

Mecanismos neurais da aldosterona no controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico

Central nervous system and aldosterone: Role on cardiovascular control and hydro-electrolytic homeostasis

Silmara Formenti¹, Guus Hermanus Maria Schoorlemmer¹, Thiago Santos Moreira^{1,2}, Eduardo Colombari^{1,2}

Resumo

A aldosterona é o mais importante mineralocorticoide circulante. É secretada pela zona glomerulosa da glândula adrenal e atua em órgãos-alvo tais como os rins, cólon, glândulas salivares e sudoríparas por meio de mecanismos genômicos, a fim de manter o equilíbrio hidroeletrolítico do organismo. Mais recentemente vêm surgindo novas descobertas sobre as ações da aldosterona, as quais não se mostram restritas aos alvos clássicos de sua ação. Órgãos como coração, vasos e muitos locais do sistema nervoso central (SNC), são apontados como novos alvos da ação da aldosterona, mostrando efeitos fisiológicos bem como fisiopatológicos, que na maioria das vezes relacionam-se a mecanismos não-genômicos. Os principais efeitos da aldosterona nesses novos alvos incluem: estimulação do apetite ao sódio (Na^+), aumento da pressão arterial basal, prejuízo do barorreflexo arterial e produção de hipertrofia e fibrose no tecido cardíaco. Esses novos achados enaltecem o papel da aldosterona como o hormônio-chave no controle cardiovascular. No entanto, os mecanismos envolvidos na produção desses efeitos permanecem desconhecidos e novos estudos são necessários para o seu completo entendimento. O principal objetivo desta revisão será resumir diversos estudos que indicam o envolvimento da aldosterona nos mecanismos de controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico do organismo.

Unitermos: Aldosterona; 11 beta-hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2); barorreflexo; pressão arterial; apetite ao Na^+ .

Abstract

Aldosterone is the most important circulating mineralocorticoid. It is secreted by the zona glomerulosa of the adrenal gland and acts on target tissues such as the kidney, colon, salivary and sweat glands by genomic mechanisms to maintain water and salt balance. More recently it has become clear that aldosterone also acts on tissues not directly involved in regulation of water and salt balance. Tissues like the heart, the vascular wall, and the central nervous system (CNS) are targets for aldosterone, which exerts its physiologic and pathophysiologic effects through both genomic and non-genomic mechanisms. The effects of aldosterone on these non-classical targets include sodium appetite, hypertension, impaired baroreceptor reflex, and cardiac hypertrophy and fibrosis. These findings reinforce the importance of aldosterone as a key cardiovascular hormone. The mechanisms that mediate these non-classical effects remain a subject of intense study. This paper reviews the involvement of aldosterone in neural mechanisms that control the cardiovascular system and water and salt balance.

Keywords: Aldosterone; 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD2); baroreflex; blood pressure; sodium appetite.

Recebido: 20/09/2007

Aprovado sem modificação: 02/04/2008

¹ Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), São Paulo (SP), Brasil

² Disciplina de Fisiologia da Faculdade de Medicina do ABC (FMABC), Santo André (SP), Brasil

Endereço para correspondência: Eduardo Colombari, Disciplina de Fisiologia, Anexo I, Faculdade de Medicina do ABC, Avenida Lauro Gomes, 2000, CEP 09060-870 – Santo André (SP), Tel.: (11) 4993-5403, Email: eduardo.colombari@pesquisador.cnpq.br

Introdução

Já se passaram mais de 50 anos desde que a aldosterona foi isolada e caracterizada^{1,2}. Desde então, sabemos que a aldosterona é o principal hormônio mineralocorticoide, sintetizado a partir do colesterol pela zona glomerulosa da glândula adrenal, que se liga a receptores mineralocorticóides (MR) específicos intra-celulares em células epiteliais-alvo. Suas ações sobre as células epiteliais são bem conhecidas e estudadas nas partes distais do néfron renal, onde atua na regulação do balanço hidroeletrolítico e subsequente homeostase da pressão arterial, por meio do aumento na reabsorção de sódio (Na⁺), água e excreção de potássio (K⁺). Outros órgãos, como o cólon, as glândulas sudoríparas e salivares, também são alvos clássicos da ação mineralocorticoide da aldosterona.

Porém, como veremos nesta revisão, ao longo desses 50 anos de história da aldosterona, muito tem se descoberto sobre suas ações. Entre elas podemos destacar: 1) suas inúmeras ações em diversos órgãos, que até então não eram considerados seus alvos; 2) o provável papel fisiopatológico em tecidos não-epiteliais; 3) sua produção extra-adrenal; 4) suas ações não-genômicas; 5) a possibilidade de um receptor de membrana e 6) características necessárias para a seletividade do receptor. Novas descobertas vêm surgindo a cada dia, provando que a aldosterona é um hormônio com ações muito mais complexas do que apenas suas ações clássicas, envolvendo órgãos-alvo, com o objetivo de manter a homeostase hidroeletrolítica e a pressão arterial no nosso organismo. Hoje em dia a aldosterona é considerada um hormônio de muita importância no controle cardiovascular.

O receptor mineralocorticoide (MR) e a sua seletividade para a ação da aldosterona

O MR, ao qual a aldosterona se liga, é classificado como um receptor nuclear, pertencente à superfamília de receptores esteróides, tireoidianos, de vitamina D e retinóides. Porém, na ausência do ligante, o MR está presente tanto no núcleo quanto no citosol, e na presença do ligante, o MR se localiza, exclusivamente, no núcleo celular^{3,4}, onde o complexo hormônio-receptor irá modular a expressão gênica e a tradução de proteínas específicas induzidas pela aldosterona. Mas essa localização mista (núcleo/citosol) é vista apenas em MRs que não estão co-localizados com a enzima chamada 11 β-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2), pois na presença de HSD2 o MR se localiza preferencialmente no citosol, assumindo a posição nuclear somente na presença do ligante⁴. Sugere-se que a enzima HSD2 medeia a associação entre o MR e a membrana do retículo endoplasmático na ausência do ligante, e aparentemente esse efeito é dependente de um componente estrutural da HSD2⁴, que ainda permanece desconhecido.

A enzima HSD2, dependente da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo na sua forma oxidada (NAD⁺), está localizada na membrana do retículo endoplasmático⁵⁻⁶ e sua função consiste em catalisar a conversão dos glicocorticóides endógenos, cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) em seus análogos biologicamente inati-

vos 11-ceto (cortisona e 11-desidrocorticosterona, respectivamente). Um estudo de hibridização *in situ*, mostrou que HSD2 é fortemente expressa nos rins, glândulas salivares e cólon⁷, órgãos considerados clássicos da ação de aldosterona.

Para a seletividade dos órgãos-alvo da aldosterona, não basta somente a presença de MR, mas deve haver a co-expressão do MR com a enzima HSD2, pois os MR são geneticamente muito semelhantes aos receptores glicocorticóides (GR) tipo 2⁸. A clonagem do MR mostrou uma impressionante homologia no domínio de ligação do DNA (94%) e no domínio de ligação do ligante (54%) com o GR⁸. Devido a isso, o MR é também chamado de GR tipo 1⁹⁻¹⁰. Portanto, os glicocorticóides apresentam a mesma afinidade que a aldosterona pelo MR¹¹. Sendo assim, os MRs desprotegidos, ou seja, sem a presença de HSD2, também se deslocam para o núcleo na presença de cortisol/corticosterona^{3,4}, sendo que o mesmo não ocorre com MRs co-localizados com HSD2⁴. Além da alta afinidade para o MR, os glicocorticóides encontram-se em concentrações plasmáticas que são de cem a mil vezes maiores do que as concentrações plasmáticas de aldosterona^{4,5,12}.

Diante da maior afinidade e da maior concentração plasmática, podemos inferir que os MRs desprotegidos são preferencialmente ocupados pelos glicocorticóides. Por isso, a presença de HSD2 nos órgãos-alvo de ação da aldosterona é de grande importância, pois ela inativa os glicocorticóides, evitando que estes se liguem ao MR, permitindo acesso apenas à aldosterona.

Em um estudo de curva dose-resposta, a corticosterona *in vivo* mostrou uma afinidade pelo MR de apenas 3% pelos MRs nos rins e no cólon, 30% para os MRs no coração e 300% pelos MRs no hipocampo¹³, quando comparada à afinidade da aldosterona, mostrando o efeito protetor da enzima HSD2 sobre os MRs de tecidos que a expressam (rins e cólon).

Um exemplo para demonstrar a importância da presença da enzima HSD2 nos órgãos-alvo da aldosterona é uma doença chamada de síndrome do excesso aparente de mineralocorticóides (SEAM). Esta síndrome pode ser causada pelo consumo excessivo de substâncias que inibem a enzima HSD2 (derivados de alcaçuz – “*licorice*”)¹⁴ ou na sua forma mais grave, uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação no gene que codifica a síntese de HSD2¹⁵. Com a deficiência de HSD2, o cortisol pode livremente se ligar aos MRs, causando retenção de Na⁺, hipocalcemia, hipertensão e supressão do sistema renina-angiotensina-aldosterona¹⁴⁻¹⁵, pois como demonstrado pelo trabalho de Odermatt *et al.*⁴, os MRs associados a HSD2 mutante, são deslocados para o núcleo após a ligação do cortisol.

Ações genômicas x ações não-genômicas

As ações epiteliais clássicas da aldosterona são chamadas de genômicas e são mediadas pelo receptor esteróide intracelular. Esse receptor se desloca para o núcleo da célula após a formação do complexo hormônio-receptor, modulando a expressão gênica e a tradução

de proteínas específicas que são induzidas pela aldosterona, como por exemplo, o canal epitelial de Na^+ e a Na^+ , K^+ -ATPase. A ação genômica da aldosterona resulta de um importante período latente (de 30 a 60 minutos) prévio ao início das mudanças na atividade celular; e inibidores da transcrição (actinomicina D), da tradução (cicloheximida), da translocação do receptor esteróide e de antagonistas do MR abolem as ações genômicas. A ação genômica consiste em duas fases: precoce (de uma a seis horas) e tardia (> seis horas). A fase precoce é mediada exclusivamente pelos efeitos primários. Os efeitos primários consistem em alterações na expressão gênica que promovem ativação de canais iônicos e de proteínas de sinalização, que por sua vez, induzem as proteínas que transportam eletrólitos (efeitos secundários). A fase tardia é resultante dos efeitos primários e secundários da expressão gênica. Mais recentemente, vêm sendo especuladas as ações rápidas, não-genômicas da aldosterona, particularmente em tecidos não-epiteliais tais como: células da musculatura lisa vascular, linfócitos, células endoteliais, miócitos cardíacos e células renais. Nesses tecidos foram observados os efeitos precoces causados pela aldosterona (< 15 minutos), que não são sensíveis aos inibidores acima citados¹⁶⁻¹⁷. Acredita-se que as ações não-genômicas da aldosterona sejam mediadas por meio de outro tipo de receptor (talvez um receptor de membrana) que seja diferente do MR clássico¹⁸. Entretanto, ainda não foi possível a identificação, a caracterização e a clonagem de tal receptor^{14-15,19}.

Ações não-epiteliais

Além das ações epiteliais da aldosterona, muitas ações não-epiteliais vêm sendo descritas ao longo dos anos, com a localização de MRs em uma variedade de tecidos não-epiteliais, particularmente no sistema cardiovascular e sistema nervoso central (SNC).

No sistema vascular, a aldosterona é conhecida por modular o tônus vascular por mecanismos ainda pouco conhecidos. Os prováveis mecanismos incluem: 1) aumento da resposta pressora às catecolaminas pela redução de sua recaptação²⁰; 2) prejuízo da resposta vasodilatadora à acetilcolina (ACh)²¹; 3) sensibilização de receptores β -adrenérgico²²; 4) sensibilização de receptores para angiotensina II (ANG II)²³⁻²⁴; 5) redução da biodisponibilidade do óxido nítrico²⁵; 6) efeito direto da aldosterona, possivelmente por meio de mecanismos não-genômicos. Este último mecanismo, pode ser exemplificado pelo trabalho de Romagni *et al.*²⁶, que mediante a infusão intra-arterial de aldosterona, mostrou uma redução do fluxo sanguíneo. Por outro lado, estudos da literatura também mostram um aumento de fluxo sanguíneo após a infusão de aldosterona, sugerindo idéias controversas na literatura²⁷⁻²⁸. Deve-se levar em conta que essas diferenças parecem se relacionar às doses de aldosterona administradas.

No coração, a aldosterona mostra uma resposta de hipertrofia ventricular e fibrose de tecidos intersticiais e perivasculares, que são independentes de mudanças na pressão arterial sistêmica, bem como

no equilíbrio hidroeletrólítico²⁹⁻³⁰. Trabalhos recentes, realizados em pacientes com insuficiência cardíaca severa, mostraram que o uso dos antagonistas de MR, espironolactona e eplerenona, em doses que não alteram significativamente a pressão arterial, reduziu a morbidade e a mortalidade desses indivíduos³¹⁻³². Em modelos animais sugere-se que eplerenona não apenas evita, como também reverte a fibrose de tecidos cardíacos³³.

Os mecanismos envolvidos na produção de fibrose induzida por aldosterona, não estão bem esclarecidos, mas alguns trabalhos observaram um aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm), de colágeno do tipo I e III pelos fibroblastos cardíacos, em ratos com hipertensão induzida pelo modelo experimental aldosterona/sal³⁴⁻³⁵. Outro estudo, *in vitro*, mostrou que a aldosterona não exerce um efeito direto sobre a síntese de colágeno pelos fibroblastos cardíacos, e que provavelmente os resultados encontrados *in vivo* sejam resultantes de efeitos secundários à aldosterona no modelo de hipertensão induzida por mineralocorticoide³⁶.

Inúmeros estudos mostram que a aldosterona também apresenta ações no SNC, aumentando o apetite ao Na^+ ^{18,37-39} e elevando cronicamente a pressão arterial⁴⁰⁻⁴⁴.

A aldosterona não é necessária para estimular o apetite ao Na^+ , mas ela aumenta a ingestão de salina e potencializa os efeitos da ANG II (um hormônio peptídeo também envolvido com o apetite ao Na^+). Fluharty e Epstein³⁷ mostraram que a ação conjunta da aldosterona com a ANG II estimula o apetite ao Na^+ com menor latência e maior magnitude do que seria produzido com maiores quantidades de cada hormônio individualmente³⁷. Conclusão semelhante chegaram Sakai *et al.*³⁸, que mostraram que o bloqueio de MRs centrais, mas não periféricos, com o uso do antagonista de MR, RU 28318, reduz mas não abole o apetite ao Na^+ induzido pelo protocolo de depleção de Na^+ em ratos. A eliminação da ingestão de Na^+ somente ocorreu após o uso concomitante de um agente que inibiu a formação de ANG II (Captopril)³⁸. Esses resultados demonstram que o sinergismo entre a ANG II e a aldosterona é responsável pela expressão do apetite ao Na^+ induzido pela depleção.

Mais recentemente, Geerling *et al.*⁴⁵ identificaram nos núcleos do trato solitário (NTS) de ratos, a presença de neurônios sensíveis à aldosterona, por eles denominados neurônios HSD2 (proveniente de 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2). Esse grupamento de neurônios mostrou intensa relação com o apetite ao Na^+ ⁴⁵ e não se correlacionou com a estimulação da sede⁴⁶.

A infusão crônica intracerebroventricular (icv) de aldosterona em ratos e cachorros promove aumento da pressão arterial, entretanto, a mesma dose quando injetada sistemicamente não modifica a pressão arterial⁴⁰⁻⁴².

Em ratos, a infusão icv de 5 ng/h de aldosterona elevou significativamente a pressão arterial com similar amplitude e tempo de início da resposta como quando 500 ng/h são injetados subcutaneamente⁴⁰. A resposta foi dose-dependente e a sensibilização pela redução da massa renal (nephrectomia unilateral) e a carga de sal acentuaram o desenvolvimento da hipertensão, mas não foram essenciais^{40,47-48}.

A resposta pressora promovida pela infusão icv de aldosterona foi bloqueada pela administração prévia do antagonista de MR, prerenone, em doses que não possuem efeitos quando injetadas sistemicamente⁴⁰. A infusão icv de outro antagonista de MR, RU 28318, também bloqueou a hipertensão produzida pela infusão subcutânea (sc) de aldosterona, o que não ocorreu com a mesma dose do antagonista injetado subcutaneamente⁴³. Do mesmo modo, infusão icv de corticosterona bloqueou, de maneira dose-dependente, os efeitos pressóricos da aldosterona⁴⁴. A injeção icv de corticosterona não exerceu nenhum efeito sobre a pressão arterial⁴⁴.

Nos modelos de ratos com hipertensão induzida pela administração do agonista mineralocorticoide acetato de desoxicorticosterona associada à ingestão de salina (DOCA/sal), os componentes simpático e parassimpático do barorreflexo se encontram atenuados nos estágios pré-hipertensivos⁴⁹⁻⁵². Neste modelo de hipertensão, a injeção icv crônica do antagonista de MR, RU 28318, significativamente atenuou a hipertensão, e essa redução foi atribuída a mecanismos que envolveram a restauração do barorreflexo e uma redução do tônus vasomotor simpático⁵³. Um trabalho que também usou o modelo crônico de hipertensão DOCA/sal (três e cinco semanas)⁵⁴ mostrou que uma única injeção icv de RU28318 em ratos tratados com DOCA/sal por três semanas (período no qual a hipertensão não está totalmente estabelecida), reduziu a pressão arterial sistólica após duas horas, medida por método indireto (pressão de cauda). Porém, a medida direta da pressão arterial (canulação) mostrou um aumento da pressão arterial média (PAM) após a injeção única icv de RU 28318, que perdurou durante todo o ciclo claro (~10 h), havendo importante queda da PAM no ciclo escuro (~17 h após a injeção icv). Nos ratos tratados com DOCA/sal por cinco semanas, o aumento de pressão arterial já está estabelecido, a injeção única icv de RU 28318 não afetou a pressão arterial basal, mostrando que o bloqueio do MR não afeta a pressão arterial basal após o estabelecimento da hipertensão⁵⁵. Esses experimentos mostram que a integridade funcional do MR é relevante para o desenvolvimento da hipertensão mineralocorticoide⁵³⁻⁵⁴.

O bloqueio do MR com o antagonista RU 28318 também foi capaz de inibir o desenvolvimento da hipertensão no modelo de ratos Dahl S/JR (sensíveis a sal) e também de reduzir os níveis hipertensivos após duas semanas de dieta hipersódica, quando a hipertensão já está estabelecida⁵⁵.

Todos esses resultados evidenciam o envolvimento dos MRs centrais no desenvolvimento da hipertensão induzida por mineralocorticóides. As doses infundidas foram muitas ordens de magnitude inferiores às quantidades necessárias para a resposta sistêmica, sugerindo assim, função primária do SNC para o efeito hipertensivo dos mineralocorticóides. O bloqueio da hipertensão com o uso de antagonistas seletivos de MR sugere que a resposta pressórica seja mediada pelo MR clássico, e o antagonismo causado pela corticosterona, sugere que o MR envolvido seja desprotegido da ação da HSD2. No entanto, a exata localização anatômica das regiões en-

cefálicas envolvidas na resposta pressórica dos mineralocorticóides precisa ainda ser mais bem elucidada. Regiões hipotalâmicas periventriculares são os locais sugeridos como o possível local de ação da aldosterona para aumento da pressão arterial⁵⁶⁻⁵⁷. No entanto, como a aldosterona e os antagonistas de MR foram injetados no ventrículo lateral e a resposta pressora apareceu após dez a 14 dias⁴⁰⁻⁴¹, pode ter ocorrido difusão dessas substâncias para outros locais do SNC.

Efeitos da aldosterona no mecanismo do barorreflexo

Estudos em humanos e em ratos demonstram uma importante relação entre a aldosterona e a atenuação da resposta do barorreflexo. Os trabalhos de um mesmo laboratório^{50,52} sugerem que ratos tratados no modelo DOCA/sal apresentam uma redução nas respostas de atuação do barorreflexo via estimulação do nervo depressor aórtico⁵⁰ e injeção intravenosa (iv) de noradrenalina⁵², ainda nos estágios pré-hipertensivos. Esses experimentos sugerem que o prejuízo do barorreflexo pode contribuir no desenvolvimento da hipertensão em ratos tratados com DOCA/sal.

Em cachorros, tanto a infusão aguda, quanto à infusão crônica de aldosterona, foram capazes de reduzir a atividade dos barorreceptores^{20,58}. A infusão prévia do antagonista de MR, espironolactona, foi capaz de impedir a redução da atividade dos barorreceptores promovida pela aldosterona, sugerindo a participação dos MRs na atividade do barorreflexo²⁰. Curiosamente essa resposta também foi bloqueada pela remoção das células endoteliais do seio carotídeo²⁰, o que sugere que a aldosterona pode estimular as células endoteliais a liberarem uma substância desconhecida que diminui a atividade dos barorreceptores. A infusão crônica de aldosterona também foi capaz de reduzir a atividade do barorreflexo. Essa redução também foi bloqueada com a infusão prévia de espironolactona⁵⁸. No mesmo estudo, os autores mostraram que a inibição da Na^+ , K^+ - ATPase, pela infusão de ouabaína, foi capaz de atenuar os efeitos da inibição do barorreflexo pela aldosterona⁵⁸. Isso sugere uma participação da Na^+ , K^+ - ATPase nessas respostas, uma vez que a aldosterona estimula a atividade da Na^+ , K^+ - ATPase⁵⁹⁻⁶⁰.

A infusão central crônica de aldosterona, também foi avaliada em ratos Dahl-sensíveis e -resistentes a sal⁶¹. Observou-se que, nos ratos sensíveis ao sal, a infusão icv de aldosterona causou um aumento da atividade simpática, hipertensão e prejuízo no controle do barorreflexo sobre a atividade simpática renal e sobre a frequência cardíaca⁶¹. Resultados semelhantes foram observados em humanos. Yee e Struthers⁶² realizaram um estudo em voluntários saudáveis e normotensos, mostrando que a infusão aguda iv de aldosterona prejudicou o controle do barorreflexo sobre a frequência cardíaca, com acentuada diminuição da resposta de bradicardia a estimulação do barorreceptor arterial elicitado pela infusão iv de fenilefrina. Esses efeitos foram atribuídos como um prejuízo do componente paras-

simpático do barorreflexo, sem alterações no componente simpático cardíaco, uma vez que, a resposta de frequência cardíaca à infusão de nitroprussiato de sódio não se mostrou alterada⁶².

Heindl *et al.*⁶³ observaram que a infusão (iv) de aldosterona resultou em uma tendência em aumentar a atividade cardíaca vagal e aumentar a resposta de taquicardia ao nitroprussiato de sódio, sem afetar o controle do barorreflexo sobre a atividade simpática para o leito muscular esquelético. Resultados diferentes foram encontrados por Monahan *et al.*⁶⁴ que observaram um prejuízo de ambos os componentes do barorreflexo, parassimpático e simpático, após infusão iv de aldosterona.

Os diferentes resultados encontrados nesses estudos em humanos possivelmente se relacionaram com as diferentes doses utilizadas, diferentes técnicas utilizadas para estimular o barorreflexo, ou também, pelo aumento da concentração plasmática de aldosterona bem acima dos valores fisiológicos⁶²⁻⁶⁴. Uma elevação nos níveis plasmáticos de aldosterona pode ser necessária para atenuar o barorreflexo, o que se aproximaria de situações patológicas que envolvem o excesso de aldosterona, como por exemplo, a hipertensão dependente de aldosterona e em situações de insuficiência cardíaca. No entanto, os mecanismos pelos quais a aldosterona promove esses efeitos sobre o barorreflexo ainda não estão esclarecidos.

As diferentes respostas encontradas em relação à alteração no componente simpático do barorreflexo, evidenciada pela atividade simpática muscular esquelética, necessita de mais estudos, usando modelos animais, a fim de investigar o possível prejuízo da modulação do tônus vasoconstritor simpático para diferentes leitos.

Apesar das diferenças entre as diversas respostas encontradas nos estudos com animais e humanos, é negável que a aldosterona está envolvida de alguma forma no prejuízo da função do barorreflexo, porém os mecanismos envolvidos ainda permanecem desconhecidos e necessitam de novas investigações.

Neurônios sensíveis à aldosterona no NTS: os neurônios HSD2

Além de ser expressa nos órgãos clássicos de ação da aldosterona⁷, um estudo de hibridização *in situ*⁶⁵ mostrou a presença da expressão de RNAm para HSD2 no SNC. Importante expressão de HSD2 foi encontrada na porção comissural do NTS e no órgão subcomissural (SCO, um órgão circunventricular localizado abaixo da comissura posterior). Ademais, níveis moderados de expressão foram vistos na porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial (VMHvl) e algumas células no núcleo vestibular medial (MV) encontraram-se marcadas para RNAm de HSD2⁶⁵. Imunoreatividade para MR⁶⁶ e para RNAm de MR⁶⁷ já foram descritas na porção medial do NTS. O NTS medial e comissural estão diretamente envolvidos no controle cardiovascular, pois lesões que acometem simultaneamente essas duas áreas resultam em hipertensão aguda fulminante⁶⁸⁻⁶⁹.

A partir dessas informações, Geerling *et al.*⁴⁵ realizaram estudos com o objetivo de identificar locais no SNC que pudessem ser sensíveis à aldosterona. Utilizando um anticorpo específico contra MR de rato, observaram uma expressão difusa de MR por todo o encefálo, corroborando com estudos prévios^{66,70}. Porém, como já descrito anteriormente, apenas a presença de MR não é suficiente para que o tecido seja seletivo à aldosterona. Diante disso, foi avaliado se estes neurônios contendo MR também expressavam a enzima HSD2, usando um anticorpo contra a sequência peptídica única de HSD2 do rato⁴⁵. Com os tratamentos anatômicos específicos descobriu-se uma intensa imunoreatividade no NTS medial, com a mesma distribuição restrita apresentada pelos MR no NTS. Com a dupla marcação observaram que a enzima HSD2 estava co-localizada com os MR nucleares e perinucleares. Sendo assim, esses neurônios receberam a denominação de “neurônios HSD2”, por serem neurônios que expressam a enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2⁴⁵.

Os neurônios HSD2 possuem localização rostral à área postrema (AP), se estendendo até a porção caudal do NTS ao nível da transição bulbo-espinal. As concentrações mais densas de neurônios HSD2 localizam-se entre o NTS medial que está na borda do quarto ventrículo, próximo ao nível que se forma o canal central, abaixo da AP^{39,45}. Assim, como Roland *et al.*⁶⁵, Geerling *et al.*⁴⁵ também encontraram, ao examinar todo o encefálo, imunoreatividade para HSD2 no SCO, no VMHvl e em poucas células no MV rostral ao NTS, porém nenhum desses locais apresentou co-localização de MR e HSD2. Sendo assim, os neurônios HSD2 do NTS são considerados os únicos neurônios sensíveis à aldosterona no SNC⁴⁵.

Além da co-localização de MR e HSD2 no NTS medial, os dendritos dos neurônios HSD2 se estendem para a região vascular do NTS abaixo da AP⁴⁵. A AP consiste em um órgão circunventricular desprovido de barreira hemato-encefálica (BHE)⁷¹, o que é outra característica importante para ação da aldosterona no SNC, uma vez que, relativamente baixos níveis de aldosterona conseguem atravessar a BHE^{13,72}. Essa informação poderia ser irrelevante se realmente se comprovasse a produção local de aldosterona pelo SNC, porém até o momento, apenas encontraram a expressão no SNC de enzimas envolvidas na síntese de aldosterona^{12,73-76}, o que não comprova a produção local de aldosterona no SNC. Portanto, devido a localização próxima à AP, os neurônios HSD2 no NTS estão em uma área de fácil acesso para a aldosterona circulante.

O NTS dorso-medial constitui o principal sítio de entrada das aferências dos barorreceptores e em menor escala, também, recebe aferências dos quimiorreceptores e aferências gastrointestinais⁷⁷⁻⁷⁹, portanto, os neurônios HSD2 podem ter um papel na integração de sinais neurais e humorais dos estados cardiovasculares ou gastrointestinais⁴⁵. De posse de todas essas informações, Geerling *et al.*³⁹ puderam comprovar que os neurônios HSD2 estão intimamente relacionados ao controle do apetite ao Na⁺. Primeiro, foi mostrado que os neurônios HSD2 são sensíveis e seletivos à aldosterona, por meio

da análise, *in vivo*, da translocação nuclear dos MR em ratos adrenalectomizados (adx) que receberam infusão de aldosterona, veículo (1% de etanol em 0.9% de salina) e corticosterona. Os ratos infundidos com aldosterona mostraram a maioria dos neurônios HSD2 com densa imunoreatividade nuclear ($62,7 \pm 4,7\%$; $p < 10^{-7}$, comparado ao veículo). Em contraste, a corticosterona teve apenas um pequeno efeito sobre a translocação nuclear dos MRs dos neurônios HSD2 ($19,4 \pm 4,5\%$; $p < 0,001$, comparado ao grupo aldosterona), apesar dos níveis de concentração cem vezes maiores³⁹, mostrando o efeito protetor da enzima HSD2 ao MR. No mesmo trabalho, os autores mostraram que os neurônios HSD2 são ativados por diversas situações que estimulam o apetite ao Na^+ (dieta de privação de Na^+ , diurese por furosemida, tratamento crônico com altas doses de DOCA e adrenalectomia). A maior ativação foi observada no protocolo de oito dias de privação de Na^+ sem acesso a salina ($32,5 \pm 4,5\%$ de expressão de proteína c-Fos pelos neurônios HSD2), comparado à diurese por furosemida associada a privação de Na^+ a curto prazo (24 - 48 horas; $18,7 \pm 6,8\%$ e $29,4 \pm 4,7\%$, respectivamente) e DOCA sem privação de Na^+ (com acesso a 3% NaCl; $20,9 \pm 2,5\%$; $p < 0,001$ vs veículo). Essa ativação se relacionou a uma importante e rápida ingestão de Na^+ mostrada no trabalho pelos grupos de oito dias de privação de Na^+ e DOCA sem privação de Na^+ ³⁹. Outro resultado interessante foi a rápida inativação dos neurônios HSD2 após acesso a salina hipertônica. Ratos que foram privados de Na^+ por oito dias apresentaram uma rápida inativação dos neurônios HSD2, sendo praticamente abolida após duas horas de acesso a 3% NaCl ($4,7 \pm 0,6\%$ de c-Fos nuclear; $p = 0,0001$, vs oito dias de privação de Na^+ sem acesso a salina). Durante essas duas horas de acesso a salina, esses ratos beberam $7,5 \pm 0,6$ mL de 3% de NaCl ($p < 10^{-7}$ vs a média antes da privação, $1,67 \pm 0,4$ mL), primariamente nos primeiros 30 minutos ($6,7 \pm 0,7$ mL)³⁹. Curiosamente, os ratos adx e privados de Na^+ (um a seis dias), apresentaram um grande aumento de expressão de c-Fos pelos neurônios HSD2 no NTS após um dia de privação de Na^+ ($36,6 \pm 3,3\%$) e que permaneceu elevada pelos seis dias restantes. Um grupo adicional de ratos adx privados de Na^+ por três dias, bebeu voluntariamente uma grande quantidade de salina hipertônica ($28,5 \pm 0,8$ mL, além de 24 horas), confirmando o seu robusto apetite ao Na^+ . Vale lembrar que a ingestão de salina hipertônica em 24 horas também inibiu a ativação dos neurônios HSD2 neste modelo ($2,9 \pm 1,4\%$; $p = 0,01$, vs 3 dias de privação sem acesso a salina). Esse resultado mostrou que, além de serem ativados pela aldosterona, os neurônios HSD2 também são ativados em situações de depleção de Na^+ , por outro mecanismo (neural/humoral) independente da aldosterona³⁹, que ainda permanece desconhecido.

O trabalho de Wang e Edwards⁸⁰ avaliou os diferentes efeitos do tamanho da lesão no bulbo dorsomedial sobre os comportamentos ingestivos de ratos, sugerindo que a porção do NTS ao redor da AP teria uma importante contribuição para os efeitos comportamentais observados após lesões na AP. Com relação à ingestão de Na^+ , os autores observaram

que animais depletados de Na^+ com lesões menores do NTS adjacente a AP, ingeriam mais Na^+ do que os animais com lesões maiores⁸⁰, o que nos leva a pensar que nos animais com lesões envolvendo uma maior parte do NTS adjacente a AP, os neurônios HSD2 também podem ter sido lesados e por isso a ingestão de Na^+ foi reduzida em comparação a lesão menor.

Outro resultado interessante foi encontrado durante o tratamento mineralocorticóide crônico, sem acesso a salina⁸¹. Como já observado, os neurônios HSD2 são ativados em paralelo ao apetite ao Na^+ por depleção de Na^+ ou por tratamento mineralocorticóide crônico na ausência de depleção de Na^+ ³⁹. Porém, após o tratamento mineralocorticóide crônico (2 mg/dia de DOCA, sete dias), os ratos tiveram acesso a salina hipertônica (3% NaCl) por duas horas, e beberam oito vezes mais salina do que o grupo controle ($0,4 \pm 0,1$ mL veículo + NaCl vs $3,5 \pm 0,7$ mL DOCA + NaCl), observando-se que o maior consumo ocorreu nos primeiros 30 minutos, $3,3 \pm 0,8$ mL, de um total ingerido em duas horas de $3,5 \pm 0,7$ mL⁸¹. Mesmo mantendo o tratamento mineralocorticóide, os neurônios HSD2 no NTS foram inibidos (aproximadamente 50% de redução da ativação) pela ingestão de salina hipertônica. Esses achados sugerem que os neurônios HSD2 são inibidos por sinais diretamente relacionados à ingestão de salina, e não pelo simples alívio da deficiência de Na^+ , que não ocorre durante a administração de mineralocorticóides⁸¹.

Como o NTS integra muitas informações viscerossensoriais, incluindo as aferências de receptores gastrointestinais, osmorreceptores hepáticos, aferências gustatórias e de receptores cardiovasculares⁷⁸⁻⁷⁹, os neurônios HSD2 poderiam ser inibidos por mecanismos inibitórios locais⁸², uma vez que, como observado após a ingestão de salina hipertônica os neurônios HSD2 foram inativados e os neurônios vizinhos a eles no NTS medial foram concomitantemente ativados⁸¹.

Como evidenciado por esses trabalhos, os neurônios HSD2 são neurônios-alvo da ação de aldosterona no SNC⁴⁵ e são ativados em paralelo com o apetite ao Na^+ durante o tratamento com altas doses do agonista mineralocorticóide (DOCA), bem como pela dieta hipossódica, que aumenta a produção de aldosterona³⁹. Além disso, os neurônios HSD2 recebem informações sobre a depleção de Na^+ por meio de outras fontes além da aldosterona³⁹, e são diretamente inibidos por sinais relacionados à ingestão de salina hipertônica⁸¹, sem que estejam relacionados à estimulação da sede⁴⁶. Todas essas informações caracterizam os neurônios HSD2 como parte integrante de um circuito neuro-humoral relacionado ao controle do apetite ao Na^+ .

Estudos com uso de traçadores neuronais mostraram importantes projeções eferentes dos neurônios HSD2 do NTS para a porção ventrolateral do núcleo leito da estria terminal (BSTvl), pré-locus ceruleus (pre-LC) e para divisão interna do núcleo parabraquial externo-lateral (PBel). Sendo que a BSTvl recebe projeções eferentes dos neurônios HSD2 tanto direta, quanto indiretamente por meio do pre-LC e do PBel⁸³. Não foram encontradas conexões entre os neurônios HSD2 e locais envolvidos no controle autonômico⁸³, sugerindo que os neurônios HSD2 provavelmente não modulem o sistema nervoso autônomo diretamente por projeções do NTS

para regiões ventrolaterais do bulbo. No entanto, não podemos descartar o possível envolvimento dos neurônios HSD2 sobre a integração que acontece no NTS dos ajustes cardiovasculares modulados no próprio NTS.

Outro estudo demonstrou que os neurônios HSD2 apresentam conexões bidirecionais com o núcleo central da amígdala (CeA)⁸⁴, região essa que está relacionada com a modulação do apetite ao Na⁺, em resposta a administração de mineralocorticóides^{18,85}. Geerling e Lowy⁸⁴ sugerem que os neurônios HSD2 enviam projeções indiretas, via PBel, para a porção lateral do CeA (CeA-L) e que a porção medial do CeA (mCeA) enviaria uma projeção descendente direta aos neurônios HSD2, formando assim um importante circuito para modulação do apetite ao Na⁺, no qual o aumento deste apetite em resposta à administração de mineralocorticóides ao CeA, seria ao menos em parte, devido a um impulso indireto dos neurônios HSD2, que poderiam fornecer informações sobre a necessidade de Na⁺ no organismo⁸⁴.

Os neurônios HSD2 também se projetam para o núcleo accumbens (NAc), por meio de uma via multisináptica⁸⁶. O NAc está envolvido nos mecanismos de recompensa, motivação e aprendizado, e se torna ativado durante vários comportamentos ingestivos, incluindo a ingestão de Na⁺⁸⁷. A via multisináptica proposta por Shekhtman *et al.*⁸⁶ envolveria os neurônios HSD2 que se projetam para o PBel e pre-LC, essas estruturas pontinas se projetam para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH), que então enviaria as informações provenientes dos neurônios HSD2 para o NAc. Esta via pode ter um papel na motivação do comportamento e procura por sal em ratos depletados de Na⁺⁸⁶.

Além dessas conexões com várias estruturas encefálicas, os neurônios HSD2 também recebem informações de microcircuitos locais que envolvem a AP e os neurônios neurotensinérgicos⁸². A AP é um órgão circunventricular que diretamente inerva o NTS⁷¹ e exerce um importante efeito inibitório sobre o apetite ao Na⁺^{80,88-90}. Mesmo com lesões de AP os animais mantêm o apetite ao Na⁺ em resposta à depleção de Na⁺, sugerindo que o circuito neural responsável pelo controle do apetite ao Na⁺ esteja preservado⁹¹. Como já citado anteriormente, lesões de AP associada a lesões do NTS adjacente, mostram diferentes respostas à ingestão de Na⁺ relacionadas ao tamanho da lesão no NTS adjacente⁸⁰. Isso pode sugerir que os neurônios da AP sensíveis ao Na⁺ poderiam inervar os neurônios HSD2⁸².

No estudo de Sequeira *et al.*⁸², observou-se que os axônios dos neurônios da AP que se projetam ao NTS estão em justaposição aos neurônios HSD2 e aos neurônios neurotensinérgicos, e os botões neurotensinérgicos estão em justaposição aos neurônios HSD2, sugerindo que este microcircuito possa ser o local de integração para informações aferentes sobre as condições cardiovascular e de Na⁺ plasmático.

Apesar dos neurônios HSD2 não mostrarem nenhuma conexão direta com o sistema nervoso autônomo⁸³, não se pode excluir que eles possam influenciá-lo de maneira indireta, uma vez que, como vimos, os neurônios HSD2 se localizam no NTS, um local do SNC de importante integração de informações viscerossensoriais⁷⁷⁻⁷⁹ e mais precisamente se localizam no NTS medial⁴⁵, importante área de controle cardiovascular⁷⁷⁻⁷⁹. Além disso, o NTS também participa de vias multissinápticas envolvendo várias estruturas que de alguma forma, seja direta ou indiretamente, se relacionam aos neurônios HSD2.

Os neurônios HSD2 são sensíveis e seletivos à aldosterona e também são ativados pela infusão de DOCA³⁹. Como já discutido anteriormente, a aldosterona além de estimular o apetite ao Na⁺^{18,37-39}, também está relacionada com o aumento da pressão arterial, por atuar em seus MRs centrais⁴⁰⁻⁴⁴, apesar de sua exata localização não estar bem esclarecida. Porém, o MR envolvido na hipertensão parece ser desprotegido, pois permite que a corticosterona de maneira dose-dependente, antagonize o efeito hipertensivo da aldosterona⁴⁴, o que não exclui a possibilidade de que haja um escape de corticosterona à ação de HSD2¹³, por exemplo, por saturação da enzima⁴.

A aldosterona está relacionada ao prejuízo do barorreflexo tanto em humanos⁶²⁻⁶⁴ quanto em animais^{20,49-52,58,61}, por mecanismos ainda desconhecidos. Em modelos animais de hipertensão mineralocorticóide o barorreflexo já se encontra atenuado em estágios pré-hipertensivos⁴⁹⁻⁵³. Animais Dahl-sensíveis a sal, que mostram uma regulação anormal do barorreflexo antes mesmo do desenvolvimento de hipertensão, apresentam 20% a mais de neurônios HSD2 no NTS quando comparados aos ratos Dahl-resistentes à sal, Sprague-Dawley, Wistar Kyoto e espontaneamente hipertensos (SHR)⁹².

Em suma, muito se descobriu sobre a aldosterona e suas ações nesses últimos anos. Esses achados vêm contrariando o dogma de que a aldosterona atua exclusivamente em alvos epiteliais por meio de um mecanismo genômico para modular o balanço hidroeletrólítico. No entanto, está claro que a aldosterona tem importantes efeitos fisiológicos e fisiopatológicos sobre alvos não-epiteliais, dos quais muitos parecem ocorrer por mecanismos não-genômicos. E os recentes avanços aumentam o número de questões sobre de que forma a aldosterona atua para estimular o apetite ao Na⁺, causar hipertensão arterial por meio de mecanismos neurais, interferir no mecanismo do barorreflexo e causar hipertrofia e fibrose no coração. As respostas para essas questões ainda permanecem desconhecidas e necessitam de novas pesquisas, pois provavelmente levarão à descoberta de novos e melhores tratamentos para doenças como hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. No entanto, muitos estudos ainda são necessários para se encontrar essas respostas, e provavelmente os próximos 50 anos de história da aldosterona serão no mínimo muito interessantes.

Referências

- Simpson AS, Tait JF, Wettstein A, Neher R, von Euw J, Reichstein T. Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with specially high effectiveness on mineral metabolism. *Experientia* 1953;9:333-5.
- Tait SA, Tait JF, Coghlan JP. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217(1-2):1-21.
- Fejes-Tóth G, Pearce D, Náráy-Fejes-Tóth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: Effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):2973-8.
- Odermatt A, Arnold P, Frey FJ. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Biol Chem* 2001;276(30):28484-92.
- Náráy-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G. Subcellular localization of the type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 1996;271(26):15436-42.
- Odermatt A, Arnold P, Stauffer A, Frey BM, Frey FJ. The N-terminal anchor sequences of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 1999;274(40):28762-70.
- Roland BL, Funder JW. Localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: in situ studies. *Endocrinology* 1996;137(3):1123-8.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237(4812):268-75.
- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985;117(6):2505-11.
- Ito T, Morita N, Nishi M, Kawata M. In vitro and in vivo immunocytochemistry for distribution of mineralocorticoid receptor with the use of specific antibody. *Neurosci Res* 2000;37(3):173-82.
- Shepard KE, Funder JW. Equivalent affinity of aldosterone and corticosterone for type I receptors in kidney and hippocampus: direct binding studies. *J Steroid Biochem* 1987;28(6):737-42.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE. Is aldosterone synthesized in the CNS regulated and functional? *Trends Endocrinol Metab* 2003;14(10):444-6.
- Funder J, Myles K. Exclusion of corticosterone from epithelial mineralocorticoid receptors is insufficient for selectivity of aldosterone action: in vivo binding studies. *Endocrinology* 1996;137(12):5264-8.
- Edwards CR, Walker BR, Benediktsson R, Seckl JR. Congenital and acquired syndromes of apparent mineralocorticoid excess. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;45(1-3):1-5.
- Stewart PM, Krozowski ZS, Gupta A, Milford DV, Howie AJ, Sheppard MC, et al. Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *Lancet* 1996;347(8994):88-91.
- Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 2002;26(1-4):8-20.
- Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 2005;186(1):1-20.
- Sakai RR, McEwen BS, Fluharty SJ, Ma LY. The amygdala: Site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. *Kidney Int* 2000;57(4):1337-45.
- Falkenstein E, Christ M, Feuring M, Wehling M. Specific nongenomic actions of aldosterone. *Kidney Int* 2000;57(4):1390-4.
- Wang W, McClain JM, Zucker IH. Aldosterone reduces baroreceptor discharge in the dog. *Hypertension* 1992;19(3):270-77.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21(6 pt 2):929-33.
- Jazayeri A, Meyer WJ. Mineralocorticoid-induced increased in beta-adrenergic receptors of cultured rat arterial smooth muscle cells. *J Steroid Biochem* 1989;33(5):987-91.
- Schiffirin EL, Gutkowska J, Genest J. Effect of angiotensin II and deoxycorticosterone infusion on vascular angiotensin II receptor in rats. *Am J Physiol* 1984;246(4 pt 2):H608-H614.
- Schiffirin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63(12):1522-7.
- Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH. Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* 2003;144(5):1712-7.
- Romagnì P, Rossi F, Guerrini L, Quirini C, Santemma V. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis* 2003;166(20):345-9.
- Schmidt BM, Oehmer S, Delles C, Bratke R, Schneider MP, Klingbeil A, et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension* 2003;42(2):156-60.
- Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB, Norregaard R, Jensen BL, Sorensen GL, et al. Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone. *Circ Res* 2003;93(12):1258-66.
- Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120(6):893-901.
- Rocha R, Stier CT Jr. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocr Metab* 2001;12(7):308-14.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341(10):709-17.

32. Pitt B, Remme WJ, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterona blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *New Engl J Med* 2003;348(14):1309-21.
33. Young M, Funder JW. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* 2004;145(7):3153-7.
34. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 1994;24(1):30-6.
35. Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouvé P, Wassef M, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995;26(6 pt 1):971-8.
36. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res* 1994;28(12):1863-7.
37. Fluharty SJ, Epstein AN. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensina II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav Neurosci* 1983;97(5):746-58.
38. Sakai RR, Nicolaidis S, Epstein AN. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *Am J Physiol* 1986;251(4 pt 2):R762-8.
39. Geerling JC, Engeland WC, Kawata M, Loewy AD. Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. *J Neurosci* 2006;26(2):411-7.
40. Gomez-Sanchez EP. Intracerebroventricular infusion of aldosterone induces hypertension in rats. *Endocrinology* 1986;118(2):819-23.
41. Kageyama Y, Bravo EL. Hypertensive mechanisms associated with centrally administered aldosterone in dogs. *Hypertension* 1988;11(6 pt 2):750-3.
42. Chen M, Lee J, Malvin RL. Central administration of aldosterone increases blood pressure in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989;11(3):459-72.
43. Gómez-Sánchez EP, Fort CM, Gómez-Sánchez CE. Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol* 1990; 258(3 pt 1):E482-4.
44. Gómez-Sánchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D, Fort C. ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am J Physiol* 1990;258(4 pt 1):E649-53.
45. Geerling JC, Kawata M, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2006;494(3):515-27.
46. Geerling JC, Loewy AD. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292(3):R1338-48.
47. Gomez-Sanchez EP. Dose-response studies of intracerebroventricular infusion of aldosterone in sensitized and non-sensitized rats. *J Hypertens* 1988;6(6):437-42.
48. Peysner K, Henry CA, Malvin RL. Central infusion of aldosterone increases blood pressure by mechanisms independent of Na retention. *Clin Exp Hypertens A* 1990;12(3):399-414.
49. Matsuguchi H, Sharabi FM, O'Connor G, Mark AL, Schmid PG. Central mechanisms in DOC-salt hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1982;4(8):1303-21.
50. Takeda K, Nakamura Y, Oguro M, Kawasaki S, Havashi J, Tanabe S, et al. Central attenuation of baroreflex precedes the development of hypertension in DOCA-salt-treated rats. *Am J Hypertens* 1988; 1(3 pt 3):23S-25S.
51. Takeda K, Nakamura Y, Havashi J, Kawasaki S, Nakata T, Oguro M, et al. Effects of salt and DOCA on hypothalamic and baroreflex control of blood pressure. *Clin Exp Hypertens A* 1988;10 (suppl 1):289-99.
52. Nakamura Y, Takeda K, Nakata T, Havashi J, Kawasaki S, Lee LC, et al. Central attenuation of aortic baroreceptor reflex in prehypertensive DOCA-salt-loaded rats. *Hypertension* 1988;12(3):259-66.
53. Janiak PC, Lewis SJ, Brody MJ. Role of central mineralocorticoid binding sites in development of hypertension. *Am J Physiol* 1990;259(5 pt 2):R1025-34.
54. Van den Berg DT, de Kloet ER, de Jong W. Central effects of mineralocorticoid antagonist RU-28318 on blood pressure of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol* 1994;267(6 pt 1):E927-33.
55. Gomez-Sanchez EP, Fort C, Thwaites D. Central mineralocorticoid receptor antagonism blocks hypertension in Dahl S/JR rats. *Am J Physiol* 1992;262(1 pt 1):E96-9.
56. Gómez-Sánchez EP. Mineralocorticoid modulation of central control of blood pressure. *Steroids* 1995;60(1):69-72.
57. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 1997;138(8):3369-73.
58. Wang W. Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension* 1994;24(5):571-5.
59. O'Neil RG. Aldosterone regulation of sodium and potassium transport in the cortical collecting duct. *Semin Nephrol* 1990;10(4):365-74.
60. Vinciguerra M, Mordasini D, Vandewalle A, Feraille E. Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA,K-pump in collecting duct principal cells. *Semin Nephrol* 2005;25(5):312-21.
61. Huang BS, Wang H, Leenen FHH. Chronic central infusion of aldosterone leads to sympathetic hyperreactivity and hypertension in Dahl S but not Dahl R rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(2):H517-24.
62. Yee KM, Struthers AD. Aldosterone blunts the baroreflex response in man. *Clin Sci (Lond)* 1998;95(6):687-92.
63. Heindl S, Holzschneider J, Hinz A, Sayk F, Fehm HL, Dodt C. Acute effects of aldosterone on the autonomic nervous system and the baroreflex function in healthy humans. *J Neuroendocrinol* 2006;18(2):115-21.
64. Monahan KD, Leuenberger UA, Ray CA. Aldosterone impairs baroreflex sensitivity in healthy adults. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(1):H190-7.
65. Roland BL, Li KX, Funder JW. Hybridization histochemical localizations of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat brain. *Endocrinology* 1995; 136(10):4697-700.

66. Ahima R, Krozowski Z, Harlam R. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* 1991;313(3):522-38.
67. Roland BL, Li KX, Funder JW. Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol Cell Endocrinol* 1995;111(1):R1-7.
68. Doba N, Reis DJ. Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. *Circ Res* 1973;32(5):584-93.
69. Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR Jr, Lopes OU. Role of medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* 2001;38(3 pt 2):549-54.
70. Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM. The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1988;1(9):887-900.
71. Johnson AK, Loewy AD. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: Loewy AD, Spyer, KM, editors. *Central regulation of autonomic functions*. New York: Oxford University Press: 1990, cap14, p. 247-67.
72. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest* 1979;64(1):145-54.
73. Gómez-Sánchez EP. Central hypertensive effects of aldosterone. *Front Neuroendocrinol* 1997;18(4):440-62.
74. MacKenzie SM, Clark CJ, Fraser R, Gómez-Sánchez CE, Connell JM, Davies E. Expression of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J Mol Endocrinol* 2000;24(3):321-8.
75. Ye P, Kenyon CJ, MacKenzie SM, Seckl JR, Fraser R, Connell JM et al. Regulation of aldosterone synthase gene expression in the rat adrenal gland and central nervous system by sodium and angiotensin II. *Endocrinology* 2003;144(8):3321-8.
76. Gomez-Sanchez EP, Samuel J, Vergara G, Ahmad N. Effect of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by trilostane on blood pressure in the Dahl salt-sensitive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288(2):R389-93.
77. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* 1980;209(4458):813-5.
78. Loewy AD. Central autonomic pathways. In: Loewy AD, Spyer, KM, editors. *Central regulation of autonomic functions*. New York: Oxford University Press: 1990, cap6, p. 88-103.
79. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 1994;74(2):323-64.
80. Wang T, Edwards GL. Differential effects of dorsomedial medulla lesion size on ingestive behavior in rats. *Am J Physiol (Integr Comp Physiol)* 1997;273(4 pt 2):R1299-308.
81. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive NTS neurons are inhibited by saline ingestion during chronic mineralocorticoid treatment. *Brain Res* 2006;1115(1):54-64.
82. Sequeira SM, Geerling JC, Loewy AD. Local inputs to aldosterone-sensitive neurons of the nucleus tractus solitarius. *Neuroscience* 2006;141(4):1995-2005.
83. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: efferent projections. *J Comp Neurol* 2006;498(3):223-50.
84. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of solitary tract: Bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol* 2006;497(4):646-57.
85. Zhang DM, Epstein AN, Schulkin J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Res* 1993;600(1):20-6.
86. Shekhtman E, Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of solitary tract: multisynaptic pathway to the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 2007;501(2):274-89.
87. Voorhies AC, Bernstein IL. Induction and expression of salt appetite: Effects on Fos expression in nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 2006;172(1):90-6.
88. Contreras RJ, Stetson PW. Changes in salt appetite of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res* 1981;211(2):355-66.
89. Hyde TM, Miselis RR. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *Am J Physiol* 1984;247(1 pt 2):R173-182.
90. Curtis KS, Huang W, Sved AF, Verbalis JG, Stricker EM. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. *Am J Physiol* 1999;277(1 pt 2):R209-19.
91. Edwards GL, Belts TG, Power JD, Johnson AK. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. *Am J Physiol* 1993;264(6 pt 2):R1242-7.
92. Geerling JC, Sequeira SM, Loewy AD. Increased number of aldosterone-sensitive NTS neurons in Dahl salt-sensitive rats. *Brain Res* 2005;1065(1-2):142-6.