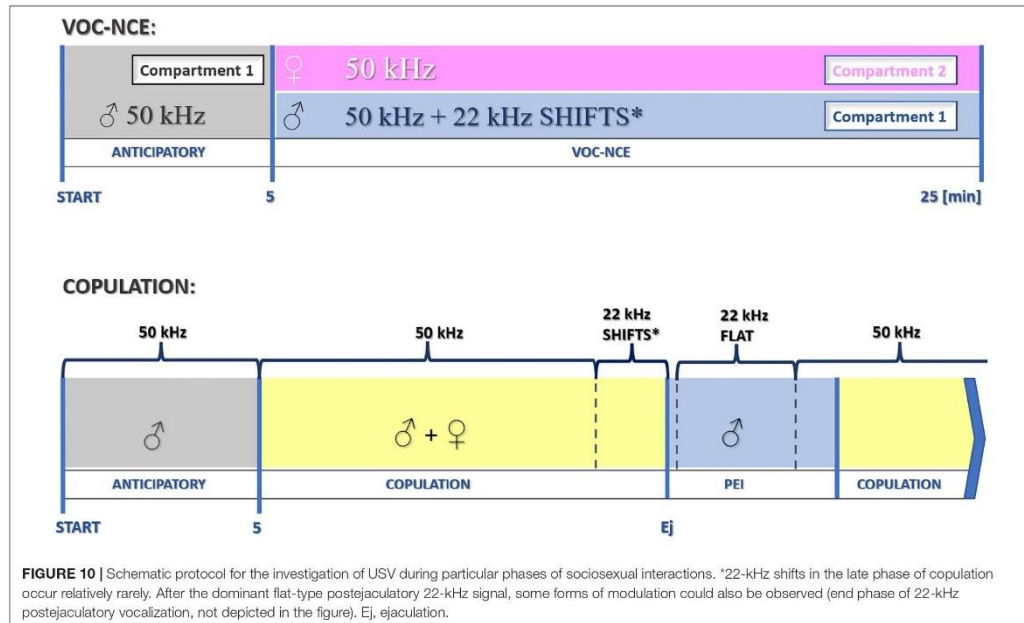


FIGURE 9 | (A–D) Another set of ultrasounds with split type, upward, and step down on the male’s side, and frequency-modulated trills on the female’s side.

the female. The duration of the anticipatory phase is determined during the preceding sexual training procedure. However, 5 min is commonly accepted due to optimal acclimation/conditioning properties during sexual behavior (Larsson, 1956; Bialy et al.,

2000). In this and previous experiments, we end the NCE sessions after 20 min with a female (25 min in total, refer to **Figure 10**).

Previously, we found vocalizations specific to the NCE test in the so-called 22-kHz band. This variation included



frequency-modulated signals and assembled types with coexisted prefixes or suffixes (Bialy et al., 2019a). By applying the VOC-NCE expansion, we have accurately identified particular emitters, in this case, by separating the ultrasound from the male and female. Thus, it probably could be functional in assessing some sexual dimorphic traits in spectrograms due to recent interest in this field (for a detailed review, refer to Lenell et al., 2021).

During 20 min of VOC-NCE, the USV of both male and female in physiological conditions should be abundant, with domination of the 50-kHz signals in the recordings. In this phase, we observed many high-frequency-modulated signals (trill-like types) co-occurring with all other subtypes of the 50-kHz group. These subtypes (trills and flat-trill) can be considered as additional markers of estrus occurrence. Our observations are consistent with the results of Barfield and Thomas (1986), which showed estrus clustered and a modulated type of USV. Similarly, Gerson et al. (2019) showed that direct clitoral stimulation elicits trill and flat-trill subtypes, and hormones significantly augment their emission. We demonstrate in **Figures 7, 9** this characteristic pattern of estrus (aroused) female vocalization with highly modulated 50-kHz signals combined in clusters. This type of USV is relatively rare in the recordings of males during non-contact. In contrast, in the male spectrograms, we observed characteristics for the non-contact test variant of a 22-kHz, i.e., the 22-kHz shift-subtype consisting of a 22-kHz call combined with a 50-kHz prefix or suffix. They seem to reflect a fluctuation of arousal that can be interpreted as an emotional state related

to sexual frustration. We have described these subtypes in detail previously (Bialy et al., 2019a). Different patterns of frequency-modulated 22-kHz USVs have also been demonstrated in many other neurobehavioral contexts (Miczek and Van Der Poel, 1991; Vivian and Miczek, 1993; Karwicka et al., 2021).

The implied question arises about the possibility of experimentally controlling the frustration levels using VOC-NCE. Potentially, it could be achieved with the implantation of removable (openable) partitions, which would allow direct contact between the male and female after a fixed time of the non-contact procedure (Pfaus et al., 1990; similarly to Mas et al., 1990, 1995; Damsma et al., 1992; Lorrain et al., 1997, 1999). In such an experimental setup, the acquisition of sexual experience should reduce frustration effects *via* the conditioning processes during trials (Pfaus et al., 2001).

Overall, based on the presented VOC-NCE model, it is possible to conduct a quantitative and qualitative analysis of the 22- and 50-kHz bands to construct individual USV profiles, which can be used as an additional parameter to describe behavioral changes during sexual activity encounters.

During sexual behavior, we found that male rats in different phases of sexual behavior (anticipatory, postejaculatory period, and NCE test) display a specific pattern of vocalizations with dominant USV subtypes (Bialy et al., 2019a; Bogacki-Rychlik et al., 2021). This suggests that specific central responsiveness (emotional/motivational/arousal) influences the USV pattern. Therefore, we discuss in more detail these phases and compare them to the NCE and VOC-NCE tests.

Anticipatory Pre-Contact Vocalization

Anticipatory sexual behavior makes possible the analysis of individual rat USVs. During our experiments, males vocalize frequently, and such vocalizations are related to emotional memory, sexual motivation, conditioning to odor and background cues, sexual experience, and level of general arousal, but not sexual arousal *per se* (Bialy et al., 2019b). The total number of anticipatory precontact 50-kHz vocalizations (PVs) positively correlates with the acquisition of sexual experience, rewarding the value of previous sociosexual contact (Bialy et al., 2000), and the level of sexual motivation (Bogacki-Rychlik et al., 2021). Contrary to the total number of PVs, the pattern of vocalizations measured by the percentage of different subtypes seems to be stable and characteristic of anticipatory behavior with dominant complex/composite and flat calls (Bogacki-Rychlik et al., 2021). In the anticipatory phase, 22-kHz signals occur very rarely, and if they do then in short and unmodulated forms. Also, in this phase, erections of the penis, a sign of sexual arousal, are not observed in the standard 5-min period, supporting the thesis that PVs reflect sexual motivation and general arousal but not sexual arousal *per se*.

USV During Copulation

Copulation of male rats is a relatively complex but well-parameterized behavior (Sachs and Barfield, 1976; Sachs, 1978; Bialy et al., 2000, 2019b; Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). During copulation, many ultrasounds are emitted by both male and female, mostly at 50 kHz. The female vocalizes intensively during solicitation (darting, hopping, and ear wiggling), and the level of USV depends on the hormonal status. The male vocalizes during an approach to the female, especially before investigation and mounting (Barfield and Thomas, 1986). This USV significantly increases when having a problem with achieving intromissions and ejaculation, thus suggesting the significant effect on USV production of some frustration and enhanced general arousal rather than sexual arousal and sexual motivation *per se* (McIntosh and Barfield, 1980; Bialy et al., 1996). The role of the male and female USV in the coordination of copulation was investigated by using devocalized animals. A female exposed to a devocalized male displays less intensive soliciting behavior and more frequently moves out during intromission or ejaculation (Thomas et al., 1981). Such results suggest some coordinator role of the USV in the sexual interaction, although the effect of female or male devocalizations on copulatory parameters is not statistically significant (Ågmo and Snoeren, 2015).

USV During the Postejaculatory Interval

The PEI is the period between ejaculation and the next cycle of copulation, first mounting, or intromission after a refractory period (Sachs, 1978; Hull and Rodríguez-Manzo, 2017). In the USV spectrograms of males, there is a domination of specific long-lasting 22-kHz calls with a very stable frequency (Barfield and Geyer, 1972; Bialy et al., 2019a). Postejaculatory vocalizations occur as the effect of an abrupt decrease in the arousal and motivation level with sleep-like patterns in EEG (Kurtz and Adler, 1973; Barfield and Geyer, 1975)

TABLE 1 | Summary of general arousal (GA), sexual arousal (SA), sexual motivation (SM), and genital tactile (GT) cues in different sexual situations.

	GA	SA	SM	GT
PV (anticipatory)	H	L	H	-
Copulation	H	H	H	H
PEI	I	I	I	L (genital grooming)
VOC-NCE	H	H	H	L (genital grooming)

H, high; L, low; I, increasing from low to high.

and thus seem to reflect the relaxation state of the male after ejaculation (Bialy et al., 2016). The intensity of 22-kHz postejaculatory (latency to start and duration time) depends on the presence of the female (Sachs and Bialy, 2000). However, the crucial cues responsible for this reaction are not clear, but an enhanced level of anxiety inhibits this type of vocalization (Bialy et al., 2016). The 50-kHz types in PEI are uncommon when the 22-kHz signal occurs and are usually observed after it ends. Thus, their presence indicates increasing sexual motivation before the next copulation cycle (Figure 10).

Overall, we can distinguish behavioral parameters during PEI, which imply the time of enhancement of general arousal, sexual arousal, and sexual motivation (Sachs and Bialy, 2000; Bialy et al., 2019b), and the presented forms of USV are some of them.

VOC-NCE vs. Anticipatory PV, Copulatory and Postejaculatory USV

The VOC-NCE model presented here, as well as anticipatory PV, is a non-invasive method to analyze individual USV. The anticipatory PV model is convenient for investigating the male USV related to sexual motivation and general arousal (Bialy et al., 2019b). In both situations, the tactile and taste cues from the female are absent. The VOC-NCE model gives an additional opportunity, that is, we can investigate male and female USV individually in a state of the enhanced level of sexual arousal (together with general arousal and sexual motivation). In male rats, sexual arousal is evoked by odors from female urine and the body (Sachs, 1997; Kondo et al., 1999), and in estrus females by hormones, male odors, and the presence of males (Barfield and Thomas, 1986).

Both VOC-NCE and copulation trigger USV, and in both situations enhanced levels of sexual arousal, general arousal, and sexual motivation can be observed. In the VOC-NCE test, direct contact with tactile stimulation essential in copulation is absent (nor taste cues). There is a lack of consummatory elements of sexual interaction, namely, intromission, ejaculation, and hypothetically rewarding mounting. Thus, the rewarding and (eventually) some aversive aspects specific to copulation are not present. Also, we do not observe a relaxation state typically observed after ejaculation, and as an implication, a PEI does not occur (we can observe a rather gradual than a rapid decrease of arousal levels). These differences have a reflection in the changes in the 22-kHz USV mentioned above.

Overall, the VOC-NCE protocol could be used as an expansion of the standard anticipatory PV + copulation,

providing an opportunity to obtain individual USV profiles (for summarization of differences between models, refer to **Table 1** and **Figure 10**).

CONCLUSION

Our modification of the non-contact test makes it possible to separate USV emitted by a pair of animals. It provides an opportunity to regulate the intensity of all modalities, including the ultrasonic stream, perceived during sociosexual interactions, and verify the influence of this change on USV profiles. We proposed the VOC-NCE cage as a new, non-invasive tool, expanding the classical sociosexual protocol (anticipatory plus copulatory). This makes it possible to describe changes in arousal and motivation during conditioned procedures by noticing differences in the USV, which should be useful in investigations of sociosexual behavior.

Additional Applications

Our results indicate that the ultrasound vocalization has been emitted intensively with significantly reduced ultrasonic feedback from another animal. In such a view, USV could be considered a behavioral reflex resulting from the activation of central autonomic nuclei (e.g., RVLM/CVLM, NTS, nucleus ambiguus) with effector response of the laryngeal and expiratory muscles (Hernandez-Miranda et al., 2017). Thus, it is comparable to the objective component of emotional response and has a non-discrete informational character perceived by concomitants. During sexual behavior, there is a remarkable parallel increase in sympathetic and parasympathetic nervous system activity. Therefore, the vocalization corresponding to this behavior is a reflection of this autonomic equilibrium, and as such, can be applied as a preclinical parameter. It is extremely valuable, especially if we combine it with other autonomic parameters detected by telemetric systems, e.g., heart rate (Filipkowski et al., 2017; Olszyński et al., 2021) and arterial blood pressure (Vianna et al., 2008).

Based on our set of experiments, we tried to present an interesting differentiation in the 22-kHz signals. The results should be considered as an argument for separating them into distinct subgroups, namely, the modulated types of NCE procedure, and the flat, long-lasting postejaculatory. They correspond to very different neurobehavioral contexts and clustering them together with a “negative-feeling” reference seems to be inappropriate. Additionally, the VOC-NCE model might help to answer the question of the communication role of USV *via* influence on the behavior of the concomitant animal and, with that, assess its communicative function. There is a recurring issue about how much of this vocalization is communicative (Sales and Pye, 1974). To be more precise, what is the proportion between phylogenetically old, non-specific stem-derived motoric reactions of the laryngeal muscles as a result of fluctuating arousal (Delius, 1970; Bell, 1974; Pfaff, 2017) and the evolutionary younger, sociobiological messages controlled by emitters reflecting distinct emotional pathways (Panksepp, 2005; Brudzynski, 2013; Wöhr et al., 2021).

Although this system is dedicated to highly appetitive sociosexual interaction, it might be applicable in other behavioral contexts. For example, during social male-male or female-female interactions, the USV profile can correspond with same-sex preference (Van de Poll and Van Dis, 1979; Olvera-Hernández et al., 2015), social buffering, anxious-type behavior, or agonistic behavior/aggressive reactions.

Additionally, this model may be seen as useful in pharmacological and neurobehavioral experiments to evaluate the potential influence of various agents on sexual parameters, which includes selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, antipsychotic drugs, other 5-HT₁ modulators, dopamine receptor agents, autonomic nervous system agents, phosphodiesterase inhibitors, nitrates, other types of endogenous substances, and toxic factors (Olivier et al., 2006, 2017, 2022; Lin et al., 2015; Sanna et al., 2015; Chiang and Park, 2020; Esquivel-Franco et al., 2020; Kermath et al., 2022). Similarly, it could be useful in investigations of emotional responses, in addition to models of erectile dysfunction or premature ejaculation (Hull et al., 1994; Sachs, 2000; Waldinger and Olivier, 2005; Olayo-Lortia et al., 2014).

LIMITATIONS

In a few cases of singular ultrasounds (not presented here), some form of vocal artifacts was recorded, probably from the concomitant. However, appropriate matching was easy to apply due to the high difference in signal energy. We decided to leave this vestigial ultrasonic leak as an additional non-specific stimulus (blurred and weak, amorphous shapes of ultrasounds cannot be considered to be a distinct communicative signal). Nevertheless, it has to be emphasized that the isolation was nearly total, and the residual leak could be reduced by a slight change in perforation size or adjusting the threshold points in the recording settings. Other limitations stemmed directly from the non-contact procedure and have already been discussed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Local Ethical Committee in Warsaw.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

WB-R and MB designed and performed the experiments, analyzed the data, and prepared the manuscript. AW analyzed the USV data and prepared the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by the Medical University of Warsaw and the Young Researcher Grant: 1MA/5/M/MB/N/20/20. The

study was carried out with the use of the CePT infrastructure financed by the European Union—the European Regional Development Fund within the Operational Program “Innovative Economy” for 2007–2013.

REFERENCES

- Ágmo, A., and Snoeren, E. M. S. (2015). Silent or vocalizing rats copulate in a similar manner. *PLoS One* 10:e0144164. doi: 10.1371/journal.pone.0144164
- Ali, U., Karim, K. J. B. A., and Buang, N. A. (2015). A review of the properties and applications of poly (methyl methacrylate)(PMMA). *Polymer Rev.* 55, 678–705.
- Barfield, R. J., Auerbach, P., Geyer, L. A., and McIntosh, T. K. (1979). Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. *Am. Zool.* 19, 469–480. doi: 10.1093/ich/19.2.469
- Barfield, R. J., and Geyer, L. A. (1972). Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. *Science* 176, 1349–1350. doi: 10.1126/science.176.4041.1349
- Barfield, R. J., and Geyer, L. A. (1975). The ultrasonic postejaculatory vocalization and postejaculatory refractory period of the male rat. *J. Comparat. Physiol. Psychol.* 88:723. doi: 10.1037/h0076435
- Barfield, R. J., and Thomas, D. A. (1986). The role of ultrasonic vocalizations in the regulation of reproduction in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 474, 33–43. doi: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb27996.x
- Bell, R. W. (1974). Ultrasounds in small rodents: arousal-produced and arousal-producing. *Dev. Psychobiol.* 7, 39–42. doi: 10.1002/dev.420070107
- Bialy, M., Beck, J., Abramezyk, P., Trzebski, A., and Przybylski, J. (1996). Sexual behavior in male rats after nitric oxide synthesis inhibition. *Physiol. Behav.* 60, 139–143. doi: 10.1016/0031-9384(95)02272-4
- Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Kasarelo, K., Nikolaev, E., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2016). Modulation of 22-kHz postejaculatory vocalizations by conditioning to new place: evidence for expression of a positive emotional state. *Behav. Neurosci.* 130, 415–421. doi: 10.1037/bne0000153
- Bialy, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J., and Zera, T. (2019a). The sexual motivation of male rats as a tool in animal models of human health disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 13:257. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00257
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., and Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019b). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 79, 1–12. doi: 10.21307/ane-2019-001
- Bialy, M., Nikolaev-Diak, A., Kalata, U., and Nikolaev, E. (2011). Blockade of androgen receptor in the medial amygdala inhibits noncontact erections in male rats. *Physiol. Behav.* 103, 295–301. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.003
- Bialy, M., Rydz, M., and Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behav. Neurosci.* 114, 983–990. doi: 10.1037/0735-7044.114.5.983
- Bialy, M., and Sachs, B. D. (2002). Androgen implants in medial amygdala briefly maintain noncontact erection in castrated male rats. *Hormones Behav.* 42, 345–355. doi: 10.1006/hbeh.2002.1821
- Bogacki-Rychlik, W., Rolf, M., and Bialy, M. (2021). Anticipatory 50-kHz precontact ultrasonic vocalizations and sexual motivation: characteristic pattern of ultrasound subtypes in an individual analyzed profile. *Front. Behav. Neurosci.* 15:722456. doi: 10.3389/fnbeh.2021.722456
- Brudzynski, S. M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.* 182, 261–273. doi: 10.1016/j.bbr.2007.03.004
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 310–317. doi: 10.1016/j.conb.2013.01.014
- Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of ultrasonic vocalizations in adult rats: significance, call classification and neural substrate. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 180–192. doi: 10.2174/1570159x13999150210141444
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfau, J. G., Brudzynski, S. M., and Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J. Comp. Psychol.* 122, 357–367. doi: 10.1037/a0012889
- Burgdorf, J., and Panksepp, J. (2006). The neurobiology of positive emotions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 173–187. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.06.001
- Caruso, A., Ricceri, L., and Scattoni, M. L. (2020). Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 116, 31–43. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.06.011
- Chiang, V. S.-C., and Park, J. H. (2020). Glutamate in male and female sexual behavior: receptors, transporters, and steroid independence. *Front. Behav. Neurosci.* 14:589882. doi: 10.3389/fnbeh.2020.589882
- Costa, G., Serra, M., and Simola, N. (2021). Association between novel object recognition/spontaneous alternation behavior and emission of ultrasonic vocalizations in rats: possible relevance to the study of memory. *Brain Sci.* 11:1053. doi: 10.3390/brainsci11081053
- Damsma, G., Pfau, J. G., Wenkstern, D., Phillips, A. G., and Fibiger, H. C. (1992). Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Neurosci.* 106:181. doi: 10.1037/0735-7044.106.1.181
- Delius, J. D. (1970). Irrelevant behaviour, information processing and arousal homeostasis. *Psychol. Forschung* 33, 165–188. doi: 10.1007/bf00424983
- Esquivel-Franco, D. C., de Boer, S. F., Waldinger, M., Olivier, B., and Olivier, J. D. A. (2020). Pharmacological studies on the role of 5-HT1A receptors in male sexual behavior of wildtype and serotonin transporter knockout rats. *Front. Behav. Neurosci.* 14:40. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00040
- Fernández-Vargas, M. (2018). Vocal signals of sexual motivation in male and female rodents. *Curr. Sexual Health Rep.* 10, 315–328. doi: 10.1007/s11930-018-0179-9
- Filipkowski, R., Polowy, R., Malz, M., Gawrys, O., and Olszynski, K. (2017). Ultrasonic and cardiovascular responses to ultrasonic sounds and vocalizations. *Acta Neurobiol. Exp.* 77(Suppl. 1), 127–128.
- Garai, M., and Guidorzi, P. (2000). European methodology for testing the airborne sound insulation characteristics of noise barriers in situ: experimental verification and comparison with laboratory data. *J. Acoustical Soc. Am.* 108, 1054–1067. doi: 10.1121/1.1286811
- Gerson, C. A., Mac Cionnaith, C. E., Quintana, G. R., and Pfau, J. G. (2019). Effects of ovarian hormones on the emission of 50-kHz ultrasonic vocalizations during distributed clitoral stimulation in the rat. *Hormones Behav.* 109, 1–9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2019.01.005
- Hernandez-Miranda, L. R., Ruffault, P.-L., Bouvier, J. C., Murray, A. J., Morin-Surun, M.-P., Zampieri, N., et al. (2017). Genetic identification of a hindbrain nucleus essential for innate vocalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 8095–8100. doi: 10.1073/pnas.1702893114
- Hull, E., Lumley, L., Matuszewich, L., Dominguez, J., Moses, J., and Lorrain, D. (1994). The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacology* 33, 1499–1504. doi: 10.1016/0028-3908(94)90054-x
- Hull, E. M., and Rodriguez-Manzo, G. (2017). “1.01 - Male sexual behavior,” in *Hormones, Brain and Behavior*, 3rd Edn, eds D. W. Pfaff and M. Joëls (Oxford: Academic Press), 1–57. doi: 10.1016/b978-0-12-803592-4.00001-8
- Karwicka, W., Wiatrowska, M., Kondrakiewicz, K., Knapska, E., Kursa, M. B., and Hamed, A. (2021). Relaying aversive ultrasonic alarm calls depends on previous experience, empathy, social buffering, or panic? *Brain Sci.* 11:759. doi: 10.3390/brainsci11060759
- Kermath, B. A., Thompson, L. M., Jefferson, J. R., Ward, M. H. B., and Gore, A. C. (2022). Transgenerational effects of prenatal endocrine disruption on reproductive and sociosexual behaviors in sprague dawley male and female rats. *Toxics* 10:47. doi: 10.3390/toxics10020047
- Kisko, T. M., Himmler, B. T., Himmler, S. M., Euston, D. R., and Pellis, S. M. (2015). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav. Processes* 111, 25–33. doi: 10.1016/j.beproc.2014.11.011

- Kondo, Y., and Hayashi, H. (2021). Neural and hormonal basis of opposite-sex preference by chemosensory signals. *Int. J. Mol. Sci.* 22:8311. doi: 10.3390/ijms22158311
- Kondo, Y., and Sachs, B. D. (2002). Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiol. Behav.* 76, 443–447. doi: 10.1016/s0031-9384(02)00682-0
- Kondo, Y., Tomihara, K., and Sakuma, Y. (1999). Sensory requirements for noncontact penile erection in the rat. *Behav. Neurosci.* 113:1062. doi: 10.1037/0735-7044.113.5.1062
- Kurtz, R. G., and Adler, N. T. (1973). Electrophysiological correlates of copulatory behavior in the male rat: evidence for a sexual inhibitory process. *J. Comparat. Physiol. Psychol.* 84:225. doi: 10.1037/h0035265
- Larsson, K. (1956). *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat*. Stockholm: Almqvist & Wiksell.
- Lenell, C., Broadfoot, C. K., Schaeen-Heacock, N. E., and Ciucci, M. R. (2021). Biological and acoustic sex differences in rat ultrasonic vocalization. *Brain Sci.* 11:459. doi: 10.3390/brainsci11040459
- Lin, L. L., Wang, D., Wang, W., Cheng, Y. Q., Su, D. F., and Liu, A. J. (2015). Long-term treatment of clonidine, atenolol, amlodipine and dihydrochlorothiazide, but not enalapril, impairs the sexual function in male spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 10:e0116155. doi: 10.1371/journal.pone.0116155
- Lorrain, D. S., Matuszewich, L., Friedman, R. D., and Hull, E. M. (1997). Extracellular serotonin in the lateral hypothalamic area is increased during the postejaculatory interval and impairs copulation in male rats. *J. Neurosci.* 17, 9361–9366. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09361.1997
- Lorrain, D. S., Riolo, J. V., Matuszewich, L., and Hull, E. M. (1999). Lateral hypothalamic serotonin inhibits nucleus accumbens dopamine: implications for sexual satiety. *J. Neurosci.* 19, 7648–7652. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-17-07648.1999
- Maggio, J. C., and Whitney, G. (1985). Ultrasonic vocalizing by adult female mice (*Mus musculus*). *J. Comp. Psychol.* 99, 420–436. doi: 10.1037/0735-7036.99.4.420
- Manzo, J., Cruz, M., Hernandez, M., Pacheco, P., and Sachs, B. (1999). Regulation of noncontact erection in rats by gonadal steroids. *Hormones Behav.* 35, 264–270. doi: 10.1006/hbeh.1999.1519
- Martin-de León, J., Pura, J. L., Bernardo, V., and Rodriguez-Pérez, M. A. (2019). Transparent nanocellular PMMA: characterization and modeling of the optical properties. *Polymer* 170, 16–23. doi: 10.1016/j.polymer.2019.03.010
- Mas, M., Fumero, B., and González-Mora, J. (1995). Voltammetric and microdialysis monitoring of brain monoamine neurotransmitter release during sociosexual interactions. *Behav. Brain Res.* 71, 69–79. doi: 10.1016/0166-4328(95)00043-7
- Mas, M., Gonzalez-Mora, J. L., Louilot, A., Solé, C., and Guadalupe, T. (1990). Increased dopamine release in the nucleus accumbens of copulating male rats as evidenced by in vivo voltammetry. *Neurosci. Lett.* 110, 303–308. doi: 10.1016/0304-3940(90)90864-6
- Matochik, J. A., Barfield, R. J., and Nyby, J. (1992). Regulation of sociosexual communication in female Long-Evans rats by ovarian hormones. *Hormones Behav.* 26, 545–555. doi: 10.1016/0018-506x(92)90021-m
- McIntosh, T. K., and Barfield, R. J. (1980). The temporal patterning of 40–60 kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (*Rattus norvegicus*). *Behav. Neural Biol.* 29, 349–358. doi: 10.1016/s0163-1047(80)90259-9
- Miczek, K. A., and Van Der Poel, A. M. (1991). Long ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. *Behaviour* 119, 127–142. doi: 10.1163/156853991X00409
- Olayo-Lortia, J., Ferreira-Nuño, A., Velázquez-Moctezuma, J., and Morales-Otal, A. (2014). Further definition on the multiple partner choice arena: a potential animal model for the study of premature ejaculation. *J. Sexual Med.* 11, 2428–2438. doi: 10.1111/jsm.12637
- Olivier, B., Chan, J. S. W., Pattij, T., de Jong, T. R., Oosting, R. S., Veening, J. G., et al. (2006). Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *Int. J. Impotence Res.* 18, S14–S23. doi: 10.1038/sj.ijir.3901330
- Olivier, J. D., Esquivel Franco, D. C., Oosting, R., Waldinger, M., Sarnyai, Z., and Olivier, B. (2017). Tramadol: effects on sexual behavior in male rats are mainly caused by its 5-HT reuptake blocking effects. *Neuropharmacology* 116, 50–58. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.11.020
- Olivier, J. D., Janssen, J., Pattij, T., Prêtre, S. D., and Olivier, B. (2022). “Antidepressants, sexual behavior, and translational models for male sexual dysfunction: development of animal models, pharmacology, and genetics,” in *Translational Research Methods for Major Depressive Disorder*, eds Y. K. Kim and M. Amidfar (Berlin: Springer), 451–515. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.02.098
- Olżyński, K. H., Polowy, R., Wardak, A. D., Grymanowska, A. W., and Filipkowski, R. K. (2021). Increased vocalization of rats in response to ultrasonic playback as a sign of hypervigilance following fear conditioning. *Brain Sci.* 11:970. doi: 10.3390/brainsci11080970
- Olvera-Hernández, S., Chavira, R., and Fernández-Guasti, A. (2015). Prenatal letrozole produces a subpopulation of male rats with same-sex preference and arousal as well as female sexual behavior. *Physiol. Behav.* 139, 403–411. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.11.060
- Panksepp, J. (2005). Psychology. Beyond a joke: from animal laughter to human joy? *Science* 308, 62–63. doi: 10.1126/science.1112066
- Pfaff, D. (2017). *How the Vertebrate Brain Regulates Behavior*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Pfaus, J., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D., Blaha, C., Phillips, A., et al. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res.* 530, 345–348. doi: 10.1016/0006-8993(90)91309-5
- Pfaus, J. G., Kippin, T. E., and Centeno, S. (2001). Conditioning and sexual behavior: a review. *Hormones Behav.* 40, 291–321. doi: 10.1006/hbeh.2001.1686
- Potasiewicz, A., Holuj, M., Piotrowska, D., Zajda, K., Wojcik, M., Popik, P., et al. (2019). Evaluation of ultrasonic vocalizations in a neurodevelopmental model of schizophrenia during the early life stages of rats. *Neuropharmacology* 146, 28–38. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.023
- Sachs, B. D. (1978). “Conceptual and neural mechanisms of masculine copulatory behavior,” in *Sex and Behavior*, eds T. E. McGill, D. A. Dewsbury, and B. D. Sachs (Berlin: Springer), 267–295
- Sachs, B. D. (1997). Erection evoked in male rats by airborne scent from estrous females. *Physiol. Behav.* 62, 921–924. doi: 10.1016/S0031-9384(97)00307-7
- Sachs, B. D. (2000). Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction, and sexual arousal. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 541–560. doi: 10.1016/s0149-7634(00)00022-1
- Sachs, B. D., Akasofu, K., Citron, J. H., Daniels, S. B., and Natoli, J. H. (1994). Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats. *Physiol. Behav.* 55, 1073–1079. doi: 10.1016/0031-9384(94)90390-5
- Sachs, B. D., and Barfield, R. J. (1976). “Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat,” in *Advances in the Study of Behavior*, eds J. S. Rosenblatt, R. A. Hinde, E. Shaw, and C. Beer (Cambridge, MA: Academic Press), 91–154. doi: 10.1016/s0065-3454(08)60166-7
- Sachs, B. D., and Bialy, M. (2000). Female presence during postejaculatory interval facilitates penile erection and 22-kHz vocalization in male rats. *Behav. Neurosci.* 114:1203. doi: 10.1037/0735-7044.114.6.1203
- Sales, G., and Pye, D. (1974). “Ultrasound in rodents,” in *Ultrasonic Communication by Animals*, eds G. Sales and D. Pye (Dordrecht: Springer Netherlands), 149–201. doi: 10.1007/978-94-011-6901-1_7
- Sangiamo, D. T., Warren, M. R., and Neunuebel, J. P. (2020). Ultrasonic signals associated with different types of social behavior of mice. *Nat. Neurosci.* 23, 411–422. doi: 10.1038/s41593-020-0584-z
- Sanna, F., Contini, A., Melis, M. R., and Argiolas, A. (2015). Role of dopamine D4 receptors in copulatory behavior: studies with selective D4 agonists and antagonists in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 137, 110–118. doi: 10.1016/j.pbb.2015.08.012
- Seffer, D., Schwarting, R. K. W., and Wöhr, M. (2014). Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies. *J. Neurosci. Methods* 234, 73–81. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.01.023
- Taracha, E., Hamed, A., Krzysciak, P., Lehner, M., Skórzcwska, A., Płaźnik, A., et al. (2012). Inter-individual diversity and intra-individual stability of amphetamine-induced sensitization of frequency-modulated 50-kHz vocalization in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 222, 619–632. doi: 10.1007/s00213-012-2658-4
- Thomas, D. A., Talalas, L., and Barfield, R. J. (1981). Effect of devocalization of the male on mating behavior in rats. *J. Comparat. Physiol. Psychol.* 95:630. doi: 10.1037/h0077803

- Van de Poll, N., and Van Dis, H. (1979). The effect of medial preoptic—anterior hypothalamic lesions on bisexual behavior of the male rat. *Brain Res. Bull.* 4, 505–511. doi: 10.1016/0361-9230(79)90035-2
- Vianna, D. M., Allen, C., and Carrive, P. (2008). Cardiovascular and behavioral responses to conditioned fear after medullary raphe neuronal blockade. *Neuroscience* 153, 1344–1353. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.033
- Vivian, J. A., and Miczek, K. A. (1993). Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats. *Psychopharmacology* 111, 367–375. doi: 10.1007/BF02244954
- Waldinger, M. D., and Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World J. Urol.* 23, 115–118. doi: 10.1007/s00345-004-0493-x
- Warren, M., Klein, R., Spurrier, M., Roth, E., and Neunuebel, J. (2020). Ultrashort-range, high-frequency communication by female mice shapes social interactions. *Sci. Rep.* 10:2637. doi: 10.1038/s41598-020-59418-0
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U., and Barfield, R. J. (1990). Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comparat. Psychol.* 104:255. doi: 10.1037/0735-7036.104.3.255
- Wöhr, M., Kisko, T. M., and Schwarting, R. K. W. (2021). Social behavior and ultrasonic vocalizations in a genetic rat model haploinsufficient for the cross-disorder risk gene *Cacna1c*. *Brain Sci.* 11:724. doi: 10.3390/brainsci11060724
- Wöhr, M., and Schwarting, R. K. W. (2013). Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res.* 354, 81–97. doi: 10.1007/s00441-013-1607-9
- Wright, J. M., Gourdon, J. C., and Clarke, P. B. (2010). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl)* 211, 1–13. doi: 10.1007/s00213-010-1859-y

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Bogacki-Rychlik, Wrona and Bialy. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Podsumowanie i wnioski

Publikacja 1:

W publikacji zaprezentowano rozróżnienie pojęć: motywacji seksualnej, wzbudzenia seksualnego i wzbudzenia ogólnego. Powiązano te pojęcia z klasycznymi parametrami zachowania seksualnego samców szczura w kontekście badań przedklinicznych. Wydaje się, że może to stanowić podłoże do dokładniejszego zrozumienia zmian i ewentualnie skuteczności terapii w takich zespołach chorobowych jak m.in: choroby psychiczne, choroby neurologiczne w tym swoiste i nieswoiste neuropatologie, patologie wątroby i nerek (z zaburzeniami elektrolitowymi, mocznicowymi i hormonalnymi), dysfunkcje tarczycy i nadnerczy, oraz cukrzyca. Wpisuje się to w metodykę aktualnie prowadzonych badań biomedycznych prezentując obok innych modeli (Verbitsky i wsp., 2020; Biosca-Brull i wsp., 2021) behawior seksualny samca szczura w kontekście użyteczności translacyjnej. Umiejętne zastosowanie opisywanych w pracy parametrów daje wgląd w motywację seksualną oraz wzbudzenie seksualne, a zestawienie otrzymanych wyników z wiedzą wynikającą z modeli molekularnych, umożliwi stworzenie zintegrowanych obrazów fizjologicznych (Dickinson i wsp., 2022).

Wnioski:

- Parametryzacja zachowań seksualnych samców szczurów może być użytecznym narzędziem w badaniach przedklinicznych w takich zespołach chorobowych jak: zaburzenia afektywne, choroby układu krążenia, neuropatie, zaburzenia metaboliczne, nefropatie i choroby wątroby i zaburzenia lękowe, zaburzenia rozwojowe i inne.

Publikacja 2:

Uzyskane wyniki wskazały na istnienie zależności między ilością ultradźwięków w paśmie 50- kHz w trakcie fazy przygotowawczej, a motywacją seksualną. Dominującymi podtypami ultradźwięków były dźwięki o umiarkowanie modulowanym charakterze określonym jako Complex/Composite (CC), oraz nie modulowane stabilne płaskie częstotliwościowo sygnały tzw. Flat. Intensywnie modulowane częstotliwościowo sygnały tzw. Trills (pol. Trille) stanowiły również widoczny procent, chociaż rzadko występowały już silnie modulowane i złożone formy zwane jako Flat-Trills i Trills with jumps. Pomimo pewnego zróżnicowania międzysobniczego w badanych spektrogramach uwidocznili się wyraźny wzorec o dominujących podtypach CC + Flat co potwierdziło nasze przypuszczenia o odruchowym charakterze wokalizacji, charakterystycznego dla danego wzorca reakcji behawioralnych. Jednocześnie brak dominacji sygnałów silnie modulowanych: Flat-

Trills, Trills with jumps, potwierdził nasze przypuszczenia o występowaniu tych ultradźwięków w odpowiedzi na bardzo silne stany wzbudzenia ośrodkowego, w tym wzbudzenia seksualnego (ang. sexual arousal) a nie samej motywacji seksualnej. Tego typu wokalizacja widoczna jest w trakcie kopulacji i w trakcie opisanego w doświadczeniu 3 modelu bez-kontaktowego.

Wnioski:

- Liczba wokalizacji odzwierciedla poziom motywacji seksualnej
- W trakcie fazy przygotowawczej obserwuje się charakterystyczny podstawowy sposób wokalizacji oparty głównie na ultradźwiękach płaskich oraz o umiarkowanym modulowanym charakterze.

Publikacja 3:

Prezentowana metoda pozwoliła na pełne i wiarygodne przyporządkowanie wokalizacji do emitującego je osobnika. Ze względu na prostotę wykonania może konkurować z innymi prezentowanymi metodami rozdziału USV, znajdując zastosowanie w analizie behawioru nie tylko seksualnego. Pierwotnie klatka NCE służyła do oceny stopnia wzbudzenia seksualnego (ang. sexual arousal) za pomocą oceny ilościowej erekcji bez-kontaktowych. Prezentowany model VOC-NCE stanowi użyteczne narzędzie rozszerzające metodę non-contact o parametr wokalizacyjny. W modelu tym możemy ocenić w kontrolowanym środowisku wpływ bodźców socjoseksualnych oraz poziomu wzbudzenia seksualnego na wokalizację ultradźwiękową. Zestawiając uzyskane w ten sposób wyniki z wynikami doświadczenia z publikacji 2, możliwe będzie wyszczególnienie ultradźwięków związanych ze wzbudzeniem seksualnym, motywacją seksualną i wzbudzeniem ogólnym. W ten sposób analiza USV z fazy przygotowawczej i NCE staną się wzajemnie uzupełniające.

Wnioski:

- Rozdzielono wokalizację samca i samicy stosując odpowiednie ekrany akustyczne.
- Metoda daje możliwość analizy ultradźwięków w kontrolowanym środowisku pod względem dochodzących bodźców.

Ograniczenia i perspektywy badawcze:

Wokalizacja ultradźwiękowa jako parametr w badaniach przedklinicznych u szczurów oraz innych gryzoni laboratoryjnych stanowi użyteczny parametr pod pewnymi warunkami. Ze względu na silną stereotypowość/odruchowość reakcji, przy stosunkowo niedużym zróżnicowaniu jakościowym, zrozumienie kontekstu emisji nie zawsze jest proste. Prawidłowa interpretacja wymaga zastosowania dodatkowych parametrów behawioralnych, w celu zminimalizowania błędnych wniosków oraz nadinterpretacji. O ile klasyczne parametry behawioralne wydają się dobrze opisywać najważniejsze składowe fizjologicznej komponenty reakcji seksualnych, o tyle korespondująca z nimi wokalizacja ultradźwiękowa nie spełnia tego wymogu. W tym ujęciu zastosowanie obu parametrów (kompilacja) wydaje się działać uzupełniająco. Za przykład nadinterpretacji przynajmniej w kontekście zachowań seksualnych może służyć prosty podział na „pozytywne” emocjonalnie 50-kHz i „negatywne” 22-kHz. Silnie nagradzające właściwości kopulacji (ejakulacja), którym towarzyszy następcza emisja 22PE wydaje się zaprzeczać temu efektowi. Podobnie narastająca ilość silnie modulowanej wokalizacji 50-kHz obserwowana w trakcie modelu frustracyjnego (dane w trakcie analizy), nie daje się łatwo przyporządkować do stanu typowo pozytywnych emocji. Prezentowane w naszej pracowni podejście badawcze testuje hipotezę o wokalizacji jako odzwierciedleniu zmian poziomów wzbudzenia ośrodkowego. W takim ujęciu profil ultradźwiękowy może odzwierciedlać afekt i silne zmiany pobudzenia ośrodkowego zwierzęcia bardziej niż poszczególne dyskretne stany emocjonalne.

Innym problemem jest konieczność rozróżnienia pętli neuronalnych kontrolujących wokalizację (Dupin i wsp., 2019; Michael i wsp., 2020; Boulanger-Bertolus i Mouly 2021;) od tych związanych z motywacją seksualną. Szczególnie istotne wydaje się tu być dokładne przyporządkowanie aktywności MPOA uczestniczącego w obu procesach. Na obecnym etapie wyniki są niejednoznaczne, wskazując na odmienny w stosunku do innych modeli eksperymentalnych, kontekst neurochemiczny związany z wokalizacją w trakcie interakcji socjoseksualnych, a także istotne różnice międzygatunkowe (Miceli i Malsbury 1982; Hardining i McGinnis 2004; Floody, 2009; Gao i wsp., 2019).

Rozwiązanie mogą przynieść eksperymenty z uzyskane techniką optogenetyki (Scardochio i wsp., 2015), a także wykorzystanie nowoczesnej farmakologii. W tym kontekście interesujące wydaje się zbadanie hormonalnej aktywności ośrodkowej poprzez podawanie selektywnych modulatorów receptorowych (SARM) ze względu na zwiększoną selektywność względem podtypów receptorów androgenowych, a także zróżnicowane parametry farmakokinetyczne (Jones i wsp., 2010; Kudwa i wsp., 2010; Aikawa i wsp., 2015) i SERM (Clark i wsp., 2012). Szereg ciekawych informacji przynieść może detaliczna analiza neurochemiczna z wykorzystaniem interkorelacyjności między profilem neuroprzebiegowym a odpowiedzią behawioralną (Hamed i wsp., 2016).

Ważnym w zrozumieniu podłoża wokalizacji ultradźwiękowej wydaje się badanie parametrów autonomicznych. Pozwoli to na zwiększenie zdolności do rozróżniania komponenty motywacyjnej od wzbudzeniowej aktywności seksualnej, oraz pogłębienia dyskryminatywności emocjonalnej komponenty obiektywnej i subiektywnej. Modele teledetekcji wydają się być tutaj właściwym narzędziem (Olszyński i wsp., 2020,2021).

Szereg ważnych informacji dostarczyć może badanie aktywności ciała migdałowatego i odseparowania szlaków ważnych w regulacji zachowań apetytywnych i awersyjnych (Knapska i wsp., 2006), w tym również obszarów ciała migdałowatego krytycznych dla wzbudzenia seksualnego. Pomocne może być wykorzystanie opisywanej wokalizacji 22PE. Widzimy, że w przeciwieństwie do opisywanych wokalizacji 22-kHz w trakcie reakcji awersyjnych, współwystępuje ona z silnie nagradzającym stanem ejakulacji, odzwierciedlając stan relaksacji i towarzyszącej jemu warunkowaniu preferencji miejsca (Biały i wsp., 2016). Badania MRI u ludzi wskazują na wyraźne zmniejszenie przepływu krwi przez ciało migdałowate po ejakulacji (Holstege i wsp., 2003). Można założyć, że wyłączenie, zmniejszenie aktywności ciała migdałowatego po silnym wzbudzeniu może indukować wystąpienie takiej wokalizacji. Tak więc, że wokalizacja ta najprawdopodobniej odzwierciedla zmiany aktywności ośrodków, z w tym aktywnością ciała migdałowatego. W strukturze tej na skutek warunkowania klasycznego, dochodzi do przygotowania organizmu na zmieniającą się sytuację. Jest to zgodne z wiedzą dotyczącą tej struktury i jej powiązania z hipokampem w procesach powstawania śladów pamięciowych wzmacnianych komponentą emocjonalną. Ten typ asocjacji w obrębie przyśrodkowej części ciała migdałowatego opisywany jest również na innych modelach (Yamanaka i Waki, 2022). Jeżeli więc udałoby się wykazać zależność pomiędzy aktywnością ciała migdałowatego, jego poszczególnych jąder z parametrem 22PE otrzymamy niezwykle cenne narzędzie przedkliniczne. W praktyce parametr ten wiązałby odpowiedź emocjonalną z przebudową centralnych ośrodków autonomicznych dając powtarzalny model dla badań przedklinicznych nad ośrodkową regulacją ciśnieniowo-krażeniowej w warunkach niskiej inwazyjności, w tym być może również w odpowiedzi długoterminowej. Niezależnie jednak od hipotetycznych rozwiązań, w tym momencie pojawiająca się wokalizacja 22PE stanowi niezwykle interesujące podłoże do badań nad procesami warunkowania, analogicznie do emisji 50-kHz w przypadku reakcji motywacyjnych w modelach oczekiwania nagrody i potencjalnie reakcji instrumentalnej (Johnson i wsp., 2022).

Do innych istotnych ograniczeń należą różnice w parametrach wokalizacyjnych i seksualnych na poziomie osobniczym (prezentowym w artykule 2) oraz szczepowym (Biały i wsp., 2014; Engelhardt i wsp., 2018; Caruso i wsp., 2022). Problem ten dotyczy jednak w tym samym stopniu wszystkich modeli zwierzęcych, znajdując rozwiązanie w doświadczeniach ze zróżnicowanymi szczepowo grupami. Dodatkowym problemem są swoiste gatunkowo różnice w reakcjach

seksualnych szczurów i ludzi oraz innych gatunków modelowych (Le Moëne i Agmo, 2019). Niezależnie jednak od różnic, przyjęte założenie o konieczności szukania organizmów modelowych spełniających cechy homologii jest podstawową rozważań przedklinicznych. Za jego słuszością przemawia obserwowany gwałtowny rozwój medycyny. W tym kontekście rozwijanie behawioru seksualnego o parametr USV w badaniach biomedycznych wydaje się w pełni uzasadnione, a filogenetyczna „dojrzałość” odruchów seksualnych i wokalizacyjnych kręgowców dodatkowo umacnia to założenie (Olivier i wsp. 2022).

Idea prowadzenia badań nad behawiorem seksualnym szczurów i innych gryzoni jest większa niż tylko chęć zgłębienia fascynujących poniekąd zależności neurofizjologicznych regulujących te procesy. Istotność sfery seksualnej ludzi, oddziałującej na wszystkie inne elementy ludzkiej aktywności, z punktu widzenia badań psychologicznych i socjologicznych jest niepodważalna. Wciąż jednak zbyt mały nacisk kładziony jest na zrozumienie działu seksuologii klinicznej, zarówno z punktu widzenia lekarza psychiatry jak i specjalistów wszystkich innych gałęzi medycyny. Znikoma ilość zajęć (lub ich całkowity brak) w trakcie studiów medycznych, a następnie kształcenia podyplomowego, tłumacząca złożoność zagadnień związanych z seksem jest tego najlepszym przykładem. Pomimo tej, być może uwarunkowanej kulturowo pomijalności akademickiej, problemy sfery seksualnej pacjentów dotyczą. Najlepszym tego przykładem wydają się być leki oddziałujące na układ serotoninericzny (TLPD, SSRI), które lecząc zaburzenia afektywne jednobiegunowe, czy zaburzenia lękowe niejednokrotnie drastycznie redukują aktywność seksualną pacjentów. W kontekście psychologicznym nasila to negatywne zmiany emocjonalne prowadząc do konieczności eskalacji dawki, zamykając tym samym krąg objawy-lek-skutki-uboczne-objawy. Chociażby z tego powodu warto szukać innych lepszych rozwiązań pracując na modelach przedklinicznych wykorzystujących behawior seksualny.

Bibliografia

- Adebayo, A. A., Oboh, G., & Ademosun, A. O. (2019). Almond-supplemented diet improves sexual functions beyond Phosphodiesterase-5 inhibition in diabetic male rats. *Heliyon*, *5*(12), e03035. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03035> 10.1016/j.heliyon.2019.e03035. eCollection 2019 Dec.
- Agmo, A. (2011). On the intricate relationship between sexual motivation and arousal. *Horm Behav*, *59*(5), 681-688. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.013>
- Agmo, A., Paredes, R., & Fernández, H. (1987). Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity, and motor execution in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav*, *28*(1), 47-52. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(87\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(87)90010-4) 10.1016/0091-3057(87)90010-4.
- Aikawa, K., Miyawaki, T., Hitaka, T., Imai, Y. N., Hara, T., Miyazaki, J., Yamaoka, M., Kusaka, M., Kanzaki, N., Tasaka, A., Shiraishi, M., & Yamamoto, S. (2015). Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I. *Bioorg Med Chem*, *23*(10), 2568-2578. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.032>
- Alemán-Laporte, J., Bandini, L. A., Garcia-Gomes, M. S. A., Zanatto, D. A., Fantoni, D. T., Amador Pereira, M. A., Navas-Suárez, P. E., Kirsten, T. B., Jimenez, R. R., & Alvarado, G. (2020). Combination of ketamine and xylazine with opioids and acepromazine in rats: physiological changes and their analgesic effect analysed by ultrasonic vocalization. *Laboratory animals*, *54*(2), 171-182.
- Allin, J. T., & Banks, E. M. (1971). Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats. *Dev Psychobiol*, *4*(2), 149-156. <https://doi.org/10.1002/dev.420040206>
- Allin, J. T., & Banks, E. M. (1972). Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Anim Behav*, *20*(1), 175-185. [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(72\)80189-1](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(72)80189-1)
- Amini, M., Saboory, E., Derafshpour, L., Fakhari, A., Wu, J. C., Bruggeman, R., Asgharzadeh, F., & Ahmadalipour, A. (2020). The impact of sleep deprivation on sexual behaviors and FAAH expression in the prefrontal cortex of male rats. *Neurosci Lett*, *735*, 135254. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135254>
- Anagnostaras, S. G., Maren, S., DeCola, J. P., Lane, N. I., Gale, G. D., Schlinger, B. A., & Fanselow, M. S. (1998). Testicular hormones do not regulate sexually dimorphic Pavlovian fear conditioning or perforant-path long-term potentiation in adult male rats. *Behav Brain Res*, *92*(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(97\)00115-0](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(97)00115-0) 10.1016/s0166-4328(97)00115-0.
- Andersen, M. L., & Tufik, S. (2002). Distinct effects of paradoxical sleep deprivation and cocaine administration on sexual behavior in male rats. *Addict Biol*, *7*(2), 251-253. <https://doi.org/10.1080/135562102200120497> 10.1080/135562102200120497.
- Anderson, E. E. (1936). Consistency of tests of copulatory frequency in the male albino rat. *Journal of Comparative Psychology*, *21*(3), 447.
- Anderson, J. W. (1954). The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. *Science*, *119*(3101), 808-809.
- Anisko, J. J., Suer, S. F., McClintock, M. K., & Adler, N. T. (1978). Relation between 22-kHz ultrasonic signals and sociosexual behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*, *92*(5), 821-829.

<https://doi.org/10.1037/h0077534>

- Avvisati, R., Contu, L., Stendardo, E., Michetti, C., Montanari, C., Scattoni, M. L., & Badiani, A. (2016). Ultrasonic vocalization in rats self-administering heroin and cocaine in different settings: evidence of substance-specific interactions between drug and setting. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(8), 1501-1511. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4247-4>
- Babaei-Balderlou, F., & Khazali, H. (2016). Effects of Ghrelin on Sexual Behavior and Luteinizing Hormone Beta-subunit Gene Expression in Male Rats. *J Reprod Infertil*, 17(2), 88-96.
- Bardin, L., Gregoire, S., Aliaga, M., Malfetes, N., Vitton, O., Ladure, P., Newman-Tancredi, A., & Depoortère, R. (2010). Comparison of milnacipran, duloxetine and pregabalin in the formalin pain test and in a model of stress-induced ultrasonic vocalizations in rats. *Neurosci Res*, 66(2), 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.10.009>
- Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1972). Sexual behavior: ultrasonic postejaculatory song of the male rat. *Science*, 176(4041), 1349-1350. <https://doi.org/10.1126/science.176.4041.1349>
- Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1975). The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. *J Comp Physiol Psychol*, 88(2), 723-734. <https://doi.org/10.1037/h0076435>
- Barfield, R. J., & Sachs, B. D. (1968). Sexual behavior: Stimulation by painful electrical shock to skin in male rats. *Science*, 161(3839), 392-395.
- Barfield, R. J., & Thomas, D. A. (1986). The Role of Ultrasonic Vocalizations in the Regulation of Reproduction in Rats a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 474(1), 33-43.
- Barker, D. J., Bercovicz, D., Servilio, L. C., Simmons, S. J., Ma, S., Root, D. H., Pawlak, A. P., & West, M. O. (2014). Rat ultrasonic vocalizations demonstrate that the motivation to contextually reinstate cocaine-seeking behavior does not necessarily involve a hedonic response. *Addict Biol*, 19(5), 781-790. <https://doi.org/10.1111/adb.12044>
- Barker, D. J., Root, D. H., Ma, S., Jha, S., Megehee, L., Pawlak, A. P., & West, M. O. (2010). Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 211(4), 435-442. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1913-9>
- Barron, S., & Gilbertson, R. (2005). Neonatal ethanol exposure but not neonatal cocaine selectively reduces specific isolation-induced vocalization waveforms in rats. *Behav Genet*, 35(1), 93-102. <https://doi.org/10.1007/s10519-004-0859-2>
- Beach, F. A. (1938). Techniques useful in studying the sex behavior of the rat. *Journal of Comparative Psychology*, 26, 355-359.
- Beach, F. A. (1942). ANALYSIS OF FACTORS INVOLVED IN THE AROUSAL, MAINTENANCE AND MANIFESTATION OF SEXUAL EXCITEMENT IN MALE ANIMALS¹. *Psychosomatic Medicine*, 4(2), 173-198.
- Beach, F. A. (1942). Analysis of the stimuli adequate to elicit mating behavior in the sexually inexperienced rat. *Journal of Comparative Psychology*, 33(2), 163.
- Beach, F. A. (1942). Comparison of copulatory behavior of male rats raised in isolation, cohabitation, and segregation. *The Pedagogical Seminary and Journal of Genetic Psychology*, 60(1), 121-136.
- Beach, F. A. (1947). Evolutionary changes in the physiological control of mating behavior in mammals. *Psychol Rev*, 54(6), 297-315. <https://doi.org/10.1037/h0056549>

- Beach, F. A., & Holz, A. M. (1946). Mating behavior in male rats castrated at various ages and injected with androgen. *J Exp Zool*, *101*, 91-142. <https://doi.org/10.1002/jez.1401010107>
- Beach, F. A., & Holz-Tucker, A. M. (1949). Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *42*(6), 433.
- Beach, F. A., & Jordan, L. (1956). Effects of sexual reinforcement upon the performance of male rats in a straight runway. *J Comp Physiol Psychol*, *49*(2), 105-110. <https://doi.org/10.1037/h0046471>
- Beck, J. (1971). Instrumental conditioned reflexes with sexual reinforcement in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *31*(3).
- Beck, J., & Biały, M. (1993). The role of sexual reward in the temporal patterning of copulatory behaviour in male rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*.
- Beck, J., & Biały, M. (2000). The role of mounts and intromissions in triggering ejaculation in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*.
- Beck, J., Biały, M., & Kostowski, W. (2002). Effects of D(1) receptor agonist SKF 38393 on male rat sexual behavior and postcopulatory departure in the goal compartment-runway paradigm. *Physiol Behav*, *76*(1), 91-97. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00678-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00678-9)
- Begg, R. (1976). Ultrasound production by the long haired rat of Australia (*Rattus villosissimus*). *Ultrasonics*, *14*(4), 177-182. [https://doi.org/10.1016/0041-624x\(76\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0041-624x(76)90050-0)
- Bell, R. W., Nitschke, W., Bell, N. J., & Zachman, T. A. (1974). Early experience, ultrasonic vocalizations, and maternal responsiveness in rats. *Dev Psychobiol*, *7*(3), 235-242. <https://doi.org/10.1002/dev.420070307>
- Bell, R. W., Nitschke, W., & Zachman, T. A. (1972). Ultra-sounds in three inbred strains of young mice. *Behav Biol*, *7*(6), 805-814. [https://doi.org/10.1016/s0091-6773\(72\)80172-x](https://doi.org/10.1016/s0091-6773(72)80172-x)
- Best, L. M., Zhao, L. L., Scardochio, T., & Clarke, P. B. (2017). Effects of repeated morphine on ultrasonic vocalizations in adult rats: increased 50-kHz call rate and altered subtype profile. *Psychopharmacology (Berl)*, *234*(1), 155-165. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4449-9>
- Bialy, M., Beck, J., Abramczyk, P., Trzebski, A., & Przybylski, J. (1996). Sexual behavior in male rats after nitric oxide synthesis inhibition. *Physiology & Behavior*, *60*(1), 139-143.
- Bialy, M., & Kaczmarek, L. (1996). c-Fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta neurobiologiae experimentalis*.
- Bialy, M., Kalata, U., Nikolaev-Diak, A., & Nikolaev, E. (2010). D1 receptors involved in the acquisition of sexual experience in male rats. *Behavioural brain research*, *206*(2), 166-176.
- Bialy, M., Nikolaev, E., Beck, J., & Kaczmarek, L. (1992). Delayed c-fos expression in sensory cortex following sexual learning in male rats. *Molecular Brain Research*, *14*(4), 352-356. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90103-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90103-I)
- Bialy, M., Nikolaev-Diak, A., Kalata, U., & Nikolaev, E. (2011). Blockade of androgen receptor in the medial amygdala inhibits noncontact erections in male rats. *Physiology & Behavior*, *103*(3), 295-301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.003>
- Bialy, M., Podobinska, M., Barski, J., Bogacki-Rychlik, W., & Sajdel-Sulkowska, E. M. (2019). Distinct classes of low frequency ultrasonic vocalizations in rats during sexual interactions relate to different emotional states. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *79*(1), 1-12.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31038481>

- Bialy, M., Rydz, M., & Kaczmarek, L. (2000). Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. *Behavioral Neuroscience*, *114*(5), 983-990. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.5.983>
- Bialy, M., & Sachs, B. D. (2002). Androgen Implants in Medial Amygdala Briefly Maintain Noncontact Erection in Castrated Male Rats. *Hormones and Behavior*, *42*(3), 345-355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1821>
- Bialy, M., Strefnel, M., Nikolaev-Diak, A., Socha, A., Nikolaev, E., & Boguszewski, P. M. (2014). Sexual performance and precontact 50-kHz ultrasonic vocalizations in WAG/Rij rats: Effects of opioid receptor treatment. *Epilepsy & Behavior*, *39*, 66-72.
- Biały, M., & Beck, J. (1993). The influence of vibrissae removal on copulatory behaviour in male rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*.
- Bigelow, L. J., Fiset, C., Jarvis, J. H. M., Macleod, S., Wöhr, M., Benke, T. A., & Bernard, P. B. (2022). Early-life seizures modify behavioral response to ultrasonic vocalization playback in adult rats. *Epilepsy Behav*, *127*, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.108494>
- Biosca-Brull, J., Pérez-Fernández, C., Mora, S., Carrillo, B., Pinos, H., Conejo, N. M., Collado, P., Arias, J. L., Martín-Sánchez, F., Sánchez-Santed, F., & Colomina, M. T. (2021). Relationship between Autism Spectrum Disorder and Pesticides: A Systematic Review of Human and Preclinical Models. *Int J Environ Res Public Health*, *18*(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph18105190>
- Blumberg, M. S., & Alberts, J. R. (1991). On the significance of similarities between ultrasonic vocalizations of infant and adult rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *15*(3), 383-390.
- Blumberg, M. S., Mennella, J. A., & Moltz, H. (1987). Hypothalamic temperature and deep body temperature during copulation in the male rat. *Physiol Behav*, *39*(3), 367-370. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90236-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90236-8)
- Blumberg, M. S., & Moltz, H. (1987). Hypothalamic temperature and the 22 kHz vocalization of the male rat. *Physiology & Behavior*, *40*(5), 637-640.
- Blumberg, M. S., & Moltz, H. (1988). How the nose cools the brain during copulation in the male rat. *Physiology & Behavior*, *43*(2), 173-176.
- Blumberg, M. S., Sokoloff, G., & Kent, K. J. (2000). A developmental analysis of clonidine's effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rats. *Dev Psychobiol*, *36*(3), 186-193.
- Blumberg, M. S., Sokoloff, G., Kirby, R. F., Knoot, T. G., & Lewis, S. J. (2002). Effects of antihypertensive drugs on ultrasound production and cardiovascular responses in 15-day-old rats. *Behav Brain Res*, *131*(1-2), 37-46. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00369-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00369-2)
- Bogacki-Rychlik, W., Bialy, M., Grajoszek, A., Przybyla, M., Slugocka, A., & Barski, J. J. (2019). Ketogenic diet and sexual motivation in male rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *79*(Suppl. 1).
- Bombail, V., Brown, S. M., Hammond, T. J., Meddle, S. L., Nielsen, B. L., Tivey, E. K. L., & Lawrence, A. B. (2021). Crying With Laughter: Adapting the Tickling Protocol to Address Individual Differences Among Rats in Their Response to Playful Handling. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 623.
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res*, *166*(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.009>

- Boulanger-Bertolus, J., & Mouly, A. M. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. *Brain Sci*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/brainsci11050616>
- Boulay, D., Ho-Van, S., Bergis, O., Avenet, P., & Griebel, G. (2013). Phencyclidine decreases tickling-induced 50-kHz ultrasound vocalizations in juvenile rats: a putative model of the negative symptoms of schizophrenia? *Behav Pharmacol*, *24*(7), 543-551. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283654044>
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2014). Attribution and expression of incentive salience are differentially signaled by ultrasonic vocalizations in rats. *PLOS ONE*, *9*(7), e102414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102414> 10.1371/journal.pone.0102414. eCollection 2014.
- Brenes, J. C., & Schwarting, R. K. (2015). Individual differences in anticipatory activity to food rewards predict cue-induced appetitive 50-kHz calls in rats. *Physiol Behav*, *149*, 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.012> 10.1016/j.physbeh.2015.05.012. Epub 2015 May 17.
- Brown, R. E. (1979). The 22-kHz pre-ejaculatory vocalizations of the male rat. *Physiol Behav*, *22*(3), 483-489. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90014-3)
- Browning, J. R., Whiteman, A. C., Leung, L. Y., Lu, X. M., & Shear, D. A. (2017). Air-puff induced vocalizations: A novel approach to detecting negative affective state following concussion in rats. *J Neurosci Methods*, *275*, 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.10.017> 10.1016/j.jneumeth.2016.10.017. Epub 2016 Oct 29.
- Brudzynski, S. M. (1994). Ultrasonic vocalization induced by intracerebral carbachol in rats: localization and a dose-response study. *Behav Brain Res*, *63*(2), 133-143. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90084-1)
- Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr Neuropharmacol*, *13*(2), 180-192. <https://doi.org/10.2174/1570159x13999150210141444>
- Brudzynski, S. M. (2021). Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sciences*, *11*(5), 605. <https://www.mdpi.com/2076-3425/11/5/605>
- Brudzynski, S. M., & Barnabi, F. (1996). Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. *Behav Brain Res*, *80*(1-2), 145-152. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00029-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00029-0)
- Brudzynski, S. M., & Bihari, F. (1990). Ultrasonic vocalization in rats produced by cholinergic stimulation of the brain. *Neurosci Lett*, *109*(1-2), 222-226. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90567-s](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90567-s)
- Brudzynski, S. M., Gibson, B., Silkstone, M., Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., & Panksepp, J. (2011). Motor and locomotor responses to systemic amphetamine in three lines of selectively bred Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *100*(1), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.006>
- Brudzynski, S. M., Komadoski, M., & St Pierre, J. (2012). Quinpirole-induced 50 kHz ultrasonic vocalization in the rat: role of D2 and D3 dopamine receptors. *Behav Brain Res*, *226*(2), 511-518. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.004>
- Brudzynski, S. M., Ociepa, D., & Bihari, F. (1991). Comparison between cholinergically and naturally induced ultrasonic vocalization in the rat. *J Psychiatry Neurosci*, *16*(4), 221-226.

- Buck, C. L., Malavar, J. C., George, O., Koob, G. F., & Vendruscolo, L. F. (2014). Anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations are associated with escalated alcohol intake in dependent rats. *Behav Brain Res*, 271, 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.003>
- Buck, C. L., Vendruscolo, L. F., Koob, G. F., & George, O. (2014). Dopamine D1 and μ -opioid receptor antagonism blocks anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations induced by palatable food cues in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(5), 929-937. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3307-2>
- Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S. M., Beinfeld, M. C., Cromwell, H. C., Kroes, R. A., & Moskal, J. R. (2009). The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. *Dev Psychobiol*, 51(1), 34-46. <https://doi.org/10.1002/dev.20343>
- Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S. M., Kroes, R., & Moskal, J. R. (2005). Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. *Behav Genet*, 35(1), 67-72. <https://doi.org/10.1007/s10519-004-0856-5>
- Burgdorf, J. S., Ghoreishi-Haack, N., Cearley, C. N., Kroes, R. A., & Moskal, J. R. (2019). Rat ultrasonic vocalizations as a measure of the emotional component of chronic pain. *Neuroreport*, 30(13), 863-866. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000001282>
- Burke, C. J., Kisko, T. M., Pellis, S. M., & Euston, D. R. (2017). Avoiding escalation from play to aggression in adult male rats: The role of ultrasonic calls. *Behav Processes*, 144, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.09.014> Epub 2017 Sep 21.
- Burke, C. J., Kisko, T. M., Swiftwolfe, H., Pellis, S. M., & Euston, D. R. (2017). Specific 50-kHz vocalizations are tightly linked to particular types of behavior in juvenile rats anticipating play. *PLOS ONE*, 12(5), e0175841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175841>
- Burke, K., Screven, L. A., & Dent, M. L. (2018). CBA/CaJ mouse ultrasonic vocalizations depend on prior social experience. *PLOS ONE*, 13(6), e0197774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197774>
- Cagiano, R., Barfield, R. J., White, N. R., Pleim, E. T., & Cuomo, V. (1989). Mediation of rat postejaculatory 22 kHz ultrasonic vocalization by dopamine D2 receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 34(1), 53-58. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90352-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90352-3)
- Cagiano, R., Barfield, R. J., White, N. R., Pleim, E. T., & Cuomo, V. (1989). Mediation of rat postejaculatory 22 kHz ultrasonic vocalization by dopamine D2 receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 34(1), 53-58. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(89\)90352-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90352-3)
- Cagiano, R., De Salvia, M., Renna, G., Racagni, G., & Cuomo, V. (1987). Prenatal exposure to methylazoxymethanol (MAM) acetate: effects on ultrasonic vocalization and locomotor activity in rat offspring. *Arch Toxicol Suppl*, 11, 148-151. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72558-6_21
- Calvino, B., Besson, J. M., Boehrer, A., & Depaulis, A. (1996). Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. *Neuroreport*, 7(2), 581-584. <https://doi.org/10.1097/00001756-199601310-00049>
- Calvino, B., Besson, J. M., Boehrer, A., & Depaulis, A. (1996). Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. *Neuroreport*, 7(2), 581-

584. <https://doi.org/10.1097/00001756-199601310-00049> 10.1097/00001756-199601310-00049.

- Canpolat, S., Ulker, N., Yardimci, A., Tancan, E., Sahin, E., Yaman, S. O., Bulmuş, O., Alver, A., & Ozcan, M. (2022). Irisin ameliorates male sexual dysfunction in paroxetine-treated male rats. *Psychoneuroendocrinology*, *136*, 105597. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105597> 10.1016/j.psyneuen.2021.105597. Epub 2021 Nov 24.
- Canseco-Alba, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2019). Endocannabinoids interact with the dopaminergic system to increase sexual motivation: lessons from the sexual satiety phenomenon. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *13*, 184.
- Caquineau, C., Leng, G., & Douglas, A. J. (2012). Sexual behaviour and neuronal activation in the vomeronasal pathway and hypothalamus of food-deprived male rats. *J Neuroendocrinol*, *24*(4), 712-723. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02290.x> 10.1111/j.1365-2826.2012.02290.x.
- Caruso, A., Marconi, M. A., Scattoni, M. L., & Ricceri, L. (2022). Ultrasonic vocalizations in laboratory mice: strain, age, and sex differences. *Genes Brain Behav*, *21*(5), e12815. <https://doi.org/10.1111/gbb.12815>
- Cavalcante, J. C., Bittencourt, J. C., & Elias, C. F. (2006). Female odors stimulate CART neurons in the ventral premammillary nucleus of male rats. *Physiol Behav*, *88*(1-2), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.032>
- Cezar, L. C., Kirsten, T. B., da Fonseca, C. C. N., de Lima, A. P. N., Bernardi, M. M., & Felicio, L. F. (2018). Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *84*(Pt A), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.02.008>
- Chang, S., Fan, Y., Shin, J. H., Ryu, Y., Kim, M. S., Steffensen, S. C., Kim, H. K., Kim, J. M., Lee, B. H., Jang, E. Y., Yang, C. H., & Kim, H. Y. (2019). Unpleasant Sound Elicits Negative Emotion and Reinstates Drug Seeking. *Mol Neurobiol*, *56*(11), 7594-7607. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1609-z>
- Chesney, K. L., Chang, C., & Bryda, E. C. (2020). Using Vaginal Impedance Measurement to Identify Proestrus in Rats Given Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) Agonist. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, *59*(3), 282-287. <https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-19-000112>
- Chiang, V. S.-C., & Park, J. H. (2020). Glutamate in Male and Female Sexual Behavior: Receptors, Transporters, and Steroid Independence [Review]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.589882>
- Ciucci, M. R., Ma, S. T., Kane, J. R., Ahrens, A. M., & Schallert, T. (2008). Limb use and complex ultrasonic vocalization in a rat model of Parkinson's disease: deficit-targeted training. *Parkinsonism Relat Disord*, *14 Suppl 2*(Suppl 2), S172-175. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.027>
- Ciucci, M. R., Vinney, L., Wahoske, E. J., & Connor, N. P. (2010). A translational approach to vocalization deficits and neural recovery after behavioral treatment in Parkinson disease. *J Commun Disord*, *43*(4), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2010.04.004>
- Clark, J. A., Alves, S., Gundlach, C., Rocha, B., Birzin, E. T., Cai, S. J., Flick, R., Hayes, E., Ho, K., Warriar, S., Pai, L., Yudkovitz, J., Fleischer, R., Colwell, L., Li, S., Wilkinson, H., Schaeffer, J., Wilkening, R., Mattingly, E., . . . Rohrer, S. P. (2012). Selective estrogen receptor-beta (SERM-beta) compounds modulate raphe nuclei tryptophan hydroxylase-1 (TPH-1) mRNA expression and

- cause antidepressant-like effects in the forced swim test. *Neuropharmacology*, 63(6), 1051-1063. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.004>
- Clément, P., Pozzato, C., Heidbreder, C., Alexandre, L., Giuliano, F., & Melotto, S. (2009). Delay of ejaculation induced by SB-277011, a selective dopamine D3 receptor antagonist, in the rat. *J Sex Med*, 6(4), 980-988. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01173.x>. Epub 2008 Feb 4.
- Conely, L., & Bell, R. W. (1978). Neonatal ultrasounds elicited by odor cues. *Dev Psychobiol*, 11(3), 193-197. <https://doi.org/10.1002/dev.420110302>
- Cooke, B. M., Breedlove, S. M., & Jordan, C. L. (2003). Both estrogen receptors and androgen receptors contribute to testosterone-induced changes in the morphology of the medial amygdala and sexual arousal in male rats. *Hormones and Behavior*, 43(2), 336-346. [https://doi.org/10.1016/s0018-506x\(02\)00047-8](https://doi.org/10.1016/s0018-506x(02)00047-8)
- Coolen, L. M., Allard, J., Truitt, W. A., & McKenna, K. E. (2004). Central regulation of ejaculation. *Physiology & Behavior*, 83(2), 203-215.
- Covington, H. E., 3rd, & Miczek, K. A. (2003). Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol*, 467(1-3), 1-13. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01558-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01558-9)
- Crews, D., & Moore, M. C. (1986). Evolution of mechanisms controlling mating behavior. *Science*, 231(4734), 121-125.
- Dalsenter, P. R., Santana, G. M., Grande, S. W., Andrade, A. J., & Araújo, S. L. (2006). Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*, 25(6), 297-303. <https://doi.org/10.1191/0960327105ht624oa> 10.1191/0960327105ht624oa.
- de Jong, T. R., Pattij, T., Veening, J. G., Waldinger, M. D., Cools, A. R., & Olivier, B. (2005). Effects of chronic selective serotonin reuptake inhibitors on 8-OH-DPAT-induced facilitation of ejaculation in rats: comparison of fluvoxamine and paroxetine. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(2), 509-515. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2186-6> 10.1007/s00213-005-2186-6. Epub 2005 Feb 18.
- de Oliveira Guaita, G., Vecchia, D. D., Andreatini, R., Robinson, D. L., Schwarting, R. K. W., & Da Cunha, C. (2018). Diazepam blocks 50 kHz ultrasonic vocalizations and stereotypies but not the increase in locomotor activity induced in rats by amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 235(7), 1887-1896. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4878-8>
- De Vry, J., Schreiber, R., Melon, C., Dalmus, M., & Jentsch, K. R. (2004). 5-HT1A receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*, 14(6), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.01.004>
- Dewsbury, D. A. (1967). A quantitative description of the behavior of rats during copulation. *Behaviour*, 154-178.
- Dewsbury, D. A. (1979). Factor analyses of measures of copulatory behavior in three species of murid rodents. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(5), 868.
- DiBenedictis, B. T., Cheung, H. K., Nussbaum, E. R., & Veenema, A. H. (2020). Involvement of ventral pallidal vasopressin in the sex-specific regulation of sociosexual motivation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 111, 104462. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104462> 10.1016/j.psyneuen.2019.104462. Epub 2019 Sep 25.

- Dickinson, S. Y., Kelly, D. A., Padilla, S. L., & Bergan, J. F. (2022). From Reductionism Toward Integration: Understanding How Social Behavior Emerges From Integrated Circuits. *Front Integr Neurosci*, *16*, 862437. <https://doi.org/10.3389/fnint.2022.862437>
- Dominguez, J. M., & Hull, E. M. (2005). Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiol Behav*, *86*(3), 356-368. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.006>
- Dorfman, V. B., Vega, M. C., & Coirini, H. (2006). Age-related changes of the GABA-B receptor in the lumbar spinal cord of male rats and penile erection. *Life Sci*, *78*(14), 1529-1534. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.06.045> 10.1016/j.lfs.2005.06.045. Epub 2006 Feb 10.
- Dupin, M., Garcia, S., Boulanger-Bertolus, J., Buonviso, N., & Mouly, A.-M. (2019). New insights from 22-kHz ultrasonic vocalizations to characterize fear responses: relationship with respiration and brain oscillatory dynamics. *Eneuro*, *6*(2).
- Elwood, R. W. (1979). Ultrasounds and maternal behavior in the Mongolian gerbil. *Dev Psychobiol*, *12*(4), 281-284. <https://doi.org/10.1002/dev.420120402>
- Emery, D. E., & Sachs, B. D. (1976). Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav*, *17*(5), 803-806. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90044-5)
- Emmerson, M. G., Spencer, K. A., & Brown, G. R. (2020). Social experience during adolescence in female rats increases 50 kHz ultrasonic vocalizations in adulthood, without affecting anxiety-like behavior. *Dev Psychobiol*, *62*(2), 212-223. <https://doi.org/10.1002/dev.21906>
- Engelhardt, K., Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2018). Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)*, *235*(1), 83-98. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4746-y>
- Engelhardt, K. A., Fuchs, E., Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2017). Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. *Eur Neuropsychopharmacol*, *27*(3), 261-273. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.003>
- Ennaceur, A., Michalikova, S., & Chazot, P. L. (2006). Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res*, *171*(1), 26-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.016> 10.1016/j.bbr.2006.03.016. Epub 2006 May 4.
- Estrada-Reyes, R., Dorantes-Barrón, A. M., Arrieta-Báez, D., Gómez-Patiño, M. B., Bernal-Trujillo, A., Castro-García, M., Carro-Juárez, M., & Martínez-Mota, L. (2019). Piper auritum Kunth (Piperaceae) improves the sexual performance of sluggish male rats through enhancing ejaculation. *J Ethnopharmacol*, *231*, 453-463. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.030> 10.1016/j.jep.2018.10.030. Epub 2018 Oct 26.
- Estrada-Reyes, R., Ortiz-López, P., Gutiérrez-Ortiz, J., & Martínez-Mota, L. (2009). Turnera diffusa Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males. *J Ethnopharmacol*, *123*(3), 423-429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.032> 10.1016/j.jep.2009.03.032. Epub 2009 Mar 31.
- Fantie, B. D., Brown, R. E., & Moger, W. H. (1984). Constant lighting conditions affect sexual behaviour and hormone levels in adult male rats. *J Reprod Fertil*, *72*(2), 435-441. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0720435> 10.1530/jrf.0.0720435.
- Farrell, W. J., & Alberts, J. R. (2000). Ultrasonic vocalizations by rat pups after adrenergic manipulations of brown fat metabolism. *Behav Neurosci*, *114*(4), 805-813.
- Faulkner, L. D., Dowling, A. R., Stuart, R. C., Nillni, E. A., & Hill, J. W. (2015). Reduced melanocortin

- production causes sexual dysfunction in male mice with POMC neuronal insulin and leptin insensitivity. *Endocrinology*, 156(4), 1372-1385. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1788> 10.1210/en.2014-1788. Epub 2015 Jan 15.
- Fernández-Guasti, A., Larsson, K., & Vega-Sanabria, J. (1986). Depression of postejaculatory ultrasonic vocalization by (+)-bicuculline. *Behav Brain Res*, 19(1), 35-39. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(86\)90045-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(86)90045-8)
- Fernández-Guasti, A., & Rodríguez-Manzo, G. (2003). Pharmacological and physiological aspects of sexual exhaustion in male rats. *Scand J Psychol*, 44(3), 257-263. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00343> 10.1111/1467-9450.00343.
- Fernández-Vargas, M. (2018). Vocal Signals of Sexual Motivation in Male and Female Rodents. *Current Sexual Health Reports*, 10(4), 315-328. <https://doi.org/10.1007/s11930-018-0179-9>
- Ferraz, M. M., Sab, I. M., Silva, M. A., Santos, D. A., & Ferraz, M. R. (2015). Prenatal Hypoxia Ischemia Increases Male Rat Sexual Behavior. *J Sex Med*, 12(10), 2013-2021. <https://doi.org/10.1111/jsm.13006> 10.1111/jsm.13006.
- Floody, O. R. (2009). Effects on hamster vocalization and aggression of carbachol injections into the MPOA/AH. *Physiol Behav*, 96(2), 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.10.012>
- Floody, O. R., & Bauer, G. B. (1987). Selectivity in the responses of hamsters to conspecific vocalizations. *Horm Behav*, 21(4), 522-527. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(87\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0018-506x(87)90010-9)
- Fujiwara, M., & Chiba, A. (2018). Sexual odor preference and dopamine release in the nucleus accumbens by estrous olfactory cues in sexually naïve and experienced male rats. *Physiol Behav*, 185, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.12.029> 10.1016/j.physbeh.2017.12.029. Epub 2017 Dec 28.
- Fyke, W., Premoli, M., Echeverry Alzate, V., López-Moreno, J. A., Lemaire-Mayo, V., Crusio, W. E., Marsicano, G., Wöhr, M., & Pietropaolo, S. (2021). Communication and social interaction in the cannabinoid-type 1 receptor null mouse: Implications for autism spectrum disorder. *Autism Res*, 14(9), 1854-1872. <https://doi.org/10.1002/aur.2562>
- Gao, S. C., Wei, Y. C., Wang, S. R., & Xu, X. H. (2019). Medial Preoptic Area Modulates Courtship Ultrasonic Vocalization in Adult Male Mice. *Neurosci Bull*, 35(4), 697-708. <https://doi.org/10.1007/s12264-019-00365-w>
- Garduño-Gutiérrez, R., León-Olea, M., & Rodríguez-Manzo, G. (2013). The mesolimbic system participates in the naltrexone-induced reversal of sexual exhaustion: opposite effects of intra-VTA naltrexone administration on copulation of sexually experienced and sexually exhausted male rats. *Behav Brain Res*, 256, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.056> 10.1016/j.bbr.2013.07.056. Epub 2013 Aug 8.
- Gerardin, D. C., Pereira, O. C., Kempinas, W. G., Florio, J. C., Moreira, E. G., & Bernardi, M. M. (2005). Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol Behav*, 84(1), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.014> 10.1016/j.physbeh.2004.10.014. Epub 2004 Nov 14.
- Giuliano, F., Bernabé, J., Brown, K., Droupy, S., Benoit, G., & Rampin, O. (1997). Erectile response to hypothalamic stimulation in rats: role of peripheral nerves. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273(6), R1990-R1997.
- Giuliano, F. A., Rampin, O., Benoit, G., & Jardin, A. (1995). Neural control of penile erection. *Urologic Clinics of North America*, 22(4), 747-766.

- Gladue, B. A., & Clemens, L. G. (1982). Development of feminine sexual behavior in the rat: androgenic and temporal influences. *Physiol Behav*, 29(2), 263-267. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90013-0)
- Gorzalka, B. B., Hanson, L. A., & Brotto, L. A. (1998). Chronic stress effects on sexual behavior in male and female rats: mediation by 5-HT_{2A} receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 61(4), 405-412. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(98\)00106-3](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(98)00106-3)
- Gould, J., & Morgan, C. (1941). Hearing in the rat at high frequencies. *Science*, 94(2433), 168-168.
- Gould, J., & Morgan, C. T. (1942). Auditory sensitivity in the rat. *Journal of Comparative Psychology*, 34(3), 321.
- Gourevitch, G., & Hack, M. H. (1966). Audibility in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 62(2), 289.
- Graham, M., & Letz, R. (1979). Within-species variation in the development of ultrasonic signaling of preweanling rats. *Dev Psychobiol*, 12(2), 129-136. <https://doi.org/10.1002/dev.420120205>
- Gulia, K. K., Kumar, V. M., & Mallick, H. N. (2002). Role of the lateral septal noradrenergic system in the elaboration of male sexual behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 72(4), 817-823. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00771-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00771-2)
- Guma, E., Snook, E., Spring, S., Lerch, J. P., Nieman, B. J., Devenyi, G. A., & Chakravarty, M. M. (2021). Subtle alterations in neonatal neurodevelopment following early or late exposure to prenatal maternal immune activation in mice. *Neuroimage Clin*, 32, 102868. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2021.102868>
- Hamed, A., Daszczuk, P., Kurska, M. B., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., Boguszewski, P. M., & Szyndler, J. (2016). Non-parametric analysis of neurochemical effects and Arc expression in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalization. *Behavioural brain research*, 312, 174-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.042>
- Han, J. S., Bird, G. C., Li, W., Jones, J., & Neugebauer, V. (2005). Computerized analysis of audible and ultrasonic vocalizations of rats as a standardized measure of pain-related behavior. *J Neurosci Methods*, 141(2), 261-269. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.07.005>
- Haney, M., & Miczek, K. A. (1994). Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)*, 114(3), 441-448. <https://doi.org/10.1007/bf02249334>
- Hård, E., Engel, J., & Lindh, A. S. (1988). Effect of clonidine on ultrasonic vocalization in preweaning rats. *J Neural Transm*, 73(3), 217-237. <https://doi.org/10.1007/bf01250138>
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2003). Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, 43(2), 327-335.
- Harding, S. M., & McGinnis, M. Y. (2004). Androgen receptor blockade in the MPOA or VMN: effects on male sociosexual behaviors. *Physiol Behav*, 81(4), 671-680. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.03.008>
- Hart, B. L., Wallach, S. J., & Melese-d'Hospital, P. Y. (1983). Differences in responsiveness to testosterone of penile reflexes and copulatory behavior of male rats. *Horm Behav*, 17(3), 274-283. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(83\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0018-506x(83)90026-0)
- Hawley, W. R., Grissom, E. M., Belkin, M. N., James, T. F., & Dohanich, G. P. (2013). Decreased sexual motivation and heightened anxiety in male Long-Evans rats are correlated with the memory for a traumatic event. *Arch Sex Behav*, 42(4), 659-668. <https://doi.org/10.1007/s10508-012->

0017-5 10.1007/s10508-012-0017-5. Epub 2012 Oct 16.

- Henley, C. L., Nunez, A. A., & Clemens, L. G. (2011). Hormones of choice: the neuroendocrinology of partner preference in animals. *Front Neuroendocrinol*, *32*(2), 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.010>
- Hermans, R. H., McGivern, R. F., Chen, W., & Longo, L. D. (1993). Altered adult sexual behavior in the male rat following chronic prenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol*, *15*(6), 353-363. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(93\)90051-o](https://doi.org/10.1016/0892-0362(93)90051-o)
- Hlinak, Z., & Madlafousek, J. (1977). Sexual behaviour of the female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement. *Behaviour*, *63*(3-4), 129-173.
- Hodgson, R. A., Guthrie, D. H., & Varty, G. B. (2008). Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav*, *88*(3), 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.09.005>
- Hofer, M. A., & Shair, H. (1978). Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, *11*(5), 495-504.
- Holman, S. D., & Seale, W. T. (1991). Ontogeny of sexually dimorphic ultrasonic vocalizations in Mongolian gerbils. *Dev Psychobiol*, *24*(2), 103-115. <https://doi.org/10.1002/dev.420240204>
- Holman, S. D., Seale, W. T., & Hutchison, J. B. (1995). Ultrasonic vocalizations in immature gerbils: emission rate and structural changes after neonatal exposure to androgen. *Physiol Behav*, *57*(3), 451-460. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00237-y](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00237-y)
- Holstege, G., Georgiadis, J. R., Paans, A. M. J., Meiners, L. C., van der Graaf, F. H. C. E., & Reinders, A. A. T. S. (2003). Brain activation during human male ejaculation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(27), 9185-9193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09185.2003>
- Hull, E. M., & Dominguez, J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*, *52*(1), 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.030>
- Hull, E. M., Lumley, L. A., Matuszewich, L., Dominguez, J., Moses, J., & Lorrain, D. S. (1994). The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacology*, *33*(11), 1499-1504.
- Hull, E. M., Meisel, R. L., & Sachs, B. D. (2002). Male sexual behavior. In *Hormones, brain and behavior* (pp. 3-137). Elsevier.
- Hull, E. M., & Rodríguez-Manzo, G. (2017). 1.01 - Male Sexual Behavior. In D. W. Pfaff & M. Joëls (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior (Third Edition)* (pp. 1-57). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00001-8>
- Inagaki, H., & Mori, Y. (2014). Relationship between 22-kHz calls and testosterone in male rats. *Horm Behav*, *65*(1), 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.11.003>
- Jean, A., Mhaouty-Kodja, S., & Hardin-Pouzet, H. (2021). Hypothalamic cellular and molecular plasticity linked to sexual experience in male rats and mice. *Front Neuroendocrinol*, *63*, 100949. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100949>
- Jesús, P. L., Arenas-Ríos, E., Ruíz-Ramos, M., Flores-Alonso, J. C., Mendoza-Núñez, V. M., Arrieta-Cruz, I., & Arteaga-Silva, M. (2022). Effect of Chronic Moderate Caloric Restriction on the Reproductive Function in Aged Male Wistar Rats. *Nutrients*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/nu14061256>

- Johnson, A. M., Doll, E. J., Grant, L. M., Ringel, L., Shier, J. N., & Ciucci, M. R. (2011). Targeted training of ultrasonic vocalizations in aged and Parkinsonian rats. *J Vis Exp*(54). <https://doi.org/10.3791/2835>
- Johnson, A. M., Lenell, C., Severa, E., Rudisch, D. M., Morrison, R. A., & Shembel, A. C. (2022). Semi-Automated Training of Rat Ultrasonic Vocalizations [Methods]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.826550>
- Jones, A., Chen, J., Hwang, D. J., Miller, D. D., & Dalton, J. T. (2009). Preclinical characterization of a (S)-N-(4-cyano-3-trifluoromethyl-phenyl)-3-(3-fluoro, 4-chlorophenoxy)-2-hydroxy-2-methyl-propanamide: a selective androgen receptor modulator for hormonal male contraception. *Endocrinology*, 150(1), 385-395. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0674> 10.1210/en.2008-0674. Epub 2008 Sep 4.
- Jones, A., Hwang, D. J., Duke, C. B., 3rd, He, Y., Siddam, A., Miller, D. D., & Dalton, J. T. (2010). Nonsteroidal selective androgen receptor modulators enhance female sexual motivation. *J Pharmacol Exp Ther*, 334(2), 439-448. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.168880>
- Jones, B. A., Shimell, J. J., & Watson, N. V. (2011). Pre- and postnatal bisphenol A treatment results in persistent deficits in the sexual behavior of male rats, but not female rats, in adulthood. *Horm Behav*, 59(2), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.12.006> 10.1016/j.yhbeh.2010.12.006. Epub 2010 Dec 23.
- Joseph, A., & McLean, H. (1922). *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena* (Vol. 6). University of California Press.
- Kanazawa, L. K. S., Radulski, D. R., Pereira, G. S., Prickaerts, J., Schwarting, R. K. W., Acco, A., & Andreatini, R. (2021). Andrographolide blocks 50-kHz ultrasonic vocalizations, hyperlocomotion and oxidative stress in an animal model of mania. *J Psychiatr Res*, 139, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.05.042>
- Karlsson, O., Colombo, G., & Roman, E. (2015). Low copulatory activity in selectively bred Sardinian alcohol-nonpreferring (sNP) relative to alcohol-preferring (sP) rats. *Ups J Med Sci*, 120(3), 181-189. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1010666>
- Keesom, S. M., Rendon, N. M., Demas, G. E., & Hurley, L. M. (2015). Vocal behaviour during aggressive encounters between Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Animal Behaviour*, 102, 85-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.01.014>
- Kelestimur, H., Bulmus, O., Serhatlioglu, I., Ercan, Z., Ozer Kaya, S., Yardimci, A., Ulker, N., Kacar, E., & Canpolat, S. (2021). Effects of treadmill exercise on sexual behavior and reproductive parameters in chronically stressed-male rats. *Physiol Res*, 70(5), 765-775. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934585>
- Kelm-Nelson, C. A., Brauer, A. F., & Ciucci, M. R. (2016). Vocal training, levodopa, and environment effects on ultrasonic vocalizations in a rat neurotoxin model of Parkinson disease. *Behav Brain Res*, 307, 54-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.006>
- Kikusui, T., Shima, Y., Sonobe, M., Yoshida, Y., Nagasawa, M., Nomoto, K., & Mogi, K. (2021). Testosterone regulates the emission of ultrasonic vocalizations and mounting behavior during different developmental periods in mice. *Dev Psychobiol*, 63(4), 725-733. <https://doi.org/10.1002/dev.22045>
- Kim, J. Y., & Wood, R. I. (2014). Anabolic-androgenic steroids and appetitive sexual behavior in male rats. *Horm Behav*, 66(4), 585-590. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.009>
- Knapp, D. J., Kampov-Polevoy, A. B., Overstreet, D. H., Breese, G. R., & Rezvani, A. H. (1997).

- Ultrasonic vocalization behavior differs between lines of ethanol-preferring and nonpreferring rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 21(7), 1232-1240.
- Knapska, E., Walasek, G., Nikolaev, E., Neuhäusser-Wespy, F., Lipp, H. P., Kaczmarek, L., & Werka, T. (2006). Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. *Learn Mem*, 13(2), 192-200. <https://doi.org/10.1101/lm.54706>
- Kobayashi, T., Kiyokawa, Y., Arata, S., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2013). c-Fos expression during the modulation of sexual behavior by an alarm pheromone. *Behav Brain Res*, 237, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.042>. Epub 2012 Sep 28.
- Kobayashi, T., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2011). Pretreatment with CP-154526 blocks the modifying effects of alarm pheromone on components of sexual behavior in male, but not in female, rats. *Chem Senses*, 36(7), 623-632. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr017>. Epub 2011 Apr 18.
- Kondo, Y., & Arai, Y. (1995). Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiology & Behavior*, 57(1), 69-73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00205-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00205-J)
- Kondo, Y., & Hayashi, H. (2021). Neural and Hormonal Basis of Opposite-Sex Preference by Chemosensory Signals. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8311. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8311>
- Kondo, Y., & Sachs, B. D. (2002). Disparate effects of small medial amygdala lesions on noncontact erection, copulation, and partner preference. *Physiology & Behavior*, 76(4-5), 443-447.
- Konorski, J. (1969). *Integracyjna działalność mózgu*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Krall, C. M., Andicochea, C. T., & McDougall, S. A. (2005). Ultrasonic vocalization production of preweanling rats: effects of central and peripheral administration of alpha2-adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmacol*, 517(3), 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.05.021>
- Krug, A., Wöhr, M., Seffer, D., Rippberger, H., Sungur, A., Dietsche, B., Stein, F., Sivalingam, S., Forstner, A. J., Witt, S. H., Dukal, H., Streit, F., Maaser, A., Heilmann-Heimbach, S., Andlauer, T. F. M., Herms, S., Hoffmann, P., Rietschel, M., Nöthen, M. M., . . . Kircher, T. (2020). Advanced paternal age as a risk factor for neurodevelopmental disorders: a translational study. *Mol Autism*, 11(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s13229-020-00345-2>
- Kuchniak, K., Wyszogrodzka, E., Chrapusta, S. J., Czarna, M., Michalak, M., Płaźnik, A., Krząścik, P., Mierzejewski, P., & Taracha, E. (2019). Using anticipatory and drug-evoked appetitive ultrasonic vocalization for monitoring the rewarding effect of amphetamine in a rat model of drug self-administration. *Behav Brain Res*, 376, 112187. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112187>
- Kudwa, A. E., López, F. J., McGivern, R. F., & Handa, R. J. (2010). A selective androgen receptor modulator enhances male-directed sexual preference, proceptive behavior, and lordosis behavior in sexually experienced, but not sexually naive, female rats. *Endocrinology*, 151(6), 2659-2668. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1289>
- Landry, G. J., Opiol, H., Marchant, E. G., Pavlovski, I., Mear, R. J., Hamson, D. K., & Mistlberger, R. E. (2012). Scheduled daily mating induces circadian anticipatory activity rhythms in the male rat. *PLOS ONE*, 7(7), e40895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040895>. Epub 2012 Jul 25.
- Lang, U., Rivest, R. W., Schlaepfer, L. V., Bradtke, J. C., Aubert, M. L., & Sizonenko, P. C. (1984). Diurnal rhythm of melatonin action on sexual maturation of male rats. *Neuroendocrinology*,

- 38(4), 261-268. <https://doi.org/10.1159/000123901> 10.1159/000123901.
- Larsson, K. (1956). Conditioning and sexual behavior in the male albino rat.
- Lawson, K. A., Flores, A. Y., Hokenson, R. E., Ruiz, C. M., & Mahler, S. V. (2021). Nucleus Accumbens Chemogenetic Inhibition Suppresses Amphetamine-Induced Ultrasonic Vocalizations in Male and Female Rats. *Brain Sci*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/brainsci11101255>
- Le Moëne, O., & Ågmo, A. (2019). Modeling Human Sexual Motivation in Rodents: Some Caveats. *Front Behav Neurosci*, 13, 187. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00187>
- Lee, H. C., Yamanouchi, K., & Nishihara, M. (2006). Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. *J Reprod Dev*, 52(3), 343-352. <https://doi.org/10.1262/jrd.17096> 10.1262/jrd.17096. Epub 2006 Feb 22.
- Liu, Y. C., Salamone, J. D., & Sachs, B. D. (1997). Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats. *J Neurosci*, 17(13), 5245-5253. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-05245.1997>
- Lukas, M., & Wöhr, M. (2015). Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats. *Psychoneuroendocrinology*, 56, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.005> 10.1016/j.psyneuen.2015.03.005. Epub 2015 Mar 10.
- Ma, S. T., Maier, E. Y., Ahrens, A. M., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2010). Repeated intravenous cocaine experience: development and escalation of pre-drug anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Brain Res*, 212(1), 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.04.001>
- Machado Figueiredo, R., de Carvalho, M. C., Brandão, M. L., & Lovick, T. A. (2019). Short-term, low-dose fluoxetine prevents oestrous cycle-linked increase in anxiety-like behaviour in female rats. *J Psychopharmacol*, 33(5), 548-557. <https://doi.org/10.1177/0269881119841833>
- Maier, E. Y., Ahrens, A. M., Ma, S. T., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2010). Cocaine deprivation effect: cue abstinence over weekends boosts anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Brain Res*, 214(1), 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.04.057>
- Mateus-Pinheiro, A., Patrício, P., Alves, N. D., Machado-Santos, A. R., Morais, M., Bessa, J. M., Sousa, N., & Pinto, L. (2014). The Sweet Drive Test: refining phenotypic characterization of anhedonic behavior in rodents. *Front Behav Neurosci*, 8, 74. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00074> 10.3389/fnbeh.2014.00074. eCollection 2014.
- McGinnis, M. Y., & Kahn, D. F. (1997). Inhibition of male sexual behavior by intracranial implants of the protein synthesis inhibitor anisomycin into the medial preoptic area of the rat. *Horm Behav*, 31(1), 15-23. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1997.1367>
- McIntosh, T. K., & Barfield, R. J. (1984). Brain monoaminergic control of male reproductive behavior. III. Norepinephrine and the post-ejaculatory refractory period. *Behav Brain Res*, 12(3), 275-281. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(84\)90153-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(84)90153-0)
- McIntosh, T. K., Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1978). Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour of female rats. *Nature*, 272(5649), 163-164. <https://doi.org/10.1038/272163a0>
- McMurray, M. S., Zeskind, P. S., Meiners, S. M., Garber, K. A., Tien, H., & Johns, J. M. (2013). Effect of prenatal cocaine on early postnatal thermoregulation and ultrasonic vocalization production. *Front Psychol*, 4, 882. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00882>
- McVary, K. T., Rathnau, C. H., & McKenna, K. E. (1997). Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR

- rat: a role of central neuropathy. *Am J Physiol*, 272(1 Pt 2), R259-267.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.272.1.R259>
- Meisel, R. L., O'Hanlon, J. K., & Sachs, B. D. (1984). Differential maintenance of penile responses and copulatory behavior by gonadal hormones in castrated male rats. *Horm Behav*, 18(1), 56-64.
[https://doi.org/10.1016/0018-506x\(84\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0018-506x(84)90050-3)
- Meisel, R. L., & Sachs, B. D. (1980). Spinal transection accelerates the developmental expression of penile reflexes in male rats. *Physiology & Behavior*, 24(2), 289-292.
- Melis, M. R., & Argiolas, A. (1995). Dopamine and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, 19(1), 19-38. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00020-2)
- Melis, M. R., & Argiolas, A. (2011). Central control of penile erection: a re-visitation of the role of oxytocin and its interaction with dopamine and glutamic acid in male rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 939-955.
- Melis, M. R., & Argiolas, A. (2021). Oxytocin, Erectile Function and Sexual Behavior: Last Discoveries and Possible Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10376.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910376>
- Melis, M. R., Melis, T., Cocco, C., Succu, S., Sanna, F., Pillolla, G., Boi, A., Ferri, G. L., & Argiolas, A. (2007). Oxytocin injected into the ventral tegmental area induces penile erection and increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens and paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats. *Eur J Neurosci*, 26(4), 1026-1035.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05721.x> 10.1111/j.1460-9568.2007.05721.x. Epub 2007 Aug 2.
- Meraz-Medina, T., Hernández-González, M., Bonilla-Jaime, H., Guevara, M. A., Flores-Mancilla, L., Viguera-Villaseñor, R. M., & Arteaga-Silva, M. (2017). Changes in hormonal levels associated with enforced interval copulation and anxiety in sexually inexperienced and experienced male rats. *Physiol Behav*, 177, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.031>
10.1016/j.physbeh.2017.03.031. Epub 2017 Apr 4.
- Miceli, M. O., & Malsbury, C. W. (1982). Sagittal knife cuts in the near and far lateral preoptic area-hypothalamus reduce ultrasonic vocalizations in female hamsters. *Physiol Behav*, 29(5), 953-956. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90350-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90350-x)
- Michael, V., Goffinet, J., Pearson, J., Wang, F., Tschida, K., & Mooney, R. (2020). Circuit and synaptic organization of forebrain-to-midbrain pathways that promote and suppress vocalization. *Elife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.63493>
- Miczek, K. A., & Vivian, J. A. (1993). Automatic quantification of withdrawal from 5-day diazepam in rats: ultrasonic distress vocalizations and hyperreflexia to acoustic startle stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*, 110(3), 379-382. <https://doi.org/10.1007/bf02251298>
- Mittal, N., Maddox, W. T., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2020). Spontaneous Ultrasonic Vocalization Transmission in Adult, Male Long-Evans Rats Is Age-Dependent and Sensitive to EtOH Modulation. *Brain Sci*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/brainsci10110890>
- Mittal, N., Thakore, N., Bell, R. L., Maddox, W. T., Schallert, T., & Duvauchelle, C. L. (2019). Sex-specific ultrasonic vocalization patterns and alcohol consumption in high alcohol-drinking (HAD-1) rats. *Physiol Behav*, 203, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.11.012>
- Molenda-Figueira, H. A., Bell, M. R., De Lorme, K. C., & Sisk, C. L. (2017). Pubertal pair-housing facilitates adult sexual behavior in male rats. *Dev Psychobiol*, 59(1), 111-117.
<https://doi.org/10.1002/dev.21475>

- Montanari, C., Giorla, E., Pelloux, Y., & Baunez, C. (2020). Subthalamic nucleus mediates the modulation on cocaine self-administration induced by ultrasonic vocalization playback in rats. *Addict Biol*, 25(1), e12710. <https://doi.org/10.1111/adb.12710>
- Morales-Navas, M., Castaño-Castaño, S., Pérez-Fernández, C., Sánchez-Gil, A., Teresa Colomina, M., Leinekugel, X., & Sánchez-Santed, F. (2020). Similarities between the Effects of Prenatal Chlorpyrifos and Valproic Acid on Ultrasonic Vocalization in Infant Wistar Rats. *Int J Environ Res Public Health*, 17(17). <https://doi.org/10.3390/ijerph17176376>
- Morimoto, M., Amano, Y., Oka, M., Harada, A., Fujita, H., Hikichi, Y., Tozawa, R., Yamaoka, M., & Hara, T. (2017). Amelioration of sexual behavior and motor activity deficits in a castrated rodent model with a selective androgen receptor modulator SARM-2f. *PLOS ONE*, 12(12), e0189480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189480> 10.1371/journal.pone.0189480. eCollection 2017.
- Mos, J., Van Logten, J., Bloetjes, K., & Olivier, B. (1991). The effects of idazoxan and 8-OH-DPAT on sexual behaviour and associated ultrasonic vocalizations in the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, 15(4), 505-515. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80140-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80140-x)
- Mu, P., Fuchs, T., Saal, D. B., Sorg, B. A., Dong, Y., & Panksepp, J. (2009). Repeated cocaine exposure induces sensitization of ultrasonic vocalization in rats. *Neurosci Lett*, 453(1), 31-35. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.007>
- Mulvihill, K. G., & Brudzynski, S. M. (2018). Individual behavioural predictors of amphetamine-induced emission of 50 kHz vocalization in rats. *Behav Brain Res*, 350, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.009>
- Murphy, A. Z., & Hoffman, G. E. (2001). Distribution of gonadal steroid receptor-containing neurons in the preoptic-periaqueductal gray-brainstem pathway: A potential circuit for the initiation of male sexual behavior. *Journal of Comparative Neurology*, 438(2), 191-212.
- Mutschler, N. H., & Miczek, K. A. (1998). Withdrawal from a self-administered or non-contingent cocaine binge: differences in ultrasonic distress vocalizations in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 136(4), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s002130050584>
- Naito, H., Okumura, T., Inoue, M., & Suzuki, Y. (2006). Ultrasonic vocalization response elicited in adjuvant-induced arthritic rats as a useful method for evaluating analgesic drugs. *Exp Anim*, 55(2), 125-129. <https://doi.org/10.1538/expanim.55.125> 10.1538/expanim.55.125.
- Nazarian, A., Krall, C. M., Osburn, J. R., & McDougall, S. A. (2001). Ultrasonic vocalizations of preweanling rats: involvement of both alpha(2)-adrenoceptor and kappa-opioid receptor systems. *Eur J Pharmacol*, 415(2-3), 165-171. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)00849-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)00849-4)
- Nguyen, T. V., Chumnanpuen, P., Parunyakul, K., Srisuksai, K., & Fungfuang, W. (2021). A study of the aphrodisiac properties of Cordyceps militaris in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Vet World*, 14(2), 537-544. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.537-544> 10.14202/vetworld.2021.537-544. Epub 2021 Feb 27.
- Nna, V. U., Abu Bakar, A. B., Ahmad, A., & Mohamed, M. (2021). Metformin mitigates impaired testicular lactate transport/utilisation and improves sexual behaviour in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*, 127(1), 51-60. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1610778> 10.1080/13813455.2019.1610778. Epub 2019 May 10.
- Novati, A., Yu-Taeger, L., Gonzalez Menendez, I., Quintanilla Martinez, L., & Nguyen, H. P. (2018).

- Sexual behavior and testis morphology in the BACHD rat model. *PLOS ONE*, *13*(6), e0198338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198338> 10.1371/journal.pone.0198338. eCollection 2018.
- Okon, E. E. (1971). The temperature relations of vocalization in infant golden hamsters and Wistar rats. *Journal of Zoology*, *164*(2), 227-237.
- Olayo-Lortia, J., Ferreira-Nuño, A., Velázquez-Moctezuma, J., & Morales-Otal, A. (2014). Further Definition on the Multiple Partner Choice Arena: A Potential Animal Model for the Study of Premature Ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine*, *11*(10), 2428-2438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jsm.12637>
- Olivier, B., Chan, J. S., Pattij, T., de Jong, T. R., Oosting, R. S., Veening, J. G., & Waldinger, M. D. (2006). Psychopharmacology of male rat sexual behavior: modeling human sexual dysfunctions? *Int J Impot Res*, *18 Suppl 1*, S14-23. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901330>
- Olivier, B., Molewijk, H. E., van der Heyden, J. A., van Oorschot, R., Ronken, E., Mos, J., & Miczek, K. A. (1998). Ultrasonic vocalizations in rat pups: effects of serotonergic ligands. *Neurosci Biobehav Rev*, *23*(2), 215-227. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(98\)00022-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(98)00022-0)
- Olivier, J. D., Esquivel Franco, D. C., Oosting, R., Waldinger, M., Sarnyai, Z., & Olivier, B. (2017). Tramadol: Effects on sexual behavior in male rats are mainly caused by its 5-HT reuptake blocking effects. *Neuropharmacology*, *116*, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.11.020> 10.1016/j.neuropharm.2016.11.020. Epub 2016 Nov 24.
- Olivier, J. D. A., Janssen, J., Pattij, T., Prêtre, S. D., & Olivier, B. (2022). Antidepressants, sexual behavior, and translational models for male sexual dysfunction: development of animal models, pharmacology, and genetics. In *Translational Research Methods for Major Depressive Disorder* (pp. 451-515). Springer.
- Olszyński, K. H., Polowy, R., Maź, M., Boguszewski, P. M., & Filipkowski, R. K. (2020). Playback of Alarm and Appetitive Calls Differentially Impacts Vocal, Heart-Rate, and Motor Response in Rats. *iScience*, *23*(10), 101577. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101577>
- Olszyński, K. H., Polowy, R., Wardak, A. D., Grymanowska, A. W., & Filipkowski, R. K. (2021). Increased Vocalization of Rats in Response to Ultrasonic Playback as a Sign of Hypervigilance Following Fear Conditioning. *Brain Sci*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci11080970>
- Olvera-Hernández, S., Chavira, R., & Fernández-Guasti, A. (2015). Prenatal letrozole produces a subpopulation of male rats with same-sex preference and arousal as well as female sexual behavior. *Physiology & Behavior*, *139*, 403-411.
- Olvera-Hernández, S., Hernández, A., Reyes, R., & Fernández-Guasti, A. (2019). Establishment of partner preference in male rats: Effect of prenatal letrozole and sexual experience. *Horm Behav*, *109*, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.009> 10.1016/j.yhbeh.2019.02.009. Epub 2019 Feb 19.
- Oosting, R. S., Chan, J. S. W., Olivier, B., & Banerjee, P. (2016). Vilazodone does not inhibit sexual behavior in male rats in contrast to paroxetine: A role for 5-HT1A receptors? *Neuropharmacology*, *107*, 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.045> 10.1016/j.neuropharm.2016.03.045. Epub 2016 Mar 31.
- Oswalt, G. L., & Meier, G. W. (1975). Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. *Dev Psychobiol*, *8*(2), 129-135. <https://doi.org/10.1002/dev.420080205>
- Oti, T., Satoh, K., Uta, D., Nagafuchi, J., Tateishi, S., Ueda, R., Takanami, K., Young, L. J., Galione, A.,

- Morris, J. F., Sakamoto, T., & Sakamoto, H. (2021). Oxytocin Influences Male Sexual Activity via Non-synaptic Axonal Release in the Spinal Cord. *Curr Biol*, *31*(1), 103-114.e105. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.089> 10.1016/j.cub.2020.09.089. Epub 2020 Oct 29.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2010). Laughing Rats? Playful Tickling Arouses High-Frequency Ultrasonic Chirping in Young Rodents. *American Journal of Play*, *2*(3), 357-372.
- Paredes, R. G. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scandinavian journal of psychology*, *44*(3), 203-212.
- Parikh, R., Sorek, E., Parikh, S., Michael, K., Bikovski, L., Tshori, S., Shefer, G., Mingelgreen, S., Zornitzki, T., & Knobler, H. (2021). Skin exposure to UVB light induces a skin-brain-gonad axis and sexual behavior. *Cell Reports*, *36*(8), 109579.
- Parrott, R. F. (1976). Effect of castration on sexual arousal in the rat, determined from records of post-ejaculatory ultrasonic vocalizations. *Physiol Behav*, *16*(6), 689-692. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(76\)90237-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(76)90237-7)
- Parrott, R. F., & Barfield, R. J. (1975). Post-ejaculatory vocalization in castrated rats treated with various steroids. *Physiol Behav*, *15*(2), 159-163. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90230-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90230-9)
- Paup, D. C., Mennin, S. P., & Gorski, R. A. (1975). Androgen- and estrogen-induced copulatory behavior and inhibition of luteinizing hormone (LH) secretion in the male rat. *Horm Behav*, *6*(1), 35-46. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(75\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0018-506x(75)90021-5) 10.1016/0018-506x(75)90021-5.
- Pfaff, D. (2017). *How the vertebrate brain regulates behavior: Direct from the lab*. Harvard University Press.
- Pfaff, D. W., Martin, E. M., & Faber, D. (2012). Origins of arousal: roles for medullary reticular neurons. *Trends in neurosciences*, *35*(8), 468-476.
- Pfaus, J. G., Erickson, K. A., & Talianakis, S. (2013). Somatosensory conditioning of sexual arousal and copulatory behavior in the male rat: a model of fetish development. *Physiol Behav*, *122*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.08.005> 10.1016/j.physbeh.2013.08.005. Epub 2013 Aug 14.
- Pfaus, J. G., Kippin, T. E., & Centeno, S. (2001). Conditioning and sexual behavior: a review. *Horm Behav*, *40*(2), 291-321. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1686>
- Pfaus, J. G., Kippin, T. E., & Coria-Avila, G. (2003). What Can Animal Models Tell Us about Human Sexual Response? *Annual Review of Sex Research*, *14*(1), 1-63. <https://doi.org/10.1080/10532528.2003.10559810>
- Pfaus, J. G., Mendelson, S. D., & Phillips, A. G. (1990). A correlational and factor analysis of anticipatory and consummatory measures of sexual behavior in the male rat. *Psychoneuroendocrinology*, *15*(5-6), 329-340.
- Pfaus, J. G., Wilkins, M. F., Dipietro, N., Benibgui, M., Toledano, R., Rowe, A., & Couch, M. C. (2010). Inhibitory and disinhibitory effects of psychomotor stimulants and depressants on the sexual behavior of male and female rats. *Horm Behav*, *58*(1), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.10.004>
- Phillips-Farfán, B. V., Romano-Torres, M., & Fernández-Guasti, A. (2008). Anabolic androgens restore mating after sexual satiety in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *89*(3), 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.12.016> 10.1016/j.pbb.2007.12.016. Epub 2007 Dec 23.
- Philogene-Khalid, H. L., Simmons, S. J., Nayak, S., Martorana, R. M., Su, S. H., Caro, Y., Ranieri, B.,

- DiFurio, K., Mo, L., Gentile, T. A., Murad, A., Reitz, A. B., Muschamp, J. W., & Rawls, S. M. (2017). Stereoselective Differences between the Reinforcing and Motivational Effects of Cathinone-Derived 4-Methylmethcathinone (Mephedrone) In Self-Administering Rats. *ACS Chem Neurosci*, *8*(12), 2648-2654. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00212>
- Pocock, V. J., Sales, G. D., Wilson, C. A., & Milligan, S. R. (2002). Effects of perinatal octylphenol on ultrasound vocalization, behavior and reproductive physiology in rats. *Physiol Behav*, *76*(4-5), 645-653. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00788-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00788-6)
- Potasiewicz, A., Holuj, M., Piotrowska, D., Zajda, K., Wojcik, M., Popik, P., & Nikiforuk, A. (2019). Evaluation of ultrasonic vocalizations in a neurodevelopmental model of schizophrenia during the early life stages of rats. *Neuropharmacology*, *146*, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.023>
- Pye, J. D., & Flinn, M. (1964). Equipment for detecting animal ultrasound. *Ultrasonics*, *2*(1), 23-28.
- Quintana, G. R., Guizar, A., Rassi, S., & Pfaus, J. G. (2018). First sexual experiences determine the development of conditioned ejaculatory preference in male rats. *Learn Mem*, *25*(10), 522-532. <https://doi.org/10.1101/lm.048090.118>
- Ramírez-Rentería, M. L., Hernández-Arteaga, E., Hernández González, M., Cruz-Aguilar, M. A., Ortega-Hernández, T. M. F., Sotelo-Tapia, C., & Guevara, M. A. (2020). Annual changes in the copulatory behavior of male rats maintained under constant laboratory conditions. *Chronobiol Int*, *37*(2), 209-217. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1715997>
- Rendon, N. M., Keesom, S. M., Amadi, C., Hurley, L. M., & Demas, G. E. (2015). Vocalizations convey sex, seasonal phenotype, and aggression in a seasonal mammal. *Physiol Behav*, *152*(Pt A), 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.014>
- Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-García, R., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm Behav*, *44*(4), 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.04.001>
- Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., & Velazquez-Moctezuma, J. (1998). Lack of effect of corticosterone administration on male sexual behavior of rats. *Physiol Behav*, *63*(3), 367-370. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00437-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00437-x)
- Reyes, K. E., Kudva, P. S., Heckler, B., Gonzalez, A. E., & Sorg, B. A. (2021). Rat ultrasonic vocalizations as an index of memory. *Neurosci Lett*, *741*, 135458. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135458>
- Ringel, L. E., Basken, J. N., Grant, L. M., & Ciucci, M. R. (2013). Dopamine D1 and D2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. *Behav Brain Res*, *252*, 252-259. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.006>
- Rodríguez-Manzo, G., & Canseco-Alba, A. (2015). Anandamide reduces the ejaculatory threshold of sexually sluggish male rats: possible relevance for human lifelong delayed ejaculation disorder. *J Sex Med*, *12*(5), 1128-1135. <https://doi.org/10.1111/jsm.12866>
- Rodríguez-Manzo, G., & Canseco-Alba, A. (2017). A new role for GABAergic transmission in the control of male rat sexual behavior expression. *Behav Brain Res*, *320*, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.041>
- Rodríguez-Manzo, G., & Fernández-Guasti, A. (1994). Reversal of sexual exhaustion by serotonergic

- and noradrenergic agents. *Behav Brain Res*, 62(2), 127-134. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90019-1) 10.1016/0166-4328(94)90019-1.
- Rojas-Carvajal, M., Chinchilla-Alvarado, J., & Brenes, J. C. (2022). Muscarinic regulation of self-grooming behavior and ultrasonic vocalizations in the context of open-field habituation in rats. *Behav Brain Res*, 418, 113641. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113641>
- Rydz, M., Bialy, M., & Kaczmarek, L. (1997). Role of NMDA receptors in ultrasonic vocalizations in 50 kHz band during acquisition of sexual behavior in male rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 57.
- Sachs, B. D. (1978). Conceptual and neural mechanisms of masculine copulatory behavior. In *Sex and behavior* (pp. 267-295). Springer.
- Sachs, B. D. (2000). Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction, and sexual arousal. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(5), 541-560.
- Sachs, B. D., Akasofu, K., Citron, J. H., Daniels, S. B., & Natoli, J. H. (1994). Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats. *Physiology & Behavior*, 55(6), 1073-1079. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90390-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90390-5)
- Sachs, B. D., Akasofu, K., & McEldowney, S. S. (1994). Effects of copulation on apomorphine-induced erection in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 48(2), 423-428. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90547-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90547-9) 10.1016/0091-3057(94)90547-9.
- Sachs, B. D., & Barfield, R. J. (1976). Functional Analysis of Masculine Copulatory Behavior in the Rat. In J. S. Rosenblatt, R. A. Hinde, E. Shaw, & C. Beer (Eds.), *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 7, pp. 91-154). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60166-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60166-7)
- Sachs, B. D., & Bialy, M. (2000). Female presence during postejaculatory interval facilitates penile erection and 22-kHz vocalization in male rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(6), 1203.
- Sachs, B. D., Pollak, E. I., Krieger, M. S., & Barfield, R. J. (1973). Sexual behavior: normal male patterning in androgenized female rats. *Science*, 181(4101), 770-772.
- Sales, G., & Pye, D. (1974). *Ultrasonic communication by animals*. Springer Science & Business Media.
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Animal Behaviour*, 20(1), 88-100.
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim Behav*, 20(1), 88-100. [https://doi.org/10.1016/s0003-3472\(72\)80177-5](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(72)80177-5) 10.1016/s0003-3472(72)80177-5.
- Sánchez, C. (2003). R-citalopram attenuates anxiolytic effects of escitalopram in a rat ultrasonic vocalisation model. *Eur J Pharmacol*, 464(2-3), 155-158. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01376-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01376-1)
- Sanchez, W. N., Pochapski, J. A., Jessen, L. F., Ellenberger, M., Schwarting, R. K., Robinson, D. L., Andreatini, R., & Da Cunha, C. (2022). Diazepam attenuates the effects of cocaine on locomotion, 50-kHz ultrasonic vocalizations and phasic dopamine in the nucleus accumbens of rats. *Br J Pharmacol*, 179(8), 1565-1577. <https://doi.org/10.1111/bph.15658>
- Sanna, F., Bratzu, J., Serra, M. P., Leo, D., Quartu, M., Boi, M., Espinoza, S., Gainetdinov, R. R., Melis, M. R., & Argiolas, A. (2020). Altered Sexual Behavior in Dopamine Transporter (DAT) Knockout Male Rats: A Behavioral, Neurochemical and Intracerebral Microdialysis Study.

- Sanna, F., Poddighe, L., Serra, M. P., Boi, M., Bratzu, J., Sanna, F., Corda, M. G., Giorgi, O., Melis, M. R., & Argiolas, A. (2019). c-Fos, Δ FosB, BDNF, trkB and arc expression in the limbic system of male roman high-and low-avoidance rats that show differences in sexual behavior: effect of sexual activity. *Neuroscience*, 396, 1-23.
- Sanna, F., Porcu, P., & Fattore, L. (2020). Editorial: Sexual Behavior as a Model for the Study of Motivational Drive and Related Behaviors [Editorial]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.00121>
- Sanna, F., Serra, M. P., Boi, M., Bratzu, J., Poddighe, L., Sanna, F., Carta, A., Corda, M. G., Giorgi, O., Melis, M. R., Argiolas, A., & Quartu, M. (2022). Neuroplastic changes in c-Fos, Δ FosB, BDNF, trkB, and Arc expression in the hippocampus of male Roman rats: differential effects of sexual activity. *Hippocampus*, n/a(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hipo.23448>
- Saucier, D. M., Ehresman, C. A., Keller, A. J., Armstrong, E., Elderkin, A., & Yager, J. Y. (2008). Hypoxia ischemia affects ultrasonic vocalization in the neonatal rat. *Behav Brain Res*, 190(2), 243-247. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.025>
- Scardocho, T., & Clarke, P. B. (2013). Inhibition of 50-kHz ultrasonic vocalizations by dopamine receptor subtype-selective agonists and antagonists in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 226(3), 589-600. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2931-6>
- Scardocho, T., Trujillo-Pisanty, I., Conover, K., Shizgal, P., & Clarke, P. B. (2015). The Effects of Electrical and Optical Stimulation of Midbrain Dopaminergic Neurons on Rat 50-kHz Ultrasonic Vocalizations. *Front Behav Neurosci*, 9, 331. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00331>
- Scattoni, M. L., Michetti, C., & Ricceri, L. (2018). Rodent vocalization studies in animal models of the autism spectrum disorder. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 25, pp. 445-456). Elsevier.
- Schildein, S., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (2000). Injections of tacrine and scopolamine into the nucleus accumbens: opposing effects of immediate vs delayed posttrial treatment on memory of an open field. *Neurobiol Learn Mem*, 73(1), 21-30. <https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3915>
- Schreiber, R., Melon, C., & De Vry, J. (1998). The role of 5-HT receptor subtypes in the anxiolytic effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the rat ultrasonic vocalization test. *Psychopharmacology (Berl)*, 135(4), 383-391. <https://doi.org/10.1007/s002130050526>
- Seffer, D., Rippberger, H., Schwarting, R. K., & Wöhr, M. (2015). Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments-phenotypic rescue by re-socialization. *Front Behav Neurosci*, 9, 102. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00102> 10.3389/fnbeh.2015.00102. eCollection 2015.
- Segarra, A. C., Luine, V. N., & Strand, F. L. (1991). Sexual behavior of male rats is differentially affected by timing of perinatal ACTH administration. *Physiol Behav*, 50(4), 689-697. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90004-8)
- Seidisarouei, M., van Gorp, S., Pranic, N. M., Calabus, I. N., van Wingerden, M., & Kalenscher, T. (2021). Distinct Profiles of 50 kHz Vocalizations Differentiate Between Social Versus Non-social Reward Approach and Consumption. *Front Behav Neurosci*, 15, 693698. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.693698> 10.3389/fnbeh.2021.693698. eCollection 2021.
- Sewell, G. D. (1970). Ultrasonic communication in rodents. *Nature*, 227(5256), 410-410.

- Shahrier, M. A., & Wada, H. (2020). Effects of prenatal ethanol exposure on acoustic characteristics of play fighting-induced ultrasonic vocalizations in juvenile rats. *Neurotoxicology*, *79*, 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.03.016>
- Shair, H. N., Rupert, D. D., Rosko, L. M., Hofer, M. A., Myers, M. M., & Welch, M. G. (2015). Effects of maternal deprivation and the duration of reunion time on rat pup ultrasonic vocalization responses to isolation: possible implications for human infant studies. *Dev Psychobiol*, *57*(1), 63-72. <https://doi.org/10.1002/dev.21258>
- Shepherd, J. K., Blanchard, D. C., Weiss, S. M., Rodgers, R. J., & Blanchard, R. J. (1992). Morphine attenuates antipredator ultrasonic vocalizations in mixed-sex rat colonies. *Pharmacol Biochem Behav*, *41*(3), 551-558. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(92\)90372-m](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90372-m)
- Shimoju, R., & Shibata, H. (2021). Simultaneous antagonism of dopamine D1/D2/D3 receptor in the NAc reduces 50-kHz ultrasonic calls in response to rhythmic tactile stroking. *Behav Brain Res*, *405*, 113211. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113211>
- Shulman, L. M., & Spritzer, M. D. (2014). Changes in the sexual behavior and testosterone levels of male rats in response to daily interactions with estrus females. *Physiology & Behavior*, *133*, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.001>
- Silkstone, M., & Brudzynski, S. M. (2019). Intracerebral injection of R(-)-Apomorphine into the nucleus accumbens decreased carbachol-induced 22-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Brain Res*, *364*, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.044>
- Silkstone, M., & Brudzynski, S. M. (2020). Dissimilar interaction between dopaminergic and cholinergic systems in the initiation of emission of 50-kHz and 22-kHz vocalizations. *Pharmacol Biochem Behav*, *188*, 172815. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172815>
- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., & Swanson, L. W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, *294*(1), 76-95. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>
- Simola, N., Frau, L., Plumitallo, A., & Morelli, M. (2014). Direct and long-lasting effects elicited by repeated drug administration on 50-kHz ultrasonic vocalizations are regulated differently: implications for the study of the affective properties of drugs of abuse. *Int J Neuropsychopharmacol*, *17*(3), 429-441. <https://doi.org/10.1017/s1461145713001235>
- Simola, N., Ma, S. T., & Schallert, T. (2010). Influence of acute caffeine on 50-kHz ultrasonic vocalizations in male adult rats and relevance to caffeine-mediated psychopharmacological effects. *Int J Neuropsychopharmacol*, *13*(1), 123-132. <https://doi.org/10.1017/s1461145709990113>
- Singh, S., Nair, V., & Gupta, Y. K. (2012). Evaluation of the aphrodisiac activity of Tribulus terrestris Linn. in sexually sluggish male albino rats. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, *3*(1), 43-47. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.92512>
- Snoeren, E. M., Lehtimäki, J., & Agmo, A. (2012). Effect of dexmedetomidine on ejaculatory behavior and sexual motivation in intact male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *103*(2), 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.007> 10.1016/j.pbb.2012.09.007. Epub 2012 Sep 12.
- Succu, S., Sanna, F., Cocco, C., Melis, T., Boi, A., Ferri, G. L., Argiolas, A., & Melis, M. R. (2008). Oxytocin induces penile erection when injected into the ventral tegmental area of male rats: role of nitric oxide and cyclic GMP. *Eur J Neurosci*, *28*(4), 813-821. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06385.x> 10.1111/j.1460-9568.2008.06385.x. Epub 2008 Jul 30.

- Suresh, S., & Prakash, S. (2012). Effect of *Mucuna pruriens* (Linn.) on sexual behavior and sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Sex Med*, *9*(12), 3066-3078. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01831.x> 10.1111/j.1743-6109.2010.01831.x. Epub 2010 Apr 26.
- Swalve, N., Mulholland, M. M., & Li, M. (2019). Alterations of acoustic features of 50 kHz vocalizations by nicotine and phencyclidine in rats. *Behav Pharmacol*, *30*(5), 446-451. <https://doi.org/10.1097/fbp.0000000000000463>
- Taracha, E., Kaniuga, E., Chrapusta, S. J., Boguszewski, P. M., Lehner, M., Krząścik, P., & Płażnik, A. (2015). N-acetyl cysteine does not modify the sensitization of the rewarding effect of amphetamine as assessed with frequency-modulated 50-kHz vocalization in the rat. *Behav Brain Res*, *280*, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.005>
- Tesdaal, N. S., King, D. K., McDaniel, L. N., & Pieper, A. A. (2017). Altered ultrasonic vocalization in neonatal SAPAP3-deficient mice. *Neuroreport*, *28*(17), 1115-1118. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000863>
- Thakore, N., Reno, J. M., Gonzales, R. A., Schallert, T., Bell, R. L., Maddox, W. T., & Duvauchelle, C. L. (2016). Alcohol enhances unprovoked 22-28 kHz USVs and suppresses USV mean frequency in High Alcohol Drinking (HAD-1) male rats. *Behav Brain Res*, *302*, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.042>
- Tikhonova, M. A., Kulikov, A. V., Lebedeva, E. I., Barykina, N. N., Amstislavskaya, T. G., & Popova, N. K. (2005). On association between cortical 5-HT_{2A} receptors and behavior in rats with experimental thyroid disturbances. *Pharmacol Biochem Behav*, *82*(3), 506-514. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.10.005> 10.1016/j.pbb.2005.10.005. Epub 2005 Dec 2.
- Urakawa, S., Mitsushima, D., Shimozuru, M., Sakuma, Y., & Kondo, Y. (2014). An Enriched Rearing Environment Calms Adult Male Rat Sexual Activity: Implication for Distinct Serotonergic and Hormonal Responses to Females. *PLOS ONE*, *9*(2), e87911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087911>
- Vagell, M. E., & McGinnis, M. Y. (1998). The role of gonadal steroid receptor activation in the restoration of sociosexual behavior in adult male rats. *Horm Behav*, *33*(3), 163-179. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1998.1445>
- Van de Poll, N. E., & Van Dis, H. (1979). The effect of medial preoptic—anterior hypothalamic lesions on bisexual behavior of the male rat. *Brain research bulletin*, *4*(4), 505-511.
- Varga, J., Fodor, A., Klausz, B., & Zelena, D. (2015). Anxiogenic role of vasopressin during the early postnatal period: maternal separation-induced ultrasound vocalization in vasopressin-deficient Brattleboro rats. *Amino Acids*, *47*(11), 2409-2418. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2034-x>
- Verbitsky, A., Dopfel, D., & Zhang, N. (2020). Rodent models of post-traumatic stress disorder: behavioral assessment. *Transl Psychiatry*, *10*(1), 132. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0806-x>
- Vivian, J. A., Farrell, W. J., Sapperstein, S. B., & Miczek, K. A. (1994). Diazepam withdrawal: effects of diazepam and gepirone on acoustic startle-induced 22 kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)*, *114*(1), 101-108. <https://doi.org/10.1007/bf02245450>
- Vivian, J. A., & Miczek, K. A. (1991). Ultrasounds during morphine withdrawal in rats. *Psychopharmacology*, *104*(2), 187-193. <https://doi.org/10.1007/BF02244177>
- Vivian, J. A., & Miczek, K. A. (1993). Diazepam and gepirone selectively attenuate either 20-32 or 32-

- 64 kHz ultrasonic vocalizations during aggressive encounters. *Psychopharmacology (Berl)*, *112*(1), 66-73. <https://doi.org/10.1007/bf02247364>
- Vivian, J. A., & Miczek, K. A. (1993). Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats. *Psychopharmacology*, *111*(3), 367-375. <https://doi.org/10.1007/BF02244954>
- Waldinger, M. D., & Olivier, B. (2005). Animal models of premature and retarded ejaculation. *World Journal of Urology*, *23*(2), 115-118. <https://doi.org/10.1007/s00345-004-0493-x>
- Walker, C. D., Kudreikis, K., Sherrard, A., & Johnston, C. C. (2003). Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. *Brain Res Dev Brain Res*, *140*(2), 253-261. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00611-9](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00611-9)
- Wang, Y., Wan, B., Huang, J., & Clarke, P. B. S. (2020). Effects of nicotine, nornicotine and cotinine, alone or in combination, on locomotor activity and ultrasonic vocalization emission in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *237*(9), 2809-2822. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05574-0>
- Ward, I. L., & Reed, J. (1985). Prenatal stress and prepuberal social rearing conditions interact to determine sexual behavior in male rats. *Behav Neurosci*, *99*(2), 301-309. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.99.2.301>
- Warren, M. R., Spurrier, M. S., Roth, E. D., & Neunuebel, J. P. (2018). Sex differences in vocal communication of freely interacting adult mice depend upon behavioral context. *PLOS ONE*, *13*(9), e0204527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204527>
- Watson, D. J. G., King, M. V., Gyertyán, I., Kiss, B., Adham, N., & Fone, K. C. F. (2016). The dopamine D₃-preferring D₂/D₃ dopamine receptor partial agonist, cariprazine, reverses behavioural changes in a rat neurodevelopmental model for schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*, *26*(2), 208-224. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.020>
- Whitney, G. (1970). Ontogeny of sonic vocalizations of laboratory mice. *Behav Genet*, *1*(3), 269-273. <https://doi.org/10.1007/bf01074658>
- Wibowo, E., Garcia, A. C. B., & Mainwaring, J. M. (2020). Chronic sleep deprivation prolongs the reduction of sexual behaviour associated with daily sexual encounter in male rats. *Physiol Behav*, *224*, 113058. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113058>. Epub 2020 Jul 9.
- Willadsen, M., Best, L. M., Wöhr, M., & Clarke, P. B. S. (2018). Effects of anxiogenic drugs on the emission of 22- and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *235*(8), 2435-2445. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4942-4>
- Willey, A. R., & Spear, L. P. (2014). Effects of ethanol on social approach and 50 kHz ultrasonic vocalization production in adolescent male Sprague-Dawley rats. *Dev Psychobiol*, *56*(4), 857-863. <https://doi.org/10.1002/dev.21143>
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor signaling modulates cocaine induction of reward-associated ultrasonic vocalization in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, *332*(2), 463-468. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.158535>
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2016). Dopamine-sensitive signaling mediators modulate psychostimulant-induced ultrasonic vocalization behavior in rats. *Behav Brain Res*, *296*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.008>
- Wöhr, M. (2021). Measuring mania-like elevated mood through amphetamine-induced 50-kHz

ultrasonic vocalizations in rats. *Br J Pharmacol*. <https://doi.org/10.1111/bph.15487>

- Wöhr, M., Engelhardt, K. A., Seffer, D., Sungur, A., & Schwarting, R. K. (2017). Acoustic Communication in Rats: Effects of Social Experiences on Ultrasonic Vocalizations as Socio-affective Signals. *Curr Top Behav Neurosci*, *30*, 67-89. https://doi.org/10.1007/7854_2015_410
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2009). Ultrasonic communication in rats: effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacol Biochem Behav*, *94*(2), 285-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.09.008>
- Yamanaka, K., & Waki, H. (2022). Conditional Regulation of Blood Pressure in Response to Emotional Stimuli by the Central Nucleus of the Amygdala in Rats [Original Research]. *Frontiers in Physiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.820112>
- Yasuhara, F., Kempinas, W. G., & Pereira, O. C. (2005). Reproductive and sexual behavior changes in male rats exposed perinatally to picrotoxin. *Reprod Toxicol*, *19*(4), 541-546. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.08.006>
- Yee, N., Schwarting, R. K., Fuchs, E., & Wöhr, M. (2012). Juvenile stress potentiates aversive 22-kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats. *Stress*, *15*(5), 533-544. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.646348>
- Yells, D. P., Hendricks, S. E., & Prendergast, M. A. (1992). Lesions of the nucleus paragigantocellularis: effects on mating behavior in male rats. *Brain Research*, *596*(1-2), 73-79.
- Yu, P., Yang, M., Zhao, H., Cao, R., Chen, Z., & Gong, D. (2020). Characteristics of pup ultrasonic vocalizations and parental behavior responses in midday gerbils (*Meriones meridianus*). *Physiol Behav*, *224*, 113075. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113075>
- Zaytseva, A. S., Volodin, I. A., Ilchenko, O. G., & Volodina, E. V. (2019). Ultrasonic vocalization of pup and adult fat-tailed gerbils (*Pachyuromys duprasi*). *PLOS ONE*, *14*(7), e0219749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219749>
- Zaytseva, A. S., Volodin, I. A., Ilchenko, O. G., & Volodina, E. V. (2020). Audible calls and their ontogenetic relationship with ultrasonic vocalization in a rodent with a wide vocal range, the fat-tailed gerbil (*Pachyuromys duprasi*). *Behav Processes*, *180*, 104241. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104241>
- Zhang, Q. J., Yang, B. B., Yang, J., Wang, Y. M., Dai, Y. T., Song, N. H., Wang, Z. J., & Xia, J. D. (2020). Inhibitory Role of Gamma-Aminobutyric Receptors in Paraventricular Nucleus on Ejaculatory Responses in Rats. *J Sex Med*, *17*(4), 614-622. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2020.01.006>
- Zhang, X., Zhang, Z., Cheng, W., Mou, X., & Reynolds, G. P. (2007). The effect of chronic antipsychotic treatment on sexual behaviour, hormones and organ size in the male rat. *J Psychopharmacol*, *21*(4), 428-434. <https://doi.org/10.1177/0269881106068702>
- Zhang, X. R., Zhang, Z. J., Jenkins, T. A., Cheng, W. R., & Reynolds, G. P. (2011). The dose-dependent effect of chronic administration of haloperidol, risperidone, and quetiapine on sexual behavior in the male rat. *J Sex Med*, *8*(12), 3345-3353. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01740.x>
- Zhang-James, Y., Yang, L., Middleton, F. A., Yang, L., Patak, J., & Faraone, S. V. (2014). Autism-related behavioral phenotypes in an inbred rat substrain. *Behav Brain Res*, *269*, 103-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.035>

- Zimmerberg, B., & Germeyan, S. C. (2015). Effects of neonatal fluoxetine exposure on behavior across development in rats selectively bred for an infantile affective trait. *Dev Psychobiol*, 57(2), 141-152. <https://doi.org/10.1002/dev.21264>
- Zippelius, H.-M., & Schleidt, W. M. (1956). Ultraschall-laute bei jungen mäusen. *Naturwissenschaften*, 43(21), 502-502.

Opinia Komisji Etycznej

UCHWAŁA NR 520/2018

z dnia 13 lutego 2018 r.

I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt. **Badanie roli receptorów 5-HT1A i 5-HT7 w powstawaniu warunkowania do miejsca (CPP) skorelowanego z poejakulacyjną wokalizacją ultradźwiękową w paśmie 22-kHz z dnia 15.01.2018 r. złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, I Wydział Lekarski ul. Żwirki i Wigury 61,02-091 Warszawa zaplanowanego przez dr Michała Białego** lokalna komisja etyczna

WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH (A)**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **UMIARKOWANY**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków:
Szczury szczepu LE Samce w wieku 5-10 miesięcy 60 os.
Szczury szczepu LE Samice w wieku 5-10 miesięcy 20 os.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Michał Biały, Wiktor Bogacki-Rychlik**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie¹ **13.02.2018 –13.02.2019 r.**
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w:
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez
9. Doświadczenie nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej

¹ Nie dłużej niż 5 lat

I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Wydziale Biologii UW
ul. Jiji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 022 5541028, e-mail: ike.waw@iel.uw.edu.pl



§ 3

Uzasadnienie:

Kategoria dotkliwości procedury, uzasadnienie jej przeprowadzenia oraz liczebność grup doświadczalnych zostały określone prawidłowo. Członkowie Komisji nie zgłosili zastrzeżeń do procedury oraz czynności doświadczalnych opisanych w przedłożonym wniosku i uznali, że realizacja tego projektu badawczego jest dopuszczalna.

Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna do 13.02.2019 r.

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
d/s. Doświadczalnej Oceny Żywności
przy Wydziale Biologii UW
ul. ul. Miecznikowa 1, 02-25 Warszawa
tel. 021 2541028, e-mail: lok@biol.uw.edu.pl



§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpisy przewodniczącego komisji

.....

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Wydziale Biologii UW
ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 022 5541028, e-mail: lk1waw@biol.uw.edu.pl



Nenda

do 18.06.2018

UCHWAŁA NR 56/2015
z dnia 23 czerwca 2015r.

II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa.

§1

Na podstawie art.30 ust 1 pkt1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz.U.Nr 33, poz. 289) i §14 ust 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku pt. „Rola receptora dopaminowego D1 w patogenezie depresji u samców szczurów”.

z dnia 18. 05. 04. 2015r. złożonego

przez: **Dr Michała BIAŁEGO**
z : **Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej**
I WL, WUM
ul. Banacha 1B , 02-097 Warszawa

WYRAŻA ZGODĘ

~~**-ODMAWIA WYRAŻENIA ZGODY-**~~

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w §1, II Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

~~Badania naukowe na zwierzętach~~
~~Doświadczenia na zwierzętach w dydaktyce~~
~~Doświadczenia na tkankach, narządach odzwierzęcych~~

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur i nie przekracza wartości 3.....

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach :(gatunek, liczba zwierząt)

Gatunek (liczba zwierząt) :

Szczury 180.....

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez : (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej)

Imię i nazwisko wnioskodawcy: **Dr Michał BIAŁY**
Nazwa jednostki doświadczalnej: **Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej I WL WUM**
ul. Banacha 1B , 02-097 Warszawa

§3

Integralną częścią niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w §1.

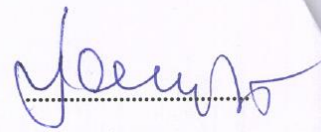
II LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
Ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy **Warszawskim Uniwersytecie Medycznym**
ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
tel. 022 5720-110, 5720-304, fax. 022 5720-169
Pieczęć II LKE
pok. 304

Przewodnicząca II Lokalnej Komisji Etycznej

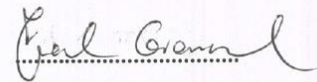
Dr hab. Ewa KUBLIK

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały. Odwołanie składa się za pomocą lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U Nr 153 poz.1275).

Maciej ONYSZKIEWICZ - Z-ca Przewodniczącego



Dr Jacek GRONCZEWSKI - członek



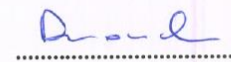
Dr hab. Robert STROSZNAJDER - członek



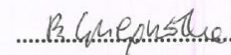
Dr Julita EL-JAI - członek



Dr Artur DZWONEK - członek



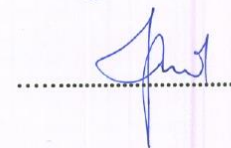
Dr Beata GRZEGRZÓŁKA - członek



Prof. dr hab. Mirosław SZUTOWSKI - członek



Dr Janina DROZD - członek



**UZASADNIENIE UCHWAŁY NR 56
z dnia 23 czerwca 2015r.**

**II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
w Warszawie, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa.**

Po rozpatrzeniu wniosku pt.

**„Rola receptora dopaminowego D1 w patogenezie depresji u samców
szczurów”.**

z dnia 18. 05. 04. 2015r. złożonego

przez: **Dr Michała BIAŁEGO**

z : **Zakładu Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej**

I WL, WUM

ul. Banacha 1B , 02-097 Warszawa

W związku z uwzględnieniem w całości postulatów zawartych
we wniosku nr 56/2015, na podstawie art. 107 par. 4 ustawy z dnia 14 czerwca
1960r. - Kodeks postępowania administracyjnego - z późniejszymi zmianami
(U. Dz. z 2000 r. Nr 98, poz. 1071) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia.
Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna
36 miesięcy.

**Przewodnicząca
II Lokalnej Komisji Etycznej**


Dr hab. Ewa KUBLIK

Pieczęć II LKE

II LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
Ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa
tel. 022 5720-110, 5720-304, fax. 022 5720-169
pok. 304

Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji

Warszawa 20.06.2022
(miejsowość, data)

dr hab. n. med. Tymoteusz Żera
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Biały, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J. & Żera, T. (2019). The sexual motivation of male rats as a tool in animal models of human health disorders. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 257.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

..... analiza piśmiennictwa, przygotowanie tabeli oraz poprawa manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako..10... %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik... w powstawanie publikacji określam jako..40... %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on:..... pisanie manuskryptu, analizę literatury, przygotowanie tabeli

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

NARZĄDZA 15.06.22
(miejsowość, data)

prof. dr hab. n. med. Jacek Przybylski
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Biały, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J., & Zera, T. (2019).
The sexual motivation of male rats as a tool in animal models of human health disorders. Frontiers in
Behavioral Neuroscience, 257.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
analizę piśmiennictwa, poprawki manuskryptu i zapewnienie finansowania.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik w powstawanie publikacji określam jako 40 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie manuskryptu, analizę literatury, przygotowanie tabeli

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

W-wr 20.06.2022
(miejscowość, data)

dr hab. n. med. Michał Biały
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Biały, M., Bogacki-Rychlik, W., Przybylski, J., & Zera, T. (2019).
The sexual motivation of male rats as a tool in animal models of human health disorders. Frontiers in
Behavioral Neuroscience, 257.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
pisanie manuskryptu, analizę literatury, nadzór nad wersją ostateczną

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 40... %.

Wkład lek.med Wiktora Bogackiego-Rychlik... w powstawanie publikacji określam jako 40... %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: pisanie manuskryptu, analizę literatury, przygotowanie tabeli.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Uz.p2012 21.06.2021
(miejsowość, data)

inż. Mateusz Rolf

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. Bogacki-Rychlik, W., Rolf, M., & Bialy, M. (2021).....
Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations and Sexual Motivation: Characteristic
Pattern of Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 15

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
analizę wyników w eksperymencie nr 2

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15 %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik w powstawanie publikacji określam jako 55 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych.....
przygotowanie manuskryptu, pisanie artykułu, redagowanie wersji ostatecznej

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Rolf Mateusz.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

W-wa 20.06.2022
(miejsowość, data)

dr hab. n. med. Michał Biały
.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ...Bogacki-Rychlik, W., Rolf, M., & Biały, M. (2021).....
Anticipatory 50-kHz Precontact Ultrasonic Vocalizations and Sexual Motivation: Characteristic
Pattern of Ultrasound Subtypes in an Individual Analyzed Profile. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 15

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

.....
koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych,.....
przygotowanie manuskryptu
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30..... %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik.. w powstawanie publikacji określam jako 55..... %,

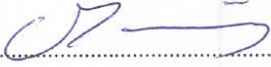
(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentów, analizę danych,.....
.....
przygotowanie manuskryptu, pisanie artykułu, redagowanie wersji ostatecznej

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

W-wca 20.06.22
(miejscowość, data)

mgr Anna Wrona
.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. A Bogacki-Rychlik, W., Wrona, A., & Bialy, M. (2022).
A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound Separation During the
Sociosexual Vocal-Non-contact Model in Rats. Frontiers in Behavioral Neuroscience.
.....

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

analiza danych, pisanie manuskryptu
.....
.....

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10.... %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik w powstawanie publikacji określam jako 60.... %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentu, analizę danych, pisanie
manuskryptu, redagowanie wersji ostatecznej
.....

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

A. Wrona
.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

W-wa 20.06.2022
(miejsowość, data)

dr hab. n. med. Michał Biały.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. A Bogacki-Rychlik, W., Wrona, A., & Biały, M. (2022).
A Protocol for the Non-invasive Method of Ultrasound Separation During the
Sociosexual Vocal-Non-contact Model in Rats. Frontiers in Behavioral Neuroscience.

oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i
opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentu, analizę danych, pisanie manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30.... %.

Wkład lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik w powstawanie publikacji określam jako 60.... %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on: koncepcję badawczą, przeprowadzenie eksperymentu, analizę danych, pisanie..
manuskryptu, redagowanie wersji ostatecznej

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr. lek. med. Wiktora Bogackiego-Rychlik

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników