



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales



Tesina de Grado

**“DIMORFISMO SEXUAL VASOPRESINÉRGICO:
ROL DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO
SEXUAL Y DE LAS HORMONAS GONADALES”**

Tesinista: Lihue Gonzalez

Firma:

Directora: Ximena Elizabeth Caeiro

Firma:



**Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba**

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y
Naturales



“DIMORFISMO SEXUAL VASOPRESINÉRGICO: ROL DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL Y DE LAS HORMONAS GONADALES”

Tribunal examinador

Dra. Nilda Anahí Franchi

Firma:

Dra. Noelia Soledad Vera

Firma:

Dra. Laura Marta Vivas

Firma:

Calificación:

Fecha:

AGRADECIMIENTOS

- A Laura Vivas por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y abrirme tantas puertas en este corto tiempo.
- A Ximena Caeiro, mi directora, por enseñarme y acompañarme en todo este proceso de aprendizaje, por siempre apoyarme y guiarme.
- A Flor Dadam que desde el primer día estuvo dispuesta a mostrarme y enseñarme todo lo que ella hacía, soportando que la persiga siempre y respondiendo mis mil preguntas.
- A Cintia Porcari y Andrea Godino, por acompañarme y estar siempre dispuestas a ayudarme.
- A toda mi familia, mi apoyo incondicional desde el primer momento, quienes siempre me empujaron para seguir adelante, festejaron mis logros y me levantaron cada vez que lo necesité.
- A Lucas y Agus, mis compañeros de laboratorio que hacen que todos los días sean súper divertidos.
- A todos mis amigos de la vida, de la facultad y de otros ámbitos por su compañía y apoyo constante.
- Al Instituto Ferreyra por permitirme finalizar mis estudios aquí.
- A la Universidad Nacional de Córdoba, por mi formación profesional.

<u>ÍNDICE</u>	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
Palabras claves.....	7
ANTECEDENTES	8
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	11
ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA	13
Modelo animal	13
Identificación de los animales transgénicos	14
Canulación de arteria carótida y vena yugular	16
Registro directo de presión arterial e infusión endovenosa	17
Análisis de la osmolaridad	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
Efecto de la administración del agonista V2R (desmopresina) sobre la osmolaridad urinaria (Objetivo N°1)	20
Efecto de la infusión continua de vasopresina sobre la respuesta dimórfica presora (Objetivo N°2).....	21
- Análisis de la presión arterial media.....	21
- Análisis de la presión arterial sistólica.....	22
- Análisis de la presión arterial diastólica.....	23
- Análisis de la presión diferencial	24
- Análisis del delta de la frecuencia cardíaca	25
DISCUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA.....	30

ABREVIATURAS

Ang II: angiotensina II

ACTH: Hormona adrenocorticotropa/corticotropina

AVP: vasopresina

CCS: complemento cromosómico sexual

CRH: Hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa

Hembras-XX: hembras (con ovarios) con CCS-XX.

Hembras-XY: hembras (con ovarios) con CCS-XY.

Machos-XY: machos (con testículos) con CCS-XY

Machos-XX: machos (con testículos) con CCS-XX.

PA: presión arterial

V2R: receptor vasopresinérgico tipo 2

DIMORFISMO SEXUAL VASOPRESINÉRGICO: ROL DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL Y DE LAS HORMONAS GONADALES

RESUMEN

Numerosos estudios experimentales y clínicos señalan un importante rol del sistema vasopresinérgico en la regulación de la presión arterial y homeostasis hidrosalina, las cuales muestran un claro dimorfismo sexual. Si bien es indiscutible el rol de los esteroides gonadales implicados en las diferencias entre machos y hembras, existen características dimórficas que no pueden ser explicadas por la acción de las hormonas esteroideas y, el perfil dimórfico cardiovascular e hidroelectrolítico no constituye una excepción. Surge entonces el interrogante: ¿puede el complemento cromosómico sexual (CCS) ejercer un efecto diferencial en los sistemas de control cardiovascular en machos y hembras?

Existe un importante número de estudios que indican diferencias sexuales en la respuesta presora y antidiurética a la administración de vasopresina. En base a evidencias propias y de otros autores, planteamos analizar el rol de los cromosomas sexuales (XX/XY) y/o su interacción con los efectos organizacionales de los esteroides gonadales en la respuesta sexual dimórfica antidiurética inducida por la estimulación del receptor vasopresinérgico 2 (V2R) y en la respuesta vasopresinérgica presora.

En primer lugar, analizamos el efecto de la administración del agonista de receptores vasopresinérgicos V2R (desmopresina) sobre la excreción renal (osmolaridad urinaria) y posteriormente evaluamos el efecto de la administración sistémica de vasopresina sobre la presión sanguínea arterial y frecuencia cardíaca. Para llevar a cabo los objetivos planteados se empleó la cepa de ratón transgénico de los cuatro genotipos que posibilita la valoración independiente de los factores: a) hormonal (gonadal, comparando machos y hembras), b) CCS (comparando Hembras-XY vs. Hembras-XX; y Machos-XY vs. Machos-XX ambos con el gen determinante de testículos "Sry" inserto en un autosoma), y c) la interacción entre los factores antes mencionados. De los estudios llevados a cabo en ratones transgénicos gonadectomizados, los cuales fueron administrados con el agonista del receptor vasopresinérgico V2 desmopresina (1mg/kg), reportamos diferencias en la osmolaridad urinaria de origen hormonal organizacional, siendo ésta mayor en machos que en hembras. Esto indica que en ausencia del factor hormonal activacional sería el factor hormonal organizacional el que estaría definiendo esta respuesta dimórfica y no el complemento cromosómico.

Por otra parte, los resultados del análisis de la respuesta presora inducida por la infusión sostenida de vasopresina (30 minutos, 0,01 UI/100 µl, volumen de infusión 100µl) demuestran un claro accionar del CCS sobre la respuesta dimórfica en estudio, reportándose

en animales XX gonadectomizados un incremento mayor en la presión arterial independientemente del factor hormonal organizacional. Los resultados obtenidos en el marco del presente proyecto nos permiten comprender en mayor detalle las bases fisiológicas del dimorfismo sexual vasopresinérgico implicado en la regulación de la osmolaridad urinaria y la presión sanguínea arterial.

Palabras claves: *Dimorfismo sexual, sistema vasopresinérgico, complemento cromosómico sexual, desmopresina, presión arterial.*

ANTECEDENTES

Un importante número de estudios indican diferencias entre machos y hembras en los sistemas neuroendocrinos de control de la presión arterial y la homeostasis hidrosalina. Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial en hombres y mujeres (OMS) lo cual señala la inmediata necesidad de identificar no sólo los mecanismos patofisiológicos implicados, sino también los factores responsables de tales diferencias para así luego poder asignar tratamientos terapéuticos específicos según el sexo.

Numerosas evidencias señalan el rol de las hormonas esteroideas en la regulación de la presión arterial. La presión arterial sistólica y diastólica media en mujeres premenopáusicas es menor que la de hombres de la misma edad, sin embargo, al alcanzar la menopausia la presión arterial aumenta rápidamente e iguala o excede a la de hombres de la misma franja etaria (Reckelhoff, J., 2001). En el mismo sentido, en diferentes modelos experimentales se han reportado diferencias entre machos y hembras respecto al desarrollo de la hipertensión y la progresión de enfermedades renales (Calhoun y cols., 1995; Reckelhoff y cols., 2000; Fischer y cols., 2002; Pendergrass y cols., 2008). La regulación de la presión arterial a largo plazo está vinculada con la función renal a través de los mecanismos de natriuresis de presión. En la patofisiología de la hipertensión, la capacidad de los riñones para mantener la homeostasis de sodio y agua se ve comprometida y el punto de ajuste para la curva de natriuresis por presión se ve desplazada hacia la derecha. La natriuresis por presión es además dependiente del sexo, sin embargo, los mecanismos que subyacen a tales diferencias sexuales aún no han sido completamente esclarecidas.

Estudios clínicos y experimentales señalan un importante rol de los sistemas angiotensinérgico y vasopresinérgico en la regulación de la presión arterial y homeostasis hidrosalina, la cual además muestra un claro dimorfismo sexual (Wang y cols., 1996; Huxley, 2007). A pesar del conocimiento de la existencia del perfil dimórfico sexual en la incidencia y progresión de las enfermedades cardiovasculares, a lo largo de la historia la mayor parte de los estudios clínicos y experimentales han sido llevados a cabo en machos, en el entendimiento que machos y hembras son similares entre sí, y difieren sólo en la magnitud de la respuesta (Huxley, 2007). Actualmente, sin embargo, se conoce que machos y hembras no necesariamente utilizan los mismos componentes y mecanismos para alcanzar la homeostasis.

¿Por qué son machos y hembras diferentes? Evidencias señalan un importante rol de las hormonas esteroideas gonadales en un sinnúmero de fenotipos sexualmente dimórficos. Clásicamente la acción de las hormonas sexuales ha sido clasificada en dos categorías: organizacional y activacional. Los efectos organizacionales son modificaciones permanentes relacionadas con el desarrollo, la maduración neuronal y sus circuitos, que se producen

durante un periodo crítico (periodo fetal-neonatal y puberal) mientras que los efectos activadores son transitorios y pueden ser revertidos si el estímulo hormonal varía o desaparece. Según la hipótesis clásica de diferenciación sexual, la organización de los circuitos cerebrales del tipo masculino es el resultado de la acción de los andrógenos segregados por el testículo durante el “periodo crítico” del desarrollo cerebral (efecto organizacional), mientras que la organización del cerebro femenino se produce en ausencia de las secreciones testiculares, cualquiera sea el sexo cromosómico (Carrer y cols., 2002; Wilson y Davies, 2007).

Si bien no se puede negar el rol indiscutible de los esteroides gonadales en el dimorfismo sexual, una serie de estudios indican que algunas características sexualmente dimórficas no pueden ser explicadas en su totalidad por la acción de las hormonas esteroideas gonadales, y el perfil dimórfico cardiovascular no constituye una excepción a este concepto (Liu y cols., 2010; Caeiro y cols., 2011). Machos y hembras no sólo difieren respecto a la presencia de testículos y ovarios (factor hormonal), sino que además sus células son portadoras de diferentes complementos cromosómicos (XY y XX respectivamente-factor genético).

En particular en lo que refiere a la participación del CCS en respuestas cardiovasculares sexualmente dimórficas, trabajos llevados a cabo por Liu y cols. (2010) demostraron que la infusión crónica de Ang II promueve un mayor incremento en la presión arterial en ratones con CCS XX que el reportado para ratones con CCS XY (independientemente del estatus gonadal -testículos u ovarios). Por otra parte estudios del laboratorio (Caeiro y cols., 2011 Dadam y cols., 2017) demostraron que, independientemente del sexo gonadal (machos o hembras), animales portadores del CCS XY presentan una respuesta bradicárdica barorrefleja atenuada y un aumento en la expresión del receptor angiotensinérgico AT1 (eje vasoconstrictor del sistema renina angiotensina) a nivel del área postrema, mientras que en ratones con CCS XX se evidencia una mayor expresión del gen del receptor Mas (eje vasodilatador) y una respuesta bradicárdica barorrefleja facilitada.

En lo que refiere al rol del CCS sobre la expresión de vasopresina, trabajos de Cox y cols (2005) han demostrado que ratones hembras con un solo cromosoma sexual X (Hembras X0) presentan mayores niveles de expresión de vasopresina a nivel de la amígdala que los reportados para Hembras-XX, Machos-XY y Machos-XXY, poniendo así en evidencia que el número de cromosomas sexuales X tiene una influencia directa sobre la expresión del gen de vasopresina en ésta área cerebral (Cox y cols. 2005). El sistema vasopresinérgico se encuentra implicado tanto en la regulación de la osmolaridad como de la presión sanguínea arterial. Vasopresina (AVP) es sintetizada en el hipotálamo (principalmente en los núcleos paraventricular y supraóptico). La vasopresina sintetizada en los grupos magnocelulares del núcleo paraventricular es liberada desde la neurohipófisis en tanto que aquella de origen parvocelular actúa como neurotransmisor en diferentes circuitos y también como co-

secretagogo de ACTH (hormona adrenocorticotropa, corticotropina) junto a CRH (hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa).

AVP actúa por medio de tres tipos de receptores acoplados a proteína G: V1aR, V1bR (V3) y V2R. El efecto periférico primario observado después de la interacción de AVP con los receptores V1aR (ubicados en el tejido vascular) es la vasoconstricción lo cual genera un incremento en el retorno venoso y gasto cardíaco; los receptores V1bR se ubican en la adenohipófisis y median el efecto secretagogo de ACTH; en tanto que los receptores V2R son los responsables de los efectos antidiuréticos y antinatriuréticos a nivel renal (Bankir y cols., 2005; Wilson y cols. 2013). Estos receptores se encuentran principalmente en las células del túbulo colector renal y al ser activados generan un aumento de la permeabilidad y reabsorción de agua a través de la acción de la acuaporina 2 (AQ2). Estas son parte de un grupo de proteínas integrales de membranas que permiten el paso diferencial de agua (acuaporinas clásicas), o agua y glicerol (acuagliceroporinas). Particularmente, la acuaporina 2 se encuentra en vesículas intracelulares que, ante el estímulo de AVP, son inducidas a la fusión con las membranas apicales de los túbulos distales y colectores renales (Wilson y cols., 2013). Además, vasopresina a través de sus V2R estimula la reabsorción de Na⁺ en el túbulo colector al incrementar la actividad de canales de sodio sensibles a amilorida (ENaC). Es así entonces, que la infusión del agonista sintético de V2R, 1-desamino-8-D-arginina vasopresina, farmacológicamente conocido como desmopresina, reduce la excreción de sodio en asociación con una disminución en el volumen urinario e incremento en la osmolaridad (Bankir y col., 2005).

Un importante número de estudios indican diferencias sexuales en la respuesta presora a la infusión de vasopresina, siendo la de los machos mayor a la de las hembras (Wang y cols., 1996). Asimismo, resultados en el campo experimental y en la clínica señalan claras diferencias sexuales en la respuesta antidiurética a desmopresina, las cuales no pueden ser explicadas desde el punto de vista farmacocinético. En humanos, ante el tratamiento con el agonista de receptor V2R se observa en mujeres una mayor reabsorción de agua (evidenciado por una mayor reducción en el volumen urinario de las mismas), lo cual se corresponde con una mayor sensibilidad a desmopresina cuando se lo compara con los hombres. Esta es la razón por la cual se ha descrito una estratificación por sexo en el tratamiento con desmopresina, siendo la dosis a emplear en hombres el doble de la indicada en mujeres. En consonancia con estas evidencias, estudios llevados a cabo en ratas intactas han demostrado que las hembras expresan a nivel renal mayores niveles de ARNm y proteína del receptor vasopresinérgico V2R, así como una osmolaridad urinaria mayor en respuesta a la administración de desmopresina cuando son comparadas con machos (Liu y cols., 2011).

Para el estudio del efecto modulador del CCS sobre la respuesta dimórfica sexual vasopresinérgica es indispensable destacar que el gen del receptor vasopresinérgico V2R (implicado en los efectos antidiuréticos de AVP) se localiza en el cromosoma sexual X. Se han descrito diferentes mutaciones a nivel del gen V2R del cromosoma X implicados en síndromes dentro de los cuales se encuentran la poliuria, polidipsia y síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada, en los cuales el fenotipo renal en los machos es más severo cuando se los compara con la sintomatología en las hembras (Migeon, 2008). Nuevos datos indican que la inactivación del cromosoma X está muy lejos de ser, como se pensaba en un comienzo, un fenómeno del "todo o nada". Esta teoría sostiene que uno de los cromosomas X en las células somáticas de mamíferos hembras es activamente transcrito mientras que el otro se encuentra completamente inactivo. Si bien en hembras la mayor parte de los genes en un cromosoma X son silenciados como resultado de la inactivación de un cromosoma X, algunos genes escapan a dicha inactivación y se expresan a partir de tanto el cromosoma X "activo" como del "inactivo" (Carrel y Willard, 2005; Yang y cols., 2006). Es así entonces, que las vías genéticas y/u hormonales podrían actuar independientemente o interactuar (sinérgica/antagónicamente) para así modular el desarrollo sexual dimórfico (Arnold y Chen., 2009).

Si bien existen evidencias que señalan: a) una respuesta vasopresinérgica presora exacerbada en machos vs hembras en condiciones normales, b) una respuesta dimórfica sexual a la administración de desmopresina, c) una mayor expresión de receptores V2R a nivel renal en ratas hembras intactas respecto a los machos y d) evidencias en fibroblastos humanos que sugieren que el gen V2R presenta altas probabilidades de escapar a la inactivación del cromosoma X (Carrel y Willard, 2005), no existen sin embargo a la fecha evidencias claras que demuestren el aporte diferencial de las hormonas sexuales gonadales y del complemento cromosómico sexual sobre el dimorfismo sexual vasopresinérgico antidiurético y presor.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En base a estudios propios y de otros autores nos proponemos como objetivo general contribuir al conocimiento de los mecanismos que determinan la diferenciación sexual en el sistema de regulación cardiovascular, analizando en particular de qué manera las diferencias genéticas asociadas a los cromosomas sexuales y a las hormonas gonadales (efectos organizacionales) modifican el sustrato morfológico y funcional que subyace a las respuestas dimórficas vasopresinérgicas antidiurética y presoras.

Planteamos como **hipótesis** que las diferencias entre machos y hembras en la respuesta vasopresinérgica dimórfica presora y anti-diurética serían atribuibles a la acción de los efectos organizacionales y/o del CCS.

Se detallan a continuación los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo N°1:** Analizar la participación del complemento cromosómico sexual y del factor hormonal organizacional en la osmolaridad urinaria luego de la administración del agonista del receptor V2R (desmopresina).
- **Objetivo N°2:** Evaluar la participación del complemento cromosómico sexual y del factor hormonal organizacional en la respuesta dimórfica presora inducida por la infusión continua de vasopresina.

ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Modelo animal

Para abordar los objetivos antes descriptos se empleó el modelo de ratón transgénico de los cuatro genotipos desarrollado por Burgoyne y cols. (1998), en el cual el gen determinante de testículos Sry (Sex determining Region of the Y chromosome) es heredado independientemente del cromosoma Y, y es incorporado en el cromosoma autosómico 3. La delección del gen Sry de ratones machos cromosómicos (XY-) resulta en un fenotipo femenino (con ovarios). Cuando el transgen Sry es insertado en el autosoma de estos ratones (XY-Sry), los animales desarrollan testículos y son fértiles. Es así entonces que el cruzamiento de ratones XY-Sry con hembras normales XX produce una progenie de 4 genotipos: hembras XX, hembras XY- (sin Sry en el cromosoma Y), machos XXSry y machos XY-Sry (ambos con el gen Sry en el cromosoma 3) (Figura 1A).

La comparación entre los 4 genotipos permite la valoración independiente de los efectos de los factores: a) hormonal, comparando machos versus hembras (es decir, animales con testículos versus animales con ovarios), b) CCS, comparando hembras XY- vs. XX y machos XY-Sry vs. XXSry, y c) la interacción de ambos factores (Figura 1B). Los machos XY-Sry y XXSry fueron designados como Machos-XY y Machos-XX, mientras que a las hembras XX y XY- se las denominó como Hembras-XX y Hembras-XY respectivamente. Para el análisis del efecto del CCS y los efectos organizacionales de los esteroides gonadales se emplearon ratones gonadectomizados de los cuatro genotipos, anulando así los efectos activacionales hormonales.

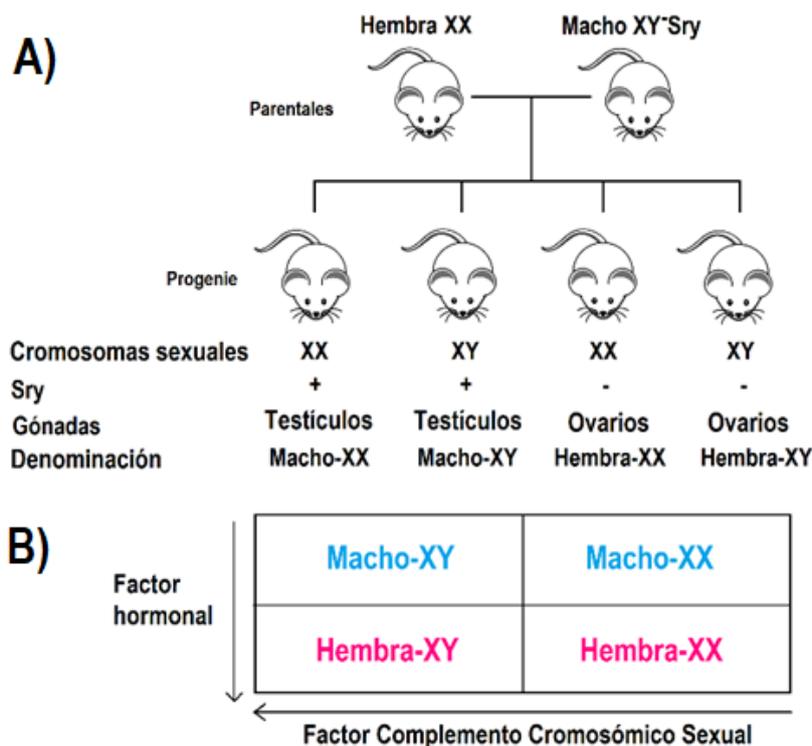


Figura 1. Modelo de ratón transgénico de los cuatro genotipos. **A)** Esquema del cruzamiento de los ratones en el que se detallan el complemento cromosómico sexual, la presencia/ausencia del gen Sry, el tipo de gónadas y la respectiva denominación de cada grupo. **B)** Esquema comparativo entre los cuatro genotipos, lo cual permite analizar en sentido vertical la influencia del factor hormonal o, en sentido horizontal, la del complemento cromosómico sexual.

Identificación de los animales transgénicos

La identificación del genotipo de los animales transgénicos se realizó a partir del análisis del ADN genómico obtenido de la cola del animal, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para la identificación diferencial de los genotipos.

1) Obtención y extracción de ADN: Los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina (4ul/g) (10 y 1 mg / kg i.p. respectivamente) para luego seccionarles con un bisturí, entre 0,5 y 1 cm de cola. Las secciones fueron incubadas a 55°C en tapón de digestión (Tris-HCL 100Mm, pH 8.0; EDTA 5mM, pH 8; SDS 0.2%; 0.5mg/ml proteinasa K 20mg/ml, Promega) durante 12-14 hs. A continuación, se centrifugaron las muestras y se recuperó el sobrenadante que luego fue incubado en isopropanol por 1min. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas y se recuperó el precipitado y se procedió a lavar con etanol 70%. Por último, las muestras se re-suspendieron y homogeneizaron en agua bidestilada estéril y se almacenaron a -20°C hasta realizar la PCR.

2) Reacción en cadena de la polimerasa: La genotipificación se realizó mediante la técnica de PCR con tres pares de oligonucleótidos o cebadores: un par que amplifica el gen Sry, uno para la región del cromosoma Y (Ssty) no presente en el cromosoma X y por último se amplificó parte del gen autosómico miogenina como control positivo de la amplificación (Myog). Las secuencias de oligonucleótidos se presentan en la Tabla 1. Las condiciones de ciclado fueron: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 72°C para finalmente concluir con 10 minutos a 72°C (Termocilcador Biometra).

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos

GEN	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'	Amplicon (pb)
Ssty (NC_000087.7)	CTGGAGCTCTACAGTGATGA	CAGTTACCAATCAACACATCAC	302
Myog (NC_000067.6)	TTACGTCCATCGTGGACAGCAT	TGGGCTGGGTGTTAGTCTTAT	245
Sry (NC_000087.7)	CTACACAGAGAGAAATACCCAAAC	GTCTTGCCTGTATGTGATGG	158

3) Electroforesis en gel de agarosa: Una vez finalizada la PCR, los productos de la misma fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X con bromuro de etidio (90 mV). Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se compararon con un marcador de fragmentos de ADN de tamaño conocido (Tabla 2). Para ejemplificar, en la figura número 2 se observan los resultados obtenidos para la genotipificación de una camada de ratones transgénicos.

Tabla 2. Identificación de ratones transgénicos

GEN	Macho-XY	Macho-XX	Hembra-XY	Hembra-XX	Amplicon (pb)
Ssty	X		X		302
Myo	X	X	X	X	245
Sry	X	X			158

Se muestran los productos de la PCR para cada genotipo (bandas denominadas como X): banda de 302-pb (Ssty), de 245-pb (Myog) y de 158-pb (Sry); Macho-XX: banda de 159-pb (Sry) y de 245-pb (Myog); hembra-XY: banda de 302-pb (Ssty) y de 245-pb (Myog); hembra-XX: banda de 245-pb (Myog).

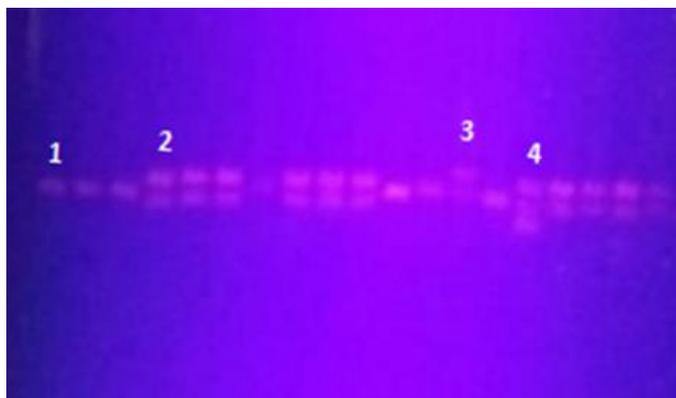


Figura 2. Gel de agarosa 1% en el cual se representan los productos de la reacción de la PCR. En cada carril se representa un animal, carril N°1 (hembra-XX), N°2 (Hembra-XY), N°3 (Macho-XX) y N°4 (Macho-XY).

Gonadectomía bilateral

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una solución de Ketamina/Xilacina (160 y 1 mg/kg respectivamente) y una vez transcurridos al menos 5-10

minutos se corroboró el grado de anestesia mediante la ausencia de diferentes reflejos entre los que se mencionan el ocular y el de punción en la cola.

Para llevar a cabo la orquiectomía, los machos fueron colocados en posición decúbito dorsal y se les rasuró la zona abdominal. Se seccionó la piel y tejidos subcutáneos en la zona abdominal inferior y se exteriorizaron ambos testículos. Posteriormente se ligaron los cordones vasculares y conducto deferente con hilo estéril, y se procedió a la remoción de los testículos. Finalmente se suturaron los tejidos subcutáneos y tegumentarios y se desinfectó la zona.

Para llevar a cabo la gonadectomía de las hembras, fueron rasuradas en la zona media superior y se las colocó en posición decúbito lateral. Se seccionó la piel y los tejidos subcutáneos y se exteriorizó el ovario. La arteria y vena ovárica fueron ligadas con hilo estéril, se removió el ovario y se procedió a la sutura de los tejidos. Dicho procedimiento en la hembra fue repetido en la región contralateral con el fin de extraer el ovario remanente.

Todos los animales fueron alojados luego en sus respectivas cajas de alojamiento hasta su recuperación.

Canulación de arteria carótida y vena yugular

Los animales fueron anestesiados con uretano (1,5 g/kg, 0,009ml/gr). Se colocó al animal en posición dorsal con las extremidades delanteras extendidas y sujetas para mejorar el campo visual de la zona quirúrgica. Se procedió a limpiar la zona ventral del cuello con ayuda de una tijera y se aplicó alcohol iodado. Se realizó un corte de aproximadamente 15mm de largo en la zona del cuello en dirección hacia la extremidad delantera derecha del animal. Una vez localizada la arteria carotídea y vena yugular, las mismas fueron divididas con ayuda de una pinza curva y recta (sin puntas filosas para evitar lesiones) para aislarlas del tejido muscular, adiposo y del nervio vago (en el caso de la arteria).

Para la canulación de la arteria carótida, una vez aislada de los tejidos de la región traqueal y del nervio vago, se colocaron por debajo de la misma 2 hilos, uno para cada extremo del vaso. Se aseguró con un nudo el hilo más distal y más próximo al operador, y se colocó un clamp en el extremo más interno. Se realizó un pequeño orificio en la pared de la arteria donde se introdujo el catéter (Catéter de Micro-Rethane MRE-025 de 9 mm acoplado a una cánula de Silastic, Dow Corning cat N° 508-002, 0,020 d. l. x 0,037 d.e) conectado a una jeringa conteniendo solución salina heparinizada (50 U/ml).

Una vez ubicada y aislada la vena, se dispusieron los 2 hilos al igual que con la arteria, y se colocó un clamp para interrumpir el flujo de sangre en el extremo más interno, es decir el extremo más alejado al operador, para proceder a ligar el extremo proximal. Se realizó luego con ayuda de una tijera oftalmológica un pequeño orificio por donde se introdujo la cánula (Catéter de Micro-Rethane MRE-025 de 5 mm acoplado a una cánula de Silastic, Dow

Corning cat N° 508-002, 0,020 d. l. x 0,037 d.e) conectada a una jeringa que contenía solución salina heparinizada (50 U/ml). En ambos casos, las cánulas fueron aseguradas en el lugar con los hilos como se observa en la figura número 3.

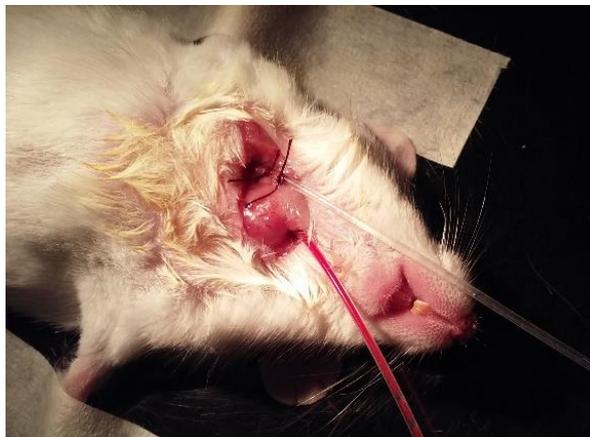


Figura 3. Ratón canalizado bajo anestesia. La cánula superior corresponde a la vena yugular, en tanto que la cánula inferior se encuentra inserta en la arteria carótida.

Registro directo de presión arterial e infusión endovenosa

Una vez finalizada la cirugía el catéter arterial fue conectado al transductor de presión sanguínea acoplado a un sistema de adquisición de datos (Power Lab, Ad Instruments) y el catéter venoso fue acoplado a una bomba calibrada (Braun) modificada para infusión de pequeños volúmenes. Se obtuvieron datos de presión arterial sistólica, diastólica y se calcularon los valores de presión arterial media, frecuencia cardíaca y presión de pulso. Los estudios se llevaron a cabo en ratones anestesiados entre las 9:00 am y las 4:00 pm.

Análisis de la osmolaridad

Luego de la recolección de la orina, las muestras fueron inmediatamente almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. La osmolaridad de cada muestra fue obtenida por duplicado o triplicado mediante la utilización del Osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520).

DISEÑO EXPERIMENTAL

-Experimento N°1 (Objetivo N°1): Efecto de la administración del agonista V2R (desmopresina) sobre la osmolaridad urinaria

Los ratones fueron gonadectomizados entre los 60-70 días de edad. Transcurridos 42 días post gonadectomía se procedió a la recolección de orina (muestras “pre-salina”) y una vez realizada la inyección de solución salina (solución vehículo de desmopresina) los animales

fueron alojados en jaulas metabólicas individuales sin acceso a agua ni comida. Transcurridas 4 horas se procedió a la recolección de orina (muestras “pos-salina”) y los animales fueron luego restituidos a sus jaulas de alojamiento. A las 24 horas y una vez tomada la muestra basal de orina (muestras “pre-desmopresina”), los animales fueron inyectados por vía subcutánea con el agonista desmopresina (1 mg/kg) y fueron alojados durante las 4 horas subsiguientes en jaulas metabólicas individuales. Transcurrido este período se tomaron las muestras de orina (“pos-desmopresina”) y los ratones fueron reincorporados a sus jaulas de alojamiento (Figura 5). Las muestras de orina fueron almacenadas a -20°C hasta determinar su osmolaridad. La recolección de orina post tratamiento con solución salina o desmopresina, se llevó a cabo empleando un multiwell de 96 pocillos el cual fue adaptado con paredes de poliestireno de alto impacto. (Figura 4).

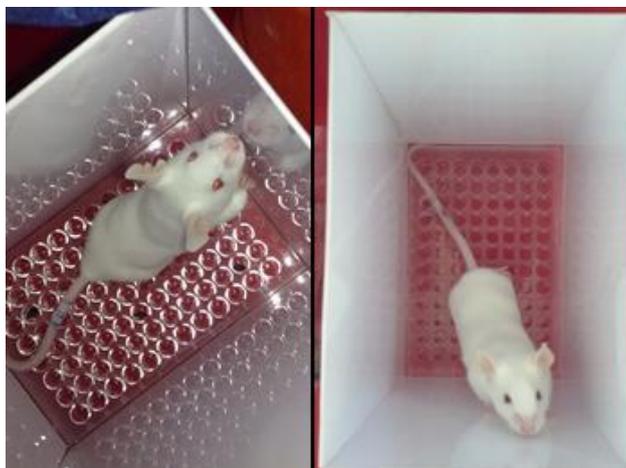


Figura 4. Dispositivo adaptado para la recolección de orina.

- Experimento N°2 (Objetivo N°2): Efecto de la infusión continua de vasopresina sobre la respuesta dimórfica presora

Transcurridos dos días de la administración del agonista V2R, desmopresina, el mismo grupo de animales fue anestesiado con uretano (1.5 g/kg) para luego poder evaluar y/o deslindar el efecto del complemento cromosómico sexual y los efectos organizacionales de los esteroides gonadales sobre la respuesta dimórfica presora a la administración intravenosa de vasopresina. Bajo anestesia y tal como consta en la sección materiales y métodos se procedió a canalizar la arteria carótida y vena yugular. Una vez estabilizados los registros de presión arterial se registraron los valores basales, así como también aquellos resultantes de la infusión continua de solución vehículo (salina, volumen de infusión 100 μl) y vasopresina (30 minutos, 0,2 UI/ml, volumen de infusión 100 μl). Se analizaron los cambios en la presión arterial, frecuencia cardíaca y presión diferencia luego de la infusión sostenida

de vasopresina a diferentes tiempos post infusión: 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. (Figura 5).

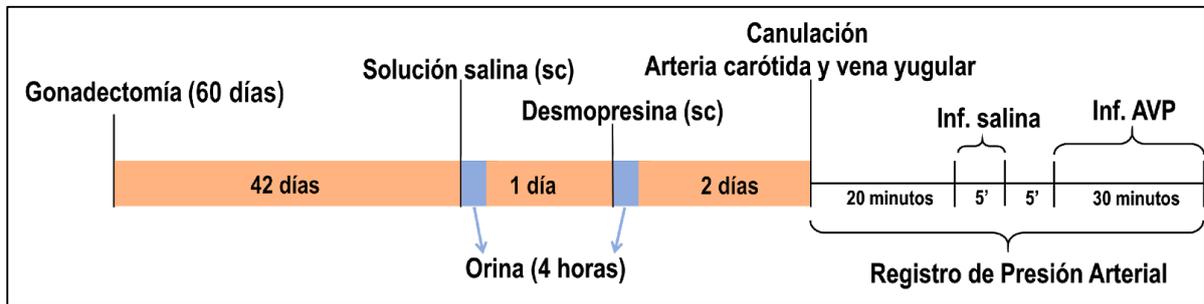


Figura 5. Diagrama del diseño experimental para los objetivos específicos 1 y 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos resultantes de cada diseño experimental fueron analizados empleando un análisis de la varianza (ANOVA) a dos vías considerando al efecto organizacional-sexo (Factor organizacional; Machos vs. Hembras) y al CCS (Factor complemento cromosómico sexual; XX vs. XY) como factores y se incluyeron en los análisis las medidas repetidas cuando correspondiese. Un nivel de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo y cuando las diferencias fueron reconocidas los datos fueron sometidos al test post-hoc LSD. Los resultados fueron expresados como Media (M) \pm Error Estándar (E.S).

RESULTADOS

Efecto de la administración del agonista V2R (desmopresina) sobre la osmolaridad urinaria (Objetivo N°1)

El análisis estadístico de la osmolaridad en el modelo de ratón de los cuatro genotipos mostró que existe un efecto del tratamiento {F (1,36) = 397,5 p=0,000} como así también de la interacción de los factores tratamiento y sexo {F (1,35) =5,0650 p=0,031} (Figura 6A). Tal como se muestra en la Figura 6B, la infusión del agonista desmopresina resultó en un aumento significativo en la osmolaridad, siendo esta mayor en machos respecto a las hembras (Machos-XX como los Machos-XY presentaron un mayor incremento en la osmolaridad cuando comparados con las hembras (XX y XY)).

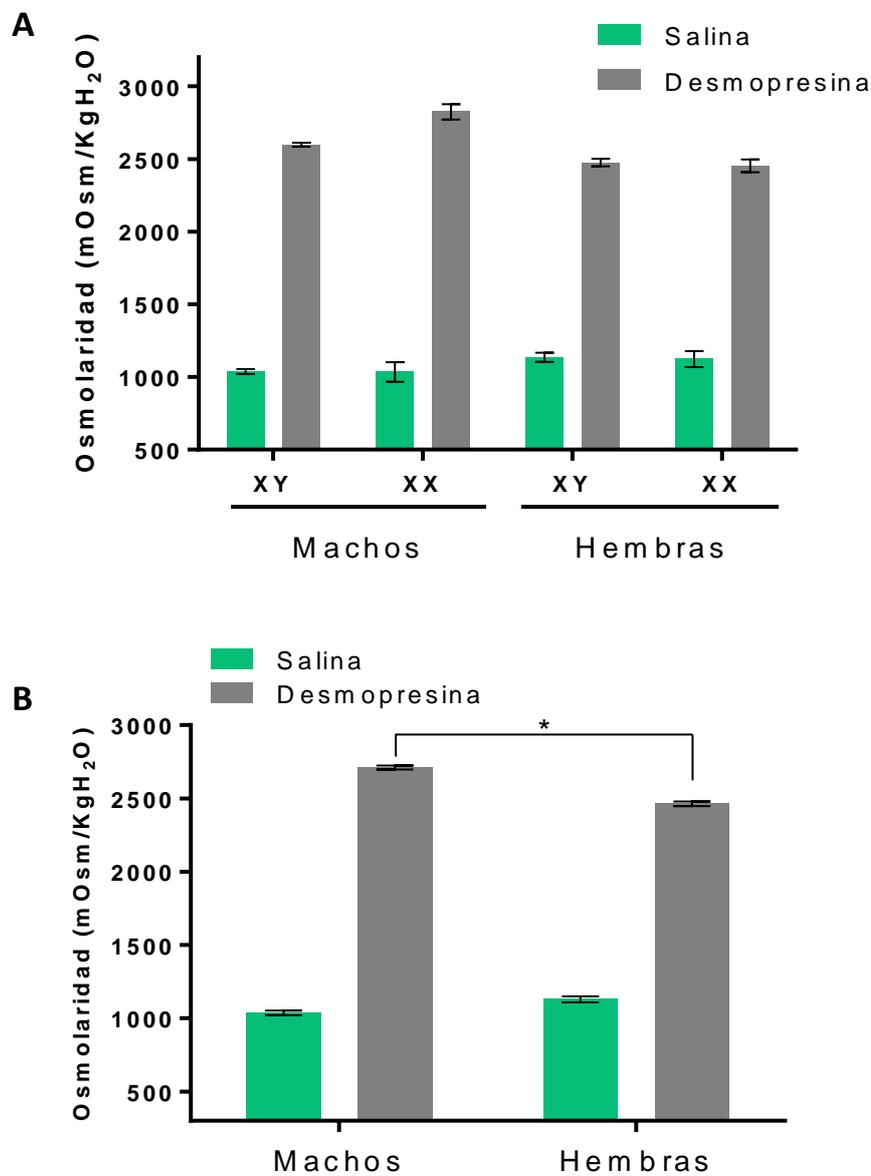


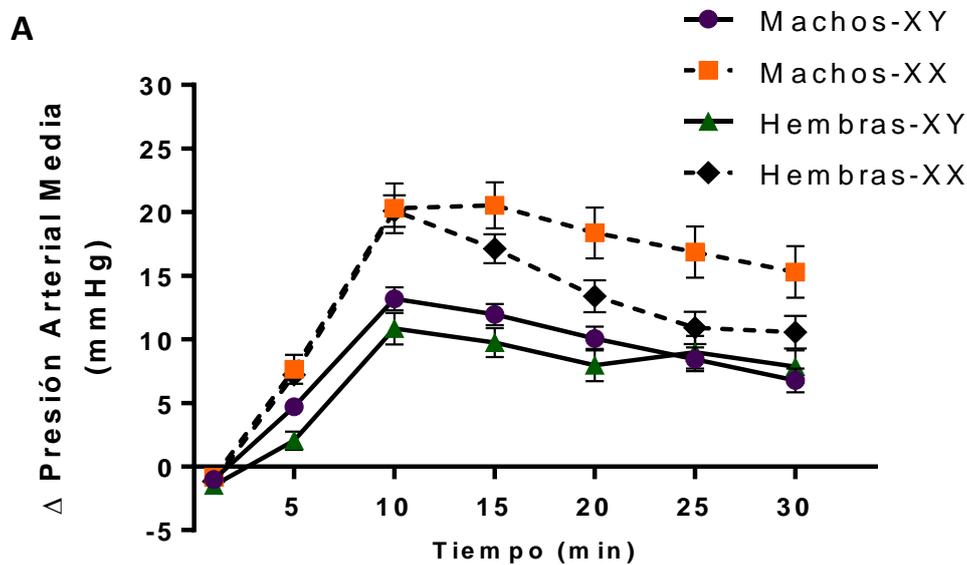
Figura 6. A) Osmolaridad urinaria luego de la infusión de solución salina (barras verdes) y desmopresina (barras grises) en ratones

Machos-XX, Machos-XY, Hembras-XX y Hembras-XY. n=5-18/grupo.
B) se representa la interacción de los factores tratamiento por fenotipo.
 Hembras incluye a Hembras-XX y Hembras-XY, mientras que Machos incluye a Machos-XX y Machos-XY *p<0,05.

Efecto de la infusión continua de vasopresina sobre la respuesta dimórfica presora (Objetivo N°2)

- Análisis de la presión arterial media

El análisis de la presión arterial media demostró un efecto significativo de los factores tiempo, complemento cromosómico y la interacción de ambos factores {F (6,120) =64,492, p<0,001}, {F (1,20) = 6,755, p<0,05} y {F (6,120) =3,4004, p<0,05} respectivamente. Tal como consta en la figura 7A se observó un aumento de la presión arterial media en todos los grupos, siendo este significativo a partir los 5 y 10 minutos de infusión (individuos XY y XX respectivamente). Asimismo, cabe señalar que los individuos XX presentaron independientemente de ser hembras o machos (hembras XX y machos XX) un incremento mayor en la presión arterial media cuando comparados con los individuos XY (hembras XY y machos XY) (Figura 7B).



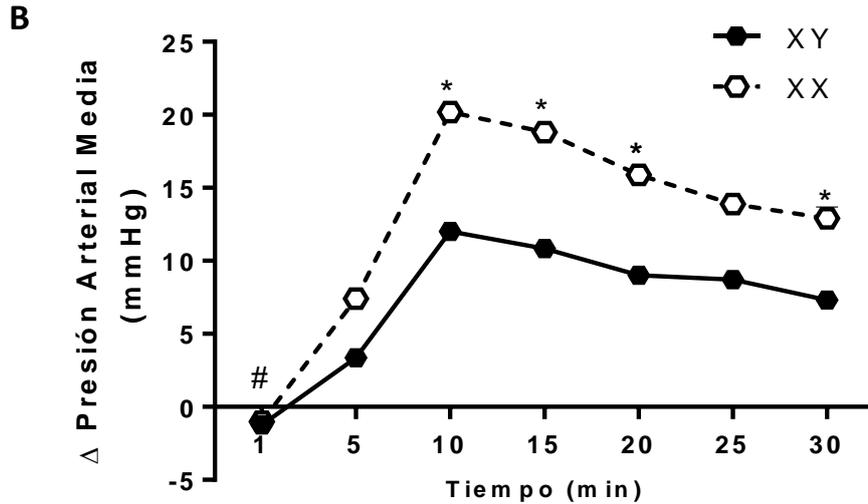


Figura 7. Curso temporal de la presión arterial media resultante de la infusión sostenida de vasopresina (0,2 UI/ml). **A)** Delta de la presión arterial media en ratones Machos-XX, Machos-XY, Hembras-XX y Hembras-XY. N= 4-8/grupo. **B)** Interacción de los factores tiempo y complemento cromosómico sexual; #p<0,05 diferencia significativa entre el minuto 1 y demás tiempos de infusión; *p<0,05 XX vs XY en los minutos 10, 15 y 20 post infusión.

- Análisis de la presión arterial sistólica

Del análisis estadístico de la presión arterial sistólica (Figura 8) se observó un efecto significativo de los factores tiempo y cromosoma sexual {F (1,20) =5,404, p<0,05} y {F (6,120) =36,587, p<0,0001} respectivamente. La infusión continua de vasopresina resultó en un incremento significativo en la presión arterial sistólica a partir de los 5 minutos y durante todo el registro (Figura 8B). Asimismo, independientemente del fenotipo gonadal los individuos XX presentaron un incremento mayor en la presión arterial sistólica en relación a los individuos XY

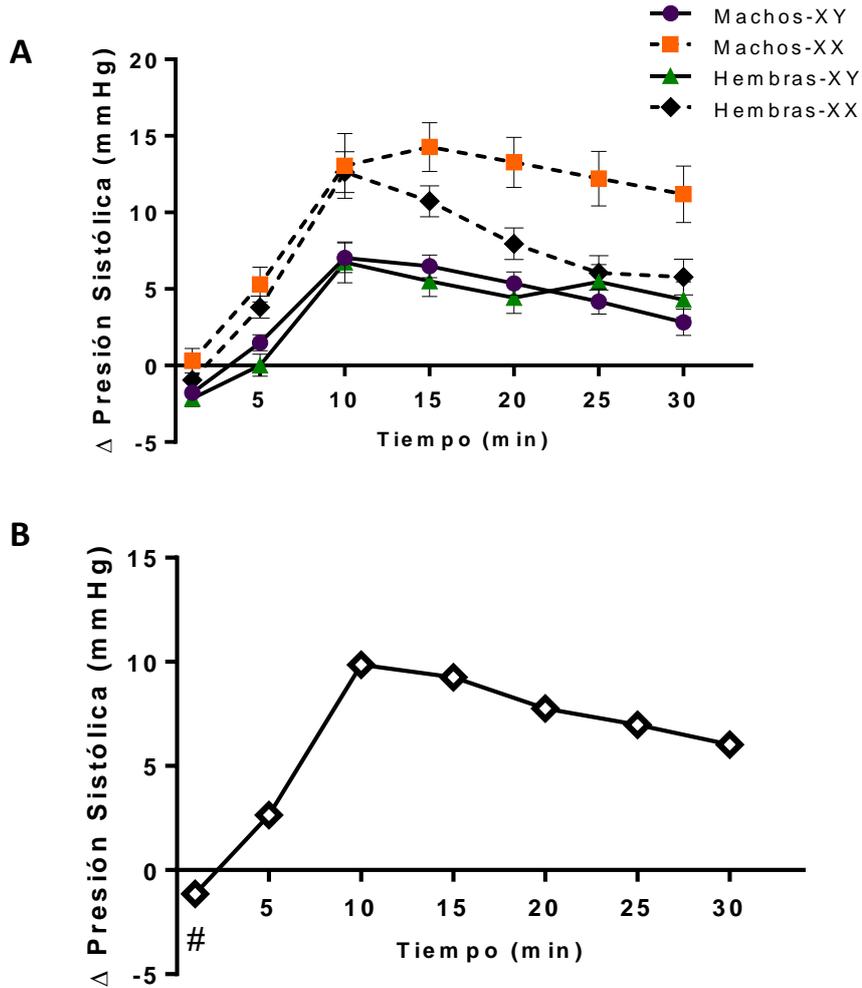


Figura 8. Curso temporal de la diferencia de presión arterial sistólica durante la administración sostenida de vasopresina (0,2 UI/ml). **A)** Diferencia de la presión arterial sistólica en ratones Machos-XX, Machos-XY, Hembras-XX y Hembras-XY. N=4-8/grupo. **B)** Representación del factor tiempo. #p<0,05 diferencia significativa en el minuto 1 vs los demás puntos temporales.

- Análisis de la presión arterial diastólica

El análisis estadístico de los datos de delta de presión arterial diastólica reveló un efecto de los factores tiempo y complemento cromosómico sexual {F (6,120) =67,615 p<0,0001} y {F (1,20) =6,026, p<0,05} respectivamente, siendo también significativa la interacción entre los mismos {F (6,120) =3,762, p<0,005}. La infusión continua de vasopresina resultó en un aumento sostenido de la presión arterial diastólica, la cual se mantuvo a lo largo de la infusión (Figura 9A). Además, tal como consta en la Figura 9B, independientemente del sexo

gonadal, machos XX y hembras XX mostraron un aumento mayor en la presión arterial diastólica cuando comparados con los individuos XY (hembras XY y machos XY).

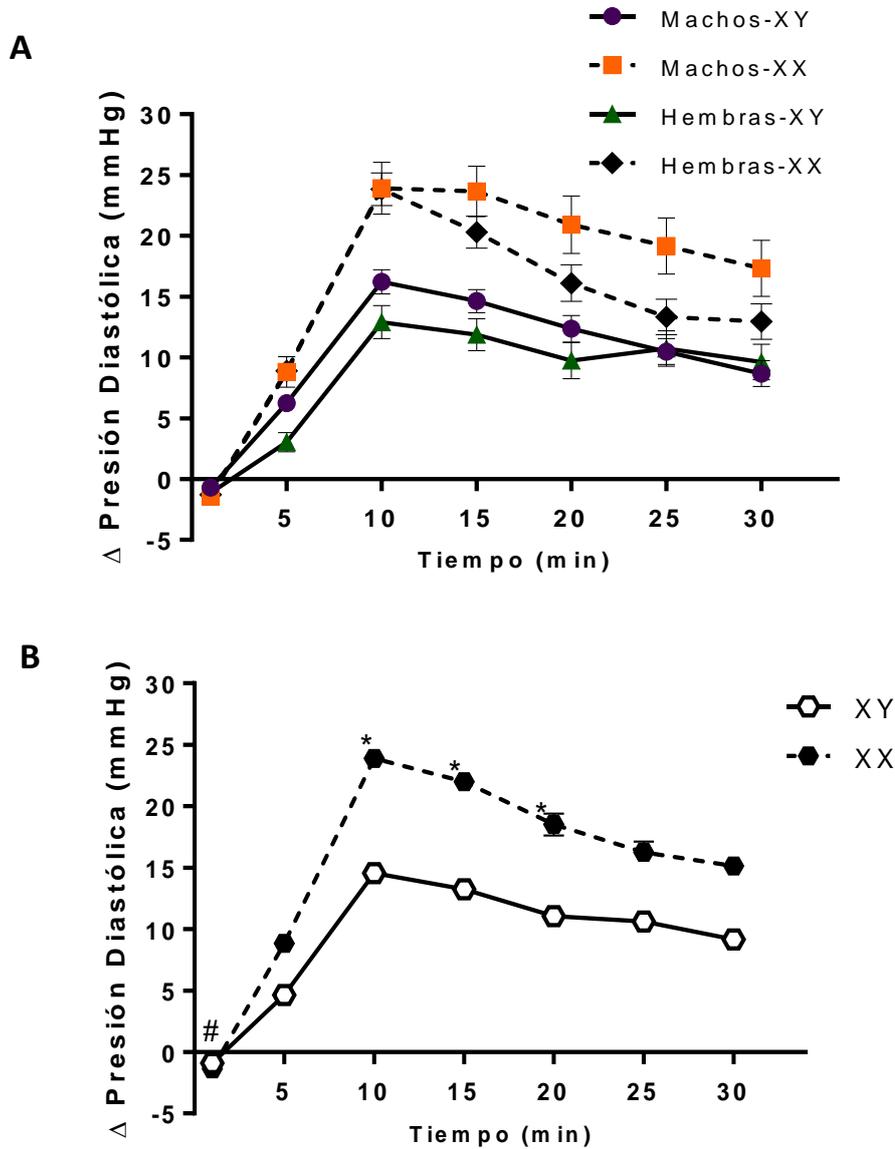


Figura 9. Curso temporal del delta de presión arterial diastólica durante la infusión sostenida de vasopresina (0,2 UI/ml). **A)** Diferencia de presión sanguínea diastólica en ratones Machos-XX, Machos-XY, Hembras-XX y Hembras-XY. N=4-8/grupo. **B)** Interacción significativa de los factores cromosoma y tiempo durante la administración de vasopresina. #p<0,05 diferencia significativa en el minuto 1 vs los demás puntos temporales. *p<0,05 diferencias significativas de los grupos XX vs grupos XY en cada punto temporal.

- Análisis de la presión diferencial

Al analizar la variable delta de presión diferencial se observó un efecto significativo de los factores tiempo y tiempo por cromosoma {F (6, 120) =30,496, p<0,0001} y {F (6,120) =2,325,

$p < 0,05$ }, poniéndose en evidencia una disminución en la variable en cuestión a partir de los 5 minutos de infusión y la cual se sostuvo a lo largo de la infusión (Figura 10).

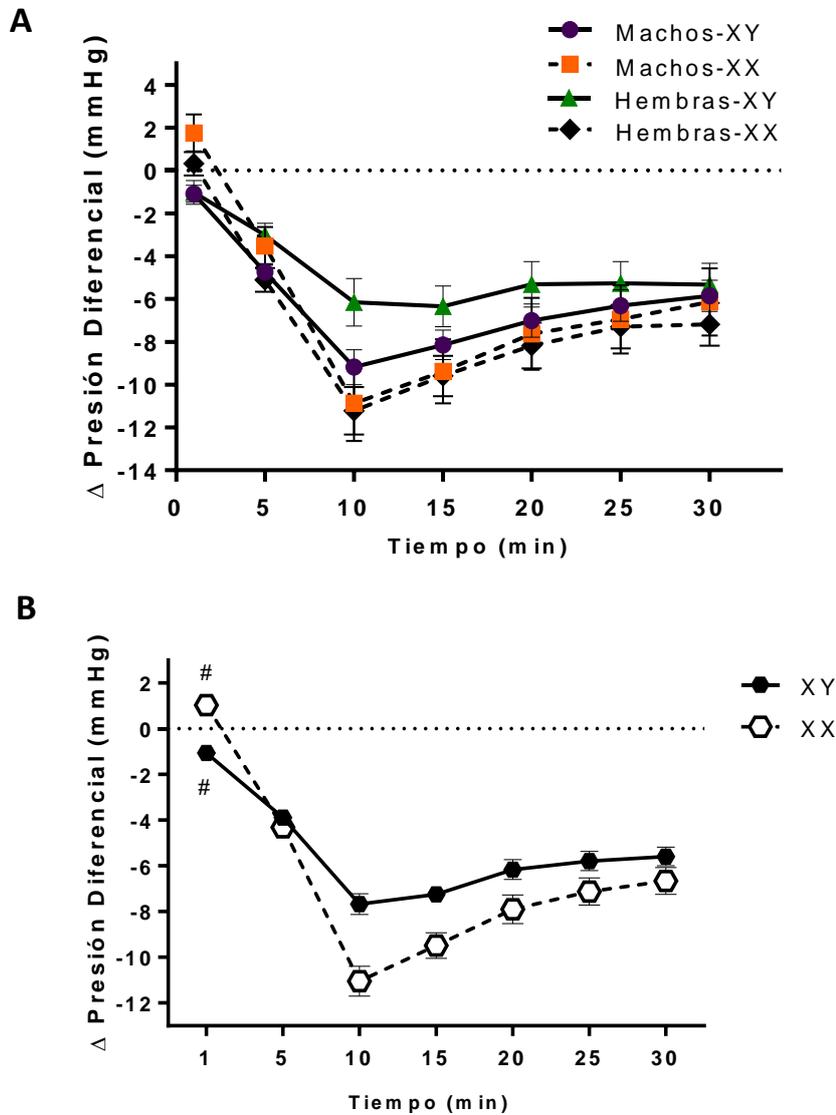


Figura 10. Curso temporal del delta de presión diferencial durante la administración sostenida de vasopresina (0,2 UI/ml). **A)** Delta de presión diferencial a través del tiempo en ratones Machos XX, Machos-XY, Hembras-XY y Hembras-XX. N=4-8/grupo **B)** Respuesta del delta de la presión diferencial en la interacción entre los factores tiempo y complemento cromosómico sexual. # $p < 0,05$ diferencia significativa respecto a los valores basales,

- Análisis del delta de la frecuencia cardíaca

El análisis estadístico del delta de la frecuencia cardíaca resultado de la infusión continua de vasopresina mostró un efecto significativo del tiempo de la infusión $\{F(6,120) = 25,275$

$p < 0,000$ }. Como era de esperar se observó una respuesta bradicárdica sostenida en respuesta a la acción presora de vasopresina (Figura 11).

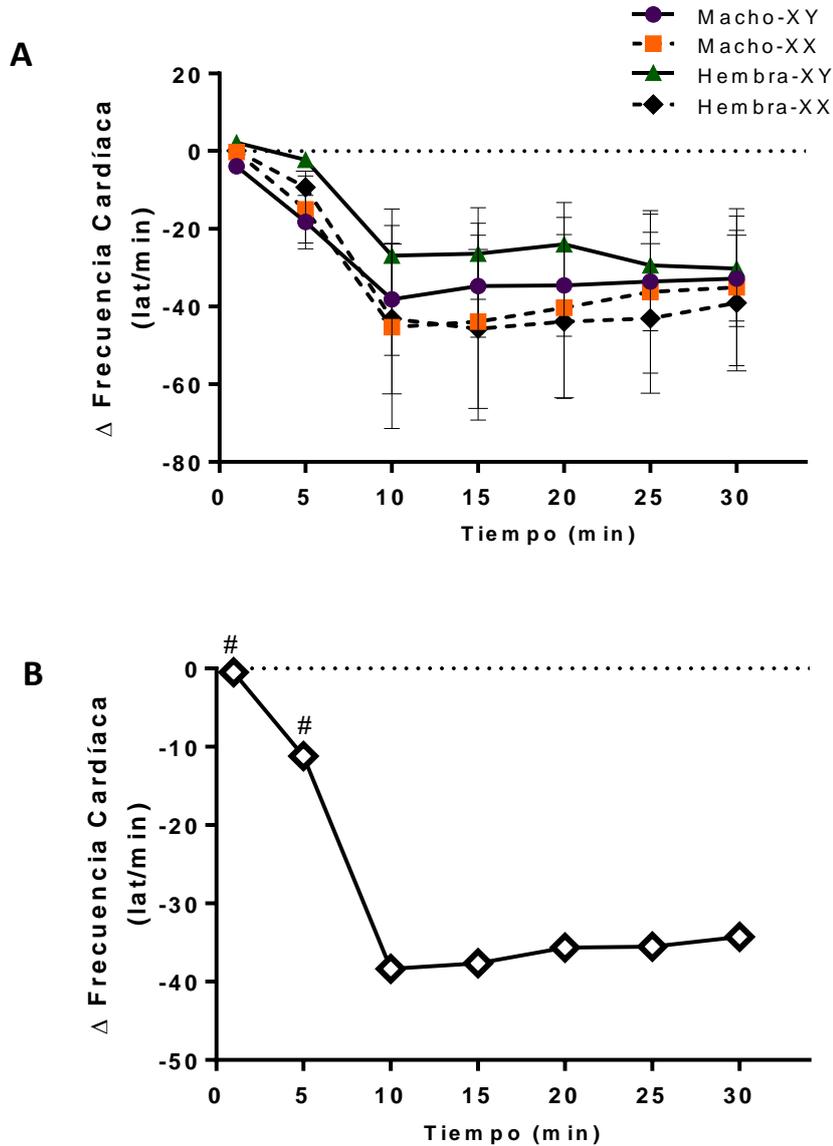


Figura 11. Curso temporal de la diferencia de la frecuencia cardíaca durante la infusión sostenida de vasopresina (0,2 UI/ml) en ratones machos-XY, machos-XX, hembras-XY y hembras-XX. N=4-8/grupo (Figura A). En la Figura B se representa el factor tiempo. # $p < 0,05$ diferencia significativa de los minutos 1 y 5 de la infusión con respecto a los siguientes puntos temporales.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten comprender en mayor detalle las bases fisiológicas del dimorfismo sexual vasopresinérgico implicado en la regulación de la osmolaridad urinaria y la presión sanguínea arterial.

Antecedentes previos indican que las hembras intactas (sin castrar) presentan una respuesta más acentuada que los machos a la administración del agonista de los receptores V2 desmopresina. Ante la administración aguda de ésta, las hembras intactas muestran una mayor osmolaridad urinaria que los machos (Liu y cols., 2011), lo cual guarda estrecha relación al hecho que en la clínica se utilicen dosis más bajas en mujeres respecto a los hombres para arribar a la misma respuesta fisiológica. En coincidencia con los resultados previamente citados evidencias en ratas intactas ha descripto mayores niveles basales de ARNm y proteína del receptor V2R en hembras que en machos. Durante un largo tiempo se ha postulado que estas diferencias sexuales serían atribuibles al escape de la inactivación del cromosoma X por parte del gen que codifica el receptor V2R (Carrel y Willard, 2005). Si esta hipótesis fuese correcta y el dimorfismo en la osmolaridad urinaria fuera debido a los efectos diferenciales del complemento cromosómico sexual, los individuos XX deberían presentar mayores niveles de expresión de los receptores V2R pudiendo además asociarse a una respuesta más acentuada ante la administración del agonista del receptor; es decir que nuestros resultados deberían haber mostrado, independientemente de ser machos u hembras, una diferencia significativa entre los ratones XX (Hembras-XX y Machos-XX) versus los ratones XY (Machos-XY y Hembras-XY).

A diferencia del trabajo de Liu y cols. (2011) en el cual los experimentos fueron llevados a cabo en animales intactos (es decir bajo los efectos combinados del CCS, y los efectos hormonales tanto organizacionales como activacionales), en nuestro trabajo se emplearon ratones gonadectomizados del modelo de los cuatro genotipos, eliminando por completo el factor hormonal activacional, lo cual permitió diferenciar la participación del CCS y hormonal organizacional en la respuesta dimórfica en estudio. Cabe señalar que si bien en el presente trabajo no encontramos (tal como fuera descripto por Liu y cols.) una mayor osmolaridad urinaria ante la administración de desmopresina en hembras vs machos si reportamos una respuesta dimórfica de origen hormonal organizacional, siendo esta mayor en machos vs hembras independientemente del CCS.

Estos datos en conjunto con las evidencias aportadas por Liu y cols., podrían sugerir que estradiol y testosterona (ejerciendo su efecto activador) en conjunción con los factores hormonales organizacionales y del complemento cromosómico sexual, serían capaces de desencadenar un efecto exacerbado en hembras versus machos, en tanto que en ausencia del factor hormonal activacional sería el factor hormonal organizacional el que estaría definiendo esta respuesta dimórfica y no el complemento cromosómico como se venía

postulando en la literatura. A los fines de dilucidar si en nuestro modelo en estudio los efectos activacionales son capaces de revertir y contrarrestar los efectos organizacionales aquí descriptos, en un futuro próximo evaluaremos la respuesta homeostática a la administración de desmopresina en animales gonadectomizados de los cuatro genotipos, pero con reemplazo hormonal de β -estradiol y testosterona. Además, se corroborará si las diferencias descriptas en la respuesta dimórfica a la administración de desmopresina son consecuencia de una expresión diferencial del receptor V2 a nivel renal y, en tal caso, si el CCS, los efectos hormonales activacionales y/u organizacionales, o su interacción, son capaces de inducir una expresión diferencial del gen.

El sistema vasopresinérgico, responsable de la regulación de la osmolaridad, también está implicado en la regulación de la presión arterial por su efecto vasoconstrictor mediado por la unión de AVP a los receptores V1aR. Tal como esperábamos, todos los grupos de animales mostraron un aumento en la presión arterial media, sistólica y diastólica ante la administración sostenida de vasopresina. Asimismo, al analizar los cambios en la frecuencia cardíaca observamos la esperada disminución en esta variable luego de 10 minutos de administración de AVP. Esto puede ser explicado por el hecho de que la vasoconstricción inducida por la unión de AVP con sus receptores V1aR, genera inicialmente un aumento en resistencia periférica y en el retorno venoso (generando este último un aumento en el gasto cardíaco) lo cual conduce al aumento en la presión arterial. En respuesta a ello se desencadena una respuesta bradicárdica compensatoria evidenciada por una disminución en la frecuencia cardíaca y la consiguiente disminución en el gasto cardíaco, intentando así contrarrestar los efectos presores inducidos por vasopresina y llevar a niveles normales de presión arterial.

Si bien todos los genotipos mostraron un incremento en la presión arterial ante la infusión sostenida de AVP, los resultados del análisis de la respuesta presora demostraron que tanto los Machos-XX como las Hembras-XX presentan un mayor aumento de la presión sanguínea arterial media con respecto a los Machos-XY y Hembras-XY. Estos estudios guardan relación con estudios previos que demostraron que la infusión crónica de Ang II en animales gonadectomizados promueve un mayor incremento en la presión arterial en ratones con CCS XX que el reportado para ratones con CCS XY (Liu y cols., 2010). Estos datos en conjunto ponen en evidencia que en ausencia de los efectos hormonales activacionales existe un claro accionar del CCS sobre la respuesta dimórfica vasopresinérgica y angiotensinérgica presora, independientemente del factor hormonal organizacional.

Los resultados de nuestro trabajo permiten contribuir al conocimiento de los factores hormonales y genéticos que subyacen el dimorfismo sexual del sistema vasopresinérgico en cuanto a la regulación de la respuesta presora y la osmolaridad. Machos y hembras no necesariamente utilizan los mismos componentes y mecanismos para alcanzar la

homeostasis. A sabiendas de que existen estas diferencias, el esclarecimiento de estas y de las similitudes entre los sexos, permitirá en un futuro el diseño de adecuados instrumentos de diagnóstico, el reconocimiento de la fisiopatología específica y la consiguiente aplicación de tratamientos adecuados de las enfermedades cardiovasculares según el sexo.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, A. P., & Chen, X. (2009). What does the “four core genotypes” mouse model tell us about sex differences in the brain and other tissues? *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(1), 1-9.

- Bankir, L., Fernandes, S., Bardoux, P., Bouby, N., & Bichet, D. G. (2005). Vasopressin-V2 receptor stimulation reduces sodium excretion in healthy humans. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(7), 1920-1928.

- Caeiro XE, Mir FR, Vivas LM, Carrer HF, Cambiasso MJ. (2011). Sex chromosome complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response. *Hypertension*; 58:505-511.

- Calhoun, D. A., Zhu, S. T., Chen, Y. F., & Oparil, S. (1995). Gender and dietary NaCl in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, 26(2), 285-289.

- Carrer, H. F., & Cambiasso, M. J. (2002). Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cellular and molecular neurobiology*, 22(5-6), 479-500.

- Carrel, L., & Willard, H. F. (2005). X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434(7031), 400-404.

- Cox, K. H., Quinlivan, K. M., Eschendoeder, A., Didrick, P. M., Eugster, E. A., & Rissman, E. F. (2015). Number of X-chromosome genes influences social behavior and vasopressin gene expression in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 271-281.

- Dadam, F. M., Cisternas, C. D., Macchione, A. F., Godino, A., Antunes-Rodrigues, J., Cambiasso, M. J., & Caeiro, X. E. (2017). Sex chromosome complement involvement in angiotensin receptor sexual dimorphism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 447, 98-105.

- Fischer, M., Baessler, A., & Schunkert, H. (2002). Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*, 53(3), 672-677.

- Fushimi N, Sasaki S, Marumo F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 1997; 272: 14800-14804.

- Huxley, V. H. (2007). Sex and the cardiovascular system: the intriguing tale of how women and men regulate cardiovascular function differently. *Advances in physiology education*, 31(1), 17-22.

- Liu, J., Sharma, N., Zheng, W., Ji, H., Tam, H., Wu, X., ... & Verbalis, J. G. (2011). Sex differences in vasopressin V₂ receptor expression and vasopressin-induced antidiuresis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 300(2), F433-F440.

- Mahadevaiah, S. K., Odorisio, T., Elliott, D. J., Rattigan, Á., Szot, M., Laval, S. H., ... & Burgoyne, P. S. (1998). Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 7(4), 715-727.

- Migeon, B. R. (2008). X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(11), 2052-2059.

- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 1013-1017.

- Nielsen S, Froklaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 2002; 82: 205-244.

- Pendergrass, K. D., Pirro, N. T., Westwood, B. M., Ferrario, C. M., Brosnihan, K. B., & Chappell, M. C. (2008). Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen. Lewis but not normotensive Lewis rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 295(1), H10-H20.

- Reckelhoff, J. F. (2001). Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*, 37:1199-1208

- Reckelhoff, J. F., Zhang, H., & Srivastava, K. (2000). Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 35(1), 480-483.

- Wang YXJ, Crofton JT, Bealer SL, Share L. (1996). Gender difference in regional hemodynamics contributes to sex difference in the pressor response to vasopressin (AVP). *FASEB Journal* 10(3):83-83 .

- Wilson, C. A., & Davies, D. C. (2007). The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction*, 133(2), 331-359.

- Wilson, J. L., Miranda, C. A., & Knepper, M. A. (2013). Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clinical and experimental nephrology*, 17(6), 751-764.

- Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A. P., Ingram-Drake, L., & Lusis, A. J. (2006). Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome research*, 16(8), 995-1004