

José Maria de Queiroz e Lencastre Fleming Torrinha

Inibidores PCSK9

Nova Estratégia para o Tratamento da Hipercolesterolemia



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Inibidores PCSK9

Inibidores PCSK9

José Maria de Queiroz e Lencastre Fleming Torrinha

Inibidores PCSK9

Nova Estratégia para o Tratamento da Hipercolesterolemia

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Inibidores PCSK9

Nova Estratégia para o Tratamento da Hipercolesterolemia

Atesto a originalidade do trabalho:

José Maria de Queiroz e Lencastre Fleming Torrinha

Projeto de Pós-Graduação/ Dissertação
apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas

Orientador:
Prof.^a Doutora Adriana Pimenta

Co-Orientador:
Prof.^a Doutora Renata Souto

Resumo

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morbidade e mortalidade a nível mundial. Neste enquadramento, um dos principais fatores de risco associado às doenças cardiovasculares é a hipercolesterolemia. As opções farmacológicas existentes para o tratamento e prevenção desta dislipidemia centram-se, sobretudo, no uso de fármacos como as estatinas, a ezetimiba, os fibratos, o ácido nicotínico e as resinas sequestradoras de ácidos biliares. Porém, esta abordagem farmacológica no combate da hipercolesterolemia caracteriza-se pelo prolongado período terapêutico decorrendo daí possíveis efeitos laterais a longo prazo, pela intolerância a grupos terapêuticos observada em alguns doentes (como acontece com as estatinas) ou, ainda, pela eficácia limitada de alguns grupos terapêuticos (como é o caso, dos fibratos), o que suscita preocupação. Os avanços científicos no conhecimento dos processos que envolvem a hipocolesterolemia e a incessante procura de fármacos mais seguros e eficazes impulsionou o desenvolvimento dos inibidores da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), afirmando-se como uma nova e promissora estratégia terapêutica. Os níveis plasmáticos elevados de colesterol proveniente das lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL) são um fator de risco, no desenvolvimento de aterosclerose e de doença vascular isquémica. O recetor LDL (R-LDL) é essencial no metabolismo do colesterol, uma vez que ao se ligar ao C-LDL é capaz de eliminá-lo da circulação. É aqui, que reside o principal foco de interesse desta nova estratégia terapêutica, uma vez que a PCSK9 promove a degradação do recetor R-LDL, conduzindo a uma redução da depuração de LDL, aumentando os níveis de colesterol LDL. Desta forma, a inibição da atividade da PCSK9, veio revelar-se como uma nova abordagem potencialmente interessante para o desenvolvimento de novos fármacos destinados à redução do C-LDL. Os anticorpos monoclonais humanos contra PCSK9 estão em desenvolvimento clínico e são, neste momento, a aposta mais promissora de inibição da PCSK9. Até ao momento, os resultados dos ensaios clínicos demonstraram a eficácia destas moléculas com redução do C-LDL na ordem dos 60%. Adicionalmente, os seus efeitos na redução do C-LDL são aditivos aos das estatinas e até à data, não mostraram qualquer efeito tóxico a nível muscular, como acontece com estas últimas, sendo fármacos bem tolerados e aparentemente seguros.

Palavras-chave: doenças cardiovasculares, morbidade/mortalidade, hipercolesterolemia, PCSK9, R-LDL, anticorpos monoclonais humanos, redução do C-LDL, tolerabilidade/segurança.

Abstract

Cardiovascular diseases are a major cause of morbidity and mortality worldwide. In this context, one of the main risk factor associated with cardiovascular disease is hypercholesterolemia. The treatment and prevention of this dyslipidemia is mainly focused on the use of drugs such as statins, ezetimibe, fibrates, nicotinic acid and bile acid sequestrants. However, the pharmacological approach in hypercholesterolemia treatment is characterized by prolonged therapeutic period elapsing possible long-term side effects, by the intolerance to treatment in some patients (as is the case of statins), or by the limited efficacy of various drugs/pharmaceuticals (as for example of fibrates), which raise concerns. Scientific advances in the understanding of hypercholesterolemia and the constant need for safer and more effective drugs prompted the development of the convertase pro-protein subtilisin inhibitor/kexin type 9 (PCSK9), as a promising new therapeutic strategy. Elevated plasma LDL cholesterol (LDL-C) levels are a risk factor for atherosclerosis and ischemic vascular disease. The LDL receptor (LDL-R) has an essential role in the cholesterol metabolism, since it binds to LDL-C removing it from circulation. Here, lies the main focus of interest of this novel therapeutic strategy, since PCSK9 promotes LDL-R the degradation, leading to a reduction of LDL clearance, increasing levels of LDL cholesterol. Therefore, inhibition of PCSK9 activity is a potentially interesting new approach for the development of new drugs to reduce LDL-C. Human monoclonal antibodies against PCSK9 are in clinical development and are presently the most promising strategy for the inhibition of PCSK9. At the moment, results of clinical trials show the efficacy of these molecules with reductions efficiencies of LDL-C in the order of 60%. Furthermore, this LDL-C reduction are additive to those of statins and until now have not shown any toxic effect in muscle, as observed with statins, and have a good record for safety and tolerability.

Key words: cardiovascular diseases, morbidity/mortality, hypercholesterolaemia, PCSK9, R-LDL, human monoclonal antibodies, reduction of LDL-C, tolerability/safety.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. Não sendo viável nomeá-los a todos, há, no entanto, alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

Desta forma, aproveito para agradecer à minha orientadora, Prof.^a Doutora Adriana Pimenta, por todo o apoio prestado, pela simpatia, perseverança e apoio constante demonstrados. Foi uma ajuda constante e essencial na elaboração desta monografia.

À Prof.^a Doutora Renata Souto, pela sua disponibilidade e contribuição como co-orientadora.

Gostaria de agradecer a Deus e à minha família, de forma especial aos meus pais, por todo o esforço, dedicação e confiança que sempre demonstraram, e pelas inúmeras oportunidades de crescimento, que me providenciaram sem nunca deixarem de acreditar em mim e nas minhas capacidades.

Agradeço também à minha namorada, a todos os amigos e colegas que me acompanharam ao longo deste demorado percurso, quer nas longas horas de farra, quer nas curtas horas de estudo intenso e que tantas alegrias e bons momentos me proporcionaram e que irei guardar na memória com grande saudade.

Por fim agradeço a todos os professores que sempre se esforçaram por ser bons profissionais e por transmitir os seus conhecimentos e experiência profissional, para que também eu e os meus colegas possamos ser profissionais dignos e competentes no futuro.

A todos, um muito obrigado!

Índice

1. Introdução	1
2. Metabolismo Lipoproteico	4
3. Lipoproteínas e Apolipoproteínas Plasmáticas	6
4. Vias do Metabolismo Lipoproteico	10
4.1 Via Exógena	11
4.2 Via Endógena	12
4.3 Via do Recetor das LDL.....	13
4.4 Via do Transporte Reverso de Colesterol.....	15
5. Dislipidemias	16
6. Hipercolesterolemia	19
6.1 Diagnóstico Clínico	21
6.2 Causas Genéticas da Hipercolesterolemia Familiar	25
6.3 Gene do Recetor-LDL (R-LDL).....	25
6.4 Gene da ApoB	27
6.5 Gene da PCSK9	28
7. Estratégias Terapêuticas	29
7.1 Estatinas	30
7.1.1 Mecanismo de Ação:	31
7.1.2 Uso Terapêutico.....	32
7.1.3 Efeitos Pleiotrópicos.....	32
7.1.4 Efeitos Adversos.....	33
7.2 Fibratos	34
7.2.1 Mecanismo de Ação	34
7.2.2 Uso Terapêutico.....	35
7.2.3 Efeitos Adversos.....	35
7.3 Ezetimiba	36
7.3.1 Mecanismo de Ação	36
7.3.2 Uso Terapêutico.....	37
7.3.3 Efeitos Adversos.....	37
7.4 Ácido Nicotínico	37
7.4.1 Mecanismo de Ação	38
7.4.2 Uso Terapêutico.....	38
7.4.3 Efeitos Adversos.....	38
7.5 Resinas Sequestradoras de Ácidos Biliares	39
7.5.1 Mecanismos de Ação.....	39
7.5.2 Uso Terapêutico.....	39

7.5.3 Efeitos Adversos.....	39
7.6 Outras Opções Terapêuticas: Inibidores PCSK9.....	40
8. PCSK9	41
8.1 Ligação da PCSK9 ao R-LDL	44
8.2 Inativação Endógena da PCSK9.....	46
8.3 Regulação Dietética e Hormonal da PCSK9	47
8.4 Regulação da PCSK9 pelos Esteróis e pela Terapêutica com Estatinas.....	47
8.5 Efeito da PCSK9 no Metabolismo Lipídico Intestinal	48
8.6 Efeito da PCSK9 na Aterosclerose.....	49
8.7 Efeito da PCSK9 na Inflamação.....	49
8.8 Efeito da PCSK9 na Morte Celular Apoptótica.....	50
8.9 Efeito da PCSK9 na Pressão Sanguínea.....	51
8.10 Efeito da PCSK9 no Metabolismo da Glucose	51
8.11 Efeito da PCSK9 na Adipogênese	51
9. Abordagens para Inibir a PCSK9.....	52
9.1 Silenciamento de Genes.....	52
9.2 Péptidos Miméticos	54
9.3 Anticorpos Monoclonais.....	54
10. Evolocumab.....	56
10.1 Mecanismo de Ação	56
10.2 Farmacocinética Evolocumab.....	57
10.3 Efeitos Adversos.....	59
10.4 Forma de Administração	59
10.5 Indicação Terapêutica.....	59
10.6 Contra Indicações e Precauções Especiais	60
10.7 Fertilidade, Gravidez e Lactação	61
10.8 Avaliação de Eficácia e Segurança do Evolocumab	61
10.8.1 Ensaios Prévios ao OSLER-1	62
10.8.2 Ensaio OSLER-1	63
10.8.3 Ensaios Prévios ao OSLER-2.....	68
10.8.4 Ensaio OSLER-2	70
10.8.5 Ensaios a Decorrer.....	76
10.8.5.1 FOURIER.....	76
11. Alirocumab.....	77
11.1 Mecanismo de Ação	78
11.2 Farmacocinética Alirocumab.....	78
11.3 Efeitos Adversos.....	79
11.4 Indicação Terapêutica.....	79
11.5 Contra Indicações e Precauções Especiais	79
11.6 Avaliação de Eficácia e Segurança do Alirocumab.....	80
11.6.1 ODYSSEY FH I, FH II e HIGH FH	82

11.6.2 ODYSSEY COMBO I e COMBO II	84
11.6.3 ODYSSEY OPTIONS I e OPTIONS II.....	87
11.6.4 ODYSSEY MONO	91
11.6.5 ODYSSEY LONG TERM	93
11.6.6 ODYSSEY ALTERNATIVE	95
11.6.7 ODYSSEY OUTCOMES	97
12. Bococizumab	98
12.1 Ensaios de Fase 3 (SPIRE)	98
13. Conclusão	99
14. Bibliografia.....	102

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular do colesterol	4
Figura 2. Síntese endógena e exógena dos diferentes tipos de colesterol..	5
Figura 3. Esquema representativo da estrutura da LDL.	6
Figura 4. Vias do metabolismo lipoproteico	11
Figura 5. Representação da via exógena do metabolismo lipoproteico	12
Figura 6. Representação da via endógena do metabolismo lipoproteico.	13
Figura 7. Representação da via do R-LDL	14
Figura 8. Representação da via do transporte reverso do colesterol	16
Figura 9. Diversas opções farmacológicas disponíveis e os respetivos mecanismos de ação	30
Figura 10. Representação do mecanismo de ação das estatinas	31
Figura 11. Domínios e ação do gene PCSK9	42
Figura 12. Cromossoma do gene PCSK9.	43
Figura 13. Síntese e função da PCSK9.....	43
Figura 14. Representação do mecanismo de ação da PCSK9 e das estratégias terapêuticas de inibição	44
Figura 15. SREBP-2-mediando a expressão do R-LDL e da PCSK9	48
Figura 16. As diferentes abordagens de inibição da PCSK9 e do seu mecanismo de ação	52
Figura 17. Mecanismo de ação dos mabs (evolocumab).....	57
Figura 18. Ensaio OSLER 1 e 2 e os seus ensaios prévios.	69
Figura 19. Representação percentual do total de participantes do ensaio OSLER-2 que atingiram os níveis propostos de C-LDL < 100 mg/dL e < 70 mg/dL	72
Figura 20. Representação percentual da redução dos diferentes parâmetros avaliados durante o ensaio OSLER-2	72
Figura 21. Representação da redução dos valores de C-LDL obtida para os grupos com terapêutica com evolocumab e padrão.....	75
Figura 22. Ensaio FOURIER.....	77
Figura 23. Representação percentual da redução de C-LDL para os diferentes grupos terapêuticos	95
Figura 24. Redução de C-LDL para os diferentes grupos terapêuticos no ensaio ODYSSEY ALTERNATIVE.	97

Índice de Tabelas

Tabela 1. Características das Lipoproteínas Presentes no Plasma.....	7
Tabela 2. Sistema Americano MED-PED como critério de diagnóstico de FH.....	22
Tabela 3. Critérios de diagnóstico do sistema Simon Broome.....	22
Tabela 4. Representação do sistema Holandês de diagnóstico.....	23
Tabela 5. Genes envolvidos na FH.	25
Tabela 6. Quadro Resumo do Efeito da Farmacoterapia no Perfil Lipídico	40
Tabela 7. Ensaios prévios ao OSLER-1	62
Tabela 8. Representação do ensaio OSLER-1.....	63
Tabela 9. Resultados relativos à redução do C-LDL observada no ensaio OSLER-1. .	64
Tabela 10. Efeitos adversos do ensaio OSLER-1	66
Tabela 11. Representação ensaios prévios ao OSLER-1	69
Tabela 12. Representação do ensaio OSLER-2.....	71
Tabela 13. Representação conjunta do ensaio OSLER (1 e 2).	73
Tabela 14. Representação dos efeitos adversos inerentes ao ensaio OSLER (1 e 2)	74
Tabela 15. Ensaio fase 2 com arilcumab.	80
Tabela 16. Representação dos ensaios ODYSSEY FH I e FH II	82
Tabela 17. Representação da redução do C-LDL nos ensaios ODYSSEY FH I e FH II	83
Tabela 18. Representação dos efeitos adversos observados nos ensaios ODYSSEY FH I e FH II.....	83
Tabela 19. Representação do ensaio ODYSSEY HIGH FH	84
Tabela 20. Representação do ensaio ODYSSEY COMBO I.	85
Tabela 21. Resultados do ensaio COMBO I ao fim de 24 semanas.	85
Tabela 22. Representação do ensaio ODYSSEY COMBO II	86
Tabela 23. Representação dos resultados obtidos no ensaio COMBO II.....	86
Tabela 24. Efeitos adversos observados para os grupos em terapêutica com alirocumab e ezetimiba.....	87
Tabela 25. Representação do ensaio OPTION I.....	88
Tabela 26. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS I para os diferentes grupos terapêuticos	89
Tabela 27. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS I para os diferentes grupos terapêuticos	89
Tabela 28. Representação do ensaio OPTIONS II	89
Tabela 29. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS II para os diferentes grupos terapêuticos	90
Tabela 30. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS II para os diferentes grupos terapêuticos	91
Tabela 31. Representação do ensaio ODYSSEY MONO	91
Tabela 32. Representação dos resultados obtidos para os diversos parâmetros avaliados no ensaio MONO em função dos diferentes grupos terapêuticos	92
Tabela 33. Representação dos efeitos adversos observados no ensaio MONO em função dos diferentes grupos terapêuticos.....	93
Tabela 34. Representação do ensaio ODYSSEY LONG TERM	94
Tabela 35. Representação dos efeitos adversos observados no ensaio ODYSSEY LONG TERM	95
Tabela 36. Representação dos ensaios ODYSSEY ALTERNATIVE	96
Tabela 37. Representação dos ensaios ODYSSEY OUTCOMES	97

Lista Abreviaturas

a.a	Amino ácidos
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ACAT	Enzima acilCoA colesterol aciltransferase
AMG145	Evolocumab
apo	Apolipoproteína
APP	<i>β-site amyloid precursor protein</i>
ARH	Proteína ligante hipercolesterolemia autossômica recessiva
ASO's	Oligonucleótidos <i>anti-sense</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CEPT	Proteína de transferência de ésteres de colesterol, do inglês <i>Cholesterylester transfer protein</i>
Ct	Colestreol total
DCV	Doenças cardiovasculares
Dcv	Doença cerebrovascular
DIC	Doença isquémica do coração
DGAT-2	Diacilglicerol aciltransferase-2
Dutch FH	Sistema Holandês para diagnóstico da hipercolesterolemia, do inglês <i>Dutch familialhypercholesterolaemia diagnostic system</i>
EAM	Enfarte agudo do miocárdio
EGFA	<i>Epidermal growth factor-like repeat homology domain</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ENaC	Canal de sódio epitelial
FCHL	Hiperlipidemia familiar combinada, do inglês <i>Familial Combined Hyperlipidemia</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDB	Deficiência familiar em apoB
FH	Hipercolesterolemia familiar, do inglês <i>familial hypercholesterolaemia</i>
FPP	Farnesilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
HDL	Lipoproteína de elevada densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i>
heFH	Hipercolesterolemia familiar heterozigótica
HMG-CoA redutase	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase
HTG	Hipertrigliceridemia
IFN	Interferão
Iκβ-α	Fator nuclear <i>kappa beta alfa</i>
LCAT	Colesterol aciltransferase, do inglês <i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>
Lp(a)	Lipoproteína a
LPL	Lipoproteína lípase
LRC-CPPT	<i>Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial</i>
mAbs	Anticorpos monoclonais

MED-PED	<i>Make early diagnosis, prevent death on mediocal pedigrees</i>
MTTP	Proteína de transferência de triglicerídeos microssomal, do inglês <i>Triglyceride Transfer protein</i>
MVA	Ácido mevalônico
Nf-κβ	Fator nuclear <i>kappa beta</i>
non-C-HDL	Colesterol lipoproteico de não-alta-densidade
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like 1</i>
OSLER	<i>Open-Label Study of Long-term Evaluation Against LDL-C</i>
oxC-LDL	C-LDL oxidado
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9
PPAR-α	Proliferadores peroxissomais
REGN727	Arilcumab
R-LDL	Recetor das LDL
Simon Broome	Sistema para diagnóstico da hipercolesterolemia, do inglês <i>Simon Broome Heart Research Trust</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOC	Padrão de tratamento no estudo OSLER
SREBP-2	<i>Sterol regulatory element binding protein-2</i>
TG	Triglicerídeos
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UE	União Europeia
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês <i>very low density lipoprotein</i>
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

1. Introdução

Na atualidade as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de mortalidade e de morbidade, a nível mundial. Segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO), o número de pessoas que morreram devido a DCV em 2012 foi de cerca de 17,5 milhões, o que representa cerca de 31% de todas as causas de morte a nível mundial (WHO, 2015).

Na Europa e em Portugal mais concretamente, as DCV, apesar da tendência constante de decréscimo verificada nos últimos anos, continuam a ser consideradas um dos mais importantes problemas de saúde pública. São a principal causa de morte, morbidade, invalidez e anos de vida potencialmente perdidos em Portugal, principalmente atribuídos à doença coronária e ao acidente vascular cerebral (AVC), representando cerca de 30% dos óbitos em 2011, um pesado impacto económico que advém da incapacidade por elas provocada, bem como dos crescentes custos relacionados com o seu tratamento (DGS, 2013; WHO, 2015).

Estes dados vêm realçar a importância do combate às DCV, como é o caso da doença isquémica do coração (DIC) cuja manifestação clínica mais relevante é o enfarte agudo do miocárdio (EAM) e a doença cerebrovascular (Dcv) incluindo o AVC isquémico. Estas patologias, que apesar do elevado impacto que representam a nível da saúde em Portugal, têm nas últimas décadas sofrido uma diminuição no que respeita às suas taxas de mortalidade. Este fenómeno é atribuído a uma conjugação de vários fatores, como a estratégia de prevenção das doenças cérebro-cardiovasculares, onde se destacam, a implementação de estratégias como a lei de cessação tabágica e a legislação sobre a redução de sal no pão (Lei n.º 75/2009). Estas medidas visam também a adoção de estilos de vida saudáveis, evitando os denominados comportamentos de risco, como o tabagismo, e incorporando componentes como o exercício físico e o combate ao sedentarismo, ou o equilíbrio da dieta e o combate à obesidade. Outras estratégias passam pela melhoria no diagnóstico e correção de fatores de risco como a hipertensão arterial ou a dislipidemia (alteração no metabolismo dos lípidos) e a diabetes, e pelos avanços científicos no tratamento das duas situações clínicas associadas a maior mortalidade: o EAM e o AVC (DGS, 2013).

Importa em primeira instância perceber então que cerca de cerca de 90% do risco para doença coronária advém de fatores de risco modificáveis segundo Yusuf *et al.* (2004), sendo que por esse mesmo motivo, qualquer estratégia de combate às DCV deve sempre passar pelo controle dos fatores de risco *major* e que podem ser modificados, como é o caso da pressão arterial, colesterol elevado, diabetes e o consumo de tabaco, como tentativa de reduzir, quer a morbidade quer a mortalidade.

Os níveis séricos elevados de colesterol total (Ct) são um fator que contribui para acelerar o processo de formação de placas de aterosclerose, pela deposição excessiva de colesterol nas artérias, aumentando desta forma a incidência de patologias como o EAM, angina e o acidente vascular cerebral, bem como outras patologias cardiovasculares. Os dados publicados pela WHO, referem que cerca de 2,6 milhões de mortes são causadas pela elevação do colesterol (WHO, 2015). Globalmente em 2008 a prevalência de hipercolesterolemia nos adultos foi de 39%, sendo maior na Europa, com cerca de 54% em ambos os géneros, seguido da América com 48% e por último África com 22,6% e de 29,0% no Sudoeste Asiático (WHO, 2015).

Segundo a WHO verifica-se também uma maior prevalência de níveis elevados de colesterol total (Ct) nos países desenvolvidos onde cerca de 50% dos adultos apresenta níveis de colesterol aumentados, em comparação com os 25% verificados na população adulta oriunda dos países em vias de desenvolvimento, podendo assim concluir-se, que há uma ligação direta entre a prevalência de níveis elevados de colesterol total e o nível económico de cada país ou região do globo (WHO, 2015).

Atendendo ao impacto devastador das doenças cardiovasculares a nível mundial e partindo do pressuposto, que reduzindo os principais fatores de risco das DCV, como é o caso dos níveis elevados de Ct, poder-se-á reduzir a incidência deste tipo de patologias, aliado à relevância desta patologia na vivência profissional, sendo o farmacêutico deparado com cada vez mais casos de doença e novos pedidos de esclarecimento, devendo o profissional de farmácia estar preparado para responder aos desafios diários, conhecendo as diferentes opções terapêuticas disponíveis no mercado, bem como os respetivos mecanismos de ação, a segurança da administração para cada utente com as suas particularidades de saúde e dos efeitos secundários possíveis, de

forma a informar o utente e incrementar a adesão terapêutica por parte do mesmo. Surge então o interesse pelo estudo mais aprofundado do metabolismo lipoproteico, pretendendo-se realizar um trabalho detalhado das estratégias terapêuticas emergentes e inovadoras como são o caso dos inibidores da proproteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), sobretudo e mais concretamente da terapêutica com anticorpos monoclonais contra a PCSK9, fazendo uma breve introdução sobre os seus avanços clínicos e o seu mecanismo de ação, bem como uma análise dos principais resultados dos estudos clínicos mais pertinentes, os efeitos adversos observados e a sua importância clínica na realidade atual. Este trabalho aborda ainda a epidemiologia da hipercolesterolemia, a fisiologia da doença e as principais características dos fármacos mais utilizados.

A presente dissertação é um trabalho de revisão bibliográfica, tendo a pesquisa efetuada sido baseada em motores de busca de artigos científicos como *Science Direct* e *Pubmed*; e também através de fontes credíveis como: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. (INFARMED), Direção-Geral da Saúde (DGS), e Organização Mundial de Saúde (WHO). Foi ainda realizada pesquisa em livros, revistas e publicações periódicas de revistas, tendo sido dada maior relevância às publicações de maior impacto e mais atuais, havendo para tal, sido aplicados filtros aos resultados desta pesquisa, de forma a identificar os artigos mais importantes para a realização desta tese, como datarem entre 1990 e 2015 ou estarem publicados em língua inglesa e portuguesa.

2. Metabolismo Lipoproteico

Os lípidos exercem diversas funções no organismo, tanto a nível biológico, como precursores de hormonas, bem como a nível funcional e estrutural, ao nível das membranas celulares e ainda como reserva energética (Rifai *et al.*, 1999). O colesterol tem também a característica mecânica de conferir força, fluidez e estabilidade à membrana, reduzindo também a permeabilidade desta à água, a pequenas moléculas e gases. Estruturalmente o colesterol é composto por 3 regiões funcionais essenciais e que são fundamentais para o funcionamento das membranas: uma estrutura anelar esteroide rígida composta por 4 anéis hidrocarbonados característicos e identificativos desta molécula. Três dos anéis hidrocarbonados são formados por 6 carbonos e um outro por 5, estando ligados em orientação *trans* criando uma estrutura plana e rígida. A molécula possui 2 substituintes metilo nas posições 10 e 13 orientados em *cis*, um pequeno grupo hidrofílico 3β – hidroxilo que torna o colesterol um álcool, conferindo-lhe alguma solubilidade em água (a combinação da estrutura anelar esteroide e o grupo hidroxilo, conferem-lhe a denominação de esterol) na posição 3 e uma pequena cadeia hidrocarbonada ligada ao anel na posição 17, composta por átomos de carbono e hidrogénio conferindo-lhe, como acontece com a região anelar, propriedades apolares (figura1) (Róg e Pasenkiewicz-Gierula, 2001).

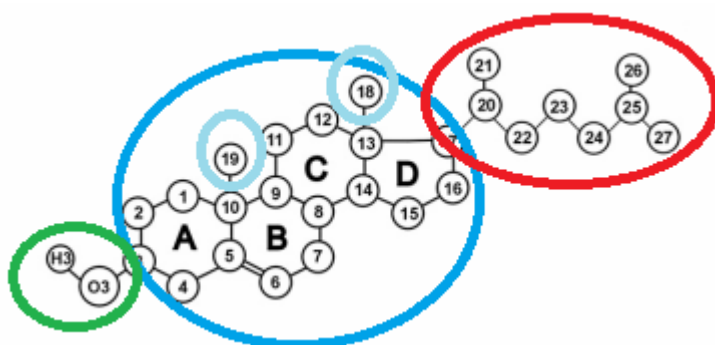


Figura 1. Estrutura molecular do colesterol. Estrutura 4 anéis esteroide, 2 substituintes metilo orientados em *cis*, grupo hidroxilo, cadeia hidrocarbonada. (Adaptado de Róg e Pasenkiewicz-Gierula, 2001).

O colesterol é obtido por duas vias distintas, através da síntese celular, o denominado colesterol endógeno produzido no fígado e que representa cerca de 70% do colesterol total, e o colesterol que é obtido através da dieta normal do indivíduo pela ingestão de

alimentos de origem animal, ovos e produtos lácteos, representando aproximadamente 30% do Ct, também denominado de colesterol exógeno (Shepherd, 2001).

Enquanto que o colesterol endógeno é produzido no fígado, por seu turno o colesterol exógeno necessita de ser primeiramente absorvido pelo intestino, a fim de ser transportado até ao fígado onde será posteriormente metabolizado e conduzido até aos tecidos adjacentes por forma a ser utilizado pelas células para o seu normal funcionamento (figura 2). O colesterol em excesso no organismo tem tendência para se acumular nas paredes arteriais, onde forma placas de aterosclerose, o que dificulta a circulação do sangue nos vasos sanguíneos (Carrageta, 2010).

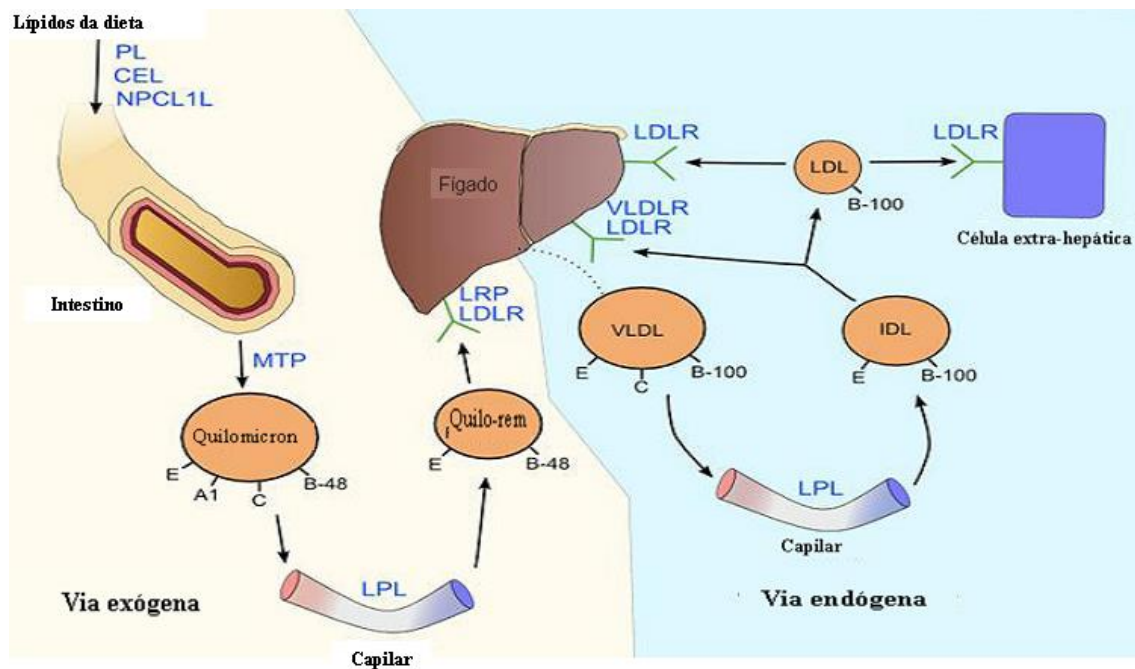


Figura 2. Síntese endógena e exógena dos diferentes tipos de colesterol. (Adaptado de Daniels *et al.*, 2009.).
 Legenda: lipase pancreática (PL), lipase carboxil éster (CEL), proteína Niemanm-pickc1-like1 (NPCL1L), proteína transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP), lipoproteína lipase (LPL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) recetor de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-R), lipoproteína de baixa densidade (LDL), recetor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL) lipoproteína de densidade intermédia (IDL), recetor da proteína derivada das lipoproteínas (LRP), apolipoproteína A1 (A1), apolipoproteína B-48 (B-48), apolipoproteína B-100 (B-100), apolipoproteína C (C), apolipoproteína E (E).

O colesterol devido às suas propriedades estruturais e físico-químicas é uma molécula hidrofóbica, sendo consequentemente insolúvel no sangue. Será necessário então, que seja transportado pelas denominadas lipoproteínas, que não são mais que complexos lipo-proteicos, como a seguir é exposto.

3. Lipoproteínas e Apolipoproteínas Plasmáticas

As lipoproteínas como o próprio nome deixa antever, são complexos de proteínas e lípidos, possuindo uma estrutura geralmente esférica, sendo internamente constituída por lípidos apolares, como os ésteres de colesterol e triglicerídeos e externamente por lípidos polares como fosfolípidos, apolipoproteínas e colesterol livre (figura 3) (Galton *et al.*, 2005). As principais lipoproteínas do plasma humano podem ser organizadas em 6 classes (Tabela 1), sendo estas a seguir apresentadas por ordem crescente de densidade e decrescente de tamanho; os quilomicrons, a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), a lipoproteína de densidade intermédia (IDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína (a) (Lp(a)), a lipoproteína de elevada densidade (HDL) (Gaw, 2004; Belo *et al.*, 2009). Como tal os quilomicrons, VLDL, IDL, LDL e Lp(a) são moléculas grandes, de baixa densidade e ricas em lípidos, enquanto que a HDL é uma molécula pequena, de elevada densidade, sendo uma molécula rica em proteína. Os quilomicrons e VLDL são associados aos valores de triglicerídeos plasmáticos e a LDL aos valores plasmáticos de colesterol, sendo esta última a lipoproteína mais abundante no sangue e encontrando-se estruturalmente relacionada com Lp(a) devido à composição química semelhante entre ambas (Belo *et al.*, 2009).

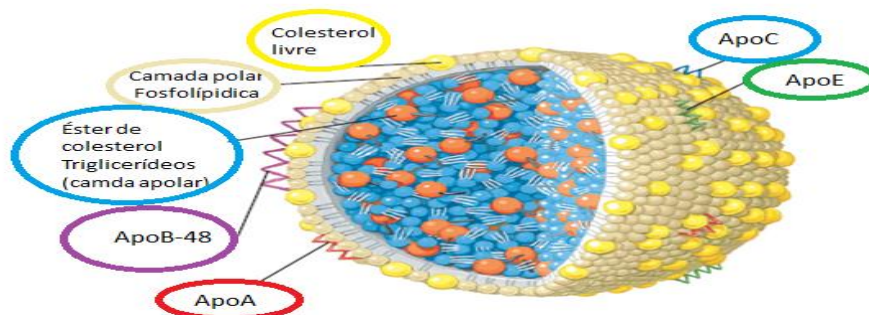


Figura 3. Esquema representativo da estrutura da LDL. (Adaptado de Raffa *et al.*, 2005). **Legenda:** Apolipoproteína A (**ApoA**), apolipoproteína B-48 (**ApoB-48**), apolipoproteína C (**ApoC**), apolipoproteína E (**ApoE**).

Tabela 1. Características das Lipoproteínas Presentes no Plasma (Adaptado de Rifai et al., 1999).

Lipoproteína	Densidade (g/ml)	Diâmetro (nm)	Local de síntese	Principais Lípidos Transportados	Apolipoproteínas
Quilomicrons	<0,96	75 - 1200	Intestino	TG e colesterol exógenos	A1; B-48; C1; C2; C3
VLDL	0,96 – 1,006	30 - 80	Fígado	TG endógenos	B100; C1; C2; C3; E
IDL	1,006 -1,019	25 - 35	Fígado	TG endógenos e ésteres de colesterol	B100; E
LDL	1,019 - 1,063	19 - 25	Fígado	Ésteres de colesterol	B100
HDL	1,063 - 1,210	05-12	Fígado e intestino	Fosfolípidos	A1; A2
Lp(a)	1,040 - 1,130	25 - 30	Fígado	Ésteres de colesterol e fosfolípidos	B100

Legenda: VLDL – lipoproteínas de muita baixa densidade; IDL – Lipoproteínas de densidade intermédia; LDL – Lipoproteínas de baixa densidade; HDL – Lipoproteínas de alta densidade; Lp(a) – Lipoproteína (a).

A Lp(a) é sintetizada a nível hepático, contudo a sua síntese ocorre por uma via distinta de VLDL, o que faz com que a sua concentração plasmática seja totalmente independente de fatores moldáveis, tais como, o exercício físico e a dieta por exemplo.

Deste modo níveis plasmáticos elevados de Lp(a) são um fator de risco para as doenças cardiovasculares e de ordem genética.

As apolipoproteínas (apo) são o resultado da associação das lipoproteínas com proteínas, encontrando-se localizadas na membrana das lipoproteínas, apresentam tamanho variável (50 a 4500 aminoácidos), tendo como característica principal o facto de terem propriedades anfipáticas, apresentando tanto regiões hidrofílicas como hidrofóbicas, o que lhes confere a capacidade de se ligarem tanto a moléculas de carácter lipídico, como é o caso das lipoproteínas, como a moléculas de carácter

hidrofílico, como são, por exemplo, as moléculas de água do meio que as rodeia. Devido a esta natureza anfílica, as apolipoproteínas atuam como detergentes das proteínas, sendo determinantes quer no tamanho quer na estabilidade estrutural das lipoproteínas, sendo curioso verificar, que as lipoproteínas só são sintetizadas pelo fígado, ou secretadas no intestino quando possuem as respetivas apolipoproteínas. (Schumaker, 1994).

As lipoproteínas atuam sobretudo como mediadores do metabolismo lipoproteico, exercendo a sua função como ligandos para os diferentes recetores celulares, bem como co-fatores para enzimas envolvidas no metabolismo. As apolipoproteínas são identificáveis e diferenciáveis entre si devido ao seu peso molecular e função (German *et al.*, 2006).

Apolipoproteína (A) (apoA) possui baixo peso molecular e duas isoformas (A1 e A2), sendo que importa realçar que a apoA1 é a principal proteína das HDL, ocorrendo a sua síntese paralelamente no fígado e no intestino, desempenhando um importante papel, quer como co-fator para a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima esta que é a responsável pela esterificação do colesterol livre nas partículas de HDL, quer no transporte reverso do colesterol atuando como um ligando no *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) – transportador que promove o efluxo de colesterol livre e fosfolípidos das células (German *et al.*, 2006).

Apolipoproteína B (apoB) apresenta duas isoformas – apoB48 e a apoB100, ambas com peso molecular e tamanho diferente, sendo que as diferenças se estendem também aos respetivos locais de síntese, uma vez que a apoB48 é sintetizada no intestino e encontra-se apenas nas quilomicrons, o mesmo não se verifica para a apoB100, sendo esta última sintetizada no fígado e encontra-se presente nas VLDL, nas IDL e LDL, o que no caso das LDL assume especial relevo, pois é diretamente responsável pela ligação das LDL aos recetores celulares, ocorrendo a sua entrada nas células, em especial nos hepatócitos (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

As 4 isoformas da apolipoproteína C (apoC) (C1, C2, C3 e C4) são uma família de pequenas apolipoproteínas, atuam na regulação do metabolismo dos TG e influenciam em relação inversa os níveis de TG e HDL. As apoC são sintetizadas no fígado e secretadas na circulação (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína D (apoD) não possui uma estrutura típica das apolipoproteínas, pertencendo à classe das lipocalinas, classe essa que inclui também proteína ligante-retinol, lactoglobulina e uteroglobulina. As apoD são responsáveis pelo transporte de pequenos ligandos hidrofóbicos, que possuem grande afinidade para o ácido araquidônico. A apoD encontra-se em variados e diversos tecidos como o fígado, intestino, pâncreas, rins, placenta entre outros (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína E (apoE) desempenha um papel importantíssimo como componente estrutural e funcional das HDL, e sobretudo no metabolismo do colesterol. Quando ligada aos recetores da LDL medeia a eliminação de quilomicrons e VLDL circulantes no sangue. Encontra-se presente nas quilomicrons, VLDL, IDL e em menor concentração nas HDL (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína (apoF) encontra-se presente quer nas HDL como nas LDL. A Apo F é sintetizada no fígado (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína H (apoH) também denominada de Beta-2-glicoproteína. Liga-se a várias substâncias carregadas negativamente como a cardioplipina, heparina e sulfato de dextrina, podendo prevenir a ativação da cascata de coagulação sanguínea através da sua ligação aos fosfolípidos presentes na superfície das células danificadas (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína J (apoJ) também conhecida como clusterina, possui cerca de 30% dos denominados carboidratos N-ligantes, ricos em ácido siálico, conferindo-lhe atividade ligante não específica para diversos locais hidrofóbicos de diferentes proteínas e também para recetores específicos existentes na superfície celular (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

A apolipoproteína L (apoL) é composta por 6 genes distintos nos humanos, contudo a classe mais estudada e melhor conhecida é a apoL1, que codifica para o fator tripanolítico, provocando a lise da espécie patogénica *Trypanosoma brucei*, quando ocorrem infeções sanguíneas por este patogénio (Vanhamme *et al.*, 2003), a apoL têm ainda a capacidade de iniciar a morte celular programada das células hospedeiras (Liu *et al.* 2005; Vanhollebeke e Pays, 2006), tendo recentemente demonstrado certas funções intracelulares, provocando a morte autofágica das células humanas (Wan *et al.*, 2008), em situações de necessidade de reciclar o conteúdo celular e de desnutrição ou fome extremas. Os genes apoL são regulados por múltiplas moléculas sinalizadoras pró – inflamatórias, casos do interferão alfa (IFN α), interferão beta (IFN β) e do interferão gama (IFN γ), bem como do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) a regulação de todos estes fatores, é indicativa da possível atividade da apoL a nível do sistema imunitário (Monajemi *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2005; Sana *et al.*, 2005).

A apolipoproteína M (apoM) pode ser encontrada sobretudo nas HDL, mas também, nas VLDL e LDL. Uma característica interessante desta molécula prende-se com o facto de ela ser em cerca de 19 % homóloga com a apoD outra apolipoproteína pertencente à família das lipocalinas. A apoM tem também a capacidade de se ligar a pequenas moléculas hidrofóbicas como são o caso das moléculas de retinol e de ácido retinóico. A apoM é sintetizada no fígado e rins (Gaw, 2004; German *et al.*, 2006).

4. Vias do Metabolismo Lipoproteico

Uma das principais funções das lipoproteínas centra-se no transporte através da circulação sanguínea quer de TG quer de colesterol. O metabolismo lípoproteico ocorre sobretudo em dois mecanismos, a nível exógeno quando ocorre absorção e transporte de lípidos de origem dietética e a nível endógeno quando esse transporte se refere a lípidos de origem hepática (síntese de colesterol) (figura 4) (Guimarães *et al.*, 2006)

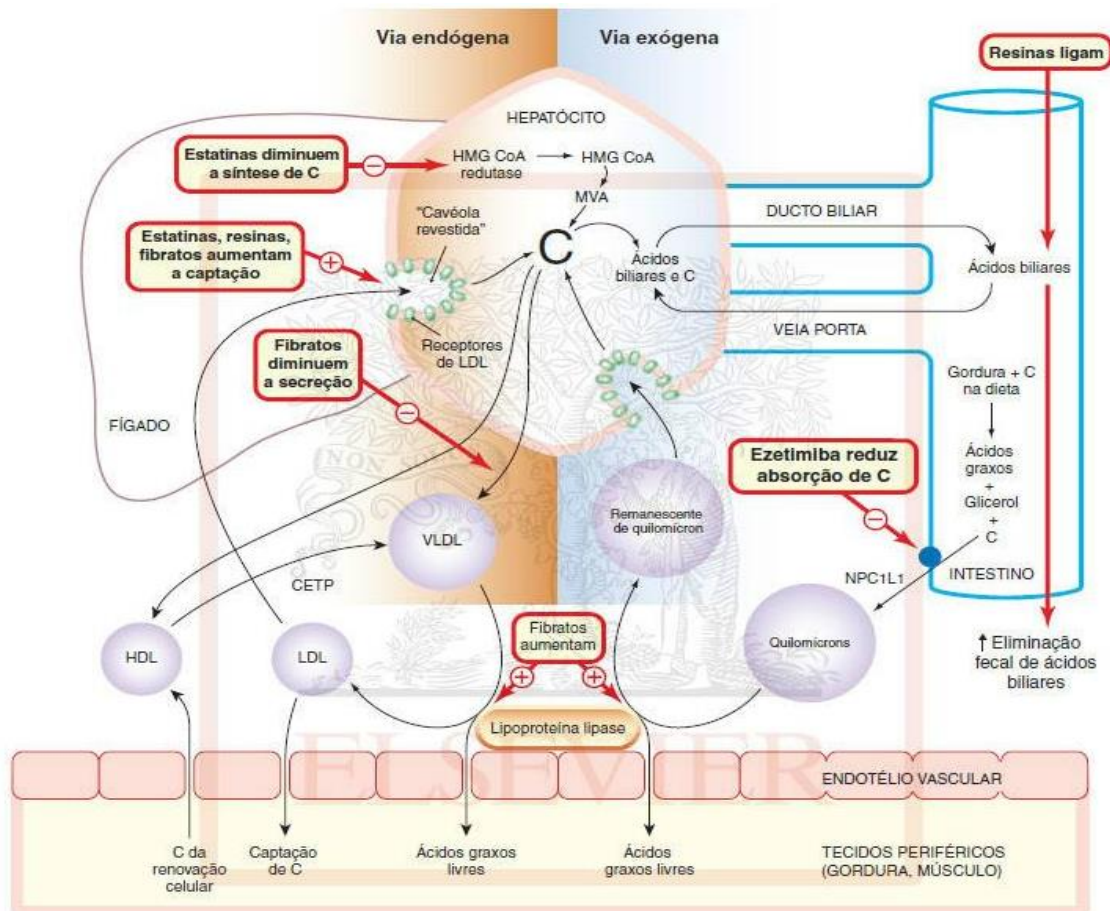


Figura 4. Vias do metabolismo lipoproteico. (Retirado Rang e Dale, 2012) **Legenda:** ácidos gordos livres (ácidos graxos livres), colesterol (C), *cholesterol ester transfer protein* (CETP), proteína ácido mevalônico (MVA), proteína *niemann-pick C1-like1* (NPC1L1), lipoproteína de elevada densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL).

Existem ainda outras duas vias do metabolismo lipoproteico a ter em conta e que são a via do recetor das LDL e a via do transporte reverso do colesterol (condução do colesterol da periferia até aos tecidos) (Guimarães *et al.*, 2006).

4.1 Via Exógena – Nesta via os TG e o colesterol exógeno são primeiramente absorvidos a nível intestinal pela mucosa, sendo posteriormente integrados em grandes lipoproteínas como é o caso das quilomícrons remanescentes, que são ricos em TG, apo B-48, apoA e pobres em colesterol, mas que ao entrarem em circulação, por um mecanismo de exocitose vão incorporar apoE e C (C1, C2 e C3) das HDL (figura 5) (Goldstein *et al.*, 1995).

A apoC2 presente na superfície dos quilomícrons vai por seu turno permitir a ativação da enzima lipoproteína lipase (LPL) da superfície das células endoteliais, dando assim

início ao processo de hidrólise dos TG em ácidos gordos livres e glicerol (Bourbon e Rato, 2006).

Desta forma os ácidos gordos obtidos são captados pelas células musculares e por ligação à albumina plasmática, são utilizados como fonte de energia pelas células musculares ou armazenados nas células adiposas sob a forma de TG, ou ainda reutilizados pelo fígado a fim de sintetizar novas lipoproteínas. Algumas moléculas de fosfolípidos e apoA são transferidas dos quilomicrons para as HDL, estes quilomicrons remanescentes são mais pobres em TG e mais ricos em colesterol. Estes podem ser reconhecidos por recetores hepáticos específicos e por um processo de endocitose são sequestrados da corrente sanguínea, sendo o seu conteúdo de seguida hidrolisado nos lisossomas. Por seu turno o colesterol libertado é transformado em sais biliares, incorporado em novas lipoproteínas recentemente formadas ou pode ainda ser armazenado sob a forma de esteres de colesterol. Por fim, desempenha ainda um papel de destaque uma vez que é responsável pela regulação da atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) – enzima limitante da biossíntese de colesterol (Goldstein *et al.*, 1995; Bourbon e Rato, 2006).

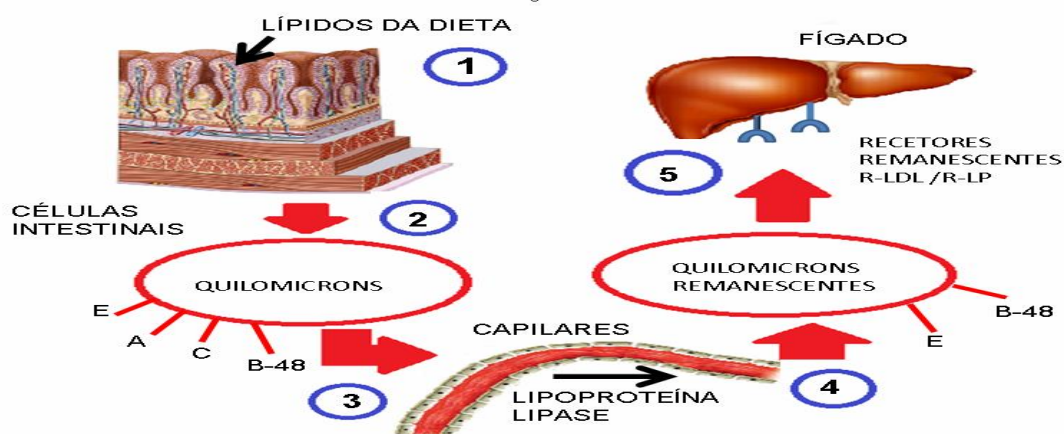


Figura 5. Representação da via exógena do metabolismo lipoproteico. (Adaptado de Daniels *et al.*, 2009).
 Legenda: apoE (E), apoA (A), apoC (C), apo B-48 (B-48), recetor LDL (R-LDL), recetor LP (R-LP).

4.2 Via Endógena – Os hepatócitos sintetizam o colesterol e TG a partir de hidratos de carbono e ácidos gordos, necessitando para tal da ativação da enzima HMG-CoA redutase. De forma similar ao que acontece na via exógena os TG e colesterol passam para o espaço extracelular por endocitose, e deste para a circulação, onde são

hidrolisados pelas enzimas LPL, passando assim a VLDL. Estas lipoproteínas contêm apoB-100, apoE e uma quantidade reduzida de Apo C (Apo C2 sobretudo) à superfície, sendo todas elas importantes para o seu metabolismo (Rifai *et al.*, 1999). Ocorre então a hidrólise dos TG das VLDL, por ativação das LPL das células endoteliais mediada pela apoC2 presente na superfície das VLDL, resultando novamente na transferência das apoC para as HDL, ocorrendo a sua transformação em VLDL remanescentes, sendo algumas destas novas partículas captadas por recetores hepáticos e as restantes convertidas em partículas cada vez mais pequenas e densas, conhecidas como IDL. Estas podem acabar por ser removidas da circulação juntamente com as VLDL, por ligação com recetores hepáticos específicos, ou podem, por outro lado, sofrer hidrólises constantes, onde os TG e as apolipoproteínas, à exceção da apoB-100, são transferidas para outras lipoproteínas e convertidas de IDL em LDL (figura 6) (Goldstein *et al.*, 1995; Rifai *et al.*, 1999).

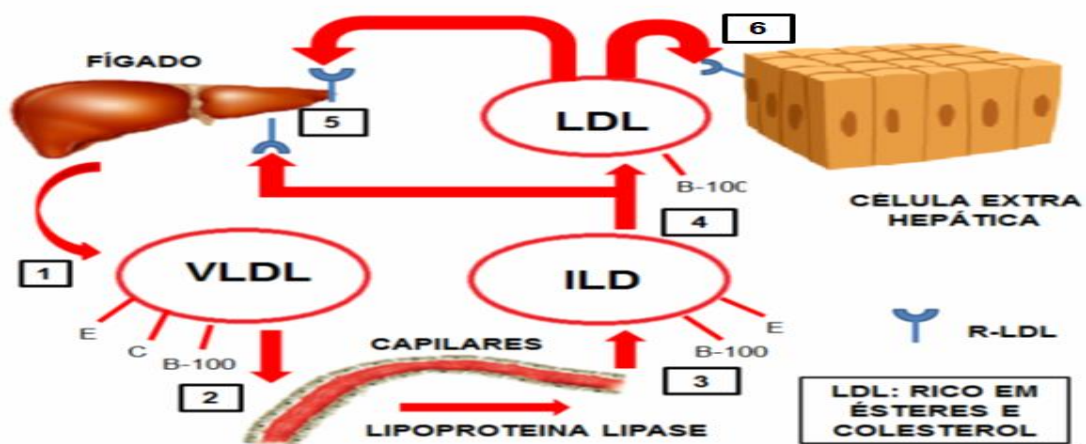


Figura 6. Representação da via endógena do metabolismo lipoproteico. (Adaptado de Daniels *et al.*, 2009.)
Legenda: apoE (E), apoB-100 (B-100), apoC (C), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermédia (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL).

4.3 Via do Recetor das LDL – O recetor das LDL (R-LDL) é uma glicoproteína de superfície que reconhece a apoB-100 e a apoE, sendo através deste recetor que as LDL são removidas da corrente sanguínea, importa também referir que a afinidade deste recetor é maior para a apoE do que para a apoB, por este mesmo motivo é que as LDL permanecem mais tempo no plasma comparativamente com outras lipoproteínas (Rifai *et al.*, 1999).

O R-LDL ao reconhecer a apoB-100 na superfície da LDL liga-se a esta, ocorrendo, desta forma, a sua posterior incorporação em vesículas de clatrina, por processo de endocitose. Durante o processo de internalização a membrana de clatrina dissocia-se originando o endossoma. Como resultado da diminuição do pH no endossoma, a partícula de LDL dissocia-se do seu recetor, sendo este último reenviado para a superfície da célula, podendo assim iniciar um novo ciclo de endocitose (figura 7). Ao mesmo tempo a partícula de LDL migra para um lisossoma, ocorrendo a degradação da apoB-100 em pequenos péptidos e aminoácidos. Os ésteres de colesterol também eles são hidrolisados e convertidos em colesterol, que irá ficar disponível para ser utilizado por exemplo, na síntese de membranas celulares, hormonas esteroides e ácidos biliares. Contudo existe uma outra fração da LDL que não é removida pelos recetores, em vez disso é direcionada para os tecidos extra-hepáticos através de um processo denominado *scavenger* e que é efetuado pelos macrófagos, que são capazes de reconhecer as LDL oxidadas, retirando-as da corrente sanguínea e transformam-se nas conhecidas *foam cells*, sendo que esta é tida como a causa primária da aterosclerose (Wasan et al., 2008)

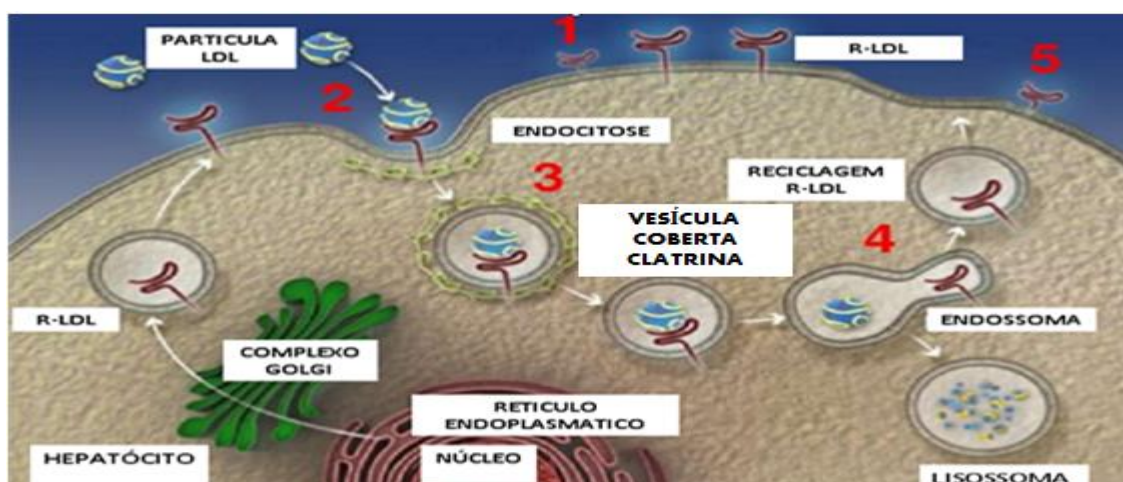


Figura 7. Representação da via do R-LDL. (Adaptado de Regeneron Pharmaceuticals, 2013). **Legenda:** Recetor lipoproteínas de baixa densidade (R-LDL), lipoproteína baixa densidade (LDL).

O metabolismo do colesterol ocorre de acordo com um mecanismo *feed-back* negativo, onde os níveis de colesterol são regulados pelo hepatócito. Assim sendo, o excesso de colesterol intracelular no hepatócito, promove uma diminuição da síntese do colesterol endógeno, resultante da inibição da enzima HMG-CoA redutase. Por outro lado, a ativação da enzima acilCoA colesterol aciltransferase (ACAT), ou inibição da síntese de novos

recetores de LDL através da supressão da transcrição do seu gene promove um aumento da formação de ésteres de colesterol (Rifai *et al.*, 1999).

4.4 Via do Transporte Reverso de Colesterol

O colesterol livre que se encontra em células extra-hepáticas, pode por esta via ser transferido para o fígado e ser excretado na forma de ácidos biliares presentes na bÍlis. As HDL são constituídas essencialmente por apoA1 e fosfolípidos, podendo ser secretadas pelo fígado ou sintetizadas diretamente pelo intestino, sob a forma de HDL remanescentes. Na presença desta apoA1 que vai servir de co-fator, o colesterol livre, pode ser transferido para as HDL, sendo esterificado por ação da enzima LCAT (Wasan *et al.*, 2008).

Sequencialmente os ésteres de colesterol podem então ser transferidos para lipoproteínas constituídas por apoB-100 através da ação da proteína de transferência de ésteres de colesterol. O colesterol das HDL é reduzido através da permuta deste com TG contidos nas lipoproteínas ricas em TG, como é o caso dos quilomicrons, VLDL e remanescentes. A transferência dos ésteres de colesterol para o fígado pode ocorrer por três mecanismos distintos e possíveis; 1- os ésteres de colesterol são retirados das HDL por recetores hepáticos (*scavenger recetor*) que removem deste modo o conteúdo em colesterol destas lipoproteínas, regressando as HDL à circulação; 2 – por intermédio da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CEPT), dado que os ésteres de colesterol são desta forma captados por lipoproteínas contendo apoB-100 e depois removidos através da via de recetores das LDL; 3- de outro modo através dos recetores hepáticos remanescentes, por reconhecimento e ligação à apoE presente nas HDL (Ohashi *et al.*, 2005; Wasan *et al.*, 2008).

O mecanismo reverso de transporte de colesterol permite a remoção de colesterol das células, diminuindo o risco de progressão e desenvolvimento do processo aterosclerótico, do mesmo modo que um aumento dos níveis HDL ou apoA1 pode reverter este processo aterosclerótico, acelerando o efluxo do colesterol (figura 8) (Wasan *et al.*, 2008).

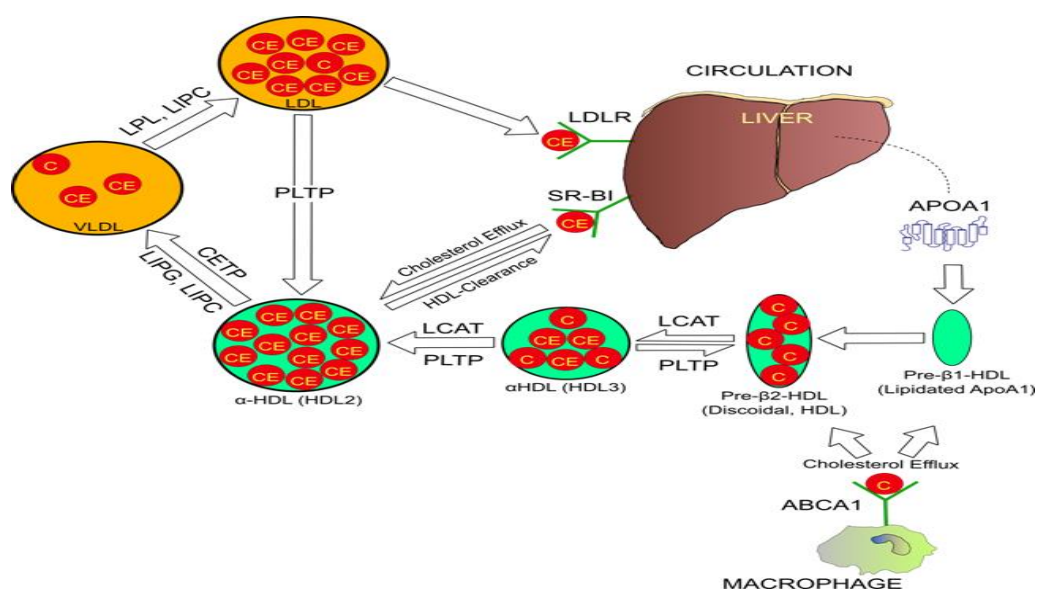


Figura 8. Representação da via do transporte reverso do colesterol. (Retirado de Daniels *et al.*, 2009) **Legenda:** colesterol (C), éster de colesterol (CE), lipase endotelial (LIPG), lipase hepática (LIPC), *cholesterol ester transfer protein* (CEPT), *ATP binding cassette transporter number 1* (ABCA1), *scavenger receptor classe B type 1* (SR-BI), *lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT), *phospholipid transfer protein* (PLTP), lipoproteína lipase (LPL), apolipoproteína A1 (APOA1), lipoproteína de elevada densidade alfa (α -HDL), lipoproteína de elevada densidade pré beta 2 (pré- β 2-HDL), lipoproteína de elevada densidade beta 1 (pré- β 1-HDL), efluxo de colesterol (cholesterol efflux).

5. Dislipidemias

O colesterol é o componente maioritário das membranas plasmáticas animais, sendo um precursor metabólico de hormonas esteroides, regulando um grande número de funções biológicas, como é o caso do metabolismo dos hidratos de carbono e também o desenvolvimento sexual, sendo ainda que sob a forma de ésteres de colesterol, este adquire ainda maior importância como constituinte das lipoproteínas do plasma sanguíneo (Ohashi *et al.*, 2005)

Quando há um desequilíbrio no balanço dos níveis de colesterol, em que a quantidade de colesterol sintetizado e a quantidade de colesterol proveniente da dieta, excedem os níveis requeridos de colesterol para o desempenho das funções biológicas normais do organismo, as moléculas de colesterol vão inevitavelmente depositar-se ao nível dos vasos sanguíneos, originando as placas ateroscleróticas, que reduzem o calibre dos vasos sanguíneos, dificultando o afluxo de sangue aos diferentes órgãos e tecidos (Ohashi *et al.*, 2005).

Quando pela mesma razão o sangue oxigenado não atinge em quantidade suficiente o músculo cardíaco, pode desencadear angina de peito, que no caso de essa obstrução ser total e se localizar na artéria coronária, pode inclusivamente resultar em enfarte agudo do miocárdio (Ohashi et al., 2005; Wasan et al., 2008).

Segundo determinam as sociedades europeia e portuguesa de cardiologia, o valor total de colesterol total (Ct) deve encontrar-se abaixo dos 190 mg/dL e que o valor de c-LDL deverá ser inferior a 115 mg/dL, contudo no caso de pessoas com alto risco cardiovascular e diabéticos, recomenda-se que os níveis de Ct permaneçam em valores inferiores a 175 mg/dl e no caso dos níveis de C-LDL permaneçam abaixo de 100 mg/dL. No que concerne aos níveis de lipoproteínas de elevada densidade HDL, os valores de C-HDL referenciados como normais para indivíduos do sexo masculino devem ser superiores a 45 mg/dL, no caso de indivíduos do sexo feminino esses mesmos valores de C-HDL devem situar-se acima dos 40 mg/dL.

As dislipidemias também denominadas de hiperlipidemias ou hiperlipoproteínemias resultam de um distúrbio do metabolismo lipídico, independentemente da fase em que esse mesmo distúrbio ocorre, pode ter como consequência alterações nos níveis, ou nas funções das lipoproteínas plasmáticas, que podem por si só aumentar o risco de desenvolver aterosclerose, sobretudo se ocorrerem em concomitância com outros fatores de risco (Guimarães et al., 2006).

As dislipidemias podem abarcar um largo espectro de diversas patologias lipídicas. São classificadas de uma forma geral, em dois grandes grupos apenas, a dislipidemias primárias ou genéticas e as dislipidemias secundárias ou adquiridas. No entanto, as dislipidemias têm frequentemente origem multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos e ambientais (Galton *et al.*, 2005).

As dislipidemias primárias, familiares, ou genéticas, como o próprio nome indica, têm origem de ordem genética. As dislipidemias familiares podem ser de origem monogénica, significando que um único gene apenas é responsável pelo seu fenótipo, ou, por outro lado, pode o seu fenótipo ser o resultado da mutação de diversos genes,

assumindo neste caso a denominação de dislipidemia familiar poligénica (Bourbon e Rato., 2006). As dislipidemias familiares são ainda agrupadas segundo a Sociedade Europeia de Aterosclerose, da seguinte forma:

- 1) **Hipercolesterolemia.** Que consiste em níveis elevados de colesterol, ocorrendo quando há um excesso de colesterol no organismo. Os níveis elevados de colesterol aumentam o risco de doenças cardiovasculares.

- 2) **Hipertrigliceridemia (HTG).** Consiste em níveis elevados de triglicerídeos, na grande maioria das vezes esta situação é provocada por diabetes mellitus não controlada, hipotireoidismo, consumo excessivo de álcool, obesidade e hábitos sedentários. Esta condição é um fator de risco de doença arterial coronária. A hipertrigliceridemia é normalmente assintomática, até os triglicerídeos atingirem valores superiores a 1000-2000 mg/dL. Os sintomas mais comuns são: sintomas gastrointestinais (dores no peito e costas, náuseas e vômitos), sintomas respiratórios (dispneia), sintomas dermatológicos (xantomas) e sintomas oftalmológicos (*arcus cornealis*). De acordo com o *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)* os níveis normais de TG deverão situar-se <150 mg/dL (Pejic e Lee, 2006).

- 3) **Hiperlipidemia familiar combinada (FCHL).** A FCHL foi inicialmente descrita como uma desordem lipídica autossomal hereditária em 1973 por Goldstein *et al.* (1995). A FCH é a forma mais comum das desordens lipídicas hereditárias, com uma prevalência estimada de 1,0% a 2,0% na população geral e de 10% a 20% em sobreviventes de enfarte do miocárdio. A FCHL caracteriza-se por elevações das concentrações plasmáticas de Ct e/ou TG, sendo por isso também denominada de “hiperlipidemia múltipla.” Este perfil lipídico está fortemente associado a um decréscimo desfavorável da concentração do C-HDL, uma elevação da concentração de apoB e a uma preponderância de partículas aterogénicas de LDL. Atualmente acredita-se que a FCHL é causada pela sobreprodução hepática de VLDL associada ou

não a uma debilitada *clearance* de lipoproteínas ricas em TG, com origem exógena ou endógena (Gaddi et al., 2007).

As dislipidemias secundárias ou adquiridas encontram-se normalmente associadas a patologias como diabetes *mellitus*, o hipotireoidismo, doenças renal e hepática, no entanto outros fatores externos como são os casos de obesidade, menopausa, dieta rica em ácidos gordos, sedentarismo, tabagismo e alcoolismo são normalmente associados à incidência destas patologias, bem como o uso de determinados fármacos como contraceptivos orais e diuréticos que provocam um aumento dos níveis lipídicos (Guimarães *et al.*, 2006; Melo e Silva, 2007).

6. Hipercolesterolemia

A hipercolesterolemia pode ser de origem monogénica ou poligénica, sendo as de origem poligenética as mais frequentes (85%) (Bourbon e Rato., 2006).

A hipercolesterolemia monogénica é uma patologia autossómica que pode ser de transmissão dominante ou recessiva. A hipercolesterolemia monogénica encontra-se subdividida em quatro grupos: hipercolesterolemia familiar (FH), deficiência familiar em apoB (FDB), hipercolesterolemia autossómica dominante 3 (FH3), hipercolesterolemia autossómica recessiva (ARH). No caso das três primeiras patologias apresentadas, todas possuem uma transmissão autossómica dominante, apresentando fenótipos semelhantes, necessitando para sua identificação que se proceda ao estudo molecular dos diferentes genótipos. A hipercolesterolemia monogénica advém de anomalias em genes tais como, recetor LDL (R-LDL), apoB, pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) e adaptador proteico 1 do recetor das lipoproteínas de baixa densidade (LDLRAP1) (Neil *et al.*, 2000).

A FH consiste então numa dislipidemia, geralmente de transmissão autossómica dominante, é também a dislipidemia monogénica mais comum, sendo que existe na forma heterozigótica e homozigótica, apresentando-se esta última como a forma mais severa da doença apesar de ser também a menos comum. Um indivíduo é homozigótico

quando os alelos provenientes, do seu progenitor masculino e feminino se encontram mutados, por outro lado a terminologia heterozigótico aplica-se, quando apenas um dos alelos é mutado (Hachem *et al.*, 2006). Adicionalmente os indivíduos homozigóticos podem eventualmente herdar alelos com mutações semelhantes quando o mesmo acontece designam-se de homozigóticos verdadeiros, no caso de possuírem duas mutações distintas atribui-se o nome de heterozigótico composto (Neil *et al.*, 2000). A prevalência heterozigótica da FH é de 1/500 na maioria das populações, o que aponta para que em Portugal existam cerca de 20000 indivíduos com esta patologia (Bourbon e Rato, 2006). Indivíduos heterozigóticos apresentam valores de colesterol total 2 a 3 vezes mais elevado do que o de indivíduos normolipidémicos (Soutar e Nauomova, 2007). Nestes casos as patologias como a aterosclerose coronária despoletam a partir da terceira ou quarta década de vida. No que concerne à forma homozigótica da FH, esta apresenta valores de incidência de 1/1 milhão (Soutar e Nauomova, 2007). Indivíduos com FH homozigótica apresentam valores de colesterol total cerca 2 vezes superiores aos apresentados por FH heterozigóticos, podendo atingir valores de Ct entre 650 - 1000 mg/dL. A Doença coronária é uma das patologias que aparecem logo na infância, causando em última instância, em casos em que estes doentes não são tratados convenientemente, a morte por enfarte cardíaco entre a primeira e segunda década de vida (Heath *et al.*, 2001; Soutar e Nauomova, 2007).

A FH caracteriza-se por níveis elevados de LDL, que é a grande responsável pelo transporte do colesterol no plasma, paralelamente ocorre também a deposição de elevados níveis de colesterol quer na pele e tendões, originando os denominados xantomias, bem como nas artérias formando os ateromas, em ambos os casos o colesterol que se deposita nos diferentes reservatórios provém das LDL, por ultimo é também vulgar a existência de historial familiar de hipercolesterolemia e DCV prematura (Myant, 1983).

As mutações no gene do recetor das LDL plasmáticas são a principal causa das FH. Assim sendo e recordando a definição de indivíduos heterozigóticos é possível correlacionar e perceber o motivo destes indivíduos possuírem valores de colesterol total 2 a 3 vezes mais elevado do que o de indivíduos normolipidémicos. Os indivíduos heterozigóticos possuem um alelo normal e um alelo mutante no *locus* do R-LDL,

determinando que as suas células se possam ligar a apenas metade das partículas de LDL, quando comparadas com células de indivíduos normais. No caso de indivíduos homozigóticos, como estes possuem uma mutação nos dois alelos no *locus* do R-LDL, há uma incapacidade total ou quase total da ligação ao R-LDL (Neil *et al.*, 2000; Campos, 2005).

6.1 Diagnóstico Clínico

Com o passar dos anos foram aprovados diversos critérios para o diagnóstico clínico de FH, não havendo ainda consenso nem uniformidade de critérios clínicos a nível mundial, nem tão pouco um critério clínico preditivo de FH, o que leva a que cada país adote critérios distintos para o diagnóstico da FH.

Atualmente são comumente adotados três conjuntos principais de critérios de diagnóstico clínico de FH. O sistema MED-PED (*make early diagnosis, prevent death on medical pedigrees*) utilizado nos Estados Unidos da América (Williams *et al.*, 1993). Os dois restantes são de maior relevância para Portugal, pois são ambos utilizados na Europa. O sistema Holandês para diagnóstico da FH (*Dutch familialhypercholesterolaemia diagnostic system*) efetua uma análise elementar, onde os resultados permitidos são “confirmado”, “provável” ou “possível” (Defesche, 2004). O terceiro sistema é o sistema Simon Broome (do inglês, *Simon Broome Heart Research Trust*) e é utilizado em Portugal à imagem do que acontece no Reino Unido, sendo os resultados permitidos “confirmado” e “possível” (Bourbon e Rato, 2006).

O sistema MED-PED utiliza como critérios de diagnóstico a idade específica dos indivíduos e critérios específicos de parentes dos indivíduos em causa como os valores de Ct. Os valores de Ct obtidos como valores de *cut-off* dos parentes de 1º, 2º ou 3º grau com FH são depois comparados com os valores de *cut-off* da população geral (Tabela 2) (Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Tabela 2. Sistema Americano MED-PED como critério de diagnóstico de FH (Adaptado de Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Idade (anos)	Parente 1º grau com FH (Ct <i>cutpoints</i> mmol/L)	Parente 2º grau com FH (Ct <i>cutpoints</i> mmol/L)	Parente 3º grau com FH (Ct <i>cutpoints</i> mmol/L)	População geral (Ct <i>cutpoints</i> mmol/L)
<20	5,7	5,9	6,2	7,0
20-29	6,2	6,5	6,7	7,5
30-39	7,0	7,2	7,5	8,8
≥40	7,5	7,8	8,0	9,3

Diagnostico: é diagnosticada FH se os níveis de Ct excederem os níveis de *Cut Point*.

O sistema Simon Broome tem em consideração parâmetros como a concentração de colesterol, características clínicas, diagnóstico molecular e o historial familiar de risco de doença coronária cardíaca fatal associada à FH (Tabela 3) (Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Tabela 3. Critérios de diagnóstico do sistema Simon Broome (Adaptado de Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Diagnóstico de FH confirmada	Diagnóstico de FH possível
Colesterol > 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou C-LDL > 189 mg/dL (4,9 mmol/L) nos adultos	Colesterol > 290 mg/dL (7,5 mmol/L) ou C-LDL > 189 mg/dL (4,9 mmol/L) nos adultos
Colesterol > 259 mg/dL (6,7 mmol/L) ou C-LDL > 155 mg/dL (4,0 mmol/L) em crianças com menos de 16 anos	Colesterol > 259 mg/dL (6,7 mmol/L) ou C-LDL > 155 mg/dL (4,0 mmol/L) em crianças com menos de 16 anos
+	+
Xantomas tendinosos nos pacientes ou em parentes em 1º grau (pais, irmãos, filhos), ou em 2º grau (avós, tios, primos)	História Familiar de enfarte do miocárdio antes dos 50 anos de idade num parente de 2º grau ou abaixo dos 60 anos num parente em 1º grau
Ou	Ou
Evidências de ADN de mutação funcional no R-LDL, PCSK9 e apoB	Historia familiar de Ct superior a 290 mg/dL (7,5 mmol/L) em parentes adultos de 1º e 2º grau ou superior a 6.7 mmol/L em filhos ou irmãos com idade inferior a 16 anos

O sistema Holandês de diagnóstico advém de modificações do sistema Simon-Broome. A principal razão para se ter desenvolvido este sistema surge pelo facto de o critério de diagnóstico Simon-Broome basear a deteção de FH no historial pessoal e familiar, examinação física e dados laboratoriais, contudo não atribui grande relevância aos efeitos moleculares da FH. É então desenvolvido o critério Holandês (tabela 4) (Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Tabela 4. Representação do sistema Holandês de diagnóstico (Adaptado de Al-Rasadi *et al.*, 2014).

Historia familiar	Resultado	Historia clínica	Resultado	Exame físico	Resultado
Parentes em 1º grau com doença prematura coronária e/ou vascular (homens ≤ 55 anos e ≤ 60 anos mulheres)	1	Pacientes com doença arterial coronária prematura (homens 55 anos e ≤ 60 anos mulheres)	2	Xantomas tendinosos	6
Ou		Pacientes com doença com doença vascular periférica ou cerebral prematura (homens ≤ 55 anos e ≤ 60 anos mulheres)	1	<i>Arcus cornealis</i> em idade ≤45 anos	4
Parentes de 1º grau com C-LDL ≥ 95 percentil para idade e sexo					C-LDL ≥8.5 (330) (mmol/L) (mg/dL)
Parentes de 1º grau com xantema tendinoso e/ou <i>arcus cornealis</i>	2			C-LDL 6.5 - 8.4 (250 - 329) (mmol/L) (mg/dL)	5
Ou				C-LDL 5.0 - 6.4 (190 - 249) (mmol/L) (mg/dL)	3
Crianças de idade ≤ 18 anos e C-LDL ≥ 95 percentil para idade e sexo					C-LDL 4.0 - 4.9 (155 189) (mmol/L) (mg/dL)
				Análise ADN – mutações funcionais R-LDL, APOB e PCSK9	8
Estratificação			Pontuação		
Hipercolesterolemia familiar definitiva			> 8		
Hipercolesterolemia familiar provável			6-8		
Hipercolesterolemia familiar possível			3- 5		
Hipercolesterolemia familiar improvável			<3		

É então necessário que os critérios de diagnóstico de FH sejam acompanhados de outras especificações, baseadas na história clínica e familiar do indivíduo, sinais físicos e marcadores bioquímicos. Apesar de muitas vezes valores elevados de Ct ou C-LDL serem de grande utilidade no diagnóstico clínico, não é possível de forma alguma

menosprezar fatores tais como, a historia familiar de hipercolesterolemia, sobretudo no que concerne à FH em crianças, depósitos de colesterol em tecidos extra vasculares, como acontece com os já mencionados xantomas, especialmente xantomas tendinosos e a acumulação de gordura a nível ocular, mais concretamente na córnea e que se dá o nome de *arcus cornealis*, ainda assim há que ter alguma precaução na avaliação destes dois últimos fatores, uma vez que frequentemente são também observados em pessoas de idade avançada, importa também salientar a importância da historia, quer familiar quer pessoal, de doença cardiovascular prematura (Soutar e Nauomova, 2007). Sabe-se ainda que indivíduos com FH, apresentam níveis de TG dentro do normal, podendo, todavia, alguns indivíduos apresentar valores acima do recomendado, devendo-se este aumento à influência exercida por certos fatores ambientais como são o caso da obesidade, álcool, diabetes, podendo ainda dever-se esta alteração à interação entre genes e a mutações no gene do R-LDL originando diferentes graus de atividade do recetor (Myant, 1993).

No entanto, há certos problemas, que se apresentam e que não são resolúveis através do diagnóstico clínico, sobretudo tendo em conta que através do diagnóstico clínico não é possível distinguir indivíduos com diferentes formas de FH, quer estas se devam a alterações no gene do LDLR, que é o caso mais comum, ou a alterações em diferentes genes, bem como no caso da hipercolesterolemia de origem não genética. Existem ainda casos em que os indivíduos apresentam um fenótipo menos severo de FH, ou até mesmo casos em que o fenótipo pode ser menos acentuado, o que acontece com frequência em casos pediátricos, sendo que em todos estes casos os indivíduos envolvidos podem não ser levados em conta por este tipo de diagnóstico. Contudo este tipo de diagnóstico de FH baseado na aplicação de diferentes critérios apresenta várias vantagens, destacando-se o baixo custo a ele associado, pelo que para sua aplicação apenas se necessita da recolha das informações clínicas tidas com pertinentes, de determinações lipídicas que as suportem e de um exame físico (Myant, 1983; Soutar e Nauomova, 2007).

Surge assim e face à incapacidade do diagnóstico clínico de resolver todas as questões e problemas decorrentes da FH, a necessidade de aprofundar o estudo molecular e as causas genéticas da FH, para que se possa não só compreender melhor esta patologia,

mas também prestar uma melhor assistência médica e farmacológica aos indivíduos que padecem da mesma.

6.2 Causas Genéticas da Hipercolesterolemia Familiar

A FH é como referido anteriormente uma das quatro patologias que compõem a hipercolesterolemia monogénica, tendo em 1938 Muller identificado a FH como sendo um único defeito genético de transmissão autossómica dominante. Todavia só mais de quarenta anos volvidos é que Goldstein e Brown são galardoados em 1985 com o premio Nobel, devido ao desenvolvimento de estudos acerca de regulação do metabolismo do colesterol, que vieram provar que a causa da FH era um defeito hereditário no gene que provoca a ausência parcial ou total de recetores das LDL que sejam funcionais.

Atualmente sabemos que a causa mais comum de FH são as mutações no gene R-LDL, representando mais de metade dos casos totais, contudo as mutações nos genes apoB e mais recentemente da pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) são igualmente fatores a reter e caracterizam também a base molecular da FH e que serão posteriormente abordados (tabela 5) (van Aalst-Cohen *et al.*, 2004; Fouchier *et al.*, 2005).

Tabela 5. Genes envolvidos na FH. (Adaptado de Rader et al. 2003).

Gene Alterado	Transmissão	Prevalência	Alteração Provocada
	Autossómica Dominante		
R-LDL	Heterozigótica	1/500	↓ Eliminação de LDL (MP)
	Homozigótica	1/1x10 ⁶	↑ Produção de LDL (MS)
ApoB	Heterozigótica	1/200 - 1/1000	↓ Eliminação de LDL
	Homozigótica	1/4x10 ⁶	
PCSK9	Heterozigótica	<1/2500	↓ Eliminação de LDL
			↑ Produção de LDL

Legenda: ↓ – Diminuição; ↑ – Aumento; MP – Mecanismo primário; MS – Mecanismo secundário.

6.3 Gene do Recetor-LDL (R-LDL)

A principal causa de FH é a presença de alterações no gene R-LDL (Gene ID NCBI: 3949; NM_000527.4) que se encontra localizado no braço curto do cromossoma 19p13.1-p13.3. Quando ocorre a sua tradução é produzida uma glicoproteína de superfície celular à qual é conferida igual designação (R-LDL P01130), que tem cerca de 45 kb de peso molecular, possuindo 860 aminoácidos. O gene R-LDL compreende 18 exões que codificam para os diferentes domínios da proteína, separados por 17 intrões. (Yamamoto *et al.*, 1984).

Estruturalmente a proteína R-LDL é formada por 839 amino ácidos (a.a.) na sua forma madura, já sem o péptido sinal de 21 a.a., constituída por cinco domínios estruturais funcionalmente distintos, podendo atuar de forma diferente (Russell *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1984).

O primeiro exão codifica os 21 a.a. que constituem o péptido sinal, o qual é clivado após a tradução e que desempenha a função de direcionar os recetores sintetizados nos ribossomas para a membrana do retículo endoplasmático, que é local onde a proteína se tornará madura (Russell *et al.*, 1984).

O primeiro domínio (1) do R-LDL é constituído pelo N-terminal, formado pelos exões de 2 a 6 e que codificam sete sequências repetitivas com 40 aa de comprimento, contendo cada uma destas sete sequências, seis resíduos de cisteína. Esta sequência de a.a. constitui o domínio de ligação do recetor ao seu ligando (Russell *et al.*, 1984).

O segundo domínio (2) é formado pelos exões de 7 a 14 e codificam para o domínio homólogo (35% de homologia) ao gene precursor do fator de crescimento epidérmico EGF (*epidermal growth factor*), que atua reciclando o recetor. Possui três “fatores de crescimento”, que são os *repeat* A, B e C, sendo que os *repeat* A e B encontram-se intimamente ligados. Por seu turno o *repeat* C encontra-se separado por um *beta-propeller motif*. O domínio EGF está também envolvido na libertação dos ligandos do recetor (Yamamoto *et al.*, 1984; Sudhof *et al.*, 1985).

O terceiro domínio (3) possui um único exão, que é o exão 15, composto por uma sequência de 58 a.a. Destes, 18 são a.a. de serina ou treonina, pelo que o exão codifica para o domínio de cadeias de hidratos de carbono (Yamamoto *et al.*, 1984; Sudhof *et al.*, 1985).

O quarto domínio (4) é constituído por um total de 22 aa hidrofóbicos, sendo integrados neste domínio o exão 16 e a região 5' do exão 17 e que codificam para o domínio transmembranar da proteína, sendo responsável pelo posicionamento do recetor na membrana celular (Russell *et al.*, 1984).

O quinto e último domínio (5) é formado pelo restante exão 17 e a porção 5' do exão 18, designando-se de domínio citoplasmático. No interior da célula encontra-se o domínio C-terminal, o qual desempenha um papel fulcral na internalização do recetor nas vesículas de clatrina (Russell *et al.*, 1984).

Atualmente estão descritas e conhecem-se diversas mutações no gene do LDLR, onde se incluem casos de grandes rearranjos, introdução de codões *stop* prematuros, substituições de um só a.a., mutações na região promotora afetando a transcrição do gene, bem como mutações no processo de *splicing* do RNA pré-mensageiro (Leigh *et al.*, 2008). Estas mutações estendem-se a todos os 18 exões do gene e inclusivamente ao promotor, o que corresponde a alterações ou anomalias que podem ser tão graves como a síntese de um recetor LDLR não funcional, ou com a sua funcionalidade alterada, falhas na síntese do recetor, incorreta ligação do recetor às LDL. Todas estas mutações variam consoante os indivíduos, os países e as populações, contudo todas elas resultam em aumento dos níveis de colesterol (Medeiros *et al.*, 2010).

6.4 Gene da ApoB

Uma outra variante da FH é a deficiência familiar em apoB (FDB), estando assim associada a alterações no gene da apoB, que se localiza ao nível do braço curto do cromossoma 2, na posição 2p24-p23. Este gene codifica para duas isoformas da apoB, a apoB-100 que é a forma maior com 4536 aa e cerca de 550 kDa de peso molecular, a

forma mais pequena é a apoB-48 com 2152 aa e um peso molecular de aproximadamente 265 kDa (Medeiros *et al.*, 2010). A apoB-100 é o único ligando das LDL, permitindo a ligação da lipoproteína ao recetor, contudo eventuais mutações no gene apoB, na região de ligação ao recetor, podem originar uma apolipoproteína à qual o recetor não se consegue ligar. O gene está organizado em 29 exões e 28 intrões, adquirindo os exões 26 e 29 especial importância, pois é nestes que reside o estudo molecular de apoB em indivíduos com suspeita clínica de FH (Medeiros *et al.*, 2010). A proteína apresenta ainda cinco domínios estruturais, em que o primeiro domínio, constituído por um N-terminal com 1000 aa, e que é extremamente importante para a formação de VLDL, visto que esta interage com a proteína microsomal de triglicéridos (MTP) o outro domínio que interessa realçar é o quarto domínio e que deve a sua importância ao facto de ser responsável pela interação da apoB com os recetores da LDL e paralelamente também pela manutenção da integridade da partícula (Knott *et al.*, 1985; Medeiros *et al.*, 2010). Várias mutações têm sido observadas e identificadas, das quais se destaca a mutação *missense* p.R3527Q, visto ser a mais frequente na Europa (Medeiros *et al.*, 2010). As mutações funcionais no gene apoB, são a segunda causa mais frequente de hipercolesterolemia familiar (Medeiros *et al.*, 2010).

6.5 Gene da PCSK9

Os primeiros indícios de um novo gene causador de FH apareceram em 1999, contudo a descoberta da pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) só foi efetuada em 2003 por Abifadel *et al.* O gene encontra-se localizado no braço do cromossoma 1, é constituído por 12 exões, codificando para a proteína que pertence à subfamília das pró-proteínas convertases, a PCSK9, contendo 692 a.a. e aproximadamente 74 kDa de peso molecular (Abifadel *et al.*, 2003). Esta proteína é responsável pela diminuição atividade do recetor das LDL, decorrente da degradação do recetor das LDL dos hepatócitos, o que irá desta forma afetar os níveis de colesterol plasmático (Sun *et al.*, 2005). Existem dois tipos distintos de mutações conhecidas. As mutações de perda de função do gene, comumente designadas de *loss-of-function*, originam a formação de uma proteína truncada, gerando níveis plasmáticos de LDL mais baixos do que os verificados em indivíduos normolipidémicos, observando-se ainda a diminuição da degradação do recetor LDL e uma proteção contra a doença

coronária prematura. Por outro lado, as mutações de aumento de função do gene, frequentemente designadas de “*gain-of-function*”, associam-se ao aumento dos níveis plasmáticos de LDL para níveis mais elevados do que os verificados para indivíduos normolipidémicos (Abifadel *et al.*, 2003).

O gene PCSK9 tem sido estudado na tentativa de esclarecer e compreender os mecanismos que possam ser responsáveis pelas mutações de perda e ganho de função. Assim a inibição da PCSK9 assume-se como um novo e interessante alvo da indústria farmacêutica (Abifadel *et al.*, 2003).

7. Estratégias Terapêuticas

No combate à hipercolesterolemia e como prevenção primária, devem ser adotados estilos de vida saudáveis, renunciando a hábitos tabágicos, adotando também a prática regular de exercício físico, perda de peso e a opção por uma dieta saudável e sobretudo variada (Delucia *et al.*, 2002).

No caso particular de indivíduos que possuam hipercolesterolemia ou que tenham sofrido de algum evento cardiovascular, é invariavelmente necessário recorrer a uma terapêutica farmacológica que permita reduzir a concentração lipídica, em especial no que se refere ao Ct e C-LDL (Magalhães *et al.*, 2005).

Atualmente no mercado existem várias opções farmacológicas distintas, com mecanismos de ação diferentes, para a diminuição significativa do C-LDL (figura 9). Em primeiro plano, destacam-se os fármacos que atuam promovendo a inibição do colesterol endógeno. Outros mecanismos possíveis consistem: na inibição da absorção intestinal do colesterol da dieta, no aumento da eliminação de ácidos biliares através da biliar, na inibição da lipólise e síntese de triglicérides ou ainda pela ativação da lipoproteína lipase. Inicialmente recorre-se à monoterapia, só se devendo avançar para qualquer tipo de associação farmacológica quando todas as outras opções se tenham revelado infrutíferas. As associações acarretam consigo a necessidade de maior vigilância, visto que poderá haver naturalmente um aumento dos efeitos adversos

associados a terapêutica, sendo habitual a sua observação sobretudo a nível muscular e hepático (Magalhães *et al.*, 2005).

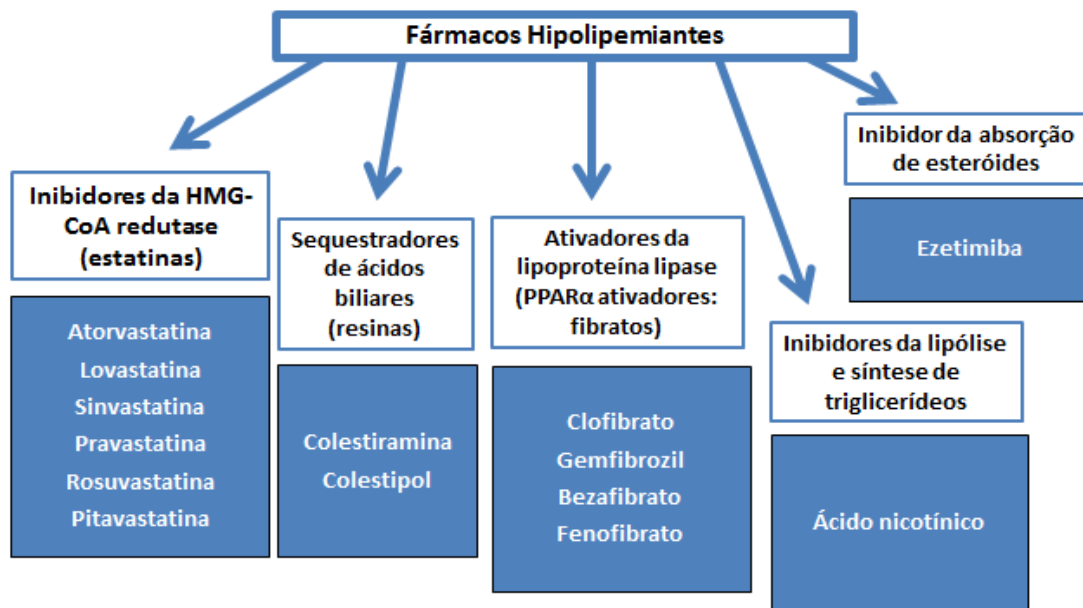


Figura 9. Diversas opções farmacológicas disponíveis e os respetivos mecanismos de ação.

7.1 Estatinas

As estatinas são o grupo de fármacos hipolipemiantes que apresentam maior eficácia na redução do C-LDL (Vaughan e Gotto, 2003).

O uso das estatinas foi aprovado para uso na terapêutica da hipercolesterolemia em 1987 pela *Food and Drug Administration* (FDA), tendo desde então evidenciado em diversos estudos efetuados, a sua elevada eficácia quer na redução de eventos cardiovasculares, quer na prevenção primária, bem como secundária da doença arterial coronária (Sadowitz *et al.*, 2010). Alguns dos fármacos que pertencem a este grupo são a sinvastatina, pravastatina, sendo ambas estatinas semi-sintéticas, e no caso das estatinas sintéticas estão disponíveis para terapêutica a rosuvastatina, atorvastatina, lovastatina, pitavastatina, fluvastatina, entre outros, sendo a terminação “vastatina” uma característica comum e que permite a sua fácil identificação (Davignon *et al.*, 2004). Apesar das estatinas apresentarem semelhanças (tanto a nível da sua estrutura química bem como nos respetivos mecanismos de ação), também apresentam diferenças consideráveis em termos de potência farmacológica, absorção, biodisponibilidade, ligação às proteínas plasmáticas, excreção e solubilidade (Delucia *et al.*, 2002).

7.1.1 Mecanismo de Ação:

As células que sintetizam colesterol expressam a glicoproteína hidroximetilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase) no seu retículo endoplasmático, enzima esta, que se encontra sobretudo no fígado, intestino delgado, glândulas supra-renais e gónadas (Gaw *et al.*, 2004). As estatinas reduzem a síntese do colesterol no fígado atuando na etapa precoce e limitante da via metabólica da síntese de colesterol, funcionando como inibidores específicos, reversíveis, competitivos e dose-dependente da HMG-CoA redutase hepática. Esta enzima é responsável pela conversão, de HMG-CoA a CoA e mevalonato. Este último é um precursor do colesterol, sendo como tal a substância limitante para a biossíntese de colesterol no fígado (Gaw *et al.*, 2004; Mukesh *et al.*, 2005). A inibição da HMG-CoA redutase deve-se ao facto de as estatinas possuírem na molécula uma estrutura análoga à HMG-CoA (substrato natural da enzima). As estatinas bloqueiam o acesso do substrato HMG-CoA ocupando o sítio de ligação do HMG e parte da superfície de ligação para o CoA (Gaw *et al.*, 2004). A elevada capacidade de ligação das estatinas deve-se também ao elevado número de interações de *Van der Waals* entre o inibidor e a HMG-CoA redutase. Paralelamente e como consequência ocorre um aumento da atividade do recetor das LDL, provocando assim também um aumento da remoção de C-LDL, bem como de lipoproteínas de densidade intermédia (IDL) e de VLDL, da corrente sanguínea (figura 10) (Vaughan e Gotto, 2003).

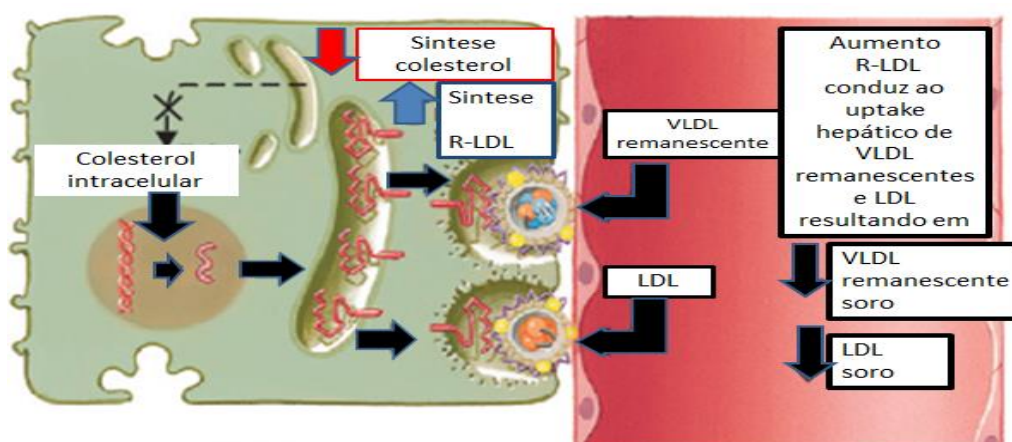


Figura 10. Representação do mecanismo de ação das estatinas. (Retirado de Raffa *et al.*, 2005). **Legenda:** recetor lipoproteínas de baixa densidade (R-LDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL).

7.1.2 Uso Terapêutico

São usadas na prevenção primária da doença arterial em pacientes de alto risco, especialmente se existirem outros fatores de risco de aterosclerose. São usadas nestes casos como fármacos de 1ª linha. São também utilizadas na prevenção secundária do EAM e do AVC em pacientes com sintomas de doença aterosclerótica como angina, acidente isquêmico ou subsequente enfarte do miocárdio ou AVC. As estatinas são ainda muito utilizadas em casos de resistência severa à terapêutica farmacológica, como acontece na hipercolesterolemia familiar homozigótica. O tratamento combinado com ezetimiba é uma opção farmacológica válida e muito utilizada nestes casos. A atorvastatina é utilizada em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica, devido à sua capacidade de redução dos níveis de colesterol plasmático (Rang e Dale, 2012).

7.1.3 Efeitos Pleiotrópicos

Pleiotropia é uma palavra de origem grega e que deriva das palavras *pleio* que significa, muito, e *trepein*, que significa influência, sendo este termo alusivo ao papel atribuído às estatinas, devido aos efeitos que estas apresentam para além do tratamento e da prevenção de problemas cardiovasculares, nomeadamente na imunomodulação, neuroprotecção e senescência celular (Davignon, 2004).

As estatinas pelo papel que desempenham, inibindo a HMG-CoA redutase, podem também inibir a síntese de intermediários isoprenoides, como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranylgeranylpirofosfato (GGPP), que deriva do ácido mevalónico (Davignon, 2004). As estatinas podem ainda ter alguma preponderância na imunomodulação e na melhoria da inflamação, bloqueando os recetores celulares imunitários, pois inibem a transdução de sinal celular, reprimindo a ativação de linfócitos T, bem como pela redução da expressão de moléculas de adesão e proteína C

reativa, ocorrendo também a supressão de citocinas pro-inflamatórias (interleucina, interferão e fator de necrose tumoral (TNF)) (Davignon, 2004).

Os efeitos favoráveis das estatinas estendem-se também aos vasos sanguíneos humanos, alterando o estado redox, pela aparente redução da geração de espécies reativas de oxigênio vasculares. Há ainda estudos que comprovam que as estatinas melhoram a função endotelial em doentes com elevado risco de serem portadores de doenças cardiovasculares (Gaw, A. *et al.*, 2004; Davignon J, 2004).

7.1.4 Efeitos Adversos

Os diferentes estudos até aqui publicados demonstram que as estatinas são além de seguras, bem toleradas, podendo estabelecer-se um a relação muito positiva entre o uso destes fármacos e uma diminuição significativa da morbidade e da mortalidade nos doentes com hipercolesterolemia (Klingenberg e Hansson, 2009).

Apesar de serem raros os efeitos adversos graves associados a estes fármacos, quando utilizados em doses adequadas, mesmo assim existem vários, tais como: cefaleias, parestesia e efeitos gastrointestinais, como dor abdominal, flatulência, diarreia, náuseas ou vômitos, *rash* ou reações de hipersensibilidade, ainda que estes últimos sejam substancialmente mais raros (Reiner, Z. *et al.*, 2011). Encontram-se também descritos sintomas de neuropatia periférica, ainda que não se tenha podido estabelecer uma relação causal definitiva e foram ainda descritos casos de impotência reversível (CADIME, 2009). O efeito adverso mais grave associado ao uso de estatinas é a miopatia, que se refere a qualquer doença dos músculos, quer esta seja adquirida ou herdada podendo manifestar-se em qualquer altura da vida do indivíduo, podendo manifestar através de diversas e distintas condições como por exemplo:

-Mialgia- Quando existe dor, não havendo aumento da enzima muscular ceratinacinase (CK), sendo este o melhor indicador desta patologia, atuando como marcador primário da morte e destruição das células musculares (Pasternak *et al.*, 2002).

-Miosite- Existência de sintomas musculares, acompanhados de um aumento da CK, havendo, contudo, possibilidade da ocorrência de aumento da CK, sem sintomas muscular. Recomenda-se a monitorização da CK durante o tratamento com as estatinas (Pasternak *et al.*, 2002).

-Rabdomiólise- Ocorrência de sintomas musculares graves, caracterizada por um colapso muscular agudo, acompanhados de aumento importante da CK, por norma acima de dez vezes do limite, que leva ao aumento da creatinina com disfunção renal, urina escura e mioglobínúria que poderá conduzir a falência renal irreversível e morte, se não se suspender, de imediato, a estatina (Maron *et al.*, 2000).

Uma situação clara de alerta para ocorrência de rabdomiólise, são os casos de administração concomitante com inibidores do citocromo P450, como é o caso da eritromicina, ciclosporina, ácido nicotínico, anti-retrovirais e anti-fúngicos azólicos, gemfibrozil (e outros fibratos), sendo que este último em associação com a cerivastatina revelou-se uma associação potencialmente fatal, levando a que esta estatina fosse retirada do mercado (Robinson, 2008). As estatinas interferem ainda com algumas substâncias como são o caso da digoxina, de estrogénios e progesterona (Maron *et al.*, 2000), podendo surgir efeitos adversos como náuseas, flatulência, obstipação intestinal, cefaleias, prurido, dores musculares, e raramente aparecem erupções cutâneas, púrpura trombocitopénica e icterícia (Bertram Katzung, 1994).

7.2 Fibratos

O clofibrato e os fármacos que surgiram posteriormente são denominados de derivados do ácido fíbrico (Steiner, 2005) como são o caso do bezafibrato, fenofibrato, etofibrato, genfibrozilo e cipofibrato (Magalhães *et al.*, 2005).

7.2.1 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação dos fibratos é bastante complexo e não se encontra completamente elucidado. Contudo, acredita-se que os seus efeitos se devem à

estimulação dos recetores α activados pelos proliferadores peroxissomais (PPAR- α), o que conduz a um aumento da β -oxidação dos ácidos gordos no fígado, reduzindo o substrato para a síntese dos TG, provocando a conseqüente redução dos valores plasmáticos dos mesmos. Aliado ainda a este facto, também promovem um aumento da síntese das apolipoproteínas AI e AII, conduzindo a um aumento do C-HDL, ocorrendo ainda a degradação das VLDL em LDL, observando-se um ténue decréscimo do C-LDL. Adicionalmente, os fibratos também aumentam a produção e ação da lipoproteína lipase (LPL), que é responsável pelo catabolismo das lipoproteínas ricas em TG, a par da redução da síntese hepática da apoC3, que é responsável por inibir a atividade da enzima (Steiner, 2005).

7.2.2 Uso Terapêutico

Os fibratos são indicados, principalmente, em casos de doentes com dislipidemia mista (níveis elevados de TG e colesterol plasmáticos) ou apenas com hipertrigliceridemia, sendo mesmo os fármacos mais eficazes na diminuição dos níveis de TG (Fiegenbaum e Hutz, 2006). São igualmente utilizados em diabéticos com dislipidemias, provocando um atraso na progressão da doença coronária em doentes com diabetes mellitus tipo 2 ou de síndrome metabólico (Bertram et al., 1994). Os fármacos de segunda geração (desenvolvidos com objetivo de obter propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas bem como menor incidência de efeitos adversos que os fármacos seus antecessores) como fenofibrato, benzafibrato e ciprofibrato, provocam adicionalmente uma redução dos níveis de C-LDL em cerca de 15 a 20 % (Clayton *et al.*, 2002).

Podem ainda ser utilizados na terapêutica da dislipidemia resistente severa em combinação com outros fármacos redutores dos níveis lipídicos. Isto pode, contudo, aumentar o risco de desenvolver rabdomiólise.

7.2.3 Efeitos Adversos

Os fibratos são fármacos geralmente bem tolerados e os efeitos adversos não são frequentes, mas podem ser observados: alterações gastrointestinais, cefaleia, mialgia,

perturbação do sono, alopecia, prurido, erupção cutânea e, muito raramente, leucopenia, aumento do risco de colelitíase, elevação das enzimas hepáticas e a um aumento ligeiro da incidência de tromboembolismo pulmonar e de pancreatite (Reiner et al., 2011). Os fibratos podem em certos casos provocar, um aumento reversível da homocisteína e da creatinina plasmática, contudo não há evidências claras de um aumento do risco de insuficiência renal. Os casos de miosite são pouco frequentes, mas podem ser severos evoluindo para casos de rabdomiólise, com mioglobinúria e insuficiência renal aguda (Rang e Dale, 2012).

Num tratamento com fibratos deve ser evitado o uso de anticoagulantes ou reduzir a concentração dos mesmos, recorrendo ao auxílio do exame do tempo de protrombina, sobretudo se os fármacos utilizados na terapia forem o clorofibrato e o benzafibrato, que podem potenciar a acção dos anticoagulantes orais, deslocando-os dos seus locais de ligação à albumina (Clayton et al., 2002).

7.3 Ezetimiba

Este fármaco foi o primeiro a surgir dentro da classe dos fármacos inibidores seletivos da absorção do colesterol, tendo obtido a aprovação para introdução no mercado por parte da FDA em Outubro de 2002. É atualmente o fármaco mais utilizado pertencente a esta classe, podendo a sua utilização ser feita em monoterapia ou em associação com outras classes de fármacos usados em dislipidemias (Jeu e Cheng, 2003).

7.3.1 Mecanismo de Ação

A ezetimiba pertence à classe dos fármacos que inibem seletivamente a absorção de colesterol, quer este seja proveniente da dieta ou de origem biliar, não interferindo, aparentemente com a absorção de ácidos gordos nem de vitaminas lipossolúveis. A ezetimiba deve a sua função à interação e consequentemente ao bloqueio do transportador *Niemann-Pick C1-like 1* (NPC1L1), localizado na membrana da bordadura em escova das células epiteliais, os denominados enterócitos, do duodeno e do jejuno. A diminuição da absorção intestinal de colesterol provoca uma depleção do

colesterol a nível hepático, assim menos colesterol é produzido para a formação dos quilomicrons (Bays *et al.*, 2008). Paralelamente, verifica-se também, um aumento da densidade de R-LDL no fígado, provocando um incremento na degradação do C-LDL, diminuindo a sua concentração plasmática. Acredita-se ainda, que este fármaco possa inclusivamente interagir com a proteína NPC1L1 hepática, mediando desta forma a regulação da concentração de colesterol circulante (Bays *et al.*, 2008).

7.3.2 Uso Terapêutico

A ezetimiba está indicada no tratamento da hipercolesterolemia primária e hipercolesterolemia familiar heterozigótica, pelo que quando utilizada em monoterapia é indicada, sobretudo, como fármaco de segunda linha, para indivíduos com concentrações elevadas de C-LDL e com intolerância às estatinas, levando a uma diminuição de perto de 20 % nos valores de Ct e de C-LDL (Bruckert *et al.*, 2003). A ezetimiba têm também sido utilizada como fármaco de primeira linha, no tratamento da sitosterolemia (Bruckert *et al.*, 2003).

7.3.3 Efeitos Adversos

A ezetimiba é um fármaco muito bem tolerado, revelando um quadro de reações adversas equivalente ao do placebo (Gagné *et al.*, 2002). Os principais efeitos laterais conhecidos são infeções do trato respiratório superior, cefaleias, lombalgias, dores musculoesqueléticas, artralgias e elevações ligeiras das enzimas hepáticas, não sendo este último efeito, contudo, suficiente para provocar dano hepático. Os valores de CK registados demonstraram semelhanças aos verificados para o placebo (Gagné *et al.*, 2002). Em casos dislipidemia com doença hepática aguda a sua utilização encontra-se desaconselhada. Foram descritos, ainda que episódios raros, de casos de mialgia e rabdomiólise, quando em associação com estatinas.

7.4 Ácido Nicotínico

O ácido nicotínico, também denominado de niacina, ácido piridino-3-carboxílico ou vitamina B3, trata-se de uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, sendo um dos fármacos mais antigos utilizados no tratamento das dislipidemias (Kamanna e Kashyap, 2008).

7.4.1 Mecanismo de Ação

Ainda que não se encontre totalmente esclarecido, acredita-se que o ácido nicotínico exerça a sua ação através de dois mecanismos distintos (Kamanna e Kashyap, 2008). Um destes mecanismos ocorre devido à inibição a nível hepático da diacilglicerol aciltransferase-2 (DGAT-2) uma enzima chave e limitante na síntese dos triglicerídeos, sucedendo-se, um aumento da degradação intra-hepática das apolipoproteínas B e consequentemente, verifica-se uma diminuição da secreção hepática de partículas VLDL e LDL. Observa-se ainda um aumento do C-HDL, resultante da diminuição do catabolismo da apoA1 no fígado (Kamanna e Kashyap, 2008). O segundo mecanismo de ação do ácido nicotínico decorre da sua ligação ao recetor GPR109A, inibindo a adenilciclase, originando uma diminuição intracelular dos níveis do nucleótido adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMP-c), resultando desta depleção, a diminuição da atividade das enzimas lípase hormono-sensível e da lipase adipócito-triacilglicerol, conduzindo em última instância à diminuição da hidrólise dos TG, limitando a síntese hepática de TG por falta de substrato (Vosper, 2009).

7.4.2 Uso Terapêutico

O ácido nicotínico revelou-se como uma alternativa farmacológica bastante válida, no tratamento de diversos quadros clínicos, demonstrando elevada capacidade de redução de eventos coronários, de acidentes vasculares cerebrais e de eventos cardiovasculares em geral, havendo ainda a registar, os efeitos positivos obtidos, na regressão da aterosclerose de artérias coronárias e carótidas (Bruckert *et al.*, 2010).

7.4.3 Efeitos Adversos

De entre os muitos efeitos adversos adjacentes a este fármaco, um dos mais comumente descritos é o *flush* cutâneo (Rang e Dale, 2012).

Encontram-se também amplamente descritos efeitos intestinais, como são os casos de náuseas, vômitos, dispepsia, flatulência, diarreia e agravamento de úlcera péptica, estando neste último caso contra-indicada a utilização deste fármaco. Estes efeitos podem, no entanto, ser ultrapassados se a toma de ácido nicotínico for efetuada após a refeição. (Rang e Dale, 2012).

7.5 Resinas Sequestradoras de Ácidos Biliares

O colestipol, a colestiramina e o colesevelam são os principais fármacos pertencentes a esta classe, também comumente designados de sequestradores, quelantes de ácidos biliares, que independentemente da terminologia aplicada, se caracterizam por serem resinas que promovem a permuta de aniões, de elevado peso molecular e insolúveis em água (Rato, 2010)

7.5.1 Mecanismos de Ação

Estes fármacos possuem um mecanismo de ação simples, que advém do facto de não serem absorvidos no tubo digestivo e de interagirem com os ácidos biliares, ligando-se a estes, promovendo a troca iónica, trocando o ião cloreto por ácidos biliares negativamente carregados, no tubo digestivo, impedindo como tal a sua absorção intestinal e aumentando a sua excreção fecal (Guimarães *et al.*, 2006).

7.5.2 Uso Terapêutico

Este grupo de fármacos encontra-se sobretudo indicado no tratamento de hipercolesterolemias, em que é necessária a redução das concentrações de C-LDL (National Cholesterol Education Program, 2002).

7.5.3 Efeitos Adversos

Pelo facto de as resinas sequestradoras de ácidos biliares não serem absorvidas pelo tubo digestivo, estas apresentam um reduzido número de efeitos adversos, sendo em geral bem toleradas. Contudo apresentam alguns efeitos laterais de natureza gastrointestinal (Davidson *et al.*, 1999).

Fármaco	C-LDL (%)	C-HDL (%)	TG (%)
Estatinas *	↓ 18-55	↑ 5-15	↓ 7-30
Fibratos	↓ 5-20	↑ 10-20	↓ 20-50
Ácido Nicotínico	↓ 5-25	↑ 15-35	20-50
Resinas	↓ 15-30	↑ 3-5	Sem Alteração
Ezetimiba**	↓ 18	↑ 1	↓ 8

Na tabela 6 encontram-se resumidos os efeitos da farmacoterapia no perfil lipídico.

Tabela 6. Quadro Resumo do Efeito da Farmacoterapia no Perfil Lipídico. (Adaptado de Rato, 2010).

Legenda: *Com exceção da Rosuvastatina; **Em monoterapia; ↓ Diminuição; ↑ Aumento.

7.6 Outras Opções Terapêuticas: Inibidores PCSK9

Apesar de todo o potencial e eficácia demonstrado ao longo dos anos pelas principais classes terapêuticas existentes no mercado, sobretudo no caso das estatinas, que são a classe de primeira escolha nos casos das hipercolesterolemias, existem ainda diversas limitações inerentes à sua utilização. A grande limitação das estatinas tem que ver com o facto de cerca de 80% dos doentes de alto risco, não conseguirem atingir o nível imposto de C-LDL <70mg/dL (1,8 mmol/L), nem recorrendo à terapêutica de elevadas doses de estatinas, tornando-se este facto de especial relevância sobretudo no caso de doentes com hipercolesterolemia familiar (Grundy *et al.*, 2004). Convém ainda ter em consideração, que os doentes podem eventualmente ser intolerantes ao uso de estatinas, tornando-se este caso, um fator limitante adicional ao uso das estatinas (Grundy *et al.*, 2004). Devemos igualmente realçar que a administração de elevadas doses de estatinas está associada a um aumento de efeitos adversos como é o caso das câibras musculares e das miopatias que vão da mialgia à altamente fatal rabdomiólise (Harper e Jacobson, 2007).

Por último há ainda que referir que as estatinas promovem a inibição da HMG-CoA redutase, provocando uma depleção dos níveis de colesterol intra-hepático e como consequência ocorre um aumento da atividade do R-LDL provocando assim também um aumento da remoção do C-LDL. Contudo este aumento da regulação do R-LDL ocorre por um mecanismo de ativação transcricional, mediado pelo *Sterol regulatory element binding protein-2* (SREBP-2), sendo acompanhado por um aumento da síntese e secreção da PCSK9, que é também regulado pelo SREBP-2, o que por sua vez irá promover a degradação hepática dos recetores LDL, reduzindo a sua densidade e consequentemente reduzindo a *clearance* de partículas de LDL. Este mecanismo de *feedback* negativo, decorrente do aumento da expressão da PCSK9, promovido pelas estatinas, resulta em última análise num menor efeito hipolipimante (Abifadel *et al.*, 2003; Maxwell *et al.*, 2003; Dubuc *et al.*, 2004).

Atendendo a todas estas limitações apresentadas, fica bem patente a necessidade de utilizar outras alternativas terapêuticas, que possam inclusivamente funcionar como um possível complemento das estratégias farmacológicas em utilização, nomeadamente da terapêutica com estatinas.

Surgiram assim três novas estratégias terapêuticas com o intuito de reduzir os elevados níveis de C-LDL. Estas novas estratégias têm como base de atuação a inibição da PCSK9, da apoB e da proteína de transferência de triglicéridos microsomal (MTTP). Este trabalho visa a abordagem e elucidação das mais-valias terapêuticas inerentes à inibição da PCSK9, sendo esta alternativa terapêutica, bem como os fatores relativos à segurança e ao balanço do risco/benefício intrínsecos a esta, abordados de seguida (Seidah e Prat, 2012).

8. PCSK9

A PCSK9 é uma das diversas enzimas que constituem a família das proproteínas convertase e da qual fazem parte um total de nove membros distintos, desempenhando os restantes oito membros funções tão distintas como a clivagem de precursores proteicos de fatores de crescimento, hormonas, recetores e também de transcrição de fatores transmembranares de passagem através da via secretora (Mayer *et al.*, 2008;

Seidah e Prat, 2012). Em termos estruturais a PCSK9 é constituída por uma sequência sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico e uma fração carboxiterminal composta por resíduos de cisteína (figura 11) (Artenstein e Opal, 2011).

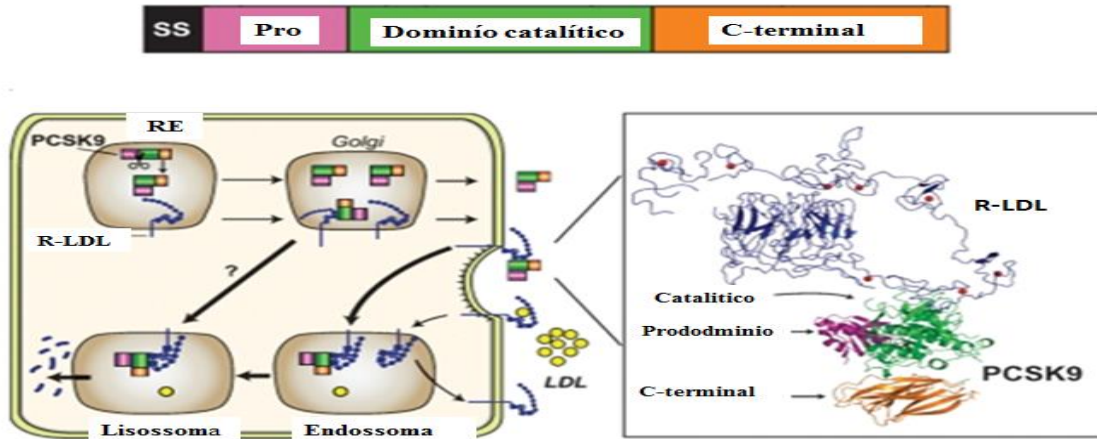


Figura 11. Domínios e ação do gene PCSK9 (Retirado de Horton *et al.*, 2009).

A PCSK9 é sintetizada inicialmente como um precursor inativo (proPCSK9) que irá posteriormente ser clivado por autocatálise, ocorrendo esta entre o pró-domínio e o domínio catalítico, sendo que o primeiro destes permanece na sua forma madura ligado à proteína, onde irá permanecer acoplado, transitando entre os seus diversos compartimentos e regulando assim a atividade enzimática (figura 12 e 13). A PCSK9 é secretada inicialmente pelos hepatócitos, contudo encontra-se também expressa, ainda que de forma diminuta em outros órgãos, como o são o caso do intestino e do rim (Mayer *et al.*, 2008). O interesse pela PCSK9 surgiu inicialmente, quando diversos estudos demonstraram que nos humanos, pequenas variações genéticas no gene do PCSK9, cooperavam na regulação do C-LDL a nível plasmático, resultando em diferentes mutações, podendo estas ser de dois tipos distintos: ganho e de perda de função da PCSK9. Nas mutações de ganho de função, que resultam em hipercolesterolemia devido ao aumento dos níveis plasmáticos de C-LDL, os indivíduos que sofrem desta patologia exibem um incremento de incidência de doença cardiovascular e de aterosclerose coronária (Abifadel *et al.*, 2003). Pelo contrário nas mutações de perda de função da PCSK9, responsáveis por casos de hipercolesterolemia resultante da diminuição dos níveis plasmáticos de C-LDL, os indivíduos afetados,

apresentam uma diminuição da incidência de doença cardiovascular e de aterosclerose coronária (Cohen *et al.*, 2005).

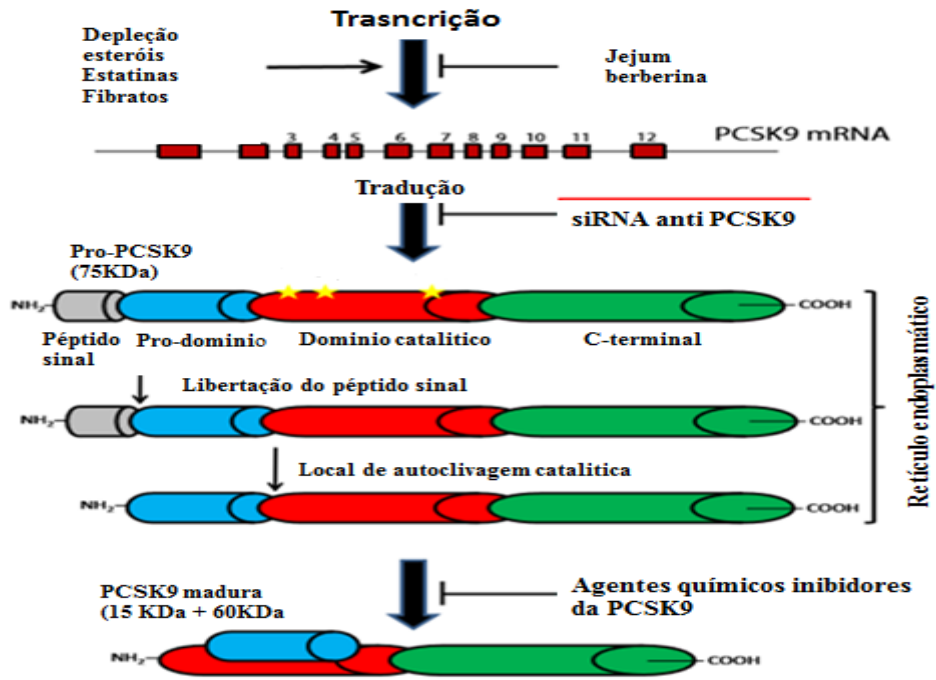


Figura 12. Cromossoma do gene PCSK9. (Adaptado de Norata *et al.*, 2014).

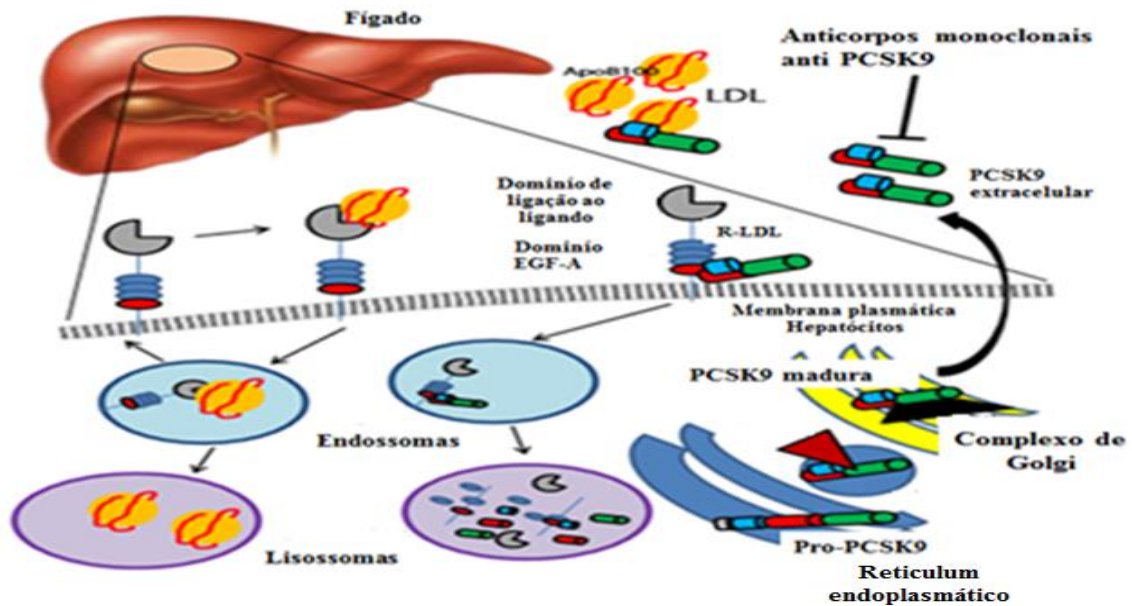


Figura 13. Síntese e função da PCSK9. (Adaptado de Norata *et al.*, 2014).

A principal função biológica da PCSK9 é a regulação da homeostase do colesterol, atuando através da aceleração da degradação dos recetores LDL (R-LDL).

A PCSK9 é sintetizada no fígado e posteriormente secretada na circulação e irá ligar-se ao recetor do LDL, ao nível da superfície dos hepatócitos (Maxwell *et al.*, 2005). A ligação da PCSK9 ao R-LDL irá desencadear uma diminuição da densidade dos recetores na superfície dos hepatócitos, que decorre de dois mecanismos distintos. O primeiro é a denominada via intracelular, em que ocorre a inibição da reciclagem do recetor, uma vez que a PCSK9 acoplada ao R-LDL é diretamente direcionada para os lisossomas, ocorrendo posteriormente a sua degradação (figura 10) (Park *et al.*, 2004; Seidah e Prat, 2012). A outra via alternativa é conhecida por via extracelular, pela qual a PCSK9 depois de secretada do complexo de Golgi, liga-se ao R-LDL, sendo ambos internalizados por endossomas revestidos de clatrina, resultando desse processo a degradação do R-LDL (figura 14). Contudo, para que possa ocorrer este último passo é necessário a expressão da proteína ligante hipercolesterolemia autossômica recessiva (ARH) (Kwon *et al.*, 2007).

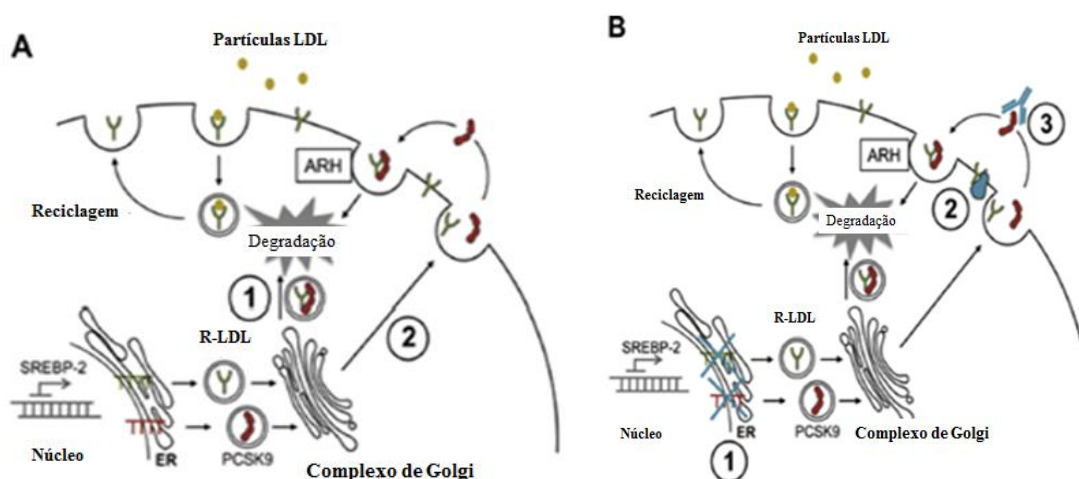


Figura 14. Representação do mecanismo de ação da PCSK9 e das estratégias terapêuticas de inibição. (Retirado de Urban *et al.*, 2013). **Legenda:** **A- 1)** Via intracelular, PCSK9 direcionado para os lisossomas com recetor LDL (LDLR) e sofrendo degradação. **2)** Via extracelular, PCSK9 secretado liga-se ao recetor LDL, é internalizado pelos endossomas com clatrina resultando na degradação do recetor LDL. **B- 1)** oligonucleótidos antisense inibem expressão da PCSK9, ligando-se ao mRNA da PCSK9, **2)** Péptidos miméticos ligam-se competitivamente ao recetor LDL impedindo a sua degradação mediada pela PCSK9, **3)** anticorpos monoclonais ligam-se especificamente à PCSK9 extracelular, inibindo a sua função. ARH-proteína adaptadora hipercolesterolemia autossômica recessiva, ER- retículo endoplasmático, LDLR- recetor LDL, SREBP-2- proteína ligante reguladora dos esteróis.

8.1 Ligação da PCSK9 ao R-LDL

A PCSK9 liga-se ao domínio extracelular do R-LDL, localizado no *epidermal growth factor – like repeat homology domain* (EGFA) (Zhang *et al.*, 2007). Esta ligação, tanto

quanto se sabe até ao momento, é do tipo cálcio dependente (Fisher *et al.*, 2007; Bottomley *et al.*, 2009). Ao nível da membrana plasmática (a pH neutro), só o domínio catalítico da PCSK9 interage com o domínio EGFA do R-LDL (Bottomley *et al.*, 2009; Surdo *et al.*, 2011). O trecho ácido localizado entre o prodomínio, atua modulando negativamente a ligação entre a PCSK9 e o R-LDL (Benjannet *et al.*, 2006). Contudo, depois de ter ocorrido o fenómeno de endocitose (o pH dos endossomas é ácido), a afinidade entre a PCSK9 e o R-LDL é substancialmente maior, comparativamente a pH neutro. Em condições de pH ácido, o prodomínio da PCSK9 estabelece com o domínio β -hélice do R-LDL, ligações por pontes salinas (Surdo *et al.*, 2011) e por sua vez o domínio C-terminal da PCSK9 carregado positivamente, liga-se, ao que tudo leva a crer, ao domínio de ligação do ligando da PCSK9 carregado negativamente (Surdo *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011; Tveten *et al.*, 2012).

Tais estudos vieram provar que a PCSK9 liga-se ao R-LDL de forma extensa e em conformação “aberta”, sendo que a incapacidade, evidenciada por parte do recetor na adoção de uma forma “fechada” no endossoma, opõe-se à reciclagem normal na membrana plasmática e conseqüentemente ajuda a direcionar o R-LDL para o lisossoma e a natural degradação do mesmo (Blacklow, 2007; Surdo *et al.*, 2011). Descobriu-se também, que algumas substituições nos a.a., que compõem quer a PCSK9 quer o R-LDL, são normalmente associadas a FH, revelando assim as “estreitas” interações moleculares existentes entre o complexo PCSK9 e R-LDL, conduzindo ainda à degradação do recetor e adicionalmente como consequência deste efeito a o aumento dos níveis de C-LDL circulatório junto dos portadores destas mutações (Pandit *et al.*, 2008; McNutt *et al.*, 2009).

As mutações de ganho de função conduzem a um fenótipo de FH extremamente severo e são particularmente difíceis de tratar com estatinas (Soutar e Naoumova, 2007). Os portadores desta mutação são afetados pelas DCV, dez anos antes, do que verificado para outros indivíduos com FH. Este fenótipo mutante revelou ainda uma capacidade de ligação ao R-LDL muito superior ao observado para a PCSK9 (tipo selvagem), permitindo a formação de pontes de hidrogénio entre a PCSK9 e o domínio EGFA do R-LDL (Bottomley *et al.*, 2009).

O domínio C-terminal da PCSK9 desempenha um papel fulcral, uma vez que direciona o R-LDL para ser degradado (Surdo *et al.*, 2011). Este domínio não é, contudo, fundamental para a ligação do R-LDL à superfície da célula, como demonstraram algumas deleções mutantes (Zhang *et al.*, 2007). Recentemente a utilização de um fragmento de ligação antigénio anticorpo direcionado ao domínio C-terminal da PCSK9, demonstrou não provocar qualquer efeito na ligação do R-LDL, mas inibindo, porém, a internalização do complexo PCSK9 - R-LDL. Da mesma forma a ligação da anexina A2 ao domínio C-terminal da PCSK9, previne a posterior ligação da PCSK9 ao R-LDL e como tal evita a degradação do recetor (Mayer *et al.*, 2008). Neste processo é necessária a internalização e endocitose do complexo PCSK9 – R-LDL, o que permite concluir que a anexina A2 é secretada a fim de exercer a sua função inibitória no PCSK9 (Mayer *et al.*, 2008). O domínio C-terminal da PCSK9, para além das ligações com a anexina A2 e o R-LDL, estabelece também interações intra e intermoleculares com o seu próprio prodomínio ao longo da via secretora, permitindo a eficaz secreção da proteína (Du *et al.*, 2011). Todavia a PCSK9 tem um efeito modulador muito ténue do R-LDL a nível adrenal, em outras áreas do cérebro (Liu *et al.*, 2010; Rousselet *et al.*, 2011), o que leva a crer que a PCSK9 necessita de outras estruturas teciduais específicas para que consiga eficazmente reduzir os níveis de R-LDL nos tecidos como acontece no fígado, no qual a PCSK9 revelou até agora ser mais eficiente (Grefhorst *et al.*, 2008). Devido à sua estrutura peculiar, todas as atenções estão agora centradas no domínio C-terminal da PCSK9 e na forte possibilidade que este possuirá para eventualmente interagir com estas ainda desconhecidas estruturas específicas, anteriormente mencionadas.

8.2 Inativação Endógena da PCSK9

A clivagem proteolítica da PCSK9 ocorre nos hepatócitos e é mediada por duas proproteínas convertase, a furina e o PC5/6A (Benjannet *et al.*, 2006; Essalmani *et al.*, 2011). Adicionalmente a mutação *missence* PCSK9 R218S, que ocorre naturalmente, origina a hipercolesterolemia autossómica dominante entre portadores homozigóticos. Estes dois resultados em conjunto permitem verificar que um mecanismo deficitário de inativação da PCSK9, tanto pela furina como pelo PC5/6A, conduzirá inevitavelmente a um aumento dos níveis plasmáticos de C-LDL (Allard *et al.*, 2005).

8.3 Regulação Dietética e Hormonal da PCSK9

Tanto os níveis plasmáticos de PCSK9, como a sua expressão, são controlados quer pelo estado nutricional, quer hormonal dos indivíduos. A expressão plasmática e os níveis de PCSK9 diminuem de forma dramática em jejum (Lambert *et al.*, 2006). A PCSK9 circulante tem um ritmo diurno muito marcado, paralelamente ao que acontece com a biossíntese do colesterol, que ao que tudo indica será mediado por variações na secreção da hormona de crescimento, o que implica que os níveis plasmáticos de PCSK9 sejam medidos, num período definido de manhã após um jejum noturno, para que se possam efetuar comparações entre indivíduos. Os níveis de PCSK9 tendem a aumentar nas raparigas e a diminuir no caso dos rapazes quando estes se encontram na adolescência, no caso da idade adulta os níveis de PCSK9 são igualmente mais elevados nas mulheres do que nos homens, contudo, esta discrepância não se deve às diferenças dos níveis de estrogénios endógenos (Mayne *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2010; Awan *et al.*, 2012).

8.4 Regulação da PCSK9 pelos Esteróis e pela Terapêutica com Estatinas

De forma semelhante ao que acontece com o R-LDL, a expressão da PCSK9 é modulada pelos níveis intracelulares de colesterol, que por sua vez é mediada sobretudo pela SREBP2 (figura 15) (Rashid *et al.*, 2005). O fator de transcrição do fator 1a nuclear do hepatócito (HNF1a) demonstrou ser também um potente estimulador da expressão do gene PCSK9 (Dong *et al.*, 2010). A PCSK9 e o R-LDL são regulados de forma coordenada a nível transcripcional pelo colesterol (homeostase do colesterol), bem como pelas estatinas, devido ao efeito provocado por estas sobre os níveis de colesterol. As estatinas provocam um aumento e a translocação da SREBP2, responsável pela ativação tanto do R-LDL, como da PCSK9, sendo assim as estatinas são responsáveis pela regulação da PCSK9, aumentando os níveis séricos desta, sendo esta ativação responsável pela atenuação dos efeitos hipolipídicos das estatinas (Rashid *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2006; Mayne *et al.*, 2008).

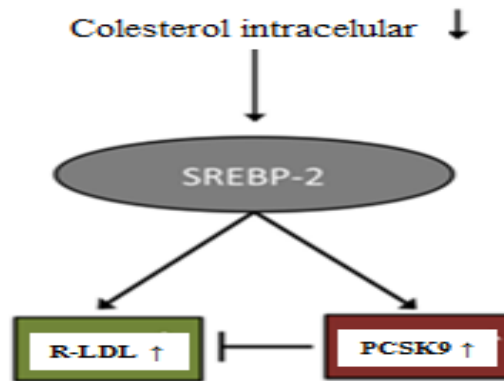


Figura 15. SREBP-2-mediando a expressão do R-LDL e da PCSK9. (Adaptado de Urban et al., 2013).

Como tal a regulação simultânea da PCSK9 e do R-LDL é de inegável interesse clínico, sendo que a inibição da PCSK9, vai com certeza ampliar os efeitos redutores do C-LDL por parte das estatinas e, assim, através de um efeito sinérgico com as estatinas, poderá surtir um efeito redutor dos níveis de C-LDL e de risco de DCV (Awan *et al.*, 2012).

8.5 Efeito da PCSK9 no Metabolismo Lipídico Intestinal

A PCSK9 aumenta a expressão do NPC1L1 nas células do epitélio intestinal, adicionalmente a PCSK9 aumenta ainda a expressão intracelular da apoB-48, provocando também a redução da atividade das enzimas HMG-CoA redutase, Acil-CoA-Colesterol-Transferase (ACAT) e um aumento da proteína de transferência microsomal (MTP) (Levy *et al.*, 2013). Outro efeito provocado pela PCSK9 é a redução da expressão do R-LDL na membrana basolateral das células epiteliais do intestino. A PCSK9 tem também como função promover a sobreprodução intestinal de apoB ricas em TG, bem como de lipoproteínas ricas em TG (TRL). Assim, a eventual redução da PCSK9 conduz a uma redução da expressão da apoB-48 (Levy *et al.*, 2013), e conseqüentemente menos TG são transferidos para a apoB48 (via da inibição da MTP), havendo um armazenamento prolongado e menor secreção de TG (inibição da ACAT) das células epiteliais (Rashid *et al.*, 2014). A sobre expressão da PCSK9 reduz os níveis de R-LDL e aumenta a expressão e atividade da MTP no intestino delgado, sendo que ambos os processos afetam o nível de secreção de TRL.

A excreção de colesterol a nível intestinal (TICE) que contribui em cerca de 30% para a excreção fecal de esteroides neutros, é também modulada pelo PCSK9. A TICE é reforçada pela apoB contendo partículas de LDL e de HDL em menor extensão. A TICE envolve a atuação do transportador ativo *ATP binding cassette transporter B* na membrana apical dos enterócitos e o R-LDL na sua membrana basolateral (Le May *et al.*, 2013). O PCSK9 reduz a TICE através da redução da expressão do R-LDL (Le May *et al.*, 2013).

8.6 Efeito da PCSK9 na Aterosclerose

A hipercolesterolemia é um dos maiores fatores de risco do processo de formação da placa aterosclerótica. Atualmente os estudos efetuados têm demonstrado que a PCSK9 é também expressa nas placas ateroscleróticas humanas (Ferri *et al.*, 2012). Os testes *in vitro* demonstram que a PCSK9 secretado pelas células do músculo liso vascular, reduz a expressão do R-LDL e o *uptake* de C-LDL de macrófagos humanos, podendo eventualmente culminar em acumulação e oxidação lipídica a nível vascular (Ferri *et al.*, 2012). Posteriormente serão abordados alguns mecanismos adicionais pelos quais a PCSK9 pode influenciar a biologia vascular.

8.7 Efeito da PCSK9 na Inflamação

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica (Libby, 2002), estando a inflamação sistémica diretamente relacionada com alterações no metabolismo lipídico. As interações entre as vias metabólicas e inflamatórias são necessárias para a normal homeostase, contudo a comunicação cruzada entre estas duas vias pode conduzir à desregulação metabólica (Feingold *et al.*, 2008).

Estudos conduzidos em ratos demonstraram que a inflamação sistémica induzida pela administração de lipolissacarídeos conduziu a um aumento da expressão do PCSK9, tendo-se verificado um decréscimo dos níveis hepáticos de R-LDL e um incremento do C-LDL circulatório (Feingold *et al.*, 2008).

Adicionalmente o *small interfering RNA* (siRNA) é responsável pela quebra de PCSK9 nos macrófagos humanos, atenuando o inibidor da degradação do fator nuclear *kappa beta alfa* ($I\kappa\beta$ - α) e a translocação do fator nuclear *kappa beta* (Nf- $\kappa\beta$), aumentando desta forma a expressão de genes pró-inflamatórios (Tang *et al.*, 2012). Um outro mecanismo pró-inflamatório decorre da indução do PCSK9 que irá promover a degradação do recetor 2 apoE (Poirier *et al.*, 2008), mantendo um fenótipo anti-inflamatório nos macrófagos (Baitsch *et al.*, 2011) intervindo na sinalização anti-apoptótica (Kysenius *et al.*, 2012). Resultados obtidos de uma análise de *microarray* demonstraram que as células HepG2 que expressam mutações de ganho de função, sendo esta mutação responsável pela redução da expressão de genes de resposta ao stress e de vias inflamatórias específicas (Ranheim *et al.*, 2008). No entanto há ainda que avaliar as consequências clínicas dos efeitos do PCSK9 na via inflamatória e em concreto no que respeita à biologia vascular.

8.8 Efeito da PCSK9 na Morte Celular Apoptótica

A PCSK9 é uma proteína que foi inicialmente descoberta como sendo regulada durante a apoptose dos neurónios (Seidah *et al.*, 2003). A PCSK9 inicialmente conhecida como *neural apoptosis-regulated convertase 1* (NARC-1) é de grande importância no desenvolvimento cerebral, especialmente ao nível do cerebelo (Poirier *et al.*, 2006). Acredita-se que seja neste local que a PCSK9 interaja inicialmente com R-VLDL e recetor apoE (apoER) que estão acoplados às vias sinalizadoras da retina. (Kysenius *et al.*, 2012). A PCSK9 está também presente no fluido cerebrospinal em concentrações surpreendentemente constantes (Chen *et al.*, 2014). A expressão de PCSK9 no tecido cerebral encontra-se aumentada nos casos de isquemia cerebral (Kysenius *et al.*, 2012) e em tecido cerebral com sinais de apoptose neuronal (Bingham *et al.*, 2006), sendo esta última induzida por concentrações crescentes de C-LDL oxidado (oxC-LDL). Uma eventual relação de causa efeito com patologias como a demência vascular e Alzheimer, é controversa, contudo é possível que a PCSK9 esteja envolvida na degradação da *β -site amyloid precursor protein* (APP), impedindo a formação de *amyloid β -peptide*, componente principal das placas amiloides presentes nos indivíduos portadores da doença de Alzheimer (Wu *et al.*, 2014).

8.9 Efeito da PCSK9 na Pressão Sanguínea

A hipertensão é um dos fatores responsáveis pelo aumento da progressão da aterosclerose. A transfeção com PCSK9 no epitélio onde é expresso o canal de sódio epitelial (ENaC), que regula a pressão sanguínea através da modulação da reabsorção de sódio epitelial, conduziu a uma redução significativa da expressão da proteína ENaC (Sharotri *et al.*, 2012), porém apesar da redução de densidade de proteína ENaC da superfície celular, a PCSK9 não provocou efeitos na endocitose de ENaC ou na degradação de ENaC da superfície da célula, o que indica que a PCSK9 pode desempenhar um papel efetivo na regulação do tráfego de ENaC. São necessários mais estudos, porém, que comprovem o efeito das observações celulares efetuadas, relacionando-as com a regulação da pressão sanguínea (Sharotri *et al.*, 2012).

8.10 Efeito da PCSK9 no Metabolismo da Glucose

A Diabetes está associada com a aterosclerose prematura (Beckman *et al.*, 2010). Na PCSK9 do tecido pancreático dos ratos de laboratório, a expressão de R-LDL encontra-se aumentada, enquanto que os níveis de insulina encontram-se diminuídos, resultando num quadro de hiperglicemia e de intolerância à glucose (Mbikay *et al.*, 2010). A intolerância à glucose está diretamente associada a malformações, apoptose e inflamação das ilhotas pancreáticas, o que é bastante revelador do carácter regulador da PCSK9 da função pancreática normal (Mbikay *et al.*, 2010).

8.11 Efeito da PCSK9 na Adipogénese

A obesidade está intimamente correlacionada com a prevalência de fatores de risco de aterosclerose (Fantuzzi e Mazzone, 2007). A depleção de PCSK9 está associada a hipertrofia dos adipócitos, a uma melhoria *in vivo* do *uptake* de ácidos gordos e à síntese de TG. O PCSK9 interage não só com o R-LDL, bem como com o R-VLDL, o qual expressa também o domínio EGF-A (Poirier *et al.*, 2008). Com base nos estudos efetuados em macacos, crê-se que o PCSK9 atue limitando a adipogénese visceral, através da regulação da adipose dos níveis de R-VLDL (Roubtsova *et al.*, 2011).

9. Abordagens para Inibir a PCSK9

De momento estão em processo de desenvolvimento três abordagens farmacologicamente distintas, com o intuito de inibir a atividade biológica da PCSK9 em humanos. Uma das abordagens é denominada de silenciamento de genes e têm como alvo principal a inibição das funções tanto intra como intercelulares da PCSK9, as outras duas estratégias terapêuticas são intituladas de péptidos miméticos e anticorpos monoclonais, sendo que ambas, ao contrário do verificado no primeiro caso, têm como foco da atuação a PCSK9 circulante, atuando então exclusivamente sobre a função extracelular (figura 16) (Seidah e Prat, 2012).

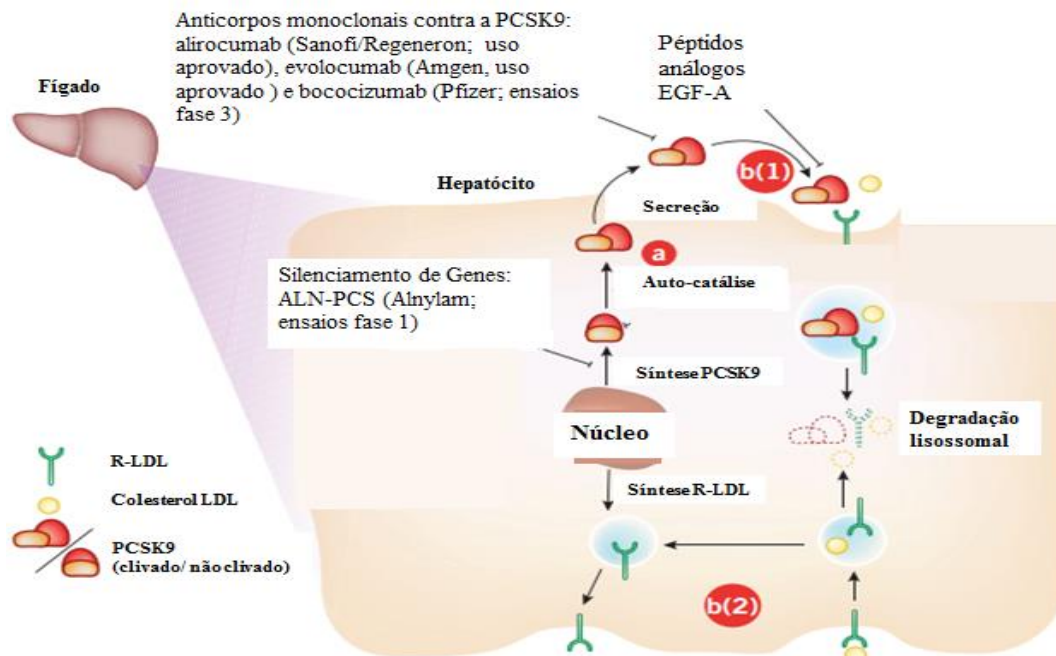


Figura 16. As diferentes abordagens de inibição da PCSK9 e do seu mecanismo de ação. (Adaptado de Martz, 2014). **Legenda:** a) A PCSK9 sofre clivagem autocatalítica. Apesar de clivados os 2 domínios da PCSK9 permanecem juntos; b1) Quando a PCSK9 se liga ao R-LDL todo o complexo é internalizado, seguindo o R-LDL para o lisossoma, onde é degradado e impedido de ser reciclado. É nesta etapa que os anticorpos monoclonais e os péptidos análogos ou miméticos atuam; b2). Se o R-LDL for internalizado sem estar ligado à PCSK9, este será reciclado para a superfície da célula, onde continuará a remover o C-LDL. Este é o objetivo que todos os inibidores da PCSK9 pretendem alcançar.

9.1 Silenciamento de Genes

Comumente designada oligonucleótidos *anti-sense* (ASO), estes ASOs não são mais do que pequenos análogos de ácidos nucleicos de cadeia simples (20 nucleótidos de

comprimento), que uma vez introduzidos na célula se podem ligar diretamente, através de uma sequência complementar, ao mRNA. Esta ligação é bastante forte e específica, sendo do tipo hibridização Watson-Crick. É o braço curto do ASOs que previne qualquer ligação não específica, não intencional a sequências de RNA e efeitos fora de alvo (Bennett e Swayze, 2010). Assim que hibridizado com a sequência mRNA alvo, os ASOs previnem a tradução do mRNA no produto proteico. Esta inibição ocorrerá devido à ativação de nucleases celulares, que degradam RNA hibridizado, provocam impedimento estérico da tradução ribossomal, ou prevenção da divisão adequada do pré-mRNA em mRNA maduro e funcional (Bennett e Swayze, 2010). Atualmente os avanços na tecnologia *antisense* permitiram que se desenhassem e sintetizassem ASOs específicos, que são quimicamente modificados, de forma a serem estáveis contra enzimas hidrolizadoras, tal mecanismo de resistência advém do uso de nucleótidos modificados quimicamente, fosfotioato e metilfosfonato, bem como sequências protetivas em asa tanto nas terminações 3' e 5' o mRNA alvo (Ito, 2007).

Os resultados de alguns estudos efetuados em ratos revelaram uma redução dos níveis de mRNA PCSK9 em cerca de 60% e assim promovendo um aumento de até 3 vezes dos níveis de R-LDL hepático em cerca de oito dias (Gupta *et al.*, 2010). Os níveis de PCSK9 circulatório também sofreram um decréscimo superior a 50%, tendo-se igualmente verificado uma queda de perto de 35% dos níveis de C-LDL e de apoB. Não se verificaram efeitos nos níveis de C-HDL (Lindholm *et al.*, 2012).

Por outro lado, temos a outra abordagem disponível no que respeita ao silenciamento de genes, que é o uso de pequenas moléculas de cadeia dupla de RNA interferente (siRNA) que são os mediadores funcionais do RNAi, capazes de impedir a transdução de uma proteína específica, através de um mecanismo de silenciamento de genes pós transcricional (Lindholm *et al.*, 2012). A quebra do mRNA, induzida pelas moléculas de siRNA com sequência complementar, permitindo assim que se possam desenvolver novas moléculas de siRNA baseadas neste mesmo princípio que inibam a expressão de proteínas específicas, neste caso da PCSK9 (Lindholm *et al.*, 2012).

Nos estudos executados em animais, como ratos e primatas, a administração de siRNA tendo como alvo o mRNA PCSK9, vieram demonstrar uma capacidade efetiva de

reduzir os níveis de C-LDL entre os 50% a 70% em ratos, verificando uma diminuição também no caso dos primatas em cerca de 50% (Awan *et al.*, 2012). Esta estratégia terapêutica de inibição da PCSK9 embora seja bastante promissora, ainda se encontra numa fase inicial de desenvolvimento, sendo que uma das moléculas em fase mais avançada de desenvolvimento, como é o caso da ALN-PCS, pertencente à empresa farmacêutica *Alynham Pharmaceuticals*, encontra-se ainda em ensaios clínicos de fase 1, estando o seu término previsto para 2016 (Wittrup e Lieberman, 2015).

9.2 Péptidos Miméticos

Os péptidos miméticos são inibidores competitivos desenhados para simular o domínio EGF-A de ligação ao R-LDL, que por sua vez interage com a PCSK9. Nas células HepG2, o péptido sintético EGF-A liga-se ao R-LDL, atuando de forma dose dependente inibindo a degradação do R-LDL, mediada pela PCSK9 (Poirier *et al.*, 2009). O domínio Cterminal isolado da PCSK9 auxilia na redução da degradação de R-LDL mediada pela PCSK9, tendo estes resultados sido observados tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* em ratos (Alborn *et al.*, 2007). Como tal ficou demonstrado, que o uso de pequenos fragmentos de PCSK9 que se ligam ao R-LDL, através de um mecanismo competitivo, sem que causem a degradação do mesmo, e adicionalmente permitindo uma redução dos níveis circulatórios de C-LDL, é uma alternativa viável para inibição da PCSK9 (Alborn *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2011).

9.3 Anticorpos Monoclonais

Usualmente denominados de mAb (anticorpos monoclonais), estes têm-se revelado como a estratégia mais promissora na inibição da degradação do R-LDL mediada pela PCSK9, sendo que atualmente são o principal alvo da indústria farmacêutica. A primeira administração de mAbs ocorreu em 2009, tendo sido efetuada a sua administração por via intravenosa em macacos, tendo-se evidenciado uma redução dos níveis de C-LDL de aproximadamente 80% (Chan *et al.* 2009).

Os anticorpos monoclonais atuam revertendo os efeitos provocados pela PCSK9 na superfície dos R-LDL, visto que os anticorpos são capazes de reconhecer os epítomos da PCSK9 localizados na vizinhança da região com o domínio catalítico, que interage com o R-LDL (Dias *et al.*, 2011). Atendendo aos dados obtidos em ensaio pré-clínicos, ficou demonstrado que os anticorpos monoclonais são efetivamente capazes de quebrar a ligação entre a PCSK9 e o R-LDL, conduzindo ao aumento dos níveis R-LDL (Duff *et al.*, 2009). Todos estes dados incentivaram a indústria farmacêutica no sentido de desenvolverem mAbs, tornando-os uma importante alternativa terapêutica.

Encontram-se atualmente aprovadas duas estratégias terapêuticas com anticorpos monoclonais atuando como inibidores da PCSK9 para indivíduos com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e homozigótica, doença cardíaca aterosclerótica, ou em indivíduos intolerantes ou que não reagem adequadamente à terapêutica com estatinas ou em associação com esta ou outra classe terapêutica utilizada na redução dos níveis de C-LDL. O primeiro medicamento a ser aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA) e pela UE para introdução no mercado da CE foi o evolocumab (Repatha™, Amgen) em julho de 2015, tendo obtido aprovação posterior por parte da *US Food and Drug Administration* (FDA) em agosto de 2015 para introdução deste medicamento no mercado americano. O outro medicamento o alirocumab (Praluent™, Regeneron/Sanofi) foi o primeiro medicamento aprovado para introdução no mercado norte americano pela FDA em julho de 2015, tendo igualmente sido aprovado o seu uso na UE pela EMA em setembro de 2015 (Amgen, 2105; EMA, 2015; FDA, 2105; Praluent, 2015).

Existe ainda um novo medicamento o bococizumab (RN316), que se encontra ainda numa fase mais precoce de desenvolvimento que os medicamentos referidos anteriormente, tendo iniciado os ensaios de fase III em outubro de 2013, sendo de esperar que até ao final do presente ano surjam novos dados relativos à sua eficácia e segurança. São também conhecidos avanços e estudos referentes a outros medicamentos de outros grupos farmacêuticos como são o caso da Eli Lilly (LY3015014) e da Roche (RG-7652) (Mombelli *et al.*, 2015).

10. Evolocumab

O evolocumab foi o primeiro anticorpo monoclonal inibidor da PCSK9 a receber autorização de introdução no mercado Europeu e o segundo no caso do mercado norte americano. O evolocumab foi desenvolvido pela empresa farmacêutica Amgen, tendo o nome comercial de Repatha™. Evolocumab deve ser utilizado como complemento da dieta e da terapêutica com doses máximas toleradas de estatinas, encontra-se sobretudo indicado nos casos de hipercolesterolemia familiar homozigótica e heterozigótica, doença aterosclerótica coronária, que necessitam de uma redução adicional dos níveis de C-LDL (Amgen, 2015).

Os ensaios com o evolocumab demonstraram a sua capacidade de redução dos níveis de C-LDL, de forma substancial e consistente, demonstrando também alterações benéficas de outros parâmetros lipídicos, em cerca de 6000 pacientes com hiperlipidemia e dislipidemia mista, incluindo mais de 4500 pacientes com elevados níveis de colesterol em 10 ensaios de fase III (Amgen, 2015).

O evolocumab demonstrou a sua eficácia promovendo uma redução significativa dos níveis de C-LDL entre os 55% e os 75% comparativamente ao observado para o placebo e em aproximadamente 35% a 45% quando comparado com ezetimiba. No que respeita aos pacientes com FH homozigótica, o evolocumab evidenciou a sua eficácia, tendo reduzido os níveis de C-LDL dos pacientes entre 15% e 30% comparativamente ao observado para o placebo. A redução dos níveis de C-LDL observada manteve-se com o tratamento a longo prazo (Amgen, 2015).

10.1 Mecanismo de Ação

O evolocumab consiste num anticorpo humano monoclonal IgG2, direcionado para a enzima PCSK9, à qual se liga, impedindo a ligação da enzima ao R-LDL e a consequente degradação do recetor, permitindo que este seja reciclado e direcionado novamente para a superfície das células hepáticas. Devido à inibição da ligação da PCSK9 ao R-LDL, o evolocumab provoca um aumento do número de R-LDL disponíveis na superfície das células hepáticas, aumentando a taxa de eliminação de C-

LDL do sangue, conduzindo a uma diminuição dos níveis de C-LDL (figura 17) (Amgen, 2015).

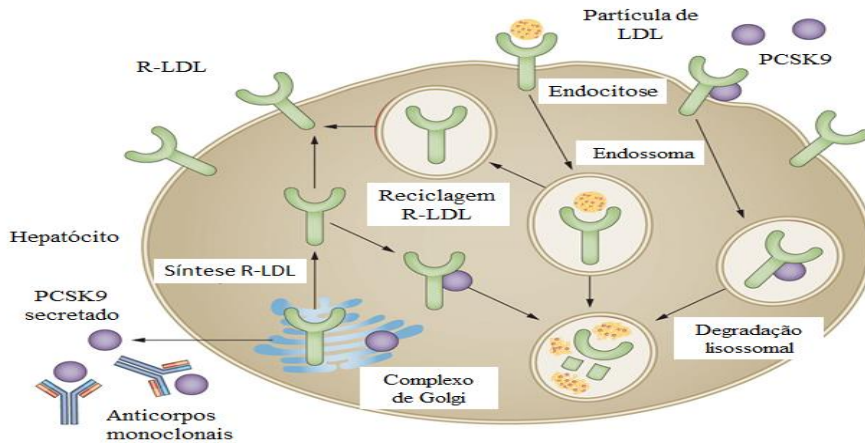


Figura 17. Mecanismo de ação dos mabs (evolocumab). (Adaptado de Davidson, 2013).

10.2 Farmacocinética Evolocumab

O pico de concentração sérica máxima para o evolocumab foi atingido em 3 a 4 dias, após uma dose única subcutânea de 140 mg ou 420 mg administrada em adultos saudáveis. Relativamente à administração de uma dose única subcutânea de 140 mg obteve-se uma concentração máxima (C_{max} média \pm desvio padrão (DP)) de $13,0 \pm (10,4)$ $\mu\text{g/ml}$ e uma AUC final (média \pm DP) de $96,5 \pm (78,7)$ dia/ $\mu\text{g/ml}$. No caso da administração única de uma dose subcutânea de 420 mg, esta originou uma C_{max} (média \pm DP) de $46,0 \pm 17,2$ $\mu\text{g/ml}$ e AUCfinal (média \pm DP) de 842 ± 333 dia/ $\mu\text{g/ml}$.

A administração de três doses subcutâneas de 140 mg demonstrou ser bioequivalente a uma dose única subcutânea de 420 mg. A biodisponibilidade absoluta após a dose subcutânea foi determinada com base em modelos farmacocinéticos como sendo de 72%.

O volume de distribuição médio \pm DP em estado de equilíbrio foi calculado posteriormente à aplicação de uma dose única intravenosa de 420 mg de evolocumab,

tendo-se obtido $3,3 \pm 0,5$ l, o que é indicativo de que o evolocumab tem uma distribuição limitada no tecido (EMA, 2015).

Sendo o evolocumab constituído unicamente por aminoácidos, hidratos de carbono e uma imunoglobulina nativa, é improvável a sua eliminação por mecanismos de metabolismo hepático, sendo expectável que o seu metabolismo e eliminação sigam as vias de depuração da imunoglobulina, resultando na degradação em pequenos péptidos e aminoácidos individuais (EMA, 2015).

O evolocumab apresenta uma semivida efetiva de 11 a 17 dias. No caso dos doentes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e medicados com doses altas de estatinas, a exposição sistémica de evolocumab foi ligeiramente inferior à de indivíduos com doses de estatinas baixas a moderadas (rácio de AUCfinal 0,74). Verificou-se um aumento cerca de 20% na depuração do evolocumab, devendo-se este facto às estatinas administradas, sendo estas responsáveis por aumentarem a concentração de PCSK9, contudo este fator não teve um impacto negativo no efeito farmacodinâmico do evolocumab a nível lipídico. A análise farmacocinética da população não revelou diferenças consideráveis nas concentrações séricas de evolocumab em doentes com hipercolesterolemia familiar ou não familiar, medicados concomitantemente com estatinas (EMA, 2015).

Após uma dose única de 420 mg, a depuração sistémica média \pm DP foi calculada em 12 ± 2 ml/h. Em estudos clínicos com doses subcutâneas repetidas ao longo de 12 semanas, observaram-se aumentos de exposição proporcionais à dose com regimes posológicos de 140 mg e superiores. Observou-se uma acumulação de cerca de 2 a 3 vezes nas concentrações séricas no vale ($C_{min} \pm DP$) de $7,21 \pm 6,6$ após doses quinzenais de 140 mg ou após doses mensais de 420 mg ($C_{min} \pm DP$) de $11,2 \pm 10,8$ e as concentrações séricas mínimas aproximaram-se do estado de equilíbrio às 12 semanas. Não se observaram alterações dependentes do tempo nas concentrações séricas ao longo de um período de 124 semanas (EMA, 2015).

10.3 Efeitos Adversos

Possíveis efeitos a longo prazo resultantes da ação do evolocumab ao nível da morbidade e mortalidade cardiovasculares não foram ainda determinados. Os efeitos adversos demonstrados pelo evolocumab podem de forma geral ser comparados aos observados para os grupos controlo. Contudo, os efeitos adversos que se verificaram com maior frequência, ocorreram em apenas 2% da população pertencente ao grupo de tratamento com evolocumab, tendo estes apresentado, no entanto, maior incidência de reações adversas do que o grupo controlo. Os exemplos mais frequentes de efeitos adversos observados são casos de nasofaringite, infeção do trato respiratório superior, lombalgias, artralgia, influenza, *rash*, náuseas e reações irritação no local de injeção (EMA, 2015).

10.4 Forma de Administração

O evolocumab deve ser administrado através de uma injeção subcutânea na zona do abdómen, na coxa ou no antebraço, devendo variar os locais de injeção e não devendo as mesmas ser efetuadas em zonas em que a pele se encontre mais sensível, pisada, dura ou irritada. O evolocumab não pode ser administrado quer por via intravenosa, quer por via intramuscular. Antes de iniciar o tratamento com evolocumab devem ser excluídas causas secundárias (não genéticas) do excesso de colesterol e de níveis anormais de lípidos no sangue. Este medicamento só pode ser obtido por prescrição médica (Amgen, 2015).

10.5 Indicação Terapêutica

O evolocumab encontra-se indicado para adultos com hipercolesterolemia primária (heterozigótica familiar e não familiar) ou dislipidemias mistas, como adjuvantes da dieta:

- Em combinação com estatinas ou com estatinas e outra terapêutica de redução dos níveis lipídicos, em pacientes que não consigam atingir os

níveis estipulados de C-LDL recorrendo a elevadas doses de estatinas (Amgen, 2015).

- Em exclusividade ou em combinação com outras terapêuticas de redução dos níveis lipídicos, em pacientes que são intolerantes às estatinas ou para os quais as estatinas estão contra indicadas (Amgen, 2015).

O evolocumab está indicado para adultos e adolescentes com 12 ou mais anos de idade com hipercolesterolemia homozigótica familiar, em combinação com outras terapias de redução dos níveis lipídicos (Amgen, 2015).

A dose recomendada para adultos com doença primária é de 140 mg a cada duas semanas ou 420 mg (equivalente ao conteúdo de três seringas pré cheias) uma vez por mês, sendo as duas doses clinicamente equivalentes. No caso de adultos ou crianças com mais de 12 anos de idade e com FH homozigótica, a dose inicial recomendada é de 420 mg uma vez por mês. Se não se obtiver uma resposta adequada ao fim de 12 semanas de tratamento, a dose poderá ser aumentada para 420 mg a cada 2 semanas (Amgen, 2015).

10.6 Contra Indicações e Precauções Especiais

Este medicamento encontra-se contra indicado nos casos de hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer um dos excipientes (Amgen, 2015). Outras Precauções especiais são:

- **Insuficiência renal:** Os pacientes que sofrem de insuficiência renal não foram abordados nos estudos, pelo que o evolocumab deve ser utilizado com precaução nos pacientes com insuficiência renal severa (Amgen, 2015).

- **Insuficiência hepática:** Nos pacientes que sofram de insuficiência hepática moderada, foi observada uma redução à exposição total do evolocumab, o que poderá conduzir a

uma limitação do efeito redutor sobre o C-LDL, implicando monitorização próxima destes pacientes. No caso de pacientes portadores de insuficiência hepática severa, estes não foram abordados pelos estudos, pelo que a administração de evolocumab nestes indivíduos deve ser efetuada com extrema precaução (Amgen, 2015).

10.7 Fertilidade, Gravidez e Lactação:

Os dados relativos ao uso de evolocumab em grávidas são bastante limitados ou não existem de todo, pelo que o evolocumab não deve ser usado em grávidas, com exceção das situações em que a condição clínica exija tratamento com evolocumab. Não existem estudos que provem que o evolocumab seja excretado no leite materno, como tal não se deve excluir a possibilidade de risco inerente ao seu uso por recém-nascidos e crianças lactantes. Não existem até ao momento quaisquer dados sobre o impacto do evolocumab na fertilidade humana (Amgen, 2015).

10.8 Avaliação de Eficácia e Segurança do Evolocumab

Os anticorpos monoclonais inibidores da PCSK9 demonstraram, em doentes com ou sem terapêutica concomitante com estatinas, capacidade de reduzir substancialmente os níveis de C-LDL, (Dias *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2012). O evolocumab, um anticorpo humano, que tem como alvo a PCSK9, apresentou dados bastante promissores na redução dos níveis de C-LDL, com valores superiores aos 65%, tendo igualmente demonstrado um perfil encorajador, em termos de segurança e tolerabilidade. Estes resultados foram observados em ensaios clínicos aleatórios de fase II, utilizando grupos controlo-placebo com mais de 1300 indivíduos com hipercolesterolemia (Giugliano *et al.*, 2012; Koren *et al.*, 2012; Raal *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2012).

O *Open-Label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C (OSLER)*, pretende aferir sobre a eficácia e segurança dos resultados obtidos nos indivíduos portadores de hipercolesterolemia (Koren *et al.*, 2012).

O ensaio OSLER encontra-se dividido em duas fases, OSLER-1 e OSLER-2. O ensaio OSLER-1 foi levado a cabo em 190 centros de ensaios clínicos e o ensaio OSLER-2 em 305 centros, tendo os indivíduos que participaram destes ensaios, sido previamente selecionados para os outros ensaios. Só os indivíduos que tenham completado algum dos principais ensaios de evolocumab de fase II e de fase III, é que puderam registar-se no ensaio OSLER-1 e OSLER-2, respetivamente, comprovando que não experienciaram qualquer efeito adverso grave e que possa de alguma forma ter contribuído para a interrupção do “produto” da investigação na fase II ou III do ensaio principal, ou por outro lado permitindo a antecipação de medidas dos níveis lipídicos e/ou o ajuste da terapia de regulação lipídica de fundo, sem que estas ocorram inconscientemente, durante as 12 semanas em que decorram os ensaios prévios.

Os quatro ensaios de fase II prévios ao ensaio OSLER-1 são então: **1) *Monoclonal Antibody Against PCSK9 to Reduce Elevated LDL-C in Subjects Currently Not Receiving Drug Therapy for Easing Lipid Levels* [MENDEL]; 2) *Low-Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C) Assessment With PCSK9 Monoclonal Antibody Inhibition Combined With Statin Therapy* [LAPLACE-TIMI 57]; 3) *Goal Achievement after Utilizing an anti-*pcsk9* antibody in Statin intolerant Subjects* [GAUSS]; 4) *Reduction of LDL-C With PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder* [RUTHERFORD] (tabela 7).**

10.8.1 Ensaios Prévios ao OSLER-1

Tabela 7. Ensaios prévios ao OSLER-1 (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Ensaios	n ^o participantes do ensaio	n ^o participantes no respetivo ensaio OSLER	Perfil participantes
Fase 2			
MENDEL	406	300	Sem terapêutica prévia; C-LDL ≥ 100 e < 190 mg/dL
LAPLACE-TIMI 57	629	530	Estatina + Ezetimiba; C-LDL ≥ 85 mg/dl
GAUSS	157	128	Intolerante estatinas; C-LDL ≥ 100 mg/dl
RUTHERFORD	167	147	FH heterozigótica; estatina + ezetimiba; C-LDL ≥ 100 mg/dl

10.8.2 Ensaio OSLER-1

O primeiro objetivo para avaliar a eficácia consistia em caracterizar os efeitos da administração a longo termo de evolocumab, através da avaliação do C-LDL, do colesterol lipoproteico de não-alta-densidade (*non-C-HDL*), ApoB, rácio entre Ctotal e C-HDL, rácio ApoB/ApoA1 em indivíduos com hipercolesterolemia. Os objetivos de segurança incluem, avaliação da incidência de efeitos adversos, efeitos adversos graves, efeitos adversos que conduzam à descontinuação do produto sobre investigação

Participaram no estudo OSLER um total de 1104 indivíduos, dos quais 736 foram escolhidos de forma aleatória para receber evolocumab a 420 mg, a cada 4 semanas, por via subcutânea, juntamente com o padrão de tratamento (SOC), e os restantes 368 foram aleatoriamente selecionados recebendo somente tratamento com SOC, durante um período de 52 semanas (tabela 8). 92% dos pacientes do grupo evolocumab + SOC completaram as 52 semanas de tratamento consecutivas e 89% dos pacientes do grupo SOC completaram também as 52 semanas de forma contínua. O valor base de C-LDL do agrupamento dos estudos principais de fase II é de 141,1 mg/dL ($\pm 39,4$ mg/dL) ou 3,6mmol/L ($\pm 1,0$ mmol/L) () (Koren *et al.*, 2014).

Tabela 8. Representação do ensaio OSLER-1.

OSLER-1	Aleatório, trabalho aberto, controlo com padrão (SOC)	n= 1104	Duração 52 semanas	Evolocumab 420mg subcutâneo + SOC (padrão) a cada 4 semanas n =736 SOC n=368
----------------	--	---------	--------------------------	--

De um total de 691 pacientes, correspondendo a 62,6 %, tiveram um tratamento base com estatinas, sendo que desses, 295, cerca de 42,7% receberam uma terapêutica intensiva com estatinas (doses diárias de atorvastatina ≥ 40 mg, rosuvastatina ≥ 20 mg, sinvastatina 80 mg, ou outra estatina ainda com ezetimibe). A proporção de pacientes que necessitaram de terapêutica base com estatinas foi superior no grupo

evolocumab+SOC perfazendo 64,9% do total, comparativamente com o grupo SOC correspondendo a cerca de 57,9% (tabela 9) (Koren *et al.*, 2014).

Tabela 9. Resultados relativos à redução do C-LDL observada no ensaio OSLER-1 (Adaptado de Koren *et al.*, 2014).

Diferentes categorias (n indivíduos)	<100 mg/dL (2,6 mmol/L), n (%)		<70 mg/dL (1,8 mmol/L), n (%)	
	SOC	Evolocumab 420 mg a cada 4 semanas + SOC	SOC	Evolocumab 420 mg a cada 4 semanas + SOC
Final estudo (359, 717)	231 (64,4)	491 (68,5)	151 (42,1)	302 (42,1)
Semana 12 (347, 716)	60 (17,3)	621 (86,7)	1 (0,3)	443 (61,9)
Semana 24 (341, 708)	59 (17,3)	613 (86,6)	3 (0,9)	431 (60,9)
Semana 36 (335, 699)	47 (14,0)	598 (85,6)	5 (1,5)	430 (61,5)
Semana 48 (314, 676)	43 (16,7)	580 (85,8)	2 (0,6)	415 (61,4)
Semana 52 (295, 640)	47 (15,9)	552 (86,3)	3 (1,0)	400 (62,5)
Atingiram nível em qualquer visita (361, 732)	117 (32,4)	703 (96,0)	13 (3,6)	606 (82,8)
Atingiram nível em todas as visitas (269, 606)	9 (3,3)	437 (72,1)	0 (0,0)	229 (37,8)
Uso de estatinas de base / Uso qualquer estatina				
Atingiram nível em qualquer visita (209, 476)	82 (39,2)	458 (96,2)	6 (2,9)	418 (87,8)
Atingiram nível em todas as visitas (163, 399)	8 (4,9)	301 (75,4)	0 (0,0)	179 (44,9)
Sem uso de estatinas				
Atingiram nível em qualquer visita (152, 256)	35 (23,0)	245 (95,7)	7 (4,6)	188 (73,4)
Atingiram nível em todas as visitas (106, 207)	1 (0,9)	136 (65,7)	0 (0,0)	50 (24,2)

Não foram detetados anticorpos neutralizantes do evolocumab em todo o estudo OSLER (Koren *et al.*, 2014). Numa perspetiva geral os efeitos adversos graves de

elevação dos valores de creatina cinase e um aumento dos níveis de aminotransferases, não foram significativos no caso dos indivíduos que atingiram níveis diminutos de C-LDL.

Um total de 411 pacientes, dos quais 99,5% receberam terapêutica com evolocumab, atingiram níveis lipídicos de C-LDL < 50mg/dL (1,3 mmol/L), 98 pacientes todos em tratamento com evolocumab demonstraram níveis de C-LDL <25 mg/dL (0,65 mmol/L), contudo houve ainda o caso de 682 pacientes, sendo que 47,4% destes estavam a receber tratamento com evolocumab, evidenciando níveis de C-LDL \geq 50 mg/dL (1,3 mmol/L) (Koren *et al.*, 2014).

Neste que foi o primeiro teste de avaliação de longa duração (52 semanas) sobre um inibidor da PCSK9, os resultados do estudo OSLER, contribuíram para uma melhor e aprofundada compreensão sobre esta nova terapêutica, providenciando ainda uma visão mais próxima sobre a eficácia, segurança e tolerabilidade da terapêutica com evolocumab em indivíduos com hipercolesterolemia. O evolocumab demonstrou uma substancial capacidade de redução dos níveis de C-LDL, em média de cerca de \approx 50% para além dos valores obtidos para o grupo SOC em diferentes populações de indivíduos portadores de hipercolesterolemia. Este decréscimo dos níveis lipídicos após 12 semanas manteve-se estável durante o decurso do estudo, não tendo revelado qualquer tendência de atenuar (Koren *et al.*, 2014).

Atualmente existem várias linhas de evidência, que sugerem que podem advir diversos benefícios da manutenção de níveis de C-LDL, mesmo abaixo dos níveis normalmente estipulados. Esta evidência é corroborada pela análise mendeliana aleatória, provando que as variações genéticas que produzem níveis bastante reduzidos de C-LDL conferem níveis elevados de proteção contra as manifestações de aterosclerose, sem que ocorram situações de morbidade e mortalidade inesperadas (Koren *et al.*, 2014).

O estudo OSLER demonstrou que uma vasta maioria dos pacientes tratados com evolocumab atingiu níveis de C-LDL significativamente inferiores ao apontado pelas *guidelines*. Devido à elevada percentagem de pacientes do estudo OSLER que

apresentaram níveis de C-LDL <50mg/dL (1,3 mmol/L), especialmente aqueles em terapia de coadministração com estatinas, indicam que futuros estudos sobre ensaios cardiovasculares com evolocumab podem ser de grande utilidade para melhor entender os benefícios inerentes à redução dos níveis de C-LDL noutros alvos terapêuticos para além dos até agora estipulados. Estes estudos podem ainda ajudar a entender se estes avanços clínicos decorrentes da terapêutica de sobre regulação dos R-LDL advém de um mecanismo de ação que possa eventualmente ser partilhado pelos inibidores da PCSK9 e pela terapêutica com estatinas (Koren *et al.*, 2014).

No que respeita à tolerabilidade da terapêutica, o elevado número de participantes (81%), do estudo principal de fase II com evolocumab, é o reflexo natural da boa tolerabilidade inerente à terapia. Adicionalmente, a reduzida percentagem (3,7%) de pacientes que descontinuaram a terapêutica com evolocumab, devido a efeitos adversos, é também um forte indicador da excelente aceitação da terapêutica aplicada. De forma geral, a incidência destes efeitos encontra-se equilibradamente dividida pelos dois grupos, tanto pelo grupo evolocumab+SOC como pelo grupo SOC (tabela 10) (Koren *et al.*, 2014).

Tabela 10. Efeitos adversos do ensaio OSLER-1 (Adaptado de Koren *et al.*, 2014).

Efeitos adversos	SOC (n=368), n (%)	Evolocumab 420 mg a cada 4 semanas+SOC (n=736), n (%)
Qualquer	269 (73,1)	599 (81,4)
Graves	23 (6,3)	52 (7,1)
Conduzindo à descontinuação da terapêutica (evolocumab)	Não aplicável	27 (3,7)
Mortes	2 (0,5)	1 (0,1)

Efeitos adversos comuns		
Nasofaringite	36 (9,8)	90 (12,2)
Infeção trato respiratório superior	28 (7,6)	57 (7,7)
Gripe	19 (5,2)	52 (7,1)
Artralgia	16 (4,3)	51 (6,9)
Lombalgia	20 (5,4)	48 (6,5)
Musculares	36 (9,8)	68 (9,2)
Reações local de injeção	Não aplicável	38 (5,2)
Resultados laboratoriais		
ALT ou AST >3×LMN em qualquer visita	6 (1,6)	13 (1,8)
ALT ou AST >5×LMN em qualquer visita	1 (0,3)	4 (0,5)
Creatina cinase >5× LMN em qualquer visita	7 (1,9)	7 (1,0)
Creatina cinase >10× LMN em qualquer visita	2 (0,5)	2 (0,3)

Legenda: Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST); Limite máximo normal (LMN).

O teste OSLER providenciou ainda informação quanto à segurança do tratamento dos pacientes a níveis reduzidos e muito reduzidos de C-LDL ao longo de 1 ano. De forma generalizada a incidência de efeitos adversos graves de elevação dos níveis de creatina cinase e aminotransferases não foram apreciavelmente superiores nos casos de pacientes que atingiram níveis inferiores de C-LDL. Estes dados sugerem que a terapêutica com evolocumab, oferece ganhos significativos e adicionais à redução do C-LDL, sem incorrer num aumento da probabilidade de surgirem efeitos laboratoriais indesejados, como observado durante a intensificação das doses de estatinas. Os pacientes do estudo OSLER que atingiram níveis reduzidos ou muito reduzidos de C-LDL reportaram um ligeiro aumento do grau de incidência de sintomas como dores de cabeça, tonturas, insónias e lombalgias. Contudo, este ligeiro aumento do grau de incidência de sintomas ligeiros e subjetivos, requer algum cuidado na interpretação dos resultados, pois estes

podem advir de alguma assimetria decorrente do *design* do próprio protocolo, o qual requer um elevado número de interações presenciais cara a cara, com pessoal no local, ao dispor dos pacientes tratados com esta terapêutica de injeção (Koren *et al.*, 2014).

Apesar da diversidade populacional apresentada por este estudo ser vista como uma vantagem em termos da generalidade das conclusões obtidas, alguns dos pacientes, como é certamente o caso dos pacientes de baixo risco do estudo de MENDEL e que não receberam terapêutica com estatinas de base, podem efetivamente não ser uma adequada representação do público alvo, a quem em última instância se destina a terapêutica anti-PCSK9 (Koren *et al.*, 2014). Finalmente no que respeita ao *design* do ensaio aberto e mais frequentemente as inspeções dos pacientes em tratamento com evolocumab, são fatores limitantes para a interpretação do grau relativo de incidência de efeitos adversos entre os dois grupos. O estudo OSLER não foi desenvolvido ou desenhado como um estudo de resultados, mas antes um estudo em curso sobre resultados cardiovasculares fruto da pesquisa com inibidores da PCSK9 em indivíduos de elevado risco. Contudo, este ensaio reafirma também que os eventos cardiovasculares clínicos adjudicados aos pacientes tratados com evolocumab e pacientes que atingiram níveis reduzidos de C-LDL, não ocorreram com maior frequência nestes grupos do que o verificado para o grupo SOC, com pacientes tratados com uma terapêutica menos agressiva. Apesar da ausência de um sinal de segurança que confira algum suporte de validade para o futuro desenvolvimento do evolocumab, os ensaios em curso, em última análise irão confirmar os benefícios, ou a falta dos mesmos, na terapêutica de redução dos níveis de C-LDL com estes inibidores da PCSK9 (Koren *et al.*, 2014).

10.8.3 Ensaio Prévios ao OSLER-2

O OSLER-2 tal como o OSLER-1 é um ensaio de avaliação a longo prazo (resultados de avaliação durante um ano) dos níveis de C-LDL mediante a utilização de evolocumab. Os indivíduos que participaram no ensaio tiveram que previamente participar em pelo menos um dos ensaios de fase III. O OSLER-2 foi um ensaio de trabalho aberto e aleatório, conduzido em 305 centros de ensaios distintos (figura 18) (Sabatine *et al.*, 2015).

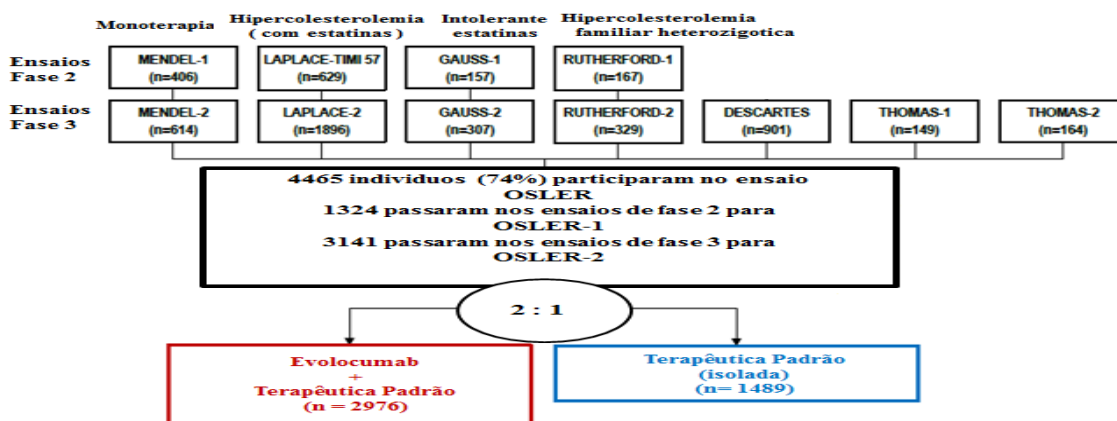


Figura 18. Ensaios OSLER 1 e 2 e os seus ensaios prévios. (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Os ensaios de fase III que antecedem o ensaio OSLER-2 estão representados na tabela 11.

Tabela 11. Representação ensaios prévios ao OSLER-1 (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Ensaio	n participantes do ensaio	n participantes no respetivo ensaio OSLER	Perfil participantes
Fase 2			
MENDEL-2	614	378	Sem terapêutica prévia; C-LDL ≥ 100 e < 190 mg/dL
LAPLACE-2	1896	1382	Terapêutica moderada ou de intensidade elevada com estatinas e com ou sem ezetimiba; C-LDL ≥ 80 mg/dl (estatina alta intensidade), C-LDL ≥ 100 mg/dl (estatina intensidade moderada), e C-LDL ≥ 150 mg/dl (sem estatina)
GAUSS-2	307	254	Intolerante estatinas; C-LDL ≥ 100 mg/dl e < 190 mg/dL
RUTHERFORD-2	329	293	FH heterozigótica; C-LDL ≥ 100 mg/dl; terapêutica com estatina com ou sem ezetimiba
DESCARTES	901	612	C-LDL ≥ 75 mg/dl; terapêutica com estatina com ou sem ezetimiba
THOMAS-1	149	112	C-LDL > 85 mg/dl terapêutica com estatina
THOMAS-2	164	110	C-LDL > 85 mg/dl terapêutica com estatina

10.8.4 Ensaio OSLER-2

O ensaio OSLER-2 foi iniciado em abril de 2013 e estima-se que esteja terminado em agosto de 2018, sendo como tal um ensaio a longo prazo, que pretende aferir sobre a eficácia e segurança da administração de evolocumab por um longo período de tempo, tratando-se de um ensaio que está ainda a decorrer, pelo que alguns dados não estão ainda disponíveis ou não existem de todo até ao momento presente. Este ensaio à semelhança do OSLER-1 é um ensaio de trabalho aberto, no qual participaram 3141 indivíduos, perfazendo um total de 4456 participantes nos dois ensaios (Sabatine *et al.*, 2015).

Os indivíduos que participaram no OSLER-2 tiveram que participar em pelo menos um dos ensaios prévios de fase III. O principal objetivo deste ensaio é reunir informação dos resultados relativos à segurança, aos efeitos secundários, à redução dos níveis de C-LDL e também sobre análise exploratória de possíveis resultados a nível cardiovascular, inerentes à administração a longo prazo de evolocumab (Sabatine *et al.*, 2015).

O OSLER-2 é um ensaio de estudo em trabalho aberto, aleatório e controlado, conduzido em 305 centros de ensaios, tendo os participantes participado em pelo menos 1 dos 7 ensaios de fase III com evolocumab (Sabatine *et al.*, 2015).

Os indivíduos que completaram pelo menos 1 dos 7 ensaios prévios de fase III puderam participar no ensaio OSLER-2, o que confirma que nenhum destes indivíduos experienciou algum tipo de efeito adverso, que pudesse ter conduzido à descontinuação do tratamento farmacológico e que adicionalmente nenhum deles possuía uma condição médica instável, sendo que não seria assim expectável que necessitassem de qualquer medição lipídica não cega, ou qualquer ajuste da terapêutica de regulação lipídica de fundo, durante as 12 primeiras semanas do ensaio OSLER (Sabatine *et al.*, 2015).

Foram administradas aos indivíduos, com base na escolha pessoal de cada um, uma dose de 140 mg a cada 2 semanas, ou 420 mg 1 vez por mês. Ambos os regimes terapêuticos demonstraram diminuir os níveis de C-LDL em aproximadamente 60% da

população participante no ensaio. Todos os indivíduos envolvidos no ensaio, bem como todo o *staff* médico estavam ao corrente do carácter de aleatoriedade dos procedimentos do ensaio. Não foi utilizado qualquer placebo no grupo com terapêutica padrão. O protocolo do ensaio estipulava que a aleatoriedade do tratamento terminaria na 48ª semana do ensaio OSLER-2, sendo que em diante todos os indivíduos passariam a receber evolocumab numa perspetiva de trabalho aberto, para que fosse possível aceder os resultados de eficácia e segurança a longo termo de forma não aleatória (tabela 12) (Sabatine et al., 2015).

Tabela 12. Representação do ensaio OSLER-2.

OSLER-2	Aleatório, trabalho aberto, controlo com padrão (SOC)	n= 3141	Duração Abril 2013 a Agosto 2018	Evolocumab 140 mg a cada 2 semanas + SOC ou Evolocumab 420 mg 1 vez mês + SOC (optativo até à 48ª semana) SOC
----------------	--	---------	---	---

O primeiro objetivo do ensaio era avaliar a incidência de efeitos adversos. A avaliação da segurança era um objetivo inerente ao primeiro, estando assim contemplados os efeitos adversos graves, efeitos adversos que pudessem conduzir à descontinuação do fármaco em estudo (indivíduos do grupo evolocumab), valores fora do normal dos níveis de creatina cinase e da função hepática e o desenvolvimento de anticorpos contra o evolocumab. O objetivo secundário do ensaio seria avaliar a eficácia do mesmo através da avaliação percentual da alteração dos níveis de C-LDL, C-HDL, Ct, TG, apoA1, apoB e Lp(a) (figura 19 e 20). O ensaio também tem como objetivo avaliar a incidência de eventos cardiovasculares (Sabatine *et al.*, 2015).

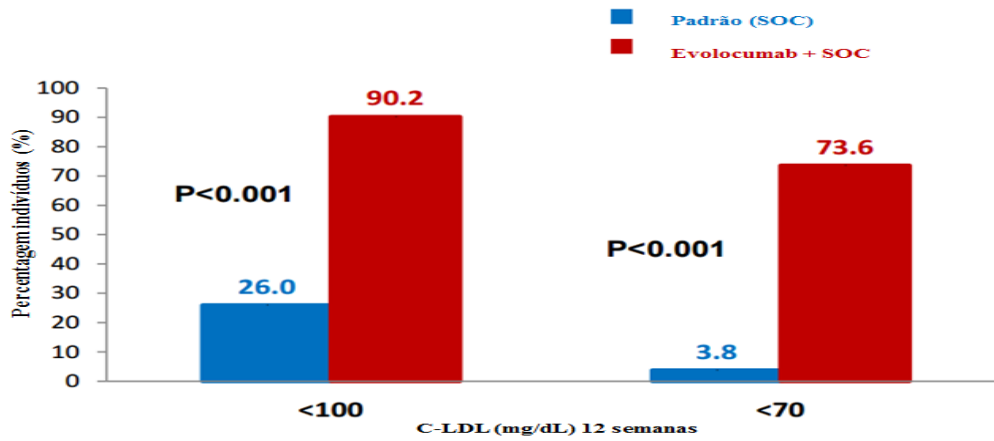


Figura 19. Representação percentual do total de participantes do ensaio OSLER-2 que atingiram os níveis propostos de C-LDL < 100 mg/dL e < 70 mg/dL (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

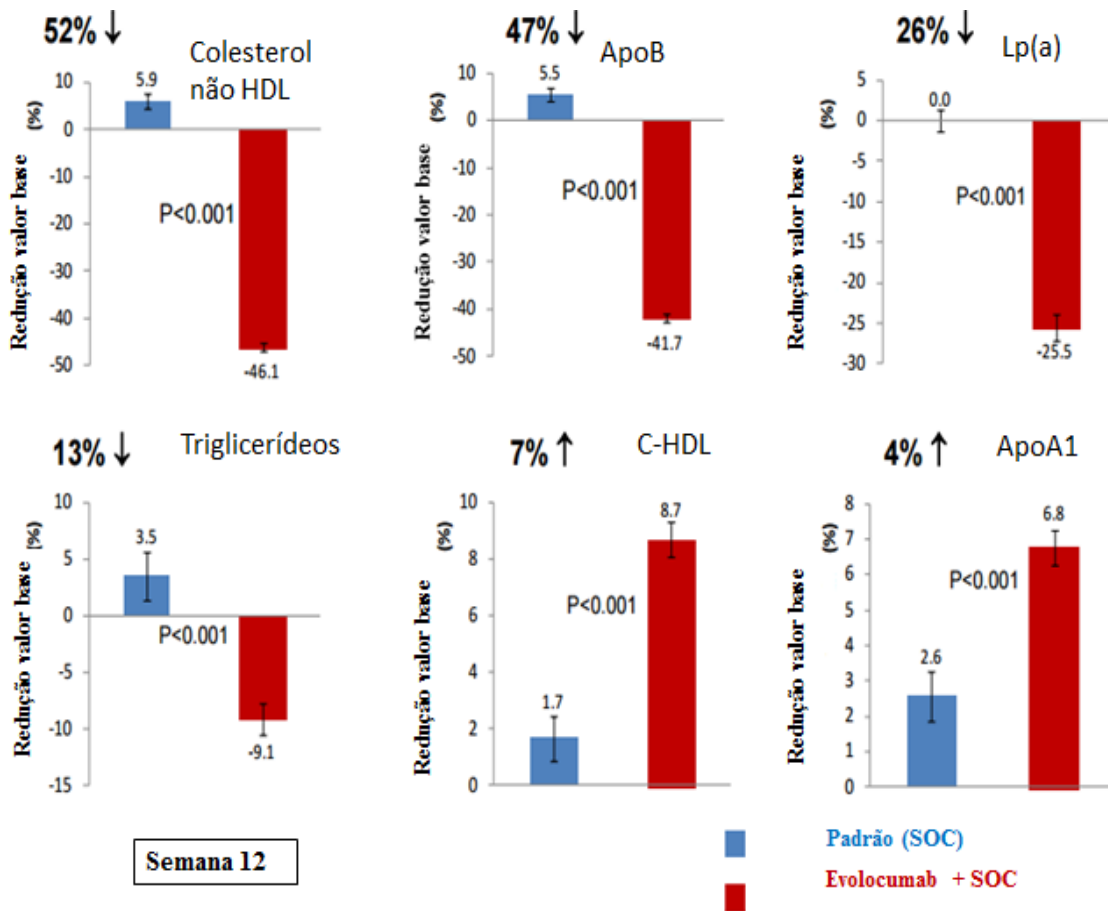


Figura 20. Representação percentual da redução dos diferentes parâmetros avaliados durante o ensaio OSLER-2 (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Os resultados do ensaio OSLER-2 foram combinados com os resultados anteriores do OSLER-1 numa análise conjunta (Sabatine *et al.*, 2015).

Participaram no ensaio OSLER um total de 4465 indivíduos, 1324 indivíduos aderiram ao OSLER-1 e 3141 indivíduos no OSLER-2. Destes 4456 indivíduos, 2976 foram selecionados aleatoriamente para receber a terapêutica com evolocumab e o padrão e 1498 receberam a terapêutica com padrão exclusivamente (tabela 13). A idade média dos indivíduos situava-se nos 58 anos de idade, possuindo 80,4% dos participantes pelo menos um fator de risco cardiovascular. Um total de 3128 participantes, perfazendo 70,1% da população, recebiam terapêutica com estatinas no início do ensaio. A descontinuação prematura e permanente do evolocumab ocorreu em cerca de 7,2% dos participantes (Sabatine *et al.*, 2015).

Tabela 13. Representação conjunta do ensaio OSLER (1 e 2).

OSLER	Aleatório, trabalho aberto, controle com padrão (SOC)	n= 4456 (OSLER-1 n=1324 e OSLER-2 n=3141)	Evolocumab + SOC
			n=2976 SOC n=1498

Verificou-se a ocorrência de efeitos secundários em 69,2% dos participantes do grupo evolocumab e em 64,8% dos participantes do grupo padrão. Registaram-se também efeitos adversos graves em 7,5% dos participantes do grupo evolocumab e do grupo padrão. Ocorreram ainda elevações dos níveis de aminotransferase e creatina cinase na mesma proporção de grandeza nos dois grupos, o aumento dos valores de aminotransferase foi de 1,0% no grupo evolocumab e 1,2% no grupo padrão e no caso dos valores de creatina cinase esses aumentos situaram-se nos 0,6% e 1,1% para o grupo evolocumab e padrão respetivamente. Foram descritos ainda que de forma diminuta (<1%) efeitos adversos neurocognitivos, tendo estes acontecido com maior frequência no grupo evolocumab (Sabatine *et al.* 2015).

Os participantes do grupo evolocumab obtiveram uma diminuição significativa da incidência de eventos cardiovasculares comparativamente ao grupo com a terapêutica padrão (Sabatine *et al.*, 2015).

Foram descritos alguns efeitos adversos não específicos como artralgia, cefaleias, dores nos membros, cansaço, bem como efeitos adversos neurocognitivos, sendo que estes

manifestaram-se sobretudo no grupo do evolocumab. Contudo estão ainda a ser desenvolvidos ensaios mais abrangentes sobre os efeitos do evolocumab a nível neurocognitivo, que poderão produzir resultados mais definitivos sobre a segurança do evolocumab a nível neurológico (tabela 14) (ClinicalTrials, 2015; Sabatine *et al.*, 2015).

Tabela 14. Representação dos efeitos adversos inerentes ao ensaio OSLER (1 e 2) (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Efeitos adversos	Grupo Evolocumab (N = 2976) n (%)	Grupo Padrão (N = 1489) n (%)
	Qualquer	2060 (69,2)
Graves	222 (7,5)	111 (7,5)
Originam descontinuação evolocumab	71 (2,4)	Não aplicável
Musculares	190 (6,4)	90 (6,0)
Reações local injeção	129 (4,3)	Não aplicável
Eventos neurocognitivos	27 (0,9)	4 (0,3)
Outros		
Artralgia	137 (4,6)	48 (3,2)
Enxaquecas	106 (3,6)	32 (2,1)
Dores nos membros	99 (3,3)	32 (2,1)
Fadiga	83 (2,8)	15 (1,0)
Resultados Laboratoriais		
Alanina ou aspartato aminotransferase >3 × LMN em qualquer visita	31 (1,0)	18 (1,2)
Creatina cinase >5 × LMN em qualquer visita	17 (0,6)	17 (1,1)

Legenda: Limite máximo normal (LMN).

Novos anticorpos de ligação ao evolocumab foram detetados em 9 participantes no grupo evolocumab perfazendo uma percentagem de 0,3%, tendo também sido detetados tais anticorpos em 4 participantes do grupo padrão o que corresponde a uma percentagem de 0,3%. Não foram detetados quaisquer anticorpos neutralizantes contra o evolocumab (Sabatine *et al.*, 2015).

Nos ensaios OSLER-1 e OSLER-2 comprovou-se a capacidade de redução dos níveis de C-LDL pelo evolocumab tendo-se obtido uma redução percentual na ordem dos

61%, tendo os valores de C-LDL sido reduzidos de valores médios pré-tratamento de 120 mg/dL para valores médios de 48 mg/dL ao fim de 12 semanas de tratamento. Estes valores foram consistentes com o reportado anteriormente nos ensaios prévios de curta duração do evolocumab. Os valores observados de redução dos níveis de C-LDL foram mantidos ao longo de 48 semanas, sendo consistentes com os resultados previamente apresentados nos ensaios de menor duração com evolocumab, tendo-se verificado a mesma situação, no que respeita ao observado para os valores de outras frações lipídicas (figura 21) (Sabatine et al., 2015).

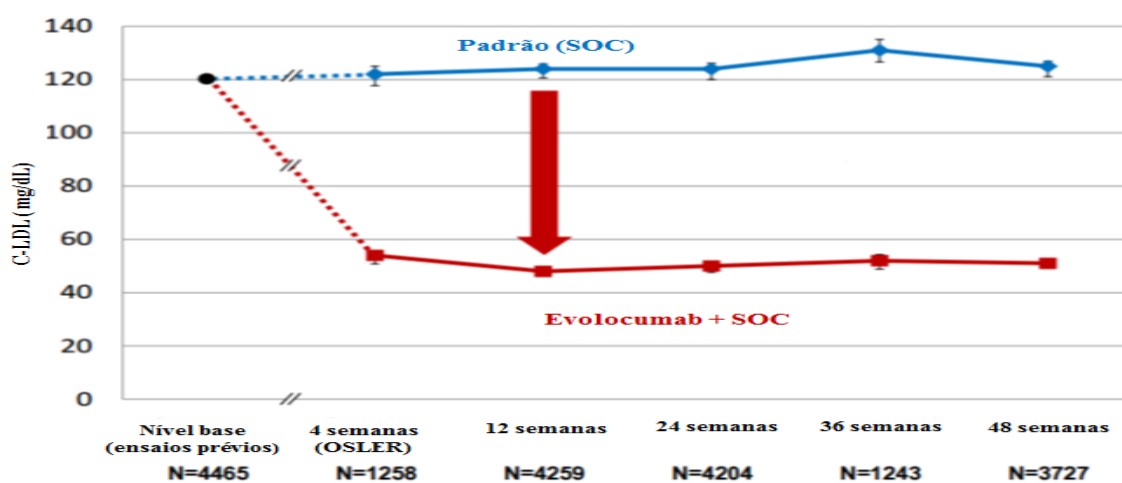


Figura 21. Representação da redução dos valores de C-LDL obtida para os grupos com terapêutica com evolocumab e padrão (Adaptado de Sabatine *et al.*, 2015).

Existem, contudo, ainda questões por responder, nomeadamente sobre se a redução dos níveis de C-LDL com os inibidores da PCSK9, resultará numa possível redução dos eventos cardiovasculares. O evolocumab ao contrário do que sucede com outros fármacos utilizados na redução dos níveis lipídicos, que não as estatinas, provoca uma redução dos níveis de C-LDL tanto igual ou maior do que as próprias estatinas em doses elevadas, tendo estas demonstrado também ao longo das duas últimas décadas uma capacidade de redução dos eventos cardiovasculares e sabendo que tanto as estatinas como os inibidores da PCSK9 partilham o mesmo mecanismo final de redução do C-LDL, por aumento da atividade do R-LDL na superfície dos hepatócitos, sugerindo que eventualmente os inibidores da PCSK9 possam de forma semelhante às estatinas produzir efeitos benéficos a nível cardiovascular (Sabatine et al., 2015).

Há ainda que ter em consideração que o potencial de redução dos eventos cardiovasculares por parte dos inibidores da PCSK9 advém da observação das variações genéticas de “perda de função” que originam uma redução da atividade da PCSK9 e estando associadas à redução da incidência de eventos cardiovasculares ao longo da vida dos indivíduos. Como tal a redução de eventos cardiovasculares verificada nos ensaios OSLER ao longo do primeiro ano de terapêutica com evolocumab, gerou grande expectativa e demonstrou ser consistente com a grande redução dos níveis de C-LDL observada, bem como com os seus mecanismos de ação e com os dados genéticos da PCSK9, apesar do carácter exploratório destes ensaios e de se basear num pequeno número de eventos observados (Sabatine et al., 2015).

O estudo OSLER foi o maior e mais longo estudo efetuado sobre a avaliação da eficácia e segurança da terapêutica com anticorpos anti-PCSK9 até hoje realizado. A terapêutica com evolocumab demonstrou ser capaz de reduzir os níveis de C-LDL em 61% ao longo de um período de 12 semanas, tendo-se mantido esta percentagem de redução de forma sustentada ao longo dos 11 meses seguintes. O ensaio provou também através da análise pré-especificada e exploratória, a capacidade do evolocumab em reduzir a incidência de eventos cardiovasculares entre os participantes do ensaio. A taxa de eventos cardiovasculares em 1 ano foi reduzida de 2,18 % no grupo de terapia padrão de 0,95% no grupo evolocumab (razão de risco no grupo evolocumab 0,47; intervalo de confiança de 95 %, 0,28 a 0,78; $p = 0,003$). Estes resultados obtidos numa população tão diversa como a que foi alvo de observação neste estudo, revelaram elevada eficácia, consistência e tolerância face à terapêutica administrada. Os resultados dos ensaios em curso irão futuramente definir a utilidade clínica do evolocumab e de outros agentes desta classe, na emergente abordagem terapêutica de redução dos níveis de C-LDL com os inibidores da PCSK9 (Sabatine et al., 2015).

10.8.5 Ensaio a Decorrer

10.8.5.1 FOURIER

The Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects With Elevated Risk (FOURIER) é um ensaio que está a decorrer e que tem principal

objetivo recolher informação que comprove os benefícios a nível cardiovascular da administração de evolocumab. Este ensaio é do tipo aleatório, com placebo como controlo, envolvendo 27500 participantes apresentando elevado risco de desenvolver doença cardiovascular e que estavam já a receber tratamento de fundo com estatinas (figura 22). Segundo o *U.S. National Institutes of Health* a data prevista para serem conhecidos os primeiros dados deste estudo está prevista para Outubro de 2017, devendo este ensaio estar concluído em Fevereiro de 2018 (ClinicalTrials, 2015).

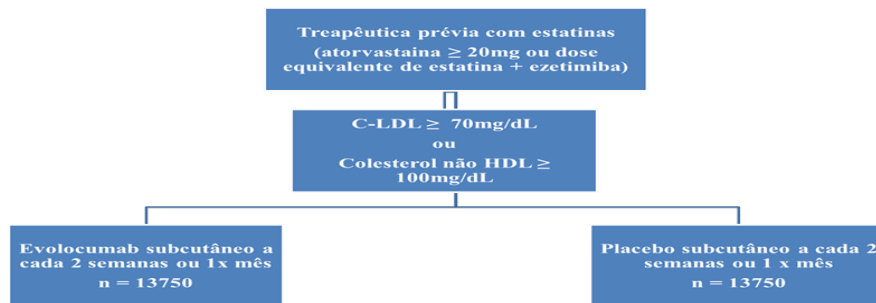


Figura 22. Ensaio FOURIER

11. Alirocumab

O alirocumab foi o primeiro anticorpo monoclonal inibidor da PCSK9 aprovado para introdução no mercado norte americano pela FDA em julho de 2015, tendo igualmente sido aprovado o seu uso na UE pela EMA em setembro de 2015. O alirocumab foi desenvolvido pela empresa farmacêutica Regeneron/Sanofi tendo o nome comercial de Praluent™. O alirocumab encontra-se indicado como complemento da dieta, ou da terapêutica com doses de estatinas máximas toleradas no tratamento de hipercolesterolemia heterozigótica familiar ou doença aterosclerótica cardiovascular em adultos que necessitam de redução acrescida dos níveis de C-LDL. O efeito do alirocumab em termos de morbilidade e mortalidade cardiovascular encontra-se ainda a ser determinado nos ensaios clínicos de longa duração. O alirocumab é comercializado e pode ser administrado de duas formas distintas, ou em canetas pré cheias de 75 mg e 150 mg, ou em seringas pré cheias de 75 mg e 150 mg (Praluent, 2015).

11.1 Mecanismo de Ação

O alirocumab é um anticorpo monoclonal humano IgG1 que se liga ao PCSK9, inibindo assim a sua ligação ao R-LDL, provocando um aumento do número de R-LDL disponíveis para eliminarem o C-LDL, diminuindo os níveis de C-LDL (Praluent, 2015).

11.2 Farmacocinética Alirocumab

A concentração sérica máxima é normalmente atingida após a administração subcutânea de 50 mg a 300 mg de alirocumab e ao fim de 3-7 dias. A farmacocinética do alirocumab após uma administração de 75 mg no abdómen, antebraço ou coxa foi em todos os casos similar. A biodisponibilidade do alirocumab após administração subcutânea foi de 85%. O *steady state* foi atingido ao fim de 2 a 3 doses com um ratio de acumulação de cerca de dobro (Praluent, 2015).

Após a administração intravenosa, o volume de distribuição foi de 0,04 a 0,05 L/kg indicando que o alirocumab é distribuído inicialmente pelo sistema circulatório (Praluent, 2015).

O alirocumab é constituído unicamente por aminoácidos, hidratos de carbono e uma imunoglobulina nativa, é improvável a sua eliminação por mecanismos de metabolismo hepático, sendo expectável que o seu metabolismo e eliminação sigam as vias de depuração da imunoglobulina, resultando na degradação em pequenos péptidos e aminoácidos individuais (Praluent, 2015).

Existem duas vias distintas de eliminação do alirocumab. Para baixas concentrações a eliminação ocorre predominantemente através da ligação saturável ao seu alvo (PCSK9), enquanto que para concentrações elevadas a eliminação do alirocumab acontece através de um via proteolítica não saturável. Com base na análise farmacocinética da população, o tempo de semi-vida médio do alirocumab no *steady state* foi de 17 a 20 dias em participantes recebendo alirocumab em monoterapia com

doses subcutâneas de 75 mg de 2 em 2 semanas, ou de 150 mg a cada 2 semanas. Quando co-administrado com estatinas, o tempo médio de semi-vida do alirocumab foi de 12 dias (Praluent, 2015).

11.3 Efeitos Adversos

Foram reportadas algumas reações de hipersensibilidade em indivíduos em terapêutica com alirocumab, como *rash*, urticária, vasculite hipersensível, reações de hipersensibilidade requerendo hospitalização (Praluent, 2015).

11.4 Indicação Terapêutica

O arilicumab encontra-se indicado, como adjuvante da dieta e da terapêutica com doses máximas toleradas de estatinas, no tratamento de hipercolesterolemia heterozigótica familiar e doença cardiovascular aterosclerótica clínica, em adultos que necessitam de redução adicional dos níveis de C-LDL (Praluent, 2015).

A dose inicial de alirocumab recomendada é de 75 mg, administrada por via subcutânea, a cada 2 semanas. Se a resposta de redução dos níveis de C-LDL a essa dose for inadequada, poder-se-á recorrer a um aumento da mesma para uma dosagem máxima de 150 mg, administrados de 2 em 2 semanas. Recomenda-se ainda que se meçam os níveis de C-LDL, entre as primeiras 4 a 8 semanas de tratamento, para que seja possível avaliar a resposta à terapêutica farmacológica e ajustar a dose, caso seja necessário (Praluent, 2015).

11.5 Contra Indicações e Precauções Especiais

O alirocumab encontra-se contra indicado nos casos de historial de hipersensibilidade severa à substância ativa ou a qualquer um dos excipientes (Praluent, 2015).

Não existem até ao momento dados relativos ao uso de alirocumab em mulheres grávidas, pelo que não são conhecidos possíveis riscos associados ao fármaco (Praluent, 2015).

Experiências efetuadas pela FDA com anticorpos monoclonais em humanos, indicaram que estes apresentam reduzida probabilidade de atravessar a placenta no primeiro trimestre de gestação, contudo o mesmo não se observa para o segundo e terceiro trimestres, podendo os anticorpos monoclonais atravessar a placenta em quantidades crescentes. Como tal antes de se prescrever o seu uso, devem ponderar-se os benefícios e os possíveis riscos para o feto (Praluent, 2015).

Não existe até á data informação relativamente à presença de alirocumab no leite materno, ou do seu efeito em lactentes, bem como sobre a produção de leite materno.

11.6 Avaliação de Eficácia e Segurança do Alirocumab

O alirocumab foi avaliado em ensaios de Fase II, durante 12 semanas (tabela 15).

Tabela 15. Ensaio fase 2 com arilocumab.

Ensaio	Design	Participantes	Terapêutica
DFI 11565	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo, dose variável	C-LDL \geq 100mg/dL estável com atorvastatina	Alirocumab: 50 mg subcutâneo 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 30
			Alirocumab: 100 mg subcutâneo 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 31
			Alirocumab: 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 31

Inibidores PCSK9

			<p>Alirocumab: 200 mg subcutâneo 1xmês durante 12 semanas alternando com placebo subcutâneo 1xmês (1 injeção 2 em 2 semanas) n = 30</p>
			<p>Alirocumab: 300 mg subcutâneo 1xmês durante 12 semanas alternando com placebo subcutâneo 1xmês (1 injeção 2 em 2 semanas) n = 30</p>
			<p>Placebo: subcutâneo 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 31</p>
CL-1003	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo, dose variável	HeFH com C-LDL \geq 100 mg/dL estável com estatina \pm ezetimiba	<p>Alirocumab: 150 mg subcutâneo 1xmês durante 12 semanas alternando com placebo subcutâneo 1xmês (1 injeção 2 em 2 semanas) n = 15</p>
			<p>Alirocumab: 200 mg subcutâneo 1xmês durante 12 semanas alternando com placebo subcutâneo 1xmês (1 injeção 2 em 2 semanas) n = 16</p>
			<p>Alirocumab: 300 mg 1xmês durante 12 semanas alternando com placebo subcutâneo 1xmês (1 injeção 2 em 2 semanas) n = 15</p>
			<p>Alirocumab: 150 mg subcutâneo de 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 16</p>
			<p>Placebo: subcutâneo de 2 em 2 semanas durante 12 semanas n = 15</p>

Os resultados obtidos foram favoráveis e progrediram para os ensaios de fase III;

11.6.1 ODYSSEY FH I, FH II e HIGH FH

O programa ODYSSEY é um conjunto de ensaios clínicos com o objetivo de avaliar o alirocumab em tanto em doentes com colesterol elevado ou com hipercolesterolemia familiar não controlados adequadamente com outros tratamentos de redução lipídica. Cada ensaio ODYSSEY tem um desenho próprio e critérios de elegibilidade dependentes do tipo de participantes com colesterol elevado.

Os ensaios ODYSSEY, *Efficacy and Safety of Alirocumab (SAR236553/REGN727) Versus Placebo on Top of Lipid-Modifying Therapy in Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Not Adequately Controlled With Their Lipid-Modifying Therapy*, FH I, FH II e HIGH FH, são 3 ensaios de fase III, que têm por objetivo a avaliação a longo prazo da eficácia e segurança da administração de evolocumab em indivíduos com hipercolesterolemia heterozigótica familiar (tabela 16) (Kastelein *et al.*, 2015).

Tabela 16. Representação dos ensaios ODYSSEY FH I e FH II

Ensaio	Design	Participantes	Terapêutica
FH I (EFC12492)	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	HeFH não controlada com estatinas ± outra terapêutica redução lipídica (LDL-C ≥ 70 mg/dL com DCV ou ≥ 100 mg/dL sem DCV documentada)	Alirocumab:75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possível aumento da dose para 150 mg 2 em 2 semanas por 78 semanas (n =323) Placebo: subcutâneo 2 em 2 semanas por 78 semanas (n =163)
FH II (CL-1112)	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	HeFH não controlada com estatinas ± outra terapêutica redução lipídica (LDL-C ≥ 70 mg/dL com DCV ou ≥ 100 mg/dL sem DCV documentada)	Alirocumab:75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possível aumento da dose para 150 mg 2 em 2 semanas por 78 semanas (n =167) Placebo: subcutâneo 2 em 2 semanas por 78 semanas (n =82)

Os resultados obtidos demonstraram que em média os níveis C-LDL foram reduzidos de 144,7 mg/dL (3,7 mmol/L) no nível base para 71,3 mg/dL (1,8 mmol/L; -57,9% vs. placebo). Na semana 24, nos participantes aleatoriamente selecionados para receber alirocumab no ensaio FH I, verificou-se uma redução dos níveis base de 134,6 mg/dL (3,5 mmol/L) para 67,7 mg/dL (1,8 mmol/L; 51,4% vs. placebo) e no ensaio FH II ($p < 0,0001$). Estas reduções mantiveram-se até à semana 78. Foram atingidos na semana 24 níveis de C-LDL < 67,7 mg/dL (1,8 mmol/L) por 59,8 % e 68,2% dos participantes tratados com alirocumab nos ensaios FH I e FH II, respetivamente. Ocorreram efeitos adversos que resultaram na descontinuação do tratamento com arilocumab em 3,4% dos participantes tratados com esta terapêutica no ensaio FH I (vs. 6,1% placebo) e em 3,6% (vs. 1,2%) dos participantes em terapêutica com arilocumab no ensaio FH II. Cerca de 12,4% dos pacientes tratados com arilocumab no ensaio FH I e 11,4% no ensaio FH II apresentaram reações no local de injeção (vs. 11,0% e 7,4% com placebo respetivamente) (tabela 17) (tabela 18) (Kastelein *et al.*, 2015).

Tabela 17. Representação da redução do C-LDL nos ensaios ODYSSEY FH I e FH II

Redução C-LDL		
Média	FH I	FH II
144,7 mg/dL – 71,3 mg/dL (3,7 mmol/L – 1,8 mmol/L)	134,6 mg/dL – 67,7 mg/dL (3,5 mmol/L – 1,8 mmol/L)	134,6 mg/dL – 67,7 mg/dL (3,5 mmol/L – 1,8 mmol/L)
% Redução		
-57,9 % vs placebo	-51,4 % vs placebo	-51,4 % vs placebo

Tabela 18. Representação dos efeitos adversos observados nos ensaios ODYSSEY FH I e FH II

Efeitos adversos	FH I	FH II
Efeitos adversos que resultam em descontinuação (%)	3,4% vs. 6,1% placebo	3,6% vs. 1,2% placebo
Reações local injeção (%)	12,4% vs. 11,0% placebo	11,4% vs. 7,4% placebo

No ensaio ODYSSEY HIGH FH, observou-se uma redução significativa dos níveis de C-LDL de cerca de 45,7% nos participantes do grupo evolocumab em comparação aos 6,6% observados para os participantes do grupo placebo, ao fim de 24 semanas e tendo-

se mantido ao longo de 52 semanas (tabela 19). Os valores absolutos de C-LDL sofreram uma redução de 90,8 mg/dL do nível base, com a terapêutica com evolocumab, comparativamente à redução de 15,5 mg/dL observada para o grupo placebo ao fim de 24 semanas. A incidência de efeitos adversos devido ao tratamento foi comparável entre os grupos (Kastelein *et al.*, 2015).

Tabela 19. Representação do ensaio ODYSSEY HIGH FH

Ensaio	Design	Duração	Participantes	Terapêutica
HIGH FH (EFC12732)	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	88 semanas	HeFH e C-LDL \geq 160 mg/dL apesar Estáveis com dose máxima estatinas diária \pm outra terapêutica de redução lipídica	Alirocumab: 150 mg subcutâneo de 2 em 2 semanas, por 78 semanas n = 72 Placebo: subcutâneo de 2 em 2 semanas, por 78 semanas n = 35

O tratamento com alicumab nos indivíduos com HeFH e níveis de C-LDL inadequadamente controlados, apesar da terapêutica com níveis máximos tolerados de estatinas, com ou sem outra terapêutica de redução lipídica, resultou numa apreciável e acentuada redução dos níveis de C-LDL, tendo-se atingido os níveis de impostos. A terapêutica com alicumab foi bem tolerada. (Kastelein *et al.*, 2015).

11.6.2 ODYSSEY COMBO I e COMBO II

O ensaio ODYSSEY COMBO I, *Efficacy and Safety of Alirocumab (SAR236553/REGN727) Versus Placebo on Top of Lipid-Modifying Therapy in Patients With High Cardiovascular Risk and Hypercholesterolemia*, têm como propósito avaliar a eficácia e segurança do alicumab em terapêutica combinada com a terapêutica estável com estatinas na dose diária máxima tolerada, com ou sem outra terapêutica de redução lipídica, em indivíduos com elevado risco cardiovascular com hipercolesterolemia (tabela 20) (Kereiakes *et al.*, 2015).

Tabela 20. Representação do ensaio ODYSSEY COMBO I.

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
COMBO I (EFC11568)	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	14 meses	Historia de DCV e C-LDL \geq 70 mg/dL ou diabetes com fatores de risco C-LDL \geq 100 mg/dL terapêutica estável de estatinas na dose máxima tolerada \pm outra terapêutica de redução lipídica	Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12 ^a semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 52 semanas n = 209 Placebo: subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 52 semanas n = 107

Ao fim de 24 semanas, ocorreu uma redução dos níveis de C-LDL comparativamente aos níveis base de 48,2% e -2.3% para o grupo alirocumab e grupo placebo, respetivamente ($p < 0,0001$). Níveis de C-LDL < 70 mg/dL foram atingidos por 75% dos participantes do grupo alirocumab vs 9% dos participantes do grupo placebo ao fim de 24 semanas. Ao fim de 12 semanas, 83,2% dos participantes do grupo alirocumab decidiram permanecer com a dose de 75 mg de 2 em 2 semanas. Os efeitos adversos emergentes foram comparáveis entre os diferentes grupos. A terapêutica com alirocumab originou uma significativa redução nos níveis de C-LDL e permitiu que uma vasta maioria dos participantes atingissem os níveis esperados de C-LDL, vs o grupo placebo após 24 semanas. A incidência de efeitos adversos e a descontinuação da terapêutica em estudo foram comparáveis entre os diferentes grupos (tabela 21) (Kereiakes *et al.*, 2015).

Tabela 21. Resultados do ensaio COMBO I ao fim de 24 semanas.

Resultados ao fim de 24 semanas		
	Alirocumab	Placebo
Redução C-LDL (%)	48,2 %	2,3 %
% participantes que atingiram níveis C-LDL \leq 70 mg/dL	75,0 %	9,0 %

O ensaio ODYSSEY COMBO II, *Efficacy and Safety of Alirocumab (SAR236553/REGN727) Versus Ezetimibe on Top of Statin in High Cardiovascular Risk Patients With Hypercholesterolemia*, é apresentado na (tabela 22) (Cannon *et al.*, 2015).

Tabela 22. Representação do ensaio ODYSSEY COMBO II

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
COMBO II (EFC11569)	Aleatório, duplamente cego, controlo ezetimiba	26 meses	Historia de DCV e C-LDL \geq 70 mg/dL ou diabetes com fatores de risco C-LDL \geq 100 mg/dL em terapêutica com estatinas	Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12 ^a semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 104 semanas n = 479 Ezetimiba: 10 mg oral diariamente ao longo de 104 semanas n = 241

Ao fim de 24 semanas os níveis de C-LDL, sofreram uma redução dos níveis base de 50,6% para o grupo alirocumab vs. 20,7% para o grupo ezetimiba ($p < 0.0001$). Cerca de 77,0% dos participantes do grupo alirocumab e 45,6% dos participantes pertencentes ao grupo ezetimiba atingiram níveis de C-LDL < 70 mg/dL ($p < 0.0001$). Os valores médios de C-LDL obtidos ao fim de 24 semanas foram de 50 mg/dL para o grupo com alirocumab e 81 mg/dL para o grupo com ezetimiba, tendo-se mantido ao longo de 52 semanas. O alirocumab foi bem tolerado, sem evidência de incidência excessiva de efeitos adversos, resultantes do tratamento terapêutico. O alirocumab originou uma redução relevante dos níveis de C-LDL, comparativamente com o grupo com ezetimiba, tendo ambos os grupos, apresentado um perfil de segurança semelhante (tabela 23) (tabela 24) (Cannon *et al.*, 2015).

Tabela 23. Representação dos resultados obtidos no ensaio COMBO II ao fim de 24 semanas

Resultados ao fim de 24 semanas		
	Alirocumab	Ezetimiba
Redução C-LDL (%)	50,6 %	20,7 %
% participantes que atingiram níveis C-LDL \leq 70 mg/dL	77,0 %	45,6 %

Tabela 24. Efeitos adversos observados para os grupos em terapêutica com alirocumab e ezetimiba
(Adaptado de Cannon *et al.*, 2015).

	Alirocumab (n = 479)	Ezetimiba (n = 241)
Quaisquer efeitos adversos resultantes do tratamento (n (%))	341 (71,2)	162 (67,2)
Efeitos adversos graves resultantes do tratamento (n (%))	90 (18,8)	43 (17,8)
Efeitos adversos resultantes do tratamento que resultaram em morte (n (%))	2 (0,4)	4 (1,7)
Efeitos adversos resultantes do tratamento que resultaram em descontinuação da terapêutica (n (%))	36 (7,5)	13 (5,4)
Overdose acidental (n (%))	30 (6,3)	16 (6,6)
Infeção trato respiratório superior (n (%))	31 (6,5)	14 (5,8)
Tonturas (n (%))	23 (4,8)	13 (5,4)
Mialgia (n (%))	21 (4,4)	12 (5,0)
Reações local injeção (n (%))	12 (2,5)	2 (0,8)
Desordens neurocognitivas (n (%))	4 (0,8)	3 (1,2)
Eventos cardiovasculares adjudicados (n (%))	23 (4,8)	9 (3,7)
Morte por doença cardiovascular (mesmo sem causa determinada) (n (%))	2 (0,4)	2 (0,8)
Enfarte do miocárdio não fatal (n (%))	12 (2,5)	3 (1,2)
Acidente vascular cerebral isquémico fatal / não fatal (n (%))	1 (0,2)	1 (0,4)
Angina instável necessitando hospitalização (n (%))	1 (0,2)	0
Falência cardíaca congestiva necessitando hospitalização (n (%))	1 (0,2)	1 (0,4)
Necessitando procedimento de revascularização coronária isquémica (n (%))	16 (3,3)	4 (1,7)
Parâmetros laboratoriais		
Alanina aminotransferase >3 × LMN (n (%))	8/470 (1,7)	1/240 (0,4)
Creatina cinase >3 × LMN (n (%))	13/467 (2,8)	6/236 (2,5)

11.6.3 ODYSSEY OPTIONS I e OPTIONS II

O principal objetivo do ensaio, *Study of the Efficacy and Safety of Alirocumab (REGN727/SAR236553) in Combination With Other Lipid-modifying Treatment*, (ODYSSEY OPTIONS I) é avaliar a segurança e eficácia de redução dos níveis de C-LDL através da combinação da terapêutica de alirocumab com atorvastatina nas doses comumente utilizadas (20 mg ou 40 mg) e comparando-a com as alternativas terapêuticas: utilizar ezetimiba, dobrar a dose de atorvastatina, ou substituir a dose de atorvastatina 40 mg para rosuvastatina 40 mg (tabela 25) (Bays *et al.*, 2015).

Tabela 25. Representação do ensaio OPTION I

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
OPTIONS I (CL-1110)	Aleatório, duplamente cego, controlo ativo (Ezetimiba, atorvastatina, rosuvastatina)	34 semanas	Risco elevado/muito, elevado de DCV sem FH ou com heFH não controlada adequadamente com atorvastatina (20 mg ou 40 mg) ± outra terapêutica de redução lipídica (excluindo ezetimiba)	<p>Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12^a semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 24 semanas n = 104</p> <p>Ezetimiba: 10 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas n = 102</p> <p>Atorvastatina: 40 mg ou 80 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas n = 102</p> <p>Rosuvastatina: 40 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas n = 45</p>

Entre os dois regimes de atorvastatina possíveis, de 20 e 40 mg, combinados com alirocumab obtiveram-se valores de redução dos níveis de C-LDL de 44,1% e 54,0% respetivamente ($p < 0,001$). Combinando com ezetimiba obtiveram-se valores percentuais de redução de C-LDL de 20,5% e 22,6%. No caso de se dobrar a dose de atorvastatina os valores obtidos percentualmente, de redução do C-LDL, foram de 5,0% e 4,8%. Alterando a atorvastatina 40 mg por rosuvastatina 40 mg, obtiveram reduções do valor de C-LDL de 21,4%. Cerca de 87% dos participantes tratados com alirocumab atingiram os valores propostos de C-LDL. Um total de 86% dos participantes recebendo a terapêutica com alirocumab mantiveram o regime com a dose de 75 mg de 2 em 2 semanas. Os efeitos adversos decorrentes do tratamento ocorreram em 65,4% dos participantes em terapêutica com alirocumab vs 64,4% dos participantes em terapêutica com ezetimibe e 63,8% dos participantes do grupo em terapêutica com o dobro da dose de atorvastatina que alteraram para rosuvastatina (tabela 26) (tabela 27) (Bays *et al.*, 2015).

Tabela 26. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS I para os diferentes grupos terapêuticos.

	Alirocumab + atorvastatina 20mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + atorvastatina 20mg + ezetimiba 10mg	Placebo (alirocumab) + atorvastatina 40mg (2x 20mg) + placebo (ezetimiba)
Redução C-LDL (%)	44,1%	20,5%	5,0%

Tabela 27. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS I para os diferentes grupos terapêuticos.

	Alirocumab + atorvastatina 40mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + atorvastatina 40mg + ezetimiba 10mg	Placebo (alirocumab) + atorvastatina 80mg (2x 40mg) + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + rosuvastatina 40mg + Placebo (ezetimiba)
Redução C-LDL (%)	54,0%	22,6%	4,8%	21,4%

O ensaio, *Study of Alirocumab (REGN727/SAR236553) added-on to Rosuvastatin Versus Other Lipid Modifying Treatments (OPTIONS II)*, focou-se na avaliação da terapêutica combinada de alirocumab e rosuvastatina, comparando-a com a terapêutica com ezetimiba ou com a terapêutica com o dobro da dose de rosuvastatina. Os participantes receberam rosuvastatina 10 mg ou 20 mg como terapêutica de base, tendo recebido as mesmas dosagens por um período igual ou superior a 4 semanas (tabela 28) (Jennifer *et al.*, 2014).

Tabela 28. Representação do ensaio OPTIONS II

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
OPTIONS II (CL-1110)	Aleatório, duplamente cego, controlo ativo (ezetimiba, rosuvastatina)	40 semanas	Risco elevado/muito, elevado de DCV sem FH ou com heFH não adequadamente controlada com atorvastatina (20 mg ou 40 mg) ± outra terapêutica de redução lipídica (excluindo ezetimiba)	Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12 ^a semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 24 semanas; n = 103 Ezetimiba: 10 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas; n = 101

				Rosuvastatina: 10 mg ou 20 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas; n = 101
--	--	--	--	--

No ensaio ODYSSEY OPTIONS II, os participantes a quem foi administrado alirocumab 75 mg a cada 2 semanas (com opção de aumentar a dose para 150 mg a cada 2 semanas, na semana 12) com rosuvastatina 10 mg/dia obtiveram uma redução dos níveis de C-LDL de 36,1 mg/dL, comparativamente aos participantes que efetuaram a terapêutica com ezetimiba 10 mg/dia em combinação com rosuvastatina 10 mg/dia e uma diferença de redução dos níveis de C-LDL de 34,2% comparativamente com os participantes a quem foi administrada rosuvastatina com o dobro da dose 20 mg/dia ($p < 0,0001$ para ambos). Quando se administrou rosuvastatina 20 mg/dia, em combinação com alirocumab 75 mg a cada 2 semanas (com opção de aumentar a dose para 150 mg a cada 2 semanas, na semana 12) obteve-se uma redução dos níveis de C-LDL de cerca de 25,3 mg/dL, comparativamente com o observado para os participantes a quem foi administrado ezetimiba 10 mg/dia, em combinação com rosuvastatina 20 mg/dia ($p=0,0136$) e uma diferença de redução de C-LDL de 20,3 mg/dL, comparativamente com os participantes que receberam rosuvastatina no dobro da dose 40 mg/dia ($p=0,0453$) (tabela 29 e 30). O perfil de segurança foi comparável entre os diferentes grupos (Jennifer *et al.*, 2014).

Tabela 29. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS II para os diferentes grupos terapêuticos

Grupo 1 (alirocumab)	Grupo 2 (rosuvastatina 20mg)	Grupo 3 (ezetimiba 10mg)
Alirocumab + rosuvastatina 10mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + rosuvastatina 20mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + rosuvastatina 10mg + Ezetimiba 10mg
	Grupo 1 vs. Grupo 2	Grupo 1 vs. Grupo 3
Redução C-LDL mg/dL	-34,2 mg/dL (redução que o grupo 2)	-36,1 mg/dL (redução que o grupo 3)

Tabela 30. Representação dos resultados obtidos no ensaio OPTIONS II para os diferentes grupos terapêuticos

Grupo 1 (alirocumab)	Grupo 2 (rosuvastatina 20mg)	Grupo 3 (ezetimiba 10mg)
Alirocumab + rosuvastatina 20mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + rosuvastatina 40mg + placebo (ezetimiba)	Placebo (alirocumab) + rosuvastatina 20mg + Ezetimiba 10mg
	Grupo 1 vs. Grupo 2	Grupo 1 vs. Grupo 3
Redução C-LDL mg/dL	-20,3 mg/dL (redução que o grupo 2)	-25,3 mg/dL (redução que o grupo 3)

11.6.4 ODYSSEY MONO

O objetivo deste ensaio, *Efficacy and Safety of Alirocumab SAR236553 (REGN727) Versus Ezetimibe in Patients With Hypercholesterolemia (ODYSSEY MONO)*, é avaliar o alirocumab comparando-o com ezetimiba, em indivíduos com hipercolesterolemia e risco cardiovascular moderado que não recebem terapêutica com estatinas, durante 24 semanas (tabela 31) (Roth *et al.*, 2014).

Tabela 31. Representação do ensaio ODYSSEY MONO

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
MONO (EFC11716)	Aleatório, duplamente cego, controlo ezetimiba	34 semanas	Níveis de C-LDL entre 100 mg/dL and 190mg/dL com risco CV moderado (10 anos risco DCV fatal $\geq 1\%$ e $< 5\%$ segundo <i>Systematic Coronary Risk Estimation (SCORE)</i>)	Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12 ^a semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 24 semanas n = 52 Ezetimiba: 10 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas n = 51

Na semana 12, antes do aumento de dose de alirocumab 75 mg a cada 2 semanas, os níveis de C-LDL haviam sido reduzidos em cerca de 53% do nível base. O período de tratamento de 24 semanas foi completado por 85% dos participantes do grupo alirocumab e por 86% dos participantes do grupo ezetimiba. Na semana 24, observou-se uma redução dos níveis de C-LDL de 47,2% no que respeita aos participantes tratados com alirocumab e de 15,6% no caso dos participantes com terapêutica com ezetimiba ($p < 0,0001$) (tabela 32). Os parâmetros de segurança e de efeitos adversos foram semelhantes entre os dois grupos. Reações adversas no local de injeção foram pouco frequentes, tendo representação em termos percentuais de 2% em relação ao grupo com alirocumab e de 4% em relação ao grupo com ezetimiba. A terapêutica com alirocumab na dose mínima de 75 mg a cada 2 semanas, foi suficiente para originar uma redução dos níveis de C-LDL $\geq 50\%$ na vasta maioria dos participantes (tabela 33) (Roth M.E. *et al.*, 2014).

Tabela 32. Representação dos resultados obtidos para os diversos parâmetros avaliados no ensaio MONO em função dos diferentes grupos terapêuticos (Adaptado de Roth *et al.*, 2014).

Parâmetros em avaliação	Alirocumab 75 mg (cada 2 semanas)	Ezetimibe 10 mg	Alirocumab vs ezetimibe
C-LDL (%)	47,2 (3,0)	15,6 (3,1)	31,6
Apo B (%)	40,8 (1,9)	11,5 (1,9)	29,2 (2,6)
Colesterol não HDL (%)	47,1 (1,9)	16,6 (1,9)	30,5 (2,7)
Colesterol total (%)	34,2 (1,6)	12,0 (1,6)	22,2 (2,3)
Lp(a) (%)	17,7 (4,1)	12,3 (4,0)	5,4 (5,7)
Triglicéridos (%)	14,7 (4,4)	12,7 (4,2)	1,9 (6,0)
C-HDL (%)	(+)8,0 (1,9)	(+) 1,7 (1,9)	(+) 6,2 (2,7)
Apo A1 (%)	(+) 5,3 (1,6)	(+) 0,7 (1,6)	(+) 6,1 (2,3)

Tabela 33. Representação dos efeitos adversos observados no ensaio MONO em função dos diferentes grupos terapêuticos (Adaptado de Roth *et al.*, 2014).

Efeitos adversos	Alirocumab 75 mg cada 2 semanas (n = 52)	Ezetimibe 10 mg (n = 51)
Nasofaringite (n (%))	12 (23,1)	8 (15,7)
Diarreia (n (%))	6 (11,5)	2 (3,9)
Gripe (n (%))	6 (11,5)	3 (5,9)
Artralgia (n (%))	3 (5,8)	2 (3,9)
Cefaleias (n (%))	3 (5,8)	2 (3,9)
Náuseas (n (%))	3 (5,8)	3 (5,9)
Infeção trato respiratório superior (n (%))	2 (3,8)	5 (9,8)
Lombalgia (n (%))	1 (1,9)	3 (5,9)
Tonturas (n (%))	1 (1,9)	3 (5,9)
Infeção trato urinário (n (%))	0	3 (5,9)
Desordens tecido musculoesquelético e conetivo (n (%))	8 (15,4)	11 (21,6)
Musculares (n (%))	2 (3,8)	2 (3,9)
Mialgia (n (%))	2 (3,8)	1 (2,0)
Espasmos musculares (n (%))	0	1 (2,0)
Dores musculoesqueléticas (n (%))	1 (1,9)	1 (2,0)
Reações no local de injeção (n (%))	1 (1,9)	2 (3,9)

11.6.5 ODYSSEY LONG TERM

Este ensaio, *Long-term Safety and Tolerability of Alirocumab (SAR236553/REGN727) Versus Placebo on Top of Lipid-Modifying Therapy in High Cardiovascular Risk Patients With Hypercholesterolemia* tem como objetivo avaliar a terapêutica com alirocumab em doentes cardiovasculares de alto risco e por um período mais longo de tempo (18 meses) (tabela 34) (Jennifer *et al.*, 2015).

Tabela 34. Representação do ensaio ODYSSEY LONG TERM

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
LONG TERM (LTS11717)	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	20 meses	Elevado risco CV, com hipercolesterolemia não adequadamente controlada com doses máximas toleradas de estatinas diariamente ± outra terapêutica de redução lipídica	Alirocumab: 150 mg subcutâneo, de 2 em 2 semanas, ao longo de 18 meses n = 1553 Placebo: subcutâneo de 2 em 2 semanas, ao longo de 18 meses n = 788

No final da 24^a semana, a diferença percentual de redução dos níveis de C-LDL entre o grupo em terapêutica com alirocumab e o grupo placebo, foi de 62 pontos percentuais ($p < 0,001$), estes resultados foram consistentes ao longo das 78 semanas de duração do ensaio (figura 23). O grupo de participantes em terapêutica com alirocumab, comparativamente ao grupo em terapêutica como placebo, demonstrou uma maior incidência de reações adversas: no local de injeção (5,9% grupo alirocumab vs. 4,2% grupo placebo), mialgia (5,4% grupo alirocumab vs. 2,9% grupo placebo), eventos neurocognitivos (1,2% grupo alirocumab vs. 0,5% grupo placebo), e eventos oftalmológicos (2,9% grupo alirocumab vs. 1,9% grupo placebo). Contudo a ocorrência de eventos cardiovasculares *major*, foi inferior nos participantes em terapêutica com alirocumab, comparativamente com o grupo placebo (1,7% grupo alirocumab vs. 3,35 grupo placebo, $p=0,02$) (Jennifer *et al.*, 2015).

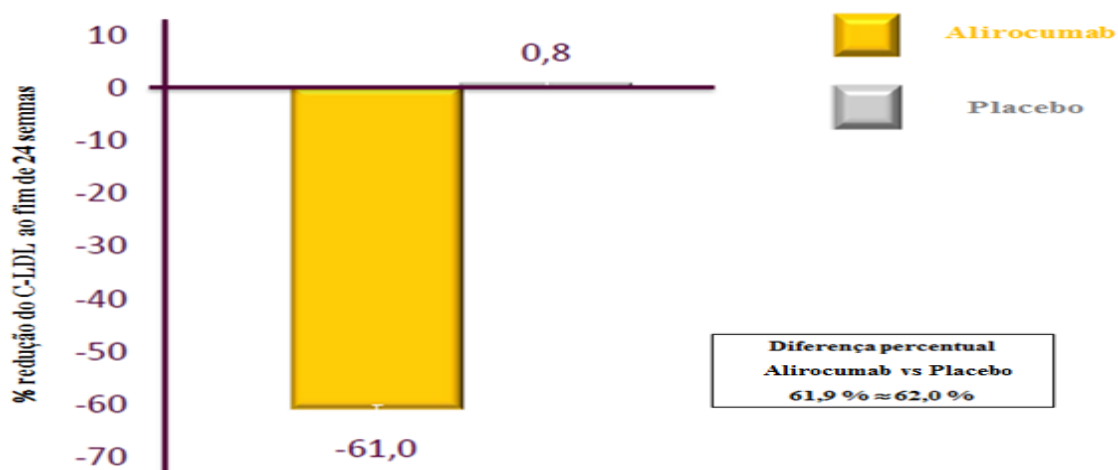


Figura 23. Representação percentual da redução de C-LDL para os diferentes grupos terapêuticos no ensaio ODYSSEY LONG TERM (Adaptado de Robinson *et al.*, 2014).

Tabela 35. Representação dos efeitos adversos observados no ensaio ODYSSEY LONG TERM (Adaptado de Robinson *et al.*, 2014).

Efeitos adversos	Alirocumab	Placebo
Reações no local de injeção (n (%))	90 (5,9)	34 (4,2)
Reações alérgicas gerais (n (%))	140 (9,0)	71 (9,0)
Todos os eventos cardiovasculares (n (%))	62 (4,0)	35 (4,4)
Cardiovascular major (n (%))	26 (1,7)	27 (3,4)
Neurológicos (n (%))	65 (4,2)	31 (3,9)
Desordens neurocognitivas (n (%))	18 (1,2)	4 (0,5)
Oftalmológicos (n (%))	38 (2,5)	15 (1,9)
Anemia hemolítica (n (%))	0	0

11.6.6 ODYSSEY ALTERNATIVE

O ensaio *Study of Alirocumab (REGN727/SAR236553) in Patients With Primary Hypercholesterolemia and Moderate, High, or Very High Cardiovascular (CV) Risk, Who Are Intolerant to Statins* (ODYSSEY ALTERNATIVE) é apresentado na tabela 36 (Moriarty *et al.*, 2014).

Tabela 36. Representação dos ensaios ODYSSEY ALTERNATIVE

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
ALTERNATIVE (CL-1119)	Aleatório, duplamente cego, controlo ativo (ezetimiba e atorvastatina)	39 semanas	Hipercolesterolemia primária e risco cardiovascular moderado, elevado e muito elevado intolerante a estatinas	Alirocumab: 75 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com possibilidade de aumentar dose na 12ª semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas ao longo de 24 semanas; n = 126 Ezetimiba: 10 mg oral diariamente ao longo de 24 semanas; n = 125 Atorvastatina: 20 mg via oral diariamente ao longo de 24 semanas; n = 63

O nível de C-LDL médio de base era de 191,3 mg/dL (5,0 mmol/L). A terapêutica com alirocumab mostrou-se capaz de reduzir os níveis de C-LDL em cerca de 45,0% vs 14,6% obtidos para o grupo em terapêutica com ezetimiba, sendo a diferença entre ambos os grupos de 30,4% ($p=0,0001$) (figura 24). A ocorrência de eventos nos músculos esqueléticos foi observada com menos frequência no grupo com alirocumab vs grupo com atorvastatina. O alirocumab provocou uma maior redução dos níveis de C-LDL, do que verificado com ezetimiba, no total dos participantes intolerantes a estatinas, tendo inclusive originado menos efeitos adversos músculo esqueléticos do que acontece no caso da atorvastatina. Porém este ensaio está ainda a decorrer, estando previsto o seu término para setembro de 2016, pelo que alguns dados e resultados estão ainda incompletos ou não são de todo conhecidos (Moriarty *et al.*, 2014).

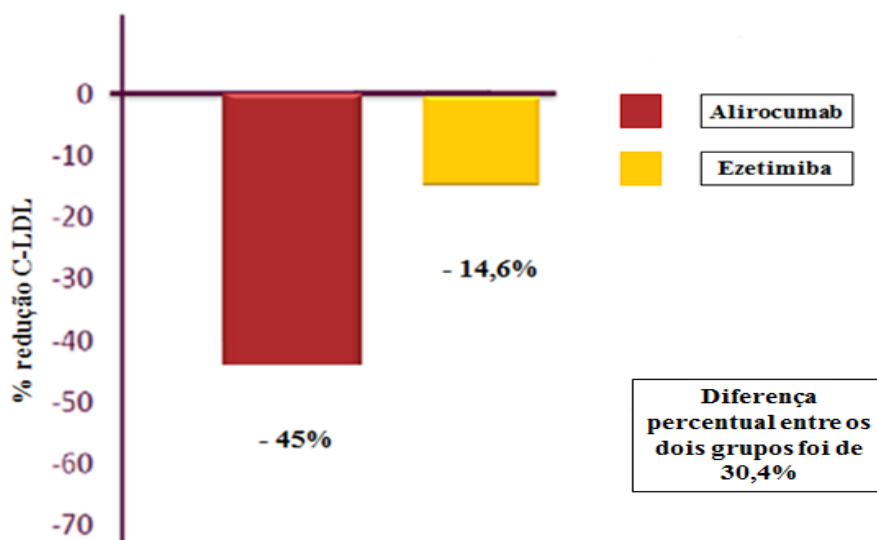


Figura 24. Redução de C-LDL para os diferentes grupos terapêuticos no ensaio ODYSSEY ALTERNATIVE.

11.6.7 ODYSSEY OUTCOMES

Após a ocorrência de síndrome coronário agudo, o risco de se repetir um evento coronário está intrinsecamente correlacionado com níveis elevados de C-LDL, mesmo que se esteja a efetuar terapêutica com estatinas. O ensaio *Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab SAR236553 (REGN727) (ODYSSEY OUTCOMES)* é apresentado na tabela 37 (Schwartz *et al.*, 2014) e pretende avaliar os efeitos do alirocumab neste grupo específico de doentes com síndrome coronário agudo.

Tabela 37. Representação dos ensaios ODYSSEY OUTCOMES

Ensaio	Design	Duração	Pacientes	Terapêutica
OUTCOMES	Aleatório, duplamente cego, controlo placebo	64 meses	C-LDL \geq 70 mg/dL, colesterol não HDL \geq 100 mg/dL, ou apoB \geq 80 mg/dL em tratamento com atorvastatina diária 40 mg ou 80 mg, ou rosuvastatina diária 20 mg ou 40 mg, ou a dose máxima aprovada de qualquer um destes agentes terapêuticos	Alirocumab: 75 mg ou 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas com aumento da dose na 4ª semana para 150 mg subcutâneo 2 em 2 semanas se e só se C-LDL \geq 50 mg/dL Placebo: subcutâneo de 2 em 2 semanas

O ensaio ODYSSEY OUTCOMES encontra-se ainda em fase de recrutamento de participantes (ClinicalTrials, 2015) e o que ainda não existem dados relativos a este estudo, que tem definido o seu término para dezembro de 2017 (Schwartz *et al.*, 2014).

12. Bococizumab

O bococizumab é um anticorpo monoclonal humano IgG2 que se liga à PCSK9 e que pode ser uma potencial opção terapêutica para redução dos níveis de LDL-C em pacientes com hipercolesterolemia. O bococizumab está a ser desenvolvido pela empresa farmacêutica Pfizer, sendo que neste momento o bococizumab se encontra em processo de ensaios de fase 3 (tabela 38) (Dadu e Ballantyne, 2014).

12.1 Ensaios de Fase 3 (SPIRE)

Tabela 38. Representação dos ensaios SPIRE

Ensaio	Participantes (terapêutica de fundo com estatinas)	Objetivo	Completo em
SPIRE-HF113	FH heterozigótica; risco elevado/muito elevado de DCV; C-LDL >70 mg/dl e TG ≤400 mg/dl (em terapêutica com estatinas)	Comparar o efeito do bococizumab + estatina versus placebo e estatina nos níveis de C-LDL em indivíduos com FH heterozigótica Duração = 12 semanas	Janeiro 2016
SPIRE-HR114	Risco elevado/ muito elevado de DCV; C-LDL >70 mg/dl e TG ≤400 mg/dl (em terapêutica com estatinas)	Comparar o efeito do bococizumab + estatina versus placebo e estatina nos níveis de C-LDL Duração = 12 semanas	Janeiro 2016
SPIRE-LDL115	Risco elevado/ muito elevado de DCV; C-LDL >70 mg/dl e TG ≤400 mg/dl (em terapêutica com estatinas)	Comparar o efeito do bococizumab + estatina versus placebo e estatina nos níveis de C-LDL Duração = 12 semanas	Dezembro 2015
SPIRE-1116	Risco elevado DCV; C-LDL ≥70 mg/dl e <100 mg/dl, ou Colesterol não HDL ≥100 mg/dl e <130 mg/dl, com terapêutica de redução lipídica (sem especificação sobre estatinas)	Comparar o efeito do bococizumab versus placebo na redução da ocorrência de eventos cardiovasculares major (morte, enfarte do miocárdio, AVC e angina instável Duração = 5 anos	Agosto 2017
SPIRE-2117	Risco elevado DCV; C-LDL ≥100 mg/dl ou Colesterol não HDL ≥130 mg/dl, com terapêutica de redução lipídica (sem especificação sobre estatinas)	Comparar o efeito do bococizumab versus placebo na redução da ocorrência de eventos cardiovasculares major (morte, enfarte do miocárdio, AVC e angina instável Duração = 5 anos	Agosto 2017

13. Conclusão

Na atualidade as dislipidemias são um dos principais fatores de risco das doenças cardiovasculares. A alteração do estilo de vida, bem como uma dieta apropriada, são as principais medidas não farmacológicas que devem ser adotadas para tratar as dislipidemias. Contudo, em diversos casos, estas alterações não são suficientes (por não haver uma redução eficaz dos níveis de lípidos) sendo necessário recorrer à terapêutica farmacológica. Os medicamentos atualmente disponíveis no mercado são uma ajuda preciosa na prevenção dos eventos cardiovasculares.

As estatinas são os fármacos de primeira linha mais utilizados a nível mundial no tratamento e prevenção, quer primária quer secundária, das dislipidemias. No caso das hipercolesterolemias é reconhecida a sua eficácia na diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol. Sendo normalmente bem toleradas, as estatinas apresentam, contudo, diversos efeitos secundários, nomeadamente cefaleias, parestesia e efeitos gastrointestinais como dor abdominal, flatulência, diarreia, náuseas ou vômitos, *rash* ou reações de hipersensibilidade. Além destes efeitos, o efeito adverso mais grave associado ao uso de estatinas é a miopatia, podendo posteriormente evoluir para um estado agravado denominado rabdomiólise. Adicionalmente, existem ainda diversos casos de indivíduos que não reagem a doses elevadas de estatinas ou que podem mesmo ser intolerantes à terapêutica com as mesmas.

Assim, surgiu a necessidade de desenvolver novas estratégias de combate à hipercolesterolemia que possam atuar por mecanismos de ação distintos dos até agora explorados, e que possibilitem o uso de terapêuticas de combinação.

Neste contexto, surgiram os inibidores da PCSK9 como sendo um alvo atrativo para a terapêutica da hipercolesterolemia, preenchendo um fosso existente na terapêutica dado que uma grande parte da população dos indivíduos de alto risco não consegue atingir os níveis de C-LDL estipulados, mesmo recorrendo às doses máximas toleradas dos fármacos disponíveis no mercado. Neste sentido, os anticorpos monoclonais são a terapêutica de inibição da PCSK9 mais avançada na atualidade, revelando grande eficácia na redução dos níveis de C-LDL e apresentando ainda grande margem de

segurança, bem como uma reduzida incidência de efeitos secundários. Paralelamente, face aos resultados apresentados até ao momento pelos anticorpos monoclonais, tem surgido também grande interesse noutras patologias como na diabetes, obesidade, hipertensão, inflamação e na disfunção endotelial, sendo necessário, contudo, mais estudos que possam caracterizar de forma adequada os possíveis efeitos benéficos inerentes à inibição da PCSK9 com anticorpos monoclonais.

No presente ano, em julho de 2015, foi aprovado pela EMA o primeiro inibidor da PCSK9 - evolocumab (Repatha™, Amgen) - tendo obtido aprovação posterior por parte da FDA em agosto de 2015 para sua introdução no mercado americano. O outro anticorpo monoclonal, o alirocumab (Praluent™, Regeneron/Sanofi), foi o primeiro medicamento aprovado para introdução no mercado norte americano pela FDA, em julho de 2015, tendo igualmente sido aprovado o seu uso na UE pela EMA em setembro de 2015. Ambos têm por base a terapêutica com anticorpos monoclonais humanos e destinam-se à terapêutica da hipercolesterolemia heterozigótica familiar e não familiar, bem como à hipercolesterolemia homozigótica familiar. Os anticorpos monoclonais podem ser utilizados tanto em monoterapia como em combinação com outros agentes utilizados na terapêutica de redução dos níveis de colesterol, afirmando-se como uma nova e válida estratégia que vem revolucionar toda a abordagem terapêutica das hipercolesterolemias e trazer uma esperança renovada para todos os indivíduos que padecem desta doença e não tiveram até ao momento acesso a uma terapêutica adequada.

Contudo, apesar do rápido desenvolvimento, ainda existem diversas questões em aberto em relação a esta terapêutica emergente, como são os casos: 1) A segurança a longo prazo da terapêutica com anticorpos monoclonais PCSK9 em relação a ativação do sistema imune está ainda por determinar, embora os resultados referentes a ensaios de 52 semanas sejam promissores; 2) Sendo os inibidores da PCSK9 tão eficazes a reduzir o C-LDL a níveis bastante baixos, coloca-se a questão de poder ou não acarretar consequências negativas. Apesar desta dúvida, os resultados conhecidos até ao momento nos indivíduos com mutações de perda total de função da PCSK9, são bastante encorajadores e demonstram que estes podem ter uma vida normal, apesar da sua condição; 3) Tendo conhecimento que a expressão da PCSK9 ocorre também em

tecidos extra-hepáticos, como é o caso do sistema nervoso central, é necessário que se proceda a uma análise mais aprofundada, por forma a obter um conhecimento mais detalhado sobre o papel a nível fisiológico desta proteína e do seu possível envolvimento em doenças neurológicas; 4) Contrastando com as estatinas, a inibição da PCSK9 não origina efeitos secundários a nível muscular, tendo este facto sido corroborado pelos ensaios a longo prazo efetuados. Este fator poderá também ajudar a esclarecer, o mecanismo subjacente à toxicidade muscular provocada pelas estatinas. 5) Os resultados da redução da ocorrência de eventos cardiovasculares a longo prazo não são ainda conhecidos, embora os resultados obtidos nos ensaios clínicos com duração de 11 meses sejam favoráveis. Como tal é expectável que os inibidores da PCSK9 estejam inicialmente disponíveis para indivíduos com hipercolesterolemia genética ou intolerantes às estatinas.

14. Bibliografia

Abifadel, M. *et al.* (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics*, 34 (2), pp. 153-157.

Alborn, W.E. *et al.* (2007). Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clinical Chemistry*, 53(10), pp. 1814-9.

Allard, D. *et al.* (2005). Novel mutations of the PCSK9 gene cause variable phenotype of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Human Mutation*, 26, pp. 497.

Al-Rasadi, K. *et al.* (2014). Criteria for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Analysis of the Different Guidelines, Appraising their Suitability in the Omani Arab Population. *Oman Medical Journal*, 29 (2), pp. 85–91.

Amgen (2015). European Commission Approves Amgen's New Cholesterol-Lowering Medication Repatha™ (Evolocumab), The First PCSK9 Inhibitor to be Approved in The World, For Treatment of High Cholesterol: Critical Milestone for Patients With Uncontrolled Cholesterol who Require Additional Intensive LDL-C Reduction. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.multivu.com/players/English/7414052-amgen-repatha/>> [Consultado em 15/08/2015].

Artenstein, A.W., Opal, S.M. (2011). Proprotein convertases in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 365 (269), pp. 2507-2518.

Awan, Z. *et al.* (2012). Rosuvastatin, proprotein convertase subtilisin/kexin type9 concentrations, and LDL cholesterol response: the JUPITER trial. *Clinical Chemistry*, 58, pp. 183-189.

Baitsch, D. *et al.* (2011). Apolipoprotein E induces anti-inflammatory phenotype in macrophages. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 31, pp. 1160-1168.

Bays, H.E. *et al.* (2008). Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 6, pp. 447-470.

- Beckman, J.A., Creager, M.A., Libby, P. (2010). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 287, pp. 2570-2581
- Belo, L. *et al.* (2009). Aspectos analíticos na gravidez normal e na patológica: modificações metabólicas e fisiológicas desencadeadas pela gravidez e suas implicações. Lidel.
- Benjannet, S. *et al.* (2006). The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, pp. 30561-30572.
- Bennett, C.F., Swayze, E.E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, pp. 259-293.
- Berge, K.E. *et al.* (2006). Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypercholesterolemia and possibly increased response to statin therapy. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 26, pp. 1094-1100.
- Bertram Katzung, G. (1994). *Farmacologia básica e clínica*. Brasil: Guanabarra.
- Blacklow, S.C. (2007). Versatilitybin ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, pp. 419-426.
- Bottomley, M.J. *et al.* (2009). Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF (AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, pp. 1313-1323.
- Bourbon, M., Rato, Q. (2006). Lipoproteínas, Genética e Aterosclerose. *RFML, Série III*, 11 (2), pp. 67-73.

Bruckert, E., Giral, P., Tellier P. (2003). Perspectives in cholesterol-lowering therapy: the role of ezetimibe, anew selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. *Circulation*, 107 (25), pp. 3124-3129.

CADIME. (2009). Utilización de estatinas en atención primaria. *Boletín Terapéutico Centro Andaluz de Información de Medicamentos*, 25 (1), pp. 1-6.

Campos, E.M. (2005). From Fredrickson's classification of phenotypes-lipoprotein patterns-to genotype comprehension. *Acta Médica Portuguesa*, 18 (3), PP. 189-198.

Cannon, P.C. *et al.* (2015). Efficacy and safety of alirocumab in high cardiovascular risk patients with inadequately controlled hypercholesterolaemia on maximally tolerated doses of statins: the ODYSSEY COMBO II randomized controlled trial. *European Heart Journal*, 36, pp. 1186–1194.

Carrageta, M. (2010). *Como Ter Um Coração Saudável*. Lisboa: Âncora Editora

Chan, J.C. *et al.* (2009). A proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 neutralizing antibody reduces serum cholesterol in mice and nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, pp. 9820-9825.

Chen, Y.Q., Troutt, J.S., Konrad, R.J. (2014). PCSK9 is present in human cerebrospinal fluid and is maintained at remarkably constant concentrations throughout the course of the day. *Lipids*, 49 (5), pp. 445-455.

Clayton, B., Stock, Y. (2002). *Fundamentos de farmacologia*. Portugal: Lusociência.

Clinicaltrials (2015). Serviço pertencente ao U.S. National Institutes of Health. [Em linha]. Disponível em: < <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>.> [consultado em 20/08/2015].

Cohen, J. *et al.* (2005). Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nature Genetics*, 37, pp.160-166.

Cui, Q. *et al.* (2010). Serum PCSK9 is associated with multiple metabolic factors in a large Han chinese population. *Atherosclerosis*, 213, pp. 632-636.

Dadu, T.R., Ballantyne, M.C. (2014). Lipid lowering with PCSK9 inhibitors. *Nature*, 11, pp. 563–575.

Daniels, T.F. *et al.* (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Sciences*, 5 (5), pp. 474-488.

Davidson, M.H. *et al.* (1999). Colesevelam hydrochloride (cholestagel): a new, potent bile acid sequestrant associated with a low incidence of gastrointestinal side effects. *Archives of Internal Medicine*, 159 (16), pp.1893-1900.

Davignon, J. (2004). Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*, 109 (23), pp. 38-43.

Defesche, J.C. (2004). Low-density lipoprotein receptor – its structure, function, and mutations. *Seminars in Vascular Medicine*, 4 (1), pp. 5-11.

Delucia, R., Filho, R.M. (2002). *Farmacologia Integrada*. Portugal: Revinter

DGS – Direção Geral de Saúde (2006). Circular Normativa. [Em linha]. Disponível em: <<http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/9B01E25D-D16C-422C-B3E0-140D1B591198/0/circularnormativadgs03dspsc060206.pdf>> [Consultado em 05/12/2014].

DGS – Direção Geral de Saúde (2006). Programa Nacional de Prevenção e Controlo das Doenças Cardiovasculares.

DGS – Direção Geral de Saúde (2013). Doenças Cérebro - Cardiovasculares em Números – 2013.

Dias, C. *et al.* (2011). A phase 1 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending single dose study to evaluate the safety, tolerability and pharmacodynamics of AMG145. *Circulation*, 124, pp. 10701.

Dong, B. *et al.* (2010). Strong induction of PCSK9 gene expression through HNF1alpha and SREBP2: mechanism for the resistance to LDL-cholesterol lowering effect of statins in dyslipidemic hamsters. *Journal of Lipid Research*, 51, pp. 1486-1495.

Du, F., Hui, Y., Zhang, M., Linton, M. F., Fazio, S., Fan, D. (2011). Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286, pp. 43054–43061.

Dubuc, G. *et al.* (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 24, pp. 1454-1459.

Duff, C.J., Scott, M.J., Kirby, I.T., Hutchinson, S.E., Martin, S.L., Hooper, N.M. (2009). Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry Journal*, 419(3), pp. 577-84.

EMA – European Medicines Agency (2015). [Em linha]. Disponível em: <<http://www.ema.europa.eu/ema/>> [Consultado em 07/03/2015].

Essalmani, R. *et al.* (2011). In vivo evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, pp.4257-4263.

Fantuzzi, G., Mazzone, T. (2007). Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 27, pp. 996-1003.

FDA – U.S. Food and Drug Administration (2015). [Em linha]. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>> [Consultado em 06/03/2015].

Feingold, K.R. *et al.* (2008). Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 374, pp. 340-344.

Ferri, N. *et al.* (2012). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*, 220, pp. 381-386.

Fiegenbaum, M., Hutz, H.M. (2006). Farmacogenética de fármacos hipolipimiantes. *Simpósio: Farmacogenética*, 39 (4), pp. 543-553.

Fisher, T.S. *et al.* (2007). Effects of ph and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, pp. 20502-20512.

Fouchier, S.W., Kastelein, J.J., Defesche, J.C. (2005). Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Human Mutation*, 26 (6), pp. 550-556.

Gaddi, A. *et al.* (2007). Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vascular Health Risk Management*, 3(6), pp. 877-886.

Gagné, C. *et al.* (2002). Efficacy and Safety of Ezetimibe Coadministered With Atorvastatin or Simvastatin in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Circulation*, 10, pp. 2469-2475.

Galton, D. *et al.* (2005). *Dislipidémia*. Algés : Euromédice.

Gaw, A. *et al.* (2004). *Statins. The HMG-CoA Reductase Inhibitors in Perspective*. Edição. London and New York: Martin Dunitz Ltd.

German, J. B. *et al.* (2006). Lipoproteínas: When size really matters. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, pp. 171-183.

Giugliano, R.P. *et al.* (2012). Efficacy, safety and tolerability of a monoclonal antibody to protein convertase subtilisin/ kexin type 9 in combination with statin in patients with

hypercholesterolemia (LAPLACE-TIMI57): A randomized, placebo controlled, dose-ranging, phase 2 study. *Lancet*, 380, pp. 2007-2017.

Goldstein, J.L., Hobbs, H.H., Brown, M. (1995). *Familial Hypercholesterolemia*. New York: McGraw-Hill Publishing.

Guimarães, S., Moura, D., Silva, P. (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto: Porto Editora.

Grefhorst, A. *et al.* (2008). Plasma PCSK9 preferentially reduces liver LDL receptors in mice. *The Journal of Lipid Research*, 49, pp. 1303-1311.

Grundy, S.M. *et al.* (2004). Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). *American Journal of Cardiology*, 95 (4), pp. 462-468.

Gupta, N. *et al.* (2010). A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *Plos ONE*, 5, pp. 10682.

Hachem, S.B., Mooradian, A.D. (2006). Familial dyslipidaemias: an overview of genetics, pathophysiology and management. *Drugs*, 66 (15), pp. 1949-1969.

Harper, C.R., Jacobson, T.A. (2007). The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis. *Current Opinion in Lipidology*, 18, pp. 400-408.

Hayashi, J. *et al.* (2005). The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology*, 335, pp. 264-275.

Heath, K.E. *et al.* (2001). Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis*, 154 (1), pp. 243-246.

Horton, J.D. *et al.* (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100, pp. 12027-12032. ~

Ito, M.K., McGowan, M.P., Moriarty, P.M. (2011). Management of familial hypercholesterolemias in adult patients: recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology*, 5(3), pp.38-45.

Jeu, L., Cheng, J.W.M. (2003). Pharmacology and Therapeutics of Ezetimibe, a Cholesterol-Absorption Inhibitor. *Clinical Therapeutics*, 25, pp. 2352-2387.

Kamanna, V.S., Kashyap, M.L. Mechanism of action of niacin. *American Journal Cardiology*, 101 (8A) pp. 20B-26B.

Kastelein, J.P. J. *et al.* (2015). ODYSSEY FH I and FH II: 78 week results with alirocumab treatment in 735 patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal*, pp. 1-8.

Kereiakes, D.J. (2015). Efficacy and safety of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitor alirocumab among high cardiovascular risk patients on maximally tolerated statin therapy: The ODYSSEY COMBO I study. *American Heart Journal*, 169(6), pp. 906-915.

Klingenberg, R., Hansson, G. (2009). Treating inflammation on atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies. *European Heart Journal*, 30 (16), pp. 2837-2844.

Knott, T.J. *et al.* (1985). Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. *Science*, 230 (4721), pp. 37-43.

Koren, M.J. et al. (2012). Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as a monotherapy in patients with hypercholesterolemia (MENDEL): a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet*, 380, pp. 1995-2006.

Koren, M.J. et al. (2014). Efficacy and Safety of Longer-Term Administration of Evolocumab (AMG145) in Patients With Hypercholesterolemia: 52-Week Results From The Open-Label Study of Long Term Evaluation Against LDL-C (OSLER) Randomized Trial. *Circulation*, 129, pp. 234-243.

Kwon, H. J., Lagace, A. T., McNutt, C. M., Horton, D. J., Deisenhofer J. (2007). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, pp. 1820–1825.

Kysenius, K. et al. (2012). PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, pp. 1903-1916.

Lambert, G. et al. (2006). Fasting induces hyperlipidemia in mice overexpressing proprotein convertase subtilisin kexin type 9: lack of modulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Endocrinology*, 147, pp. 4985-4995.

Leigh, S.E. et al. (2008). Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Annals of Human Genetics*, 72 (4), pp. 485-498.

Le May, C. et al. (2013). Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 29, pp. 684-690.

Levy, E. et al. (2013). PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*, 227, pp. 297-306.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420, pp. 868-874.

Lindholm, M.W. *et al.* (2012). PCSK9 LNA antisense oligonucleotides induce sustained reduction of LDL cholesterol in nonhuman primates. *Molecular Therapy*, 20, pp. 376-381.

Liu, J. *et al.* (2005). Joint distribution of Non-HDL and LDL cholesterol and coronary heart disease risk prediction among individuals with and without diabetes. *Diabetes care*, 28, pp. 1916-1921.

Liu, M. *et al.* (2010). PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *Journal of Lipid Research*, 51(9), pp. 2611-2618.

Magalhães, C.C., Chagas, A.C.P., Luz, P.L. (2005). Hipertriglicemia: implicações terapêuticas. *Rev Soc Cardiol*, 15 (6), pp. 490-505. [Em linha]. Disponível em: <<http://200.220.14.51/revistasocesp/edicoes/volume15/pdf/n06.pdf>> [Consultado em 07/04/2015]

Maron, J.D., Fazio, S., Linton, M.F. (2000). Current perspectives on statins. *Journal of American Heart Association*, 101 (63), pp. 206-213.

Martz, L. (2014). PCSK9 peptide inhibitors. *Science-Business Exchange*, pp. 1-3.

Maxwell, K.N. *et al.* (2003). Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *Journal Lipid Research*, 44, pp. 2109-2119.

Maxwell, K.N., Fisher, E.A., Breslow, J.L. (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, pp. 2069-2074.

Mayer, G., Poirier, S., Seidah, N.G. (2008). Anxin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 31791-31801.

Mayne, J. *et al.* (2007). Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, pp. 451-456.

Mbikay, M. *et al.* (2010). PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Letters*, 584, pp. 701-706.

Mcnutt, M.C. *et al.* (2009). Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, pp.10561-10570.

Medeiros, A.M. *et al.* (2010). Update of the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study. *Atherosclerosis*, 212 (2), pp. 553-558.

Melo e Silva, A. *et al.* (2007). Recomendações Portuguesas para a Prevenção Primária e Secundária da Aterosclerose. *Sociedade Portuguesa de Aterosclerose*, 2ª Edição, pp.1-115.

Mombelli, G., Castelnuovo, S., Pavanello, C. (2015). Potential of PCSK9 as a new target for the management of LDL cholesterol. *Dovepress*, 6, pp. 73-86.

Monajemi, H. *et al.* (2002). The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics*, 79, pp. 539–546.

Moriarty, M. P. (2014). Efficacy and safety of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, in statin-intolerant patients: Design and rationale of ODYSSEY ALTERNATIVE, a randomized phase 3 trial. *Journal of Clinical Lipidology*, 8, pp. 554–561

Mukesh, K.J., Paul, M.R. (2005). Anti-inflammatory effects of statins: Clinical evidence and basic mechanisms. *Natura Reviews Drug discovery*, 30 (5), pp. 997-987.

Myant, N.B. (1983). The metabolic basis of familial hypercholesterolemia. *Klin Wochenschr*, 61 (8), pp. 383-401.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel. (2002). National Heart, Lung, and Blood Institute and National Institutes of Health NIH, Publication, N° 02-5215 Setembro 2002.

Neil, H.A. et al. (2000). Extent of underdiagnosis of familial hypercholesterolaemia in routine practice. *Prospective registry study, British Medical Journal*, 321, pp. 148-150.

Norata, G. D., Tibolla, G., Catapano A. L. (2014). PCSK9 inhibition for the treatment of hypercholesterolemia: Promises and emerging challenges. *Elsevier*, 62, pp. 103-111

Ohashi, R. et al. (2005). Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Quarterly Journal of Medicine*, 98 (12), pp. 853-856.

Pandit, S. et al. (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for the hypercholesterolemia. *The Journal of Lipid Research*, 49, pp. 1333-1343.

Park, S.W., Moon, Y.A., Horton, D. (2004). Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, pp. 50630-50638.

Pasternak, R.C. et al. (2002). Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins. *Circulation*, 106 (8), pp. 1024-1028.

Pejic, N.R., Lee T.D. (2006). Hypertriglyceridemia. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 19(3), pp. 310-316.

Poirier, S. et al. (2008). The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 2363-2372.

Poirier S., Mayer G. (2009). The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Design, Development and Therapy*, 7, pp. 1135–1148.

Praluent (2015). Full Prescribing Information of Praluent [Em linha]. Disponível em: <<https://www.praluenthcp.com/>> [Consultado em 22/06/2015]

Raal, F. *et al.* (2012). Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the reduction of LDL-C with PCSK9 inhibition in heterozygous familial hypercholesterolemia disorder (RUTHERFORD) randomized trial. *Circulation*, 126, pp. 2408-2417.

Rader, D.J., Cohen, J., Hobbs, H.H. (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *Journal of Clinical Investigation*, 111, pp. 1795–1803.

Raffa, B.R., Rawls, M.S., Beyzarov, P.E. (2005). *Netter's Illustrated Pharmacology 1st edition*, New Jersey: Medi Media Inc.

Rang, H.P., Dale, M.M. (2012). *Pharmacology 7th edition*. London: Elsevier Inc.

Ranheim, T. *et al.* (2008). Genome-wide expression analysis of cells expressing gain of function mutant D374Y-PCSK9. *Journal of Cellular Physiology*, 217, pp. 459-467.

Rashid, S. *et al.* (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, pp. 5374-5379.

Rashid, S. *et al.* (2014). PCSK9 Promotes Intestinal Overproduction of Triglyceride-Rich Apolipoprotein-B Lipoproteins Through Both LDL-Receptor Dependent and Independent Mechanisms. *Circulation*, 130 (5), pp. 431–441.

Rato, Q. (2010). Terapêutica farmacológica das dislipidemias. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 29 (Supl III), pp. 49-66.

Reiner, Z. *et al.* (2011). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *European Heart Journal*, 32, pp. 1769-1818.

Regeneron Pharmaceuticals (2013). J.P. Morgan Healthcare Conference. [Em linha]. Disponível em: <<http://investor.regeneron.com/secfiling.cfm?filingID=1193125-13-6146&CIK=872589>> [Consultado em 15/08/2015].

Rifai, *et al.* (1999). Lipid, Lipoproteins and apolipoprotein. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., (eds.) Teitz textbook of clinical chemistry 3^a ed. Philadelphia: W.B Saunders company, pp. 809 – 861.

Robinson, J. (2008). Models for describing relations among the various statin drugs, low-density lipoprotein cholesterol lowering, pleiotropic effects, and cardiovascular risk. *American Journal of Cardiology*, 101, pp. 1008-1015.

Robinson, J.G. *et al.* (2014). Long-term safety, tolerability and efficacy of alirocumab versus placebo in high cardiovascular risk patients: first results from the ODYSSEY LONG TERM study in 2,341 patients. [Em linha]. Disponível em <<http://www.escardio.org/Congresses-&-Events/Congress-resources/ESC-Congress-365/Long-term-safety-tolerability-and-efficacy-of-alirocumab-versus-placebo-in-high>> [Consultado em 28/10/2015]

Róg, T., Pasenkiewicz-Gierula, M. (2001). Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study. *Biophysical Journal*, 81, pp. 2190–2202.

Roth, M.E. *et al.* (2014). Monotherapy with the PCSK9 inhibitor alirocumab versus ezetimibe in patients with hypercholesterolemia: Results of a 24 week, double-blind, randomized Phase 3 trial. *Elsevier*, 176, pp. 55-61.

Roubtsova, A. *et al.* (2011). Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 31, pp. 785-791.

Rousselet, E. *et al.* (2011). PCSK9 reduces the protein levels of the LDL receptor in mouse brain during development and after the LDL receptor in mouse brain during development and after ischemic stroke. *Journal of Lipid Research*, 52, pp.1383-1391.

Russell, D.W. *et al.* (1984). Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*, 37 (2), pp. 577-585.

Sabatine, S.M. *et al.* (2015). Efficacy and Safety of Evolocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events. *New England Journal of Medicine*, 372, pp. 1501-1509.

Sadowitz, B. *et al.* (2010). Statin Therapy – Part 1: The Pleiotropic effects of statins in Cardiovascular Disease. *Vascular and Endovascular Surgery*, 44 (4), pp. 241-251.

Sana, T.R. *et al.* (2005). Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine*, 29, pp. 256–269.

Schwartz, G.G. *et al.* (2014). Effect of alirocumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on long-term cardiovascular outcomes following acute coronary syndromes: rationale and design of the ODYSSEY outcomes trial. *American Heart Journal*, 168 (5), pp. 682-689.

Seidah, N.G., Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, pp. 367-383.

Sharotri, V. *et al.* (2012). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/ kexin type 9 (PCSK9). *Journal of Biological Chemistry*, 287, pp. 19266-19274.

Shepherd, J. (2001). The role of the exogenous pathway in hypercholesterolaemia. *European Heart Journal Supplement*, 3 (Supplement E), pp. E2–E5.

Schumaker N.V. (ed.) (1994). *Advances on Protein Chemistry: Lipoproteins, Apolipoproteins and Lipases*. Volume 45. London: Academic Press Limited.

Soutar, A.K., Nauomova, R.P. (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4 (4), pp. 214-225.

Sudhof, T.C. *et al.* (1985). The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, 288 (4701), pp. 815-822.

Surdo, P.L. *et al.* (2011). Mechanistic implications for LDL receptor degradation from PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Reports*, 12, pp. 1300-1305.

Steiner, G. (2005). Fibrates and coronary risk reduction. *Atherosclerosis*, 182, pp. 199-207.

Sullivan, D. *et al.* (2012). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on low-density lipoprotein cholesterol levels in statins intolerant patients: the GAUSS randomized trial. *JAMA*, 308, pp. 2497-2506.

Sun, X.M. *et al.* (2005). Evidence of effect of mutant PCSK9 on apolipoprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia. *Human Molecular Genetics*, 14 (9), pp. 1161-1169.

Tang, Z. *et al.* (2012). PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF- κ B activation in THP-1 derived macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, 30, pp. 931-938.

Tveten, K. *et al.* (2012). Interaction between the ligand-binding domain of the LDL receptor and the C-terminal domain of PCSK9 is required for PCSK9 to remain bound to the LDL receptor during endosomal acidification. *Human Molecular Genetics*, 21, pp. 1402-1409.

Urban, D. *et al.* (2013). Targeting the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 for the Treatment of Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(16), pp. 1401–1408.

Vanhamme, L. *et al.* (2003). Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature*, 422, pp. 83–87.

van Aalst-Cohen, E.S. *et al.* (2004). Clinical, diagnostic, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia. *Seminars in Vascular Medicine*, 4 (1), pp. 31-41.

Vanhollebeke, B., Pays E, (2006). The function of apolipoproteins L. *Celular and Molecular Life Sciences*, 63, pp. 1937-1944.

Vaughan, C.J., Gotto, A.M, Jr. (2004). Update on statins. 2003. *Circulation*, 110 (7), pp. 886-892.

Vosper, H. (2009). Niacin: a re-emerging pharmaceutical for the treatment of dyslipidemia. *British Journal of Pharmacology*, 158 (2), pp. 429-441.

Wan, G. *et al.* (2008). Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 21540–21549.

Wasan, K. M. *et al.* (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (1), pp. 84-99.

WHO – World Health Organization (2015). Cardiovascular diseases. [Em linha]. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> > [consultado em 05/12/20014].

Williams, R.R. *et al.* (1993). Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *American Journal of Cardiology*, 72 (2), pp. 171-176.

Wittrup A., Lieberman J. (2015). Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews*, 16, pp. 543-550.

Wu, C.Y. *et al.* (2014). PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359, pp. 347-358.

Yamamoto, T. *et al.* (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*, 39 (1), pp. 27-38.

Yamamoto, T., Lu, C., Ryan, R.O. (2011). A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 286, pp. 5464-5470.

Yusuf, *et al.* (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case control study. *Lancet*, 2004, 364, pp. 937- 952.

Zhang, D. *et al.* (2008). Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, pp. 13045–13050.