ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE – TES02

NEPRILISINA COMO ALVO TERAPÊUTICO NAS DOENÇAS CARDIORRENAIS – REVISÃO DE LITERATURA

A. G. OLIVEIRA¹, N. K. S. LIMA¹, L. B. S. NASCIMENTO², M. R. SOUZA², F. P. B. RIBEIRO², R. S. AIRES²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Laboratório de Fisiopatologia Renal

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal

E-mail para contato: angeloliveira.farma.ufpe@gmail.com

RESUMO – *A neprilisina (NEP) é uma endopeptidase neutra, presente na membrana de borda em escova, que degrada uma variedade de peptídeos bioativos. Dentre os substratos da NEP, incluem-se os peptídeos natriuréticos (PNs), que são importantes mediadores regulatórios da biologia cardiovascular e renal. A inibição da NEP diante de insultos cardiovasculares e renais promove efeitos benéficos. Porém, uma melhor abordagem a respeito do impacto fisiológico da inibição desta enzima é necessária. Assim, esta revisão teve por objetivo evidenciar a importância da neprilisina no contexto fisiológico e contemplar seu papel na vigência de insultos cardiorrenais. Para compor a revisão de literatura, foram utilizados artigos publicados no PubMed. Após análise criteriosa dos artigos selecionados, foi possível descrever os tópicos relacionados a síntese, estrutura e função desta enzima, bem como seu mecanismo de ação. E por fim, de que forma a inibição da neprilisina pode funcionar como um alvo terapêutico na ocorrência de comorbidades cardiorrenais.*

Palavras-chave: *endopeptidase neutra, aplicação terapêutica, doença cardiovascular, doença renal.*

ABSTRACT – *Neprilysin (NEP) is a neutral endopeptidase, present on the brush border membrane, which degrades a variety of bioactive peptides. Among the substrates of NEP, natriuretic peptides (PN), which are important regulatory mediators of cardiovascular and renal biology. Inhibition of NEP in the face of cardiovascular and renal insults promotes beneficial effects. However, a better approach to the physiological impact of inhibition of this enzyme is needed. Thus, this review aimed to highlight the importance of neprilysin in the physiological context and contemplate its role in the validity of cardiorenal insults. To compose the literature review, articles published in PubMed were used. After a careful*

analysis of the selected articles, it was possible to describe the topics related to the synthesis, structure and function of this enzyme, as well as its mechanism of action. And finally, how inhibition of neprilysin may act as a therapeutic target in the occurrence of cardiorenal comorbidities.

Keywords: neutral endopeptidase, therapeutic application, cardiovascular disease, renal disease.

1. INTRODUÇÃO

Pacientes com doença renal crônica (DRC) têm maior incidência de eventos cardiovasculares, que por sua vez têm um risco aumentado de progressão para a doença renal em estágio final (TUEGEL; BANSAL, 2017). Nesse contexto, novas estratégias terapêuticas têm surgido, e um grande enfoque tem sido dado ao uso de peptídeos natriuréticos (PNs) e inibidores da neprilisina (NEP) (MUNEER; NAIR, 2017). A NEP é uma enzima amplamente distribuída entre as espécies e sua atividade vem sendo estudada há anos (SULLIVAN et al, 1980). Esta enzima está envolvida na degradação de diversos peptídeos biologicamente ativos, entre eles os PNs. A inibição da NEP, além de oferecer um novo alvo terapêutico para pacientes com insuficiência cardíaca, poderia representar uma potencial estratégia de melhoria em pacientes com DRC.

A ideia de inibir a neprilisina não é muito recente, mas os primeiros medicamentos utilizados como inibidores tiveram uma alta incidência de angioedema (MESSERLI; NUSSBERGER, 2000). Com a inibição da NEP há uma maior biodisponibilidade dos PNs, o que resulta em aumento da diurese e da excreção de sódio. Além disso, há um impacto sobre o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) porque a angiotensina II, principal efetor do sistema, é um substrato para NEP. Algumas moléculas como o LCZ696 que combina um inibidor da neprilisina – sacubitril, com um antagonista do receptor da angiotensina II – valsartan, têm apresentado efeitos promissores no tratamento de hipertensão arterial e insuficiência cardíaca. A expectativa é de que efeitos igualmente positivos possam ocorrer em pacientes com DRC.

Assim, estudos que possibilitem avanços na elucidação das características bioquímicas e papel fisiológico de enzimas como a neprilisina, são fundamentais para o entendimento de sua função nos organismos vivos. Após a compreensão dos mecanismos envolvidos na atuação da NEP, é possível explanar aplicações na perspectiva terapêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares e renais. Dessa forma, neste trabalho buscou-se evidenciar a importância da neprilisina no contexto fisiológico e contemplar seu papel na vigência de insultos cardiorrenais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi elaborado a partir de uma revisão da literatura na base de dados PubMed, considerando artigos publicados no período entre 2012 e 2017, além de outros artigos mais antigos, contendo definições e evidências relevantes para esta revisão. As palavras-chave utilizadas foram “neprilysin”, “chronic kidney disease” e “heart failure”.

Foram critérios de exclusão: artigos que apresentavam duplicidade na base de dados, ou seja, apareciam duas vezes nos resultados da busca. Foram encontrados 467 artigos. Após a leitura dos títulos dos artigos, foram selecionados 97 artigos para a leitura do resumo e excluídos os que não diziam respeito ao propósito deste estudo. Após a leitura dos resumos, foram selecionados 30 artigos que preenchiam os critérios inicialmente propostos e que foram lidos na íntegra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para compreender o papel da neprilisina nas doenças cardiorrenais, inicialmente foi feita uma abordagem sobre a síntese, estrutura e função desta enzima, bem como seu mecanismo de ação. E por fim, de que forma a inibição da neprilisina pode funcionar como um alvo terapêutico.

Síntese, estrutura e função

A neprilisina (NEP) também identificada como endopeptidase neutra, é o principal componente das membranas de borda em escova do rim (GEORGE; KENNY, 1973), também está presente no encéfalo e em outros tecidos, entretanto em menor quantidade. É pertencente a subfamília 13 de melatonina peptidase e constituída por 749 resíduos de aminoácidos, com um átomo de zinco para a atividade catalítica, além de um domínio transmembranar e um domínio intracelular curto (BAYES-GENIS; BARALLAT; RICHARDS, 2016), (Figura 1).

Figura 1 - (A) Molécula da neprilisina (branco) envolvendo inteiramente o peptídeo natriurético do tipo C (PNC) (laranja). (B) Uma visão expandida da cavidade interior da neprilisina (verde) e do sítio catalítico (amarelo). Modificada de Bayes-Genis et al (2016).

A principal importância da NEP é devido ao seu potencial de degradar uma série de peptídeos endógenos vasodilatadores como peptídeos natriuréticos (CRUDEN et al, 2004), bradicinina (RADEMAKER et al, 1996) e adrenomedulina (WILKINSON et al, 2001) e exercer uma função importante na desativação da sinalização de peptídeos na superfície celular.

O gene NEP, está situado no cromossomo 3q25.1-q25.2 sendo constituído por 24 éxons (KUBIAK-WLEKLY; NIEMIR, 2009) dos quais vinte exons curtos (de 4-23) agem no fragmento extracelular da enzima, e o exon 24 agindo na codificação de 32 aminoácidos carboxi-terminal da proteína e as sequências 3' não traduzidas (D'ADAMIO; SHIPP;

MASTELLER, et al, 1989). A sequência de pentapeptídeos (His-Glu-Ile-Thr-His) está correlacionada ao ligamento de metaloprotease zinco com a catálise de substrato no exon 19 (D'ADAMIO; SHIPP; MASTELLER, et al, 1989). A conservação substancial de suas sequências não traduzidas de 5' e a presença de splicing alternativo 5' são plausíveis com o controle diferencial da expressão de NEP durante o desenvolvimento e regulação específica de tecido (D'ADAMIO; SHIPP; MASTELLER, et al, 1989).

Mecanismo de ação

Como já dito, a NEP é uma zinco-metaloprotease endotelial que hidrolisa de maneira eficaz a bradicinina, o fator natriurético atrial, as angiotensinas I e II, substância P, endorfinas e neurotensina. A inibição isolada da NEP não provoca redução significativa da pressão arterial. Isso pode ser explicado pelo fato de existir interação com o metabolismo de outros peptídeos vasoconstritores como a angiotensina II (FRANCISCO; BOMBIG, 2011).

Segundo Salgado et al., 2011, esta metaloprotease tem um papel importante no metabolismo da bradicinina e do peptídeo natriurético, os quais podem atuar como vasodilatadores e natriuréticos, assim como podem ter efeitos antitróficos cardíacos e vasculares. A inibição da NEP poderia potencializar os efeitos benéficos dos peptídeos natriuréticos e exercer efeitos favoráveis no tratamento de doenças cardiovasculares. A NEP metaboliza a bradicinina e também converte angiotensina-I em angiotensina 1-7 e participa da metabolização de angiotensina II. A inibição deste processo de conversão, aumenta o substrato para conversão alternativa de angiotensina-II (BAYES-GENIS et al., 2016).

O efeito dos peptídeos natriuréticos é controlado pela ação da NEP, que inativa as moléculas do peptídeo. Dessa forma, agentes que possam inibir as endopeptidases podem promover o aumento da duração do efeito dos peptídeos natriuréticos (FRANCISCO; BOMBIG, 2011). A neprilisina é responsável pela clivagem proteolítica inicial do peptídeo natriurético tipo A (PNA) e do peptídeo natriurético tipo C (PNC). Nos seres humanos, o peptídeo natriurético tipo B (PNB) é relativamente resistente à degradação pela NEP (BAYES-GENIS et al., 2016), isso se deve a caudas N- e C- terminais estendidas, o que reflete numa meia-vida significativamente mais longa (PANKOW et al., 2009).

Estudos mostram que além da forma da NEP ligada à membrana, amplamente distribuída nos tecidos, ela também existe em uma forma circulante que conserva a atividade catalítica (RICHARDS, 2015). Nesse mesmo contexto, Bayes-Genis et al., 2016, afirmam que os terminais amino e carboxi dos peptídeos natriuréticos alteram seu acesso e orientação dentro da fenda catalítica e, juntamente com a sequência de resíduos do motivo circular de 17 membros, determinam a eficácia da catálise de peptídeos.

A NEP é expressa em fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, e parece ser mais importante do que a enzima conversora da angiotensina (ECA) na depuração da bradicinina cardíaca. Em contraste, a ECA está presente em grande quantidade em células endoteliais (BAYES-GENIS et al., 2016). A ECA e a NEP são peptidases que podem agir em diferentes substratos e, sabe-se que há uma interação complexa entre inibição da ECA e inibição da NEP. A ECA e a NEP metabolizam a bradicinina; o efeito da inibição simultânea da NEP e da ECA resulta em maior aumento dos níveis de bradicinina, redução da formação de angiotensina 1-7 e aumento dos níveis de angiotensina II (SALGADO et al., 2011).

Alvo terapêutico

A doença renal crônica (DRC) é um dos principais problemas de saúde pública

mundial, apresentando altas taxas de morbimortalidade, principalmente quando associada a insuficiência cardíaca (IC). As complicações decorrentes da coexistência da DRC e IC refletem uma síndrome cardiorrenal, uma vez que se tem paralelamente uma perda de função do coração e dos rins (MARTINS et al, 2011). As estratégias terapêuticas utilizadas atualmente buscam evitar a progressão dessas comorbidades e evitar danos irreversíveis. Assim, a busca por novos alvos terapêuticos tem despertado o interesse para moléculas vasoativas, como é o caso dos peptídeos natriuréticos e endopeptidases.

Tendo em vista que os PNs são um substrato importante para a NEP, houve uma extensiva investigação com inibidores seletivos de NEP. Os PNs atuam através de receptores acoplados a guanil-ciclase A - pGC-A, receptor do peptídeo natriurético A (RPN-A) e B - pGC-B, receptor do peptídeo natriurético B (NPR-B). Através da ativação do cGMP e das vias de sinalização subjacentes, os PNs medeiam ações benéficas. Com a inibição da NEP as ações biológicas dos PNs são amplificadas. Em um modelo de insuficiência cardíaca experimental foi demonstrado que os efeitos natriuréticos observados após a inibição da NEP é dependente da ativação do SRAA (CHEN et al 1999), o que reflete na necessidade de se considerar o SRAA diante da inibição da NEP.

Nessa perspectiva, agentes que combinam inibidores da NEP e inibidores da ECA foram desenvolvidos, incluindo omapatrilato, fasidotril, sampatrilato e mixanpril, porém devido ao desenvolvimento de angiodema, os ensaios clínicos com estas drogas foram descontinuados (PACKER et al, 2002). Uma alternativa a estes fármacos foi a combinação de inibidores da NEP com antagonistas de receptor de angiotensina II, como o LCZ696 (VON LUEDER, 2013). O LCZ696 apresenta mais efeitos benéficos e reduz os riscos causados pela inibição da NEP (LI et al, 2017) e foi aprovado para uso pelas últimas diretrizes de tratamento de insuficiência cardíaca na Europa e nos EUA (KHDER et al., 2017).

Por outro lado, DRC e IC cursam em paralelo, isso se deve a uma série de mecanismos, incluindo hipertensão e doenças cardíacas estruturais, como hipertrofia ventricular esquerda. Por isso, é sugerido que essa combinação de inibidores da NEP com antagonistas de receptor de angiotensina II poderia beneficiar os pacientes com DRC, de forma a retardar a progressão da DRC e reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Atualmente, o LCZ696 está sendo estudado em indivíduos com DRC (JUDGE et al, 2015).

4. CONCLUSÃO

Abordagens acerca da neprilisina como alvo terapêutico são antigas, porém os primeiros compostos utilizados para inibir a NEP apresentavam efeitos colaterais graves. Com a intensificação dos estudos e o interesse por peptídeos vasoativos, foi desenvolvido um novo fármaco, o LCZ696, resultado de uma combinação entre um inibidor da NEP com um antagonista de receptor de angiotensina II. O LCZ696, aprovado para tratamento da IC, suporta a ideia de que a inibição da NEP em paralelo a inibição do SRAA tem efeitos mais benéficos e reduz os riscos causados apenas pela inibição da NEP. Contudo, ainda estão sendo realizados estudos em indivíduos com DRC para de fato comprovar sua eficácia frente aos insultos da síndrome cardiorrenal.

5. REFERÊNCIAS

BAYES-GENIS, A.; BARALLAT, J.; RICHARDS, A. M. A Test in Context: Neprilysin. **J**

Am Coll Cardiol. v. 68, n. 6, p. 639-653, 2016.

CRUDEN, N. L. et al. A inibição da endopeptidase neutra aumenta as ações vasculares da bradicinina em pacientes tratados com inibição da enzima conversora da angiotensina. **Hipertensão.** v. 44, p. 913-918, 2004.

D'ADAMIO, L. et al. Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. **Proc Natl Acad Sci.** v.86, p. 7103–7107, 1989.

FRANCISCO, Y.A.; BOMBIG, M. T. N. Inibidores de neprilisina e associações com bloqueadores do sistema renina-angiotensina. **Rev Bras Hipertens.** v. 18, n. 4, p. 153-159, 2011.

GEORGE S.G.; KENNY, A. J. Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney. **Biochem J.** p. 134:43–57, 1973.

JUDGE, P. et al. Neprilysin inhibition in chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant.** v. 30, n. 5, p. 738-43, 2015.

KHDER, Y. et al. Sacubitril/Valsartan (LCZ696) in Heart Failure. **Handb Exp Pharmacol.** v. 243, p. 133-165, 2017.

KUBIAK-WLEKLY, A.; NIEMIR, ZI. Neprilysin--structure of the gene and protein product and the localization of expression. 2009

LI, B. et al. Safety of the neprilysin/renin-angiotensin system inhibitor LCZ696. **Oncotarget.** v. 8, n. 47, p. 83323-83333, 2017.

MARTINS, H. et al. SÍNDROME CARDIO-RENAL: Os Desafios no Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Acta Med Port.** v. 24, p. 285-292, 2011.

MESSERLI, F. H.; NUSSBERGER, J. Vasoepitidase inhibition and angio-edema. **Lancet.** v. 356, n. 9230, p. 608-9, 2000.

MUNEER, K.; NAIR, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and receptor blockers in heart failure and chronic kidney disease - Demystifying controversies. **Indian Heart J.** 2017

PANKOW, K. Structural Substrate Conditions Required for Neutral Endopeptidase-Mediated Natriuretic Peptide Degradation. **J. Mol. Biol.** v. 393, p. 496–503, 2009.

RADEMAKER, M. T. et al. Inibição da endopeptidase neutra: peptídeo natriurético atrial e cerebral aumentado, respostas hemodinâmicas e natriuréticas na insuficiência cardíaca ovina. **Hipertensão**. v. 91, p. 283-291.

RICHARDS, A. M. Plasma Neprilysin Concentrations: A New Prognostic Marker in Heart Failure? **Rev Esp Cardiol**. v. 68, n. 12, p. 1053-1055, 2015.

SALGADO, H. C.; DURAND, M. T.; SALGADO, M. C. O. Bases fisiopatológicas para novos tratamentos em hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**. v. 18, n. 4, p. 137-144. 2011.

SOLOMON, S. D. et al. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: A phase 2 double-blind randomised controlled trial. **The Lancet**. v. 380, n. 9851, p. 1387-1395. 2012.

SULLIVAN, S. et al. Enkephalinase: selective inhibitors and partial characterization. **Peptides**. v. 1, n. 1, p. 31-5, 1980.

TUEGEL, C.; BANSAL, N. Heart failure in patients with kidney disease. **Heart**. v. 103, n. 23, p. 1848-1853.

WILKINSON, I. B. et al. Adrenomedulina (ADM) no leito vascular humano do antebraço: efeito da inibição da endopeptidase neutra e comparação com o péptido de proadrenomedulina com NH2-terminal 20 (PAMP). **Br J Clin Pharmacol**. v. 52, p. 159-164, 2001.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UFPE, ao PPGIT, e aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FACEPE pela realização desta pesquisa.