

Recetor LDL

PCSK9

LDL

Luís Filipe Falhas Cavaleiro

## PCSK9: novo alvo terapêutico no combate à aterosclerose?

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luís Filipe Falhas Cavaleiro

# PCSK9: novo alvo terapêutico no combate à aterosclerose?

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Leonor Martins Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Luís Filipe Falhas Cavaleiro, estudante de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o número de estudante de 2011167198, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

---

(Luís Filipe Falhas Cavaleiro)

**Tutora da Monografia**

---

(Professora Doutora Leonor Martins Almeida)

**O Aluno**

---

(Luís Filipe Falhas Cavaleiro)

*Aos meus pais, Fernando Cavaleiro e Isabel Falhas, por todo o apoio que me deram, pelo esforço que fizeram para me dar sempre o melhor e por todos os valores que me transmitiram, contribuindo para aquilo que sou hoje.*

*À minha Tia, Margarida Falhas, e Irmão, João Cavaleiro, pela presença em todos os momentos da minha vida.*

*À minha restante Família, pela preocupação constante e por me apoiarem nesta longa caminhada.*

*Aos meus Amigos do coração que levo comigo para a vida, que nunca irei esquecer e dos quais nunca irei abdicar.*

*A toda a equipa da Farmácia Estádio pela compreensão, amizade e apoio.*

*À Professora Doutora Leonor Almeida pela orientação, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.*

*A Coimbra, cidade das tradições, das memórias, do amor, da saudade e da felicidade.  
Cidade única pela qual me apaixonei.*

## ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>2</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Breve noção do Metabolismo Lipídico e das Lipoproteínas.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Dislipidemia .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Hipercolesterolemia e Aterosclerose: mecanismo molecular e celular.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Tratamentos mais comuns da Dislipidemia.....</b>	<b>13</b>
<b>5.1. Tratamento não farmacológico.....</b>	<b>13</b>
<b>5.2. Tratamentos farmacológicos .....</b>	<b>14</b>
<b>6. PCSK9: novo alvo terapêutico hipocolesterolêmico .....</b>	<b>16</b>
<b>6.1. Fundamentos bioquímicos e moleculares da PCSK9.....</b>	<b>17</b>
<b>6.2. Papel da PCSK9 na regulação do metabolismo dos recetores de LDL.....</b>	<b>18</b>
<b>6.3. Gene PCSK9: ganho de funções e perda de funções.....</b>	<b>19</b>
<b>6.4. Fatores que influenciam os níveis plasmáticos de PCSK9 .....</b>	<b>20</b>
<b>6.5. Impacto da PCSK9 na aterosclerose.....</b>	<b>21</b>
<b>6.6. Terapêuticas de Inibição da PCSK9 .....</b>	<b>22</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>28</b>
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>30</b>

## Lista de Abreviaturas

<b>AGL</b> – Ácidos Gordos Livres	<b>LDLmox</b> – LDL minimamente oxidadas
<b>ALT</b> – Alanina Aminotransferase	<b>LOF</b> – Perda de Função ( <i>Loss Of Function</i> )
<b>Apo A</b> – Apolipoproteína A	<b>LPL</b> – Lipoproteína Lipases
<b>Apo B</b> – Apolipoproteína B	<b>mAbs</b> – Anticorpos Monoclonais ( <i>monoclonal Antibodies</i> )
<b>Apo B48</b> – Apolipoproteína B48	<b>mRNA</b> – RNA mensageiro ( <i>Messenger RNA</i> )
<b>Apo B100</b> – Apolipoproteína B100	<b>NO</b> – Óxido Nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )
<b>Apo C</b> – Apolipoproteína C	<b>OMS</b> – Organização Mundial de Saúde
<b>Apo E</b> – Apolipoproteína E	<b>PCSK9</b> – Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9
<b>ASO</b> – Oligonucleótidos <i>antisense</i>	<b>RE</b> – Retículo Endoplasmático
<b>AST</b> – Aspartato Aminotransferase	<b>RLDL</b> – Recetores de LDL
<b>AVC</b> – Acidente Vascular Cerebral	<b>RNA</b> – Ácido Ribonucleico
<b>CE</b> – Colesterol Esterificado	<b>RNAse H</b> – Ribonuclease H
<b>C- HDL</b> – Colesterol HDL	<b>ROS</b> – Espécies Reativas de Oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>C-LDL</b> – Colesterol LDL	<b>RVLDL</b> – Recetores de VLDL
<b>Ct</b> – Colesterol Total	<b>SC</b> – Via Subcutânea
<b>DCV</b> – Doenças Cardiovasculares	<b>SREBP-2</b> – <i>Sterol regulatory element binding protein-2</i>
<b>EGFA</b> – <i>Epidermal Growth Factor Domain</i>	<b>SR-BI</b> – <i>Scavenger receptor - BI</i>
<b>EMA</b> – Agência Europeia do Medicamento	<b>TG</b> – Triacilgliceróis
<b>EU</b> – União Europeia	<b>TGF – <math>\alpha</math></b> – Fator de Transformação do Crescimento $\alpha$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i> )
<b>FDA</b> – <i>Food and Drug Administration</i>	<b>TGF – <math>\beta</math></b> – Fator de Transformação do Crescimento $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
<b>FGF</b> – Fator de Crescimento de Fibroblastos ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )	<b>VEGF</b> – Fator de Crescimento Vascular Endotelial ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>FH</b> – Hipercolesterolemia Familiar ( <i>Familial Hypercholesterolemia</i> )	<b>VLDL</b> – Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade ( <i>Very Low Density Lipoproteins</i> )
<b>GOF</b> – Ganho de Funções ( <i>Gain Of Function</i> )	<b>WHO</b> – Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
<b>HDL</b> – Lipoproteínas de Alta Densidade ( <i>High Density Lipoproteins</i> )	
<b>HMG CoA</b> – 3-hidroxi-3-metil- glutaril-Coenzima A	
<b>IDL</b> – Lipoproteínas de Densidade Intermédia ( <i>Intermediate Density Lipoprotein</i> )	
<b>IL-1</b> – Interleucina I	
<b>IM</b> – Via Intramuscular	
<b>IMC</b> – Índice de Massa Corporal	
<b>LCAT</b> – Lecitina Colesterol Aciltransferase	
<b>LDL</b> – Lipoproteínas de Baixa Densidade ( <i>Low Density Lipoproteins</i> )	

## Resumo

O colesterol é um lípido intrínseco do organismo humano essencial para o seu normal funcionamento. Contudo, atualmente, a palavra “colesterol” é, na maioria das vezes, associada à falta de saúde. A verdade é que este apenas pode ser um indicador de doença quando a sua concentração no plasma está aumentada relativamente aos valores de referência. Dada a elevada prevalência desta situação, muitas são as pessoas curiosas acerca da sua origem e dos mecanismos bioquímicos subjacentes a esse aumento, das diferentes vias metabólicas do colesterol, etc. O colesterol, tal como os outros lípidos no plasma estão incorporados várias lipoproteínas as quais podem conter variadíssimas apoproteínas necessárias para o metabolismo lipídico. Quando este é perturbado podem ocorrer dislipidémias, isto é, alterações das concentrações de lípidos/lipoproteínas plasmáticas. Na maioria dos casos, as dislipidémias estão associadas ao desenvolvimento de aterosclerose que, por sua vez, pode originar doenças cardiovasculares, destacando-se neste contexto a hipercolesterolemia familiar. A adoção de estilos de vida saudáveis são, sem dúvida, as principais medidas não farmacológicas que devem ser implementadas antes de qualquer outra medida farmacológica. Nestas últimas, dispomos de um leque extenso de terapêuticas hipolipemiantes disponíveis no mercado: as estatinas, a ezetimiba, os fibratos, etc. Apesar disto, as terapêuticas existentes, por vezes, mostram ser insuficientes ou até mesmo ineficazes. Como tal, estudos recentes permitiram a descoberta de um novo alvo terapêutico no combate a aterosclerose, uma próteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9). Nesta monografia faz-se uma revisão geral deste tema, explorando os fundamentos bioquímicos e moleculares da PCSK9, o seu papel na regulação do metabolismo dos recetores de LDL, a influência das potenciais mutações com ganho ou perda da sua função, os fatores que influenciam os seus teores plasmáticos, o efeito desta enzima na aterosclerose e as várias terapêuticas de inibição da mesma. Assim, destacam-se os péptidos miméticos, as pequenas moléculas inibidoras, os oligonucleótidos antisense e siRNA que atuam a nível do silenciamento dos genes, as vacinas anti-PCSK9 e os anticorpos monoclonais anti-PCSK9. Estes últimos têm ganho especial destaque na medida em que são extremamente eficazes tendo já dois deles obtido aprovação para introdução no mercado: o Alirocumab (Praluent<sup>®</sup>) e o Evolocumab (Repatha<sup>®</sup>). Tudo em prol do bem-estar e saúde da população.

## **Abstract**

Cholesterol is an intrinsic lipid of the human organism crucial for normal functioning. Today, however, the word "cholesterol" is most often associated with lack of health. The truth is that this can only happen when its plasmatic concentration increases relative to reference values. Given the high prevalence of this situation, there are many people curious about the origin of such increases and the underlying biochemical mechanisms, about the different metabolic pathways of cholesterol, etc. Cholesterol, like other plasma lipids is incorporated in various lipoproteins which may contain an extensive range of apoproteins necessary for the lipid metabolism. When this is disturbed, dyslipidemias may occur, i.e. changes in lipid concentration/plasma lipoproteins. In most cases, dyslipidemias are associated with the development of atherosclerosis which, in turn, can lead to cardiovascular diseases, standing out in this context the familial hypercholesterolemia. The adoption of healthy lifestyles is undoubtedly the main non-pharmacological measures to be implemented before any other pharmacological treatment. Regarding this, we have an extensive range of lipid-lowering standard therapies available on the market: statins, ezetimibe, fibrates, etc. Nevertheless, sometimes, such therapies prove to be insufficient or even ineffective. Therefore, recent studies have reported a new therapeutic target in the combat of atherosclerosis, the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). This monograph makes a general review of this theme, exploring the biochemical and molecular foundations of PCSK9, their role in regulating the metabolism of LDL receptors, the influence of potential mutations with gain or loss of function, the factors influencing their plasma concentrations, the action of this enzyme on atherosclerosis and the various therapies proposed for its inhibition. From these, the out-mimetic peptides, the small molecule inhibitors, antisense oligonucleotides and siRNA that act on the level of silencing genes, the anti-PCSK9 vaccines and anti-PCSK9 monoclonal antibodies are stand out. These antibodies have gained special attention as they are extremely effective and two of them have already received approval to be commercialized: the Alirocumab (Praluent<sup>®</sup>) and Evolocumab (Repatha<sup>®</sup>). Everything for the well-being and health-related quality of life of the population.

## I. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são, atualmente, a causa número um de morte em todo o mundo. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram de DCV em 2012, representando 31% de todas as mortes globais, das quais 7,4 milhões foram por doença cardíaca coronária e 6,7 milhões foram por acidente vascular cerebral (AVC). A maioria das doenças cardiovasculares podem ser prevenidas, através da adoção de estilos de vida saudáveis, ou seja, medidas não farmacológicas, que passam por evitar o uso do tabaco, por ter uma alimentação saudável evitando a obesidade, combater o sedentarismo e o uso nocivo do álcool. Assim, será possível reverter esta situação atual (WHO, 2016).

Contudo, as medidas não farmacológicas são, frequentemente, insuficientes, tornando-se imprescindível a utilização de medidas farmacológicas sobre as quais o conhecimento está em constante mudança e evolução. De fato, pessoas com doenças cardiovasculares ou com elevado risco cardiovascular (pela presença de um ou mais fatores de risco: hipertensão arterial, diabetes, hiperlipidemia, etc.) precisam não só de adotar medidas não farmacológicas como também medidas farmacológicas, isto é, uso de medicamentos com substâncias ativas apropriados ao seu estado clínico (WHO, 2016). Na verdade, em muitos casos, a dieta e a modificação do estilo de vida têm de ser complementadas pela instituição atempada e racional de medidas farmacológicas como, por exemplo, o uso de fármacos hipolipemiantes. A escolha destes fármacos, para além de assentar na facilidade da sua administração e no perfil de efeitos adversos e de segurança a longo prazo, assenta, necessariamente, na expressão fenotípica da dislipidemia que se quer tratar (e no efeito farmacológico modificador do perfil lipoproteico visado) (Marques da Silva, 2015).

Estes fármacos são dirigidos, a maior parte das vezes, ao abaixamento do colesterol, em particular ao colesterol associado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A maior parte do colesterol do nosso organismo é sintetizada pelo fígado ou deriva de uma ampla variedade de alimentos ricos em gorduras saturadas principalmente de origem animal. O aumento do colesterol LDL (C-LDL) no plasma pode levar ao aparecimento de aterosclerose que facilita a progressiva ou súbita obstrução das artérias, dificultando a passagem do sangue, e provocando as mais graves doenças cardiocerebrovasculares: angina de peito, enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, etc. Assim, quanto mais alta for a concentração de C-LDL (comumente chamado de “mau colesterol”) maior é o risco aterogénico, mas em contraste quanto mais elevado o colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) (comumente chamado de “bom colesterol”), menor é esse risco. Em valores numéricos,

estima-se que o C-LDL elevado seja a causa de 18% das doenças cerebrovasculares (eventos não fatais na sua maioria) e de 56% das doenças isquêmicas do coração (WHO, 2002).

O grande impacto deste assunto na sociedade atual levou ao meu interesse no seu estudo. Na verdade, o farmacêutico como profissional do medicamento e agente de saúde pública tem a obrigação de saber esclarecer as dúvidas do utente acerca de assuntos preocupantes como o colesterol elevado no sangue, aterosclerose e todas as consequências negativas a eles associados. Raras são as pessoas com conhecimentos aprofundados e consistentes sobre este tema e muitas são as pessoas que procuram o farmacêutico com a intenção de esclarecer as suas dúvidas. Assim sendo, esta monografia dedica-se ao esclarecimento de tais assuntos bem como de algumas terapêuticas hipocolesterolémicas já utilizadas, mas principalmente à abordagem de terapêuticas inovadoras, algumas ainda em desenvolvimento. Inicialmente, apresentar-se-ão alguns conceitos breves referentes ao metabolismo dos lípidos, aterosclerose e terapêuticas não farmacológicas e farmacológicas mais utilizadas no tratamento da dislipidemia, e seguidamente far-se-á a abordagem a terapêuticas emergentes e inovadoras como é o caso dos inibidores da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9).

A pesquisa efetuada foi realizada através da utilização de artigos científicos obtidos, em particular da *Science Direct*, da *Pubmed* e também através de fontes credíveis como: Fundação Portuguesa de Cardiologia, Organização Mundial de Saúde (OMS), etc. Foi dada maior relevância às publicações de maior impacto e mais atuais tendo sido aplicados filtros aos resultados desta pesquisa, de forma a identificar os artigos mais pertinentes.

## **2. Breve noção do Metabolismo Lipídico e das Lipoproteínas**

Neste ponto, será feita uma breve referência ao metabolismo lipídico que envolve as diversas lipoproteínas que visa contextualizar e compreender o mecanismo de ação da nova terapêutica inovadora subjacente ao tema desta monografia. Deste modo e de forma não exhaustiva serão abordadas 3 vias distintas de metabolismo dos lípidos: via exógena – que compreende a absorção e o transporte das gorduras da dieta até ao fígado e aos tecidos; via endógena – que abarca o transporte e o metabolismo das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) produzidas no hepatócito; e finalmente, via do transporte reverso de colesterol, que envolve o C-HDL e se relaciona com o transporte do colesterol, provavelmente em excesso, dos tecidos periféricos para o fígado, onde vai ser utilizado e catabolizado (Burnett, 2010; Marques da Silva, 2015).

*Via exógena*

Os lípidos, provenientes da dieta após serem emulsionados com ácidos biliares e sofrerem ação de enzimas pancreáticas no lúmen intestinal são incorporados em micelas e absorvidos. Nos enterócitos (células do intestino), os triacilgliceróis (TG), o colesterol esterificado (CE) e os fosfolípidos voltam a ser sintetizados e conjuntamente com a apolipoproteína B48 (apo B48) formam os quilomicrons, lipoproteínas de muito baixa densidade e muito ricas em TG, que entram na circulação através do sistema linfático. Seguidamente, os quilomicrons nos capilares de alguns tecidos, em particular do tecido adiposo, adquirem, a partir das HDL, a apolipoproteína E (apo E) e apolipoproteína C (apo C), ao mesmo tempo que os TG são hidrolisados pela lipoproteína lípase (LPL) em ácidos gordos livres (AGL), os quais são transportados para dentro dos adipócitos e aí armazenados sob a forma de TG (podendo posteriormente ser hidrolisados e originar AGL para serem utilizados em energia quando necessário). Desse processo, resultam os quilomicrons residuais, mais pobres em TG e mais ricos em colesterol. Estes, rapidamente são depurados da circulação através de recetores da apolipoproteína B100 (apo B100) / apo E, presentes no fígado, ocorrendo a sua internalização por endocitose, sendo os seus componentes hidrolisados nos lisossomas. Desta forma, o colesterol libertado é transformado em ácidos biliares, incorporado em VLDL ou armazenado sob a forma de ésteres de colesterol (Burnett, 2010; Katzung *et al.*, 2012; Marais *et al.*, 2015; Marques da Silva, 2015).

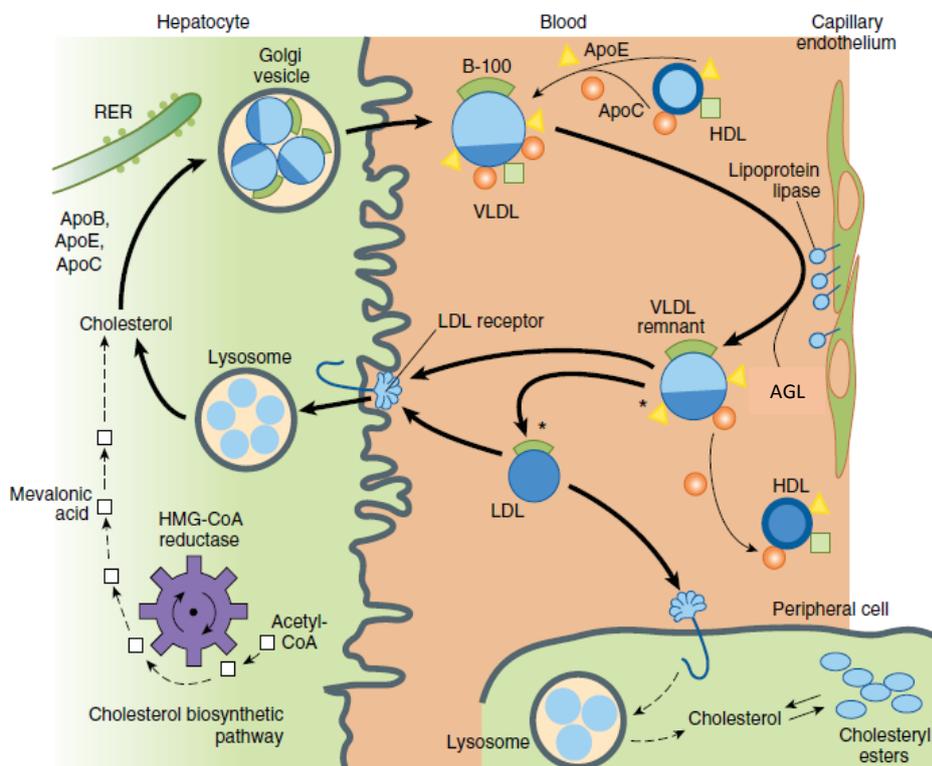
*Via endógena*

No fígado, os hepatócitos sintetizam colesterol e TG, que são incorporados em lipoproteínas e transportadas por exocitose para o meio extracelular, formando-se, deste modo, as VLDL. Estas entram na circulação e são catabolizadas, tal como referido para os quilomicrons. As VLDL apresentam na sua constituição a apo B100, apo E e apo C importantes no seu metabolismo. Em circulação, estas lipoproteínas sofrem a ação da LPL presente nas células endoteliais, em particular no tecido adiposo, sendo convertidas em partículas cada vez mais pequenas e mais ricas em colesterol – as VLDL remanescentes ou lipoproteínas de densidade intermédia (IDL). Estas últimas são também catabolizadas pelo fígado pelos recetores apo B100 / apo E e uma pequena parte transforma-se em LDL, cujo teor de TG é bastante reduzido contrariamente ao teor de CE que é superior a 50%. Finalmente, as LDL podem ser captadas para o interior das células através daquele mesmo recetor, também

chamado recetor LDL (RLDL) em particular, para os hepatócitos que têm um número muito elevado dos mesmos (Figura 1).

### Figura 1 – Metabolismo de lipoproteínas de origem hepática.

As setas mais grossas mostram as principais vias. Inicialmente as VLDL nascentes são secretadas no complexo de Golgi. Posteriormente, adquirem apo C e apo E a partir da HDL. As VLDL são convertidas em VLDL remanescente / IDL por lipólise por meio da LPL nos vasos de tecidos periféricos. No processo, as apo C e uma parte da apo E são recicladas, voltando para a HDL. Algumas VLDL são convertidas em LDL por uma maior perda de TG e perda de apo E. A principal via para a degradação de LDL envolve a endocitose da LDL pelos RLDL no fígado e nos tecidos periféricos que apresenta especificidade para a apo B100. Na imagem, a cor azul escura representa CE, a cor azul clara representa TG; o asterisco indica um ligando funcional para os recetores de LDL; triângulos indicam apo E; círculos e quadrados representam apo C; RER, retículo endoplasmático rugoso (Adaptado de Katzung *et al.*, 2012).



Este RLDL é uma glicoproteína de superfície que reconhece a apo B100 e a apo E. De notar que a afinidade deste recetor é maior para a apo E do que para a apo B, por este mesmo motivo é que as LDL permanecem mais tempo no plasma do que outras lipoproteínas. A ligação da LDL ao RLDL permite a sua internalização por endocitose formando-se, posteriormente, endossomas. No entanto, parte dos RLDL são reciclados, regressando à superfície celular. Quanto às LDL são degradadas em péptidos e aminoácidos e o CE é hidrolisado podendo ser utilizado para a produção de novas membranas, hormonas esteroides e ácidos biliares. De relevar que os hepatócitos conseguem regular os teores de colesterol intracelular controlando a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima chave da síntese de colesterol e inibindo a síntese de novos recetores de LDL através da supressão do seu gene. A regulação é feita por um mecanismo de *feedback*. Perceber tais factos, é de extrema relevância para a compreensão do mecanismo de ação dos inibidores do PCSK9 (Burnett, 2010; Katzung *et al.*, 2012; Marques da Silva, 2015).

#### Via do transporte reverso

As HDL são um grupo de lipoproteínas importantíssimo, ricas em colesterol, reconhecido como o “bom colesterol”. Mas a que se deve tal facto? Vejamos, as HDL podem ser produzidas

pelo fígado ou sintetizadas pelo intestino. Em ambos os processos, formam-se HDL nascentes (que apresentam elevada concentração de apoproteína e baixo teor de colesterol). A HDL pode ser vista como um depósito de apo E e apo C para as lipoproteínas que delas carecem (quilomicrons, VLDL). Por outro lado, o mais fantástico das HDL é que aquando do excesso de colesterol nos tecidos extra-hepáticos, as partículas de HDL nascentes recolhem este excesso sob a forma de colesterol livre, o qual é esterificado após ação, na HDL, da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), graças ao co-factor apolipoproteína A (Apo A), sendo transferido para o interior da lipoproteína. Deste modo, formam-se as HDL maduras que transportam esse CE em excesso para o fígado onde são captadas por recetores hepáticos (*scavenger receptor – SR-B1*) sendo o conteúdo de colesterol dessas lipoproteínas transferido para o hepatócito, onde é catabolizado e excretado pela bÍlis. As HDL também transferem pela mesma via o seu colesterol para as células dos tecidos esteroideogénicos, que requerem maiores quantidades de colesterol para a síntese de hormonas. Outra opção passa pela transferência deste colesterol para as VLDL e LDL. O processo de transporte reverso tem sido alvo de vários estudos, estando esta via cada vez mais aprofundada e detalhada. Assim, esta via garante que o excesso de colesterol das células é eliminado, em particular, dos macrófagos na íntima das artérias, diminuindo a probabilidade de progressão de processos ateroscleróticos (Bell *et al.*, 2012; Katzung *et al.*, 2012; Marques da Silva, 2015).

### 3. Dislipidémia

O termo “dislipidémia” pode ser utilizado para definir todas as anomalias quantitativas e qualitativas dos lípidos no sangue. As dislipidémias podem ser de vários tipos podendo manifestar-se por um aumento dos TG, por um aumento do colesterol, por um aumento quer dos TG quer do colesterol, a designada dislipidémia mista, ou então por uma redução dos níveis de HDL. De facto, a dislipidémia é um dos fatores de risco mais determinantes para o desenvolvimento de aterosclerose, a qual poderá levar à obstrução parcial ou total do fluxo sanguíneo que chega ao coração e ao cérebro (Burnett, 2010).

Dependendo do vaso sanguíneo, a consequência será diferente. De facto, se estivermos a falar de uma artéria coronária, por exemplo, a consequência poderá ser angina de peito estável ou instável, podendo esta evoluir, mais facilmente, para um enfarte agudo do miocárdio. Se for um vaso sanguíneo cerebral, poderá ocorrer um acidente vascular cerebral isquémico por obstrução e necrose de tecidos subjacentes (Fundação Portuguesa de Cardiologia, 2016).

Assim e de modo a impedir a ocorrência de dislipidémias e a garantir a saúde e bem-estar da população, a Fundação Portuguesa de Cardiologia recomenda os seguintes valores de referência para os parâmetros laboratoriais relacionados com o colesterol no plasma: colesterol total (Ct) abaixo dos 190 mg/dL; Colesterol HDL (C-HDL) acima de 40 mg/dL para homens e acima de 45 mg/dL para mulheres; C-LDL inferior a 115 mg/dL. Quanto aos TG plasmáticos, a concentração recomendada é 115 mg/dL (Fundação Portuguesa de Cardiologia, 2016).

Existem dois grandes fatores que contribuem para as dislipidémias: i) fatores genéticos responsáveis pelas dislipidémias primárias, familiares ou genéticas, podendo ser monogénicas, quando apenas um gene é responsável pelo seu fenótipo ou poligénicas quando o fenótipo resulta da mutação de vários genes; ii) fatores ambientais que contribuem para dislipidémias secundárias ou adquiridas. Alguns destes fatores estão relacionados com alimentação rica em gorduras e pobre em fibras e vegetais, obesidade, sedentarismo, resistência à insulina (doentes obesos e diabéticos) uma vez que o excesso de insulina no sangue ativa a HMG-CoA redutase e consequentemente a produção excessiva de colesterol endógeno, hipotireoidismo (problemas endócrinos) uma vez que as hormonas da tiroide aumentam a atividade dos RLDL, consumo de álcool, consumo de tabaco, etc. (Bell *et al.*, 2012; Burnett, 2010; Nordestgaard *et al.*, 2013).

#### *Hipercolesterolemia Familiar (FH)*

A hipercolesterolemia familiar (FH) é uma das patologias monogénicas mais comuns associada ao aumento do risco cardiovascular, tendo sido a primeira patologia genética do metabolismo lipídico a ser caracterizada molecularmente (Bourbon *et al.*, 2006). Existe na forma homozigótica - quando os alelos provenientes do seu progenitor masculino e feminino se encontram mutados; e heterozigótica - quando apenas um dos alelos é mutado, sendo esta última a forma mais severa da doença apesar de ser também a menos comum. Sendo que a principal causa de FH passa pela mutação do gene dos RLDL, a gravidade da hipercolesterolemia de um individuo homozigótico relaciona-se com o facto de a mutação estar presente nos dois alelos e consequentemente as suas células serem incapazes, de uma forma total ou quase total, de ligar e internalizar as LDL. A forma menos severa é a hipercolesterolemia dos heterozigóticos já que apenas apresentam um dos alelos mutados. Tal fato leva a que, nas células, apenas parte das partículas de LDL se liguem e sejam internalizadas, permanecendo as restantes no sangue. Consequentemente, os indivíduos heterozigóticos apresentam uma concentração de colesterol no plasma 2 a 3 superior aos valores de referência, enquanto que os indivíduos homozigóticos têm uma hipercolesterolemia severa,

que pode atingir valores extremamente elevados. A FH heterozigótica tem uma frequência de 1/500 na maioria das populações europeias, estimando-se em Portugal cerca de 20.000 casos. A forma homozigótica da FH apresenta uma prevalência de 1/1.000.000 (Ahn *et al.*, 2015; Bourbon *et al.*, 2006; Nordestgaard *et al.*, 2013).

Clinicamente, esta patologia é caracterizada essencialmente por um aumento dos teores de colesterol no plasma o que pode originar a sua acumulação nos tendões (xantomas tendinosos) e o desenvolvimento de ateromas. Assim, estes indivíduos apresentam uma maior tendência para desenvolverem precocemente aterosclerose com a ocorrência de eventos cardiovasculares muito prematuramente. As mutações subjacentes podem verificar-se, mais frequentemente, em três genes: o gene do LDL, o gene da apolipoproteína B (ApoB) e o gene da PCSK9, sendo este último mais relevante no contexto desta monografia (Ahn *et al.*, 2015). A deteção precoce da FH leva à implementação atempada de aconselhamento e tratamento farmacológico adequado, minimizando o risco de eventos cardiovasculares podendo mesmo levar à regressão da placa aterosclerótica. Apesar de ser uma doença multifatorial, a dislipidémia, em particular, a hipercolesterolemia-LDL é considerada um dos fatores causais mais relevantes (Bourbon *et al.*, 2006; Nordestgaard *et al.*, 2013).

#### **4. Hipercolesterolemia e Aterosclerose: mecanismos moleculares e celulares**

Estudos epidemiológicos têm definido vários fatores de risco ambientais e genéticos para o desenvolvimento da aterosclerose (Lusis, 2000) sendo a dislipidémia e em particular a hipercolesterolemia-LDL um dos fatores mais relevantes. Esta doença é caracterizada pela deposição de gordura nas artérias, em particular colesterol. Estes eventos começam cedo, na infância e adolescência, afetando as artérias de médio e grande calibre. Na verdade, a lesão não é só uma obstrução, é um processo ativo, inflamatório e imunológico (Fak *et al.*, 2015).

A primeira alteração observável na aterosclerose prende-se com a acumulação de LDL, na íntima da parede das artérias. Posteriormente, estas serão oxidadas acumulando-se nesse espaço. Determinadas zonas são mais propícias à acumulação destas lipoproteínas pois estão submetidas a uma maior turbulência sanguínea por se encontrarem em ramificações ou curvaturas (zonas de *shear stress*) do sistema circulatório. Nestas zonas, o fluxo sanguíneo não é uniforme e laminar, é um fluxo perturbado que aumenta do influxo de LDL para a matriz subendotelial, sendo cada vez maior a fração que pode ser oxidada por aí permanecer durante algum tempo. De notar que nessas zonas e em situações de hipercolesterolemia – LDL o

influxo de LDL é bastante superior ao seu efluxo, contrariamente às HDL que entram e saem facilmente (por apresentarem menores dimensões) na íntima. As LDL retidas são sujeitas a várias modificações nas moléculas de lípidos originando-se espécies de LDL minimamente oxidadas (LDLmox), as quais são pró-inflamatórias. Assim, a aterogênese passa pelo recrutamento de monócitos e linfócitos pela ação de moléculas pro-inflamatórias produzidas pelo endotélio que incluem, não só moléculas de adesão, mas também fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), a interleucina-1 (IL-1) e os fatores de transformação do crescimento  $-\alpha$  e  $-\beta$  (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), fatores quimiotáticos (citocinas), etc. As LDLmox são também responsáveis pela inibição de produção do óxido nítrico (NO) pelo endotélio, um mediador químico com múltiplas propriedades anti-aterogénicas, incluindo a vasodilatação. A proliferação de macrófagos derivados dos monócitos na íntima leva à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e mediadores inflamatórios, os quais geram uma situação de *stress* oxidativo bastante acentuado. Assim, ocorre extensa oxidação das LDL incluindo a apo B passando estas partículas a ser descontroladamente captadas por macrófagos, levando à sua transformação em células esponjosas/células espumosas. De notar que as lipoproteínas residuais, derivadas das VLDL e quilomicrons, já enriquecidas em colesterol são, também, aterogénicas entrando na íntima e sendo captadas também por macrófagos. As HDL surgem nesta situação como um fator benéfico, sendo responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, já mencionado anteriormente, inibindo a transformação de macrófagos em células esponjosas/células espumosas por recolher o excesso de colesterol presente nessas células. Assim, concentrações baixas de HDL em nada contribuem para reverter esta situação. Se o processo aterosclerótico não for travado, as células do músculo liso acabam por migrar para a túnica íntima, na qual ocorre uma intensa produção de componentes de matriz extracelular que contribuem para a formação de uma cápsula fibrosa que produz espessamentos, distribuídos irregularmente pelo revestimento interno da artéria. Cada zona de espessamento (chamada placa aterosclerótica ou ateroma) é constituída por células esponjosas e estrias gordas cheias de colesterol, células musculares lisas, células de tecido conjuntivo e eventualmente, lípidos extracelulares resultantes da necrose celular. As artérias afetadas pela aterosclerose perdem a sua elasticidade e, à medida que os ateromas crescem, tornam-se mais estreitas. Além disso, com o tempo, as artérias acumulam depósitos de cálcio que conferem maior fragilidade à capsula fibrosa. A rutura de uma pode desencadear a formação de um coágulo sanguíneo por recrutamento de plaquetas (trombo). O coágulo estreita ainda mais a artéria podendo gerar a sua oclusão ou então desprende-se e passa a circular no sangue até chegar a uma artéria

mais pequena, podendo causar aí uma embolia (Burnett, 2010; Lusic, 2000; Mgv et al., 2005; MSD, 2009).

## 5. Tratamentos mais comuns da Dislipidémia

### 5.1. Tratamento não farmacológico

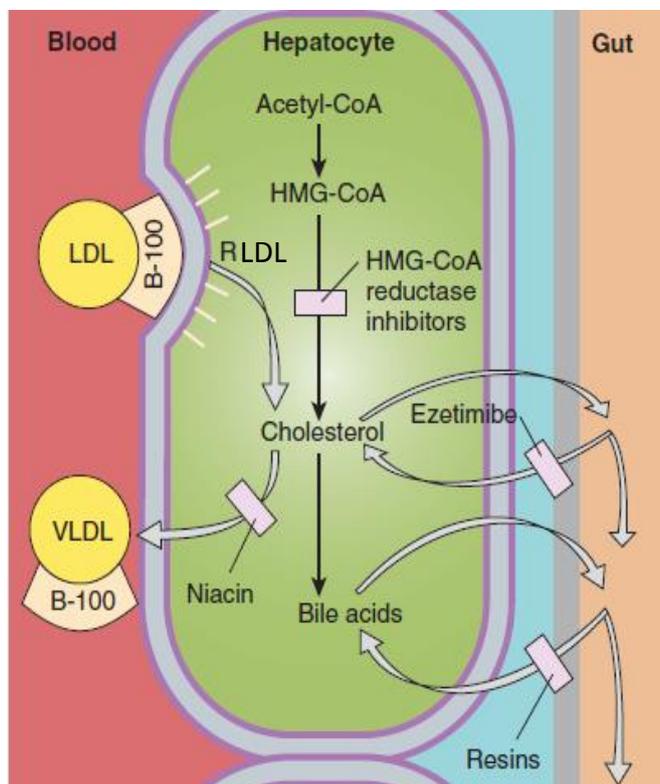
Dependendo de cada pessoa e do seu estado clínico, pessoas diferentes devem adotar medidas de tratamento para a dislipidémia diferentes. Contudo, existem um conjunto de medidas as quais podem ser adotadas por todos, as chamadas medidas não farmacológicas as quais devem ser privilegiadas antes da utilização de qualquer tipo de fármaco. De notar, que mesmo as pessoas que utilizam medidas farmacológicas devem cumprir as medidas não farmacológicas. Isto, porque, não faz qualquer sentido uma pessoa utilizar uma determinada terapêutica e continuar com hábitos alimentares não saudáveis e estilos de vida prejudiciais à sua saúde. Felizmente, a maioria das medidas não farmacológicas encontram-se encadeadas, isto é, tomar medidas para levar a cabo alguns objetivos ajuda a levar a cabo outros. Vejamos, fazer exercício físico ajuda a perder peso, o que, por sua vez, ajuda a diminuir os valores do colesterol e da pressão arterial, do mesmo modo que deixar de fumar ajuda a baixar os valores de colesterol e da pressão arterial. O hábito de fumar é particularmente perigoso para as pessoas que já têm um risco elevado de sofrer doenças cardíacas. Estudos demonstram que fumar diminui a concentração das HDL e aumenta a concentração de LDL. Por outro lado, fumar aumenta a tendência da coagulação sanguínea, o que aumenta o risco de doença arterial periférica e doença das artérias coronárias (MSD, 2009).

O tratamento das dislipidémias passa por uma mudança do estilo de vida, ao nível da alimentação e do exercício. Deste modo recomenda-se a redução da ingestão de alimentos de origem animal (carnes vermelhas, manteiga, queijos gordos); evicção de produtos de charcutaria e alimentos pré-cozinhados; preferência no consumo de produtos frescos; preferência na ingestão de proteínas animais ligadas ao peixe, carne de aves sem pele e carnes magras; preferência pelo azeite e outras gorduras polinsaturadas; ingestão de mais alimentos ricos em ómega 3 (exemplo: sardinhas, salmão, óleo de soja); ingestão de mais cereais integrais, de vegetais, fruta e fibras solúveis (que facilitam a eliminação do colesterol); cozinhar a vapor ou grelhar os alimentos evitando os fritos; evicção de natas e maioneses; moderar o consumo de chocolate; limitar o consumo de gemas de ovo; praticar atividade física regular (30 min por dia; 5 a 7 dias por semana); evitar o consumo de álcool; controlar o peso mantendo o Índice de Massa Corporal (IMC) entre 18 e 25 Kg/m<sup>2</sup> e, finalmente, abandonar,

caso existam, hábitos tabágicos. Aquando da adoção destas medidas, se os valores lipídicos não baixarem para valores normais, ter-se-á de recorrer a medidas farmacológicas abaixo resumidas (European Society of Cardiology, 2011; Fundação Portuguesa de Cardiologia, 2016; MSD, 2009).

## 5.2. Tratamentos farmacológicos

Existe uma grande variedade de medidas farmacológicas utilizadas no tratamento de dislipidémias, em particular, da hipercolesterolemia-LDL: estatinas, ezetimiba, fibratos, ácido nicotínico/niacina/vit.B3, colestiramina e colestipol (resinas) (Figura 2). Contudo existem ainda outras em desenvolvimento, os inibidores da PCSK9, que serão abordadas mais adiante (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).



**Figura 2 – Medidas farmacológicas mais utilizadas.** Locais de ação dos inibidores da HMG-CoA redutase, niacina (ácido nicotínico), ezetimiba, e resinas utilizadas no tratamento de hiperlipidemia. Os RLDL são aumentados por tratamento com resinas e com os inibidores da HMG-CoA redutase (Adaptado de Katzung *et al.*, 2012).

### Estatinas

Atuam no fígado e constituem de momento os fármacos mais eficazes em reduzir o C-LDL e eventos cardiovasculares. São a classe de fármacos que tem evidenciado mais benefícios clínicos e consequentemente são os fármacos mais utilizados na terapêutica das dislipidémias. As principais estatinas são: lovastina, pravastina, fluvastatina, atorvastatina, sinvastatina e rosuvastatina. As estatinas reduzem o Ct, C-LDL e em menor grau, a trigliceridémia. Atuam numa etapa muito precoce e limitante da biossíntese do colesterol, como inibidores específicos, reversíveis, competitivos e dose-dependentes da HMG-CoA redutase hepática, a enzima chave daquele processo de síntese. Em geral, as estatinas possuem boa margem de segurança e tolerabilidade, com incidência de efeitos adversos em menos de 2% dos pacientes (fraqueza e/ou dores musculares, miopatias, etc.). As estatinas são indicadas basicamente na hipercolesterolemia isolada e hiperlipidemia mista com hipertrigliceridémia moderada. São

eficazes em reduzir de modo dose-dependente o C-LDL sérico em 25-45%. O tratamento com estatinas inicia-se, geralmente, com doses baixas, aumentando progressivamente e monitorizando-se a resposta lipídica até atingir, caso necessário, a dose máxima recomendada para cada composto. Estes fármacos parecem ser igualmente eficazes em portadores de hipercolesterolemia familiar heterozigótica, o que não acontece nos pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica. A nível da aterosclerose, parecem modificar a parede arterial impedindo o crescimento da placa aterosclerótica. Apresentam, também, grande potencial antioxidante e efeito antiproliferativo sobre células musculares lisas (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).

#### *Ezetimiba*

A ezetimiba inibe a absorção de colesterol proveniente da dieta. Vários estudos demonstraram a inibição desta absorção em cerca de 54% em duas semanas. Assim, a quantidade de colesterol incorporado nos quilomicrons é menor e, por conseguinte, a quantidade de colesterol livre disponibilizada ao fígado (hepatócitos), através dos quilomicrons residuais, é bastante reduzida. Tais fatos induzem a ativação da HMG-CoA redutase que leva ao aumento da produção de colesterol endógeno e ao aumento do número de LDL, aumento este responsável por uma redução de cerca de 15-20% do C-LDL e, conseqüentemente, do Ct no sangue. A ezetimiba também reduz, discretamente os TG (em cerca de 5%) e eleva o C-HDL (em 1-2%) no plasma. Como a ezetimiba leva a um aumento da biossíntese de colesterol, este fármaco pode ser associado com estatinas, o que promove uma redução adicional de 10-15%, podendo ser alcançadas reduções totais de 60% de C-LDL. A ezetimiba pode ser utilizada por pacientes nos quais uma redução de 15-20% de C-LDL é satisfatória ou ainda em pacientes para os quais as estatinas não são o fármaco mais adequado (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).

#### *Fibratos*

Os fibratos, como o bezafibrato, o ciprofibrato e o fenofibrato são úteis em pacientes com hipertrigliceridemia. O principal efeito é a redução das VLDL séricas ao mesmo tempo que reduzem o C-LDL. Diminuem, portanto, as lipoproteínas ricas em TG tais como VLDL, através do aumento da atividade da LPL no músculo e tecido adiposo. Em adição, pode ocorrer aumento do C-HDL via indução da expressão génica das apo A hepáticas, o que leva ao aumento das HDL nascentes, precursoras das HDL maduras (Katzung *et al.*, 2012).

Os fibratos geralmente são bem tolerados, ocorrendo efeitos adversos em 5-10% dos pacientes, mas estes não são suficientes, na maior parte dos casos, para causar a suspensão do

fármaco. Os efeitos adversos gastrointestinais são os mais comuns (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).

#### *Ácido Nicotínico/Niacina/Vitamina B3*

O ácido nicotínico atua sobre o Ct, o C-LDL (reduzindo cerca de 20%-30%, em 3 a 6 semanas), as VLDL e os TG (reduzindo 35%-50%, em 4 a 7 dias), além de aumentar o C-HDL (em 30%-40%). Este fármaco é geralmente usado na tentativa de elevar o C-HDL e reduzir os TG (sendo tão efetivo como os fibratos, mas mais potente do que as estatinas nesta função). Pode ser utilizado como terapia primária ou como terapia auxiliar, mas apenas quando é bem tolerado já que por vezes os seus efeitos colaterais, em particular rubor em associação com palpitações e prurido, limitam o seu uso em grande parte dos pacientes. Esta terapêutica inibe a lipólise que ocorre nos adipócitos diminuindo a utilização de AGL para a síntese de TG no fígado. O aumento do catabolismo das VLDL também ocorre por aumento da atividade da LPL. A diminuição do C-LDL pode dever-se à produção diminuída de VLDL e ao aumento do catabolismo hepático de IDL, que são os precursores de LDL (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).

#### *Colestiramina e Colestipol (Resinas)*

A colestiramina e o colestipol são dos fármacos hipolipemiantes mais antigos, sequestradores de ácidos biliares ou resinas que impedem a absorção intestinal do colesterol proveniente da alimentação. Apresentam boa margem de segurança. Atualmente são recomendados como fármacos de segunda escolha, visto que as estatinas são mais efetivas na redução da colesterolémia (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012).

## **6. PCSK9: Novo alvo terapêutico hipocolesterolémico**

Embora exista atualmente uma grande variedade de estratégias terapêuticas relativamente eficazes para o tratamento de dislipidémias são ainda reconhecidas bastantes limitações à sua utilização. Por exemplo, as estatinas são a estratégia terapêutica mais utilizada e como já foi referido, estas possuem boa margem de segurança e tolerabilidade, com incidência de efeitos adversos em menos de 2% dos pacientes. Contudo, em menos de 1% dos pacientes, observa-se aumento sérico das atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que é revertido com a suspensão da terapêutica com estatinas. Por outro lado, apesar de rara, pode ocorrer miopatia (associada a fraqueza muscular) com ou sem rabdomiólise (lise rápida das células do músculo esquelético com libertação de produtos

intracelulares na corrente sanguínea os quais podem causar insuficiência renal aguda) (DeLucia *et al.*, 2014; Katzung *et al.*, 2012). Para além disto, apesar do uso intensivo de estatinas, mesmo na sua máxima dosagem ou em combinação com outras terapias, como por exemplo a ezetimiba, permanece um risco residual de AVC e enfarte agudo do miocárdio (Ahn *et al.*, 2015; Gupta, 2015; McKenney, 2015) uma vez que alguns pacientes não atingem os objetivos hipolipemiantes desejados aquando da instituição da terapêutica (Kołodziejczak *et al.*, 2016). Deste modo, pacientes com um nível de hipercolesterolemia extremamente elevado, e/ou pacientes que são intolerantes ou não respondem às estatinas, necessitam de alternativas mais viáveis e eficazes. Assim, surgiram os inibidores da PCSK9, os inibidores da apo B e os inibidores da proteína de transferência de triacilgliceróis microsomal (MTTP). Nesta monografia serão focados apenas os inibidores da PCSK9 (Ahn *et al.*, 2015).

### **6.1. Fundamentos bioquímicos e moleculares do PCSK9**

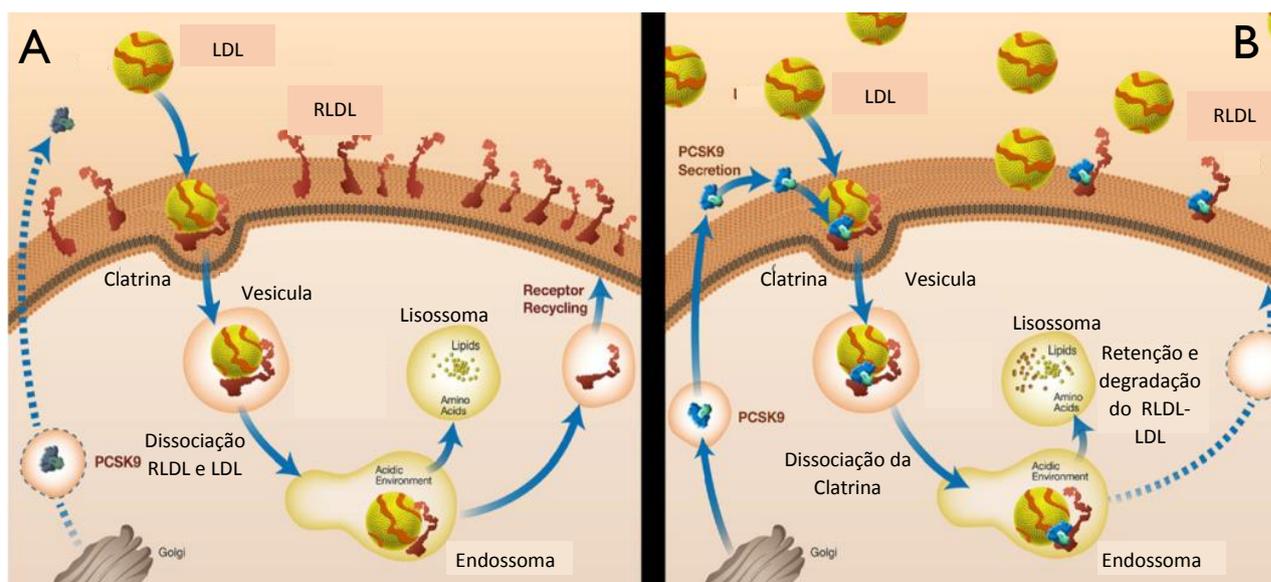
Aproximadamente quarenta anos após a descoberta de Goldstein e Brown do RLDL – descoberta que levou Goldstein e Brown ao Prémio Nobel da Medicina em 1985 – e 25 anos após a introdução das estatinas no tratamento da dislipidemia, surge um novo marco na terapêutica hipocolesterolemica que incide novamente mas indiretamente, nos RLDL. Esta terapêutica baseia-se no mecanismo de ação da PCSK9, uma das diversas enzimas que constituem a família das pro-proteínas convertase (responsáveis pela clivagem de precursores proteicos de fatores de crescimento, hormonas, recetores, etc.) e da qual fazem parte um total de nove membros distintos sendo a PCSK9 o nono membro (Corral, 2014; Davignon *et al.*, 2010).

Esta é sintetizada como uma enzima inativa (zimogénio) com 74 kDa (proPCSK9), a qual se encontra bem organizada, sendo constituída por um péptido de sinal com N-terminal necessário para a secreção do PCSK9, seguido por um pro-domínio, um domínio catalítico e finalmente um domínio rico em cisteína-histidina. A proPCSK9 é clivada por autocatálise entre o pro-domínio e o domínio catalítico. Depois da clivagem do pro-domínio, o N-terminal permanece associado ao domínio catalítico da PCSK9, formando um heterodímero estável: pro-domínio – PCSK9 que regulará a atividade enzimática. Este processo autocatalítico ocorre dentro do retículo endoplasmático (RE) e culmina na formação de uma enzima PCSK9 madura de 62 kDa. Este processo de clivagem é necessário para a sua ativação e libertação do retículo endoplasmático. Assim, numa fase posterior, a PCSK9 interage diretamente com o RLDL, segundo um mecanismo referido mais à frente (Corral, 2014; Davignon, Dubuc *et al.*, 2010; Marais *et al.*, 2015; McKenney, 2015; Urban *et al.*, 2013).

## 6.2. Papel da PCSK9 na regulação do metabolismo dos recetores de LDL

De um modo geral e bastante simplista, a principal via de remoção das LDL do plasma é através de endocitose, mediada pela interação e ligação da apo B100 das LDL com o RLDL (presente em grande número na membrana plasmática dos hepatócitos). Durante este processo de internalização os RLDL voltam para a superfície da célula, sendo portanto reciclados (Giugliano *et al.*, 2015) (Figura 3A).

Através de vários estudos verificou-se que a PCSK9 desempenha um papel crítico na regulação da homeostase do colesterol. Constatou-se que a ligação da PCSK9 aos RLDL presentes nos hepatócitos conduz a alterações conformacionais que levam à degradação intracelular dos RLDL, diminuindo a sua densidade à superfície destas células, conduzindo, deste modo, a um aumento de C-LDL no plasma. De notar, que quer os RLDL quer a PCSK9 são igualmente regulados pelo *Sterol Regulatory Element Binding Protein-2* (SREBP-2), de modo a impedir o influxo excessivo de colesterol na célula e garantir a homeostase intracelular do colesterol (Stock, 2014). Este processo inicia-se com a ligação da PCSK9 ao domínio do RLDL, *Epidermal Growth Factor – like repeat homology domain* (EGFA). Esta ligação ocorre a um pH neutro o que determina a sua baixa afinidade. Contudo, a afinidade desta ligação PCSK9-RLDL aumenta após a endocitose, o que pode ser explicado pelo facto do pH do endossoma formado ser bastante ácido, o que contribui para o fortalecimento do tipo de ligações existentes entre domínios. O RLDL “marcado” desta forma com o PCSK9 é direccionado para o lisossoma para ser, impedindo a sua reciclagem (Figura 3B) (Marais *et al.*, 2015).

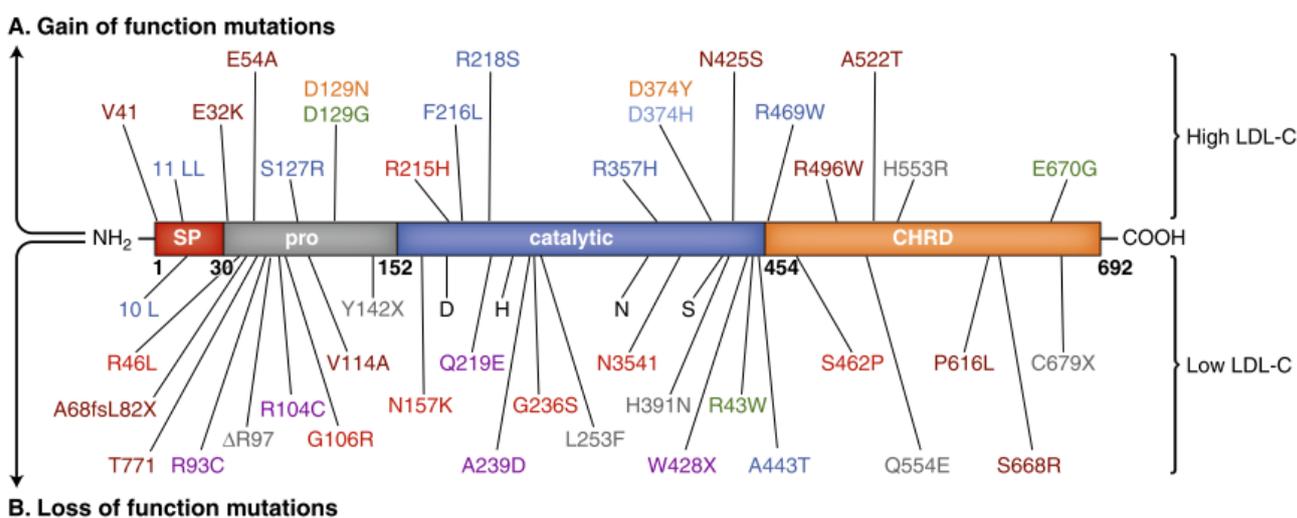


**Figura 3 – Metabolismo dos recetores LDL na presença e ausência de PCSK9.** Metabolismo dos recetores LDL na ausência (A) e na presença (B) de PCSK9 (Adaptado de Marais *et al.*, 2015).

Em suma, podemos dividir a mecanismo pelo qual a PCSK9 atua em duas fases distintas. Numa primeira fase, que ocorre extracelularmente, a PCSK9 madura, que sofreu transformações prévias e necessárias à sua ativação no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi, liga-se ao RLDL na superfície das células, ocorrendo a posterior internalização deste complexo após a ligação as LDL com formação de endossomas revestidos de clatrina. Numa segunda fase, que ocorre intracelularmente, o complexo é direcionado para os lisossomas, onde ocorre a sua degradação, não havendo reciclagem do RLDL. Assim a PCSK9 madura atua como um chaperão que marca o RLDL enviando-o para a via de degradação endossoma/lisossoma (Corral, 2014; Giunzioni *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2014; Liu, 2015; McKenney, 2015; Puri *et al.*, 2016; Tavori *et al.*, 2015; Urban *et al.*, 2013).

### 6.3. Gene PCSK9: ganho de funções e perda de funções

Relativamente ao gene PCSK9 existem duas formas de mutação conhecidas: as mutações com ganho de função (GOF do inglês *gain-of-function*) e as mutações com perda de função (LOF do inglês *loss-of-function*). Dado o papel desempenhado pela PCSK9, mutações com GOF neste gene resultam na sua sobre-expressão, levando a uma maior inativação de RLDL e, por conseguinte, maiores níveis circulantes de C-LDL. Por outro lado, mutações com LOF deste gene resultam em níveis mais baixos de C-LDL (Giugliano *et al.*, 2015). Na verdade, as mutações GOF são mais raras e responsáveis por FH (Akram *et al.*, 2010), enquanto que as mutações LOF são mais comuns, provocando uma diminuição significativa do C-LDL e diminuindo assim a probabilidade de formação de placas ateroscleróticas (Bell *et al.*, 2012).



**Figura 4 – Mutações GOF e LOF da PCSK9 que influenciam as concentrações plasmáticas de C-LDL.** A PCSK9 está representada no centro e as posições e substituições de aminoácidos chave das mutações associadas com níveis elevados/baixos de C-LDL estão indicados. A cor indica a origem da mutação: França (azul), Grã-Bretanha (laranja), Canadá (verde), Noruega (vermelho), Itália (vermelho escuro), Japão (roxo), Nova Zelândia (verde escuro) e Portugal (azul claro) (Davignon *et al.*, 2010).

Em 2005, Cohen e Cols. através do estudo Risco de Aterosclerose em Comunidades (ARIC) descreveram a influência da perda da função de PCSK9 em indivíduos afro-americanos e caucasianos. Verificou-se que a prevalência desta mutação era 2,6% e como consequência inerente à mesma, os níveis séricos de C-LDL foram 28% inferiores aos indivíduos sem qualquer mutação no gene. Os riscos cardiovasculares dos indivíduos com essa mutação, tais como enfarte do miocárdio foram igualmente mais baixos (Akram *et al.*, 2010; Corral, 2014). Até à data, conhecem-se mais de 50 mutações em aminoácidos da PCSK9, as quais influenciam os valores de colesterol do organismo do indivíduo mutado (Figura 4) (Davignon *et al.*, 2010). Na tabela I verificamos, por exemplo, a mutação ganho de função D374Y-PCSK9 a qual está na origem de FH com um fenótipo extremamente severo (C-LDL = 350 md/dL) e difícil de tratar com estatinas, sendo os seus portadores afetados 10 anos mais cedo do que os restantes indivíduos com FH, por doenças cardíacas coronárias prematuras (Akram *et al.*, 2010). Este facto foi explicado com experiências que indicaram que a mutação D374Y GOF tem uma potência 6 vezes maior na ligação ao recetor de LDL (Banerjee *et al.*, 2016).

**Tabela I** – Concentrações médias de C-LDL em doentes com mutações GOF e LOF na PCSK9 (McKenney, 2015).

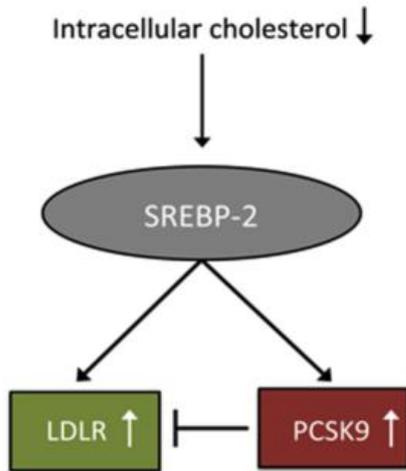
Gain-of-function mutations		Loss-of-function mutations	
Mutation	Mean LDL-C (mg/dL)	Mutation	Mean LDL-C (mg/dL)
Control	105	Control	105
D35Y	249	R46L	88
L108R	266	R97	56
S127R	287	G105R	89
F216L	227	Y124X	53
R218S	216	C679X	68
D374Y	350		

LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

#### 6.4. Fatores que influenciam os teores plasmáticos de PCSK9

Tendo em conta vários estudos realizados, verificou-se que os níveis plasmáticos de PCSK9 sofrem algumas variações interindividuais. Deste modo, conclui-se que os níveis mais elevados são relatados em pessoas com idade avançada, do sexo feminino, estado pós-menopausa, maiores IMC, níveis elevados de C-LDL, níveis elevados de TG e jejum podendo, desta forma, estes valores sofrerem alguma variação ao longo do dia. Na verdade, os níveis plasmáticos de PCSK9 devem ser medidos, de manhã após um jejum noturno, para que se possam efetuar comparações entre indivíduos. Após uma refeição, a quantidade de colesterol intracelular aumenta, não havendo necessidade de entrada de mais colesterol para o interior da célula. Assim sendo, não há síntese de RLDL e, por consequência, de PCSK9, atingindo estes valores mínimos. Contudo, um indivíduo em jejum apresenta uma menor quantidade de colesterol intracelular. Assim, torna-se essencial a sua captação a qual será efetuada através de um recetor LDL sintetizado através do SREBP-2. Contudo, juntamente com a síntese dos RLDL

ocorre a síntese da PCSK9, aumentando esta também após um período longo de jejum (Banerjee *et al.*, 2016; McKenney, 2015).



**Figura 5 – Mecanismo de expressão de LDLR e PCSK9.** Quando ocorre uma diminuição dos níveis de colesterol intracelular, a SREBP-2 é ativada aumentando os níveis de LDLR (LDLR) e a PCSK9. Contudo, esta liga-se aos receptores de LDL levando à sua destruição (Urban *et al.*, 2013).

As estatinas têm como mecanismo de ação a inibição da HMG CoA redutase, podendo ser vistas como um dos fatores que influencia as concentrações séricas de PCSK9. Devido à diminuição do colesterol endógeno, as estatinas provocam um aumento da SREBP-2. Este, tal como já foi referido, é responsável pela ativação quer do LDLR, quer da PCSK9, sendo que este último, aumenta a degradação do LDLR hepático, prevenindo assim a absorção excessiva de colesterol atenuando o efeito hipolipemiante destes fármacos (Urban *et al.*, 2013) (Figura 5).

Como exemplos, estudos têm demonstrado que a toma de 40 mg de Atorvastatina por dia implica um aumento significativo de 34% nos níveis de PCSK9, 80 mg de Atorvastatina um aumento de 47% e 20 mg de Rosuvastatina um aumento de 28% em homens e de 35% em mulheres (Guo *et al.*, 2014; McKenney, 2015).

### 6.5. Impacto da PCSK9 na Aterosclerose

Como já foi referido, mutações no gene da PCSK9 podem causar FH, através da destruição dos LDLR e estudos recentes demonstraram também que essas mutações estão associadas a um risco elevado de doença aterosclerótica (Guo *et al.*, 2014). Além disso, estudos experimentais sugerem que a PCSK9 está diretamente relacionada com processos inflamatórios. Assim, a concentração de PCSK9 no sangue pode ser relacionada linearmente associada com a formação e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas, independentemente do uso de estatinas e da concentração plasmática de LDL. Estes fatos transformam a PCSK9 num alvo terapêutico interessantíssimo. Primeiro, porque esta enzima influencia as concentrações de LDL sanguíneo (o que contribui para o agravamento do processo aterosclerótico) e segundo, porque intervém, de forma independente, no processo inflamatório da aterosclerose. Tal como já atrás explanado, a lesão aterosclerótica não é só um processo obstrutivo, é um processo ativo, inflamatório e imunológico (Fak *et al.*, 2015; Silva, 2015). Assim sendo, a PCSK9 apresenta-se como um interveniente que agrava esse processo inflamatório degradando os receptores não só das LDL, como também das VLDL (RVLDL), o que implica a sua acumulação no plasma e o agravamento da situação (Xie *et al.*,

2016). Por outro lado, aquando da utilização de estratégias para inibição de PCSK9, verificou-se uma melhoria e mesmo a regressão da placa aterosclerótica formada. Esta observação veio dar força ao conceito de que a PCSK9 desempenha um papel direto na aterosclerose (Cheng *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Robinson, Heistad *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).

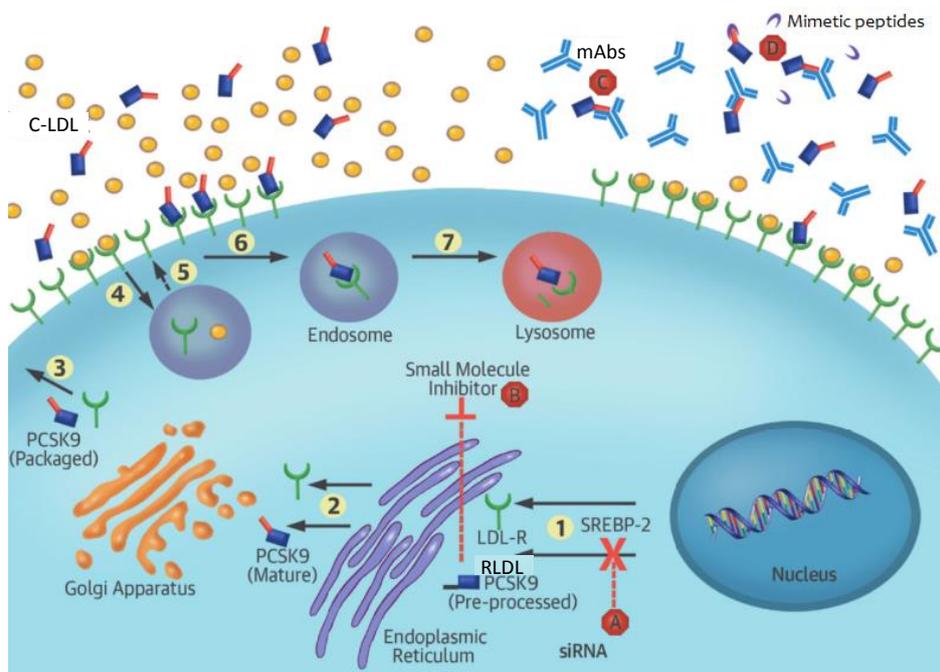
Uma elevada expressão de PCSK9 está, igualmente, associada a uma maior apoptose celular (na presença de PCSK9, a razão Bcl-2 (anti-apoptótico) / Bax (pro-apoptótico) é diminuída favorecendo a morte celular) (McKenney, 2015).

Uma última conclusão relevante relaciona-se com o efeito da PCSK9 na hipertensão, considerada um dos fatores relevantes que contribuem para a progressão da aterosclerose. A PCSK9 intervém na pressão arterial através da diminuição da expressão dos canais de sódio epiteliais o que pode, eventualmente, desregular os níveis de sódio no sangue e levar a hipertensão arterial (McKenney, 2015).

Por todas estas razões, a PCSK9 é encarada como um alvo terapêutico extremamente desafiador. Na verdade, existe um grande número de indivíduos com hipercolesterolemia e aterosclerose que não conseguem alcançar os teores plasmáticos de C-LDL pretendidos com qualquer das terapêuticas já existentes (exemplo: estatinas). Este fato pode ser explicado, muitas vezes, pelo uso de doses inadequadas, pelos efeitos adversos inerentes à terapêutica, pela resistência aos fármacos e pela baixa adesão à terapêutica (muitas vezes relacionada com a ausência de sintomatologia associada à patologia). Assim, emergiu uma grande necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas mais eficazes e inovadoras, tal como os inibidores da PCSK9 que serão abaixo indicados (Urban *et al.*, 2013).

### **6.6. Terapêuticas de Inibição da PCSK9**

O objetivo destas terapêuticas passa pelo bloqueio da síntese da PCSK9 (a nível intracelular) ou pela inibição desta enzima (a nível extracelular) com o conseqüente aumento de LDL. Deste modo, várias alternativas têm surgido (Figura 6): pequenos interferentes de ácido ribonucleico (siRNA), oligonucleótidos *antisense* (ASO) e pequenos inibidores moleculares, cujas funções passam pela inibição intracelular bloqueando a transcrição de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (mRNA) de PCSK9 ou interrompendo o processamento de PCSK9; péptidos miméticos e anticorpos monoclonais (mAbs), ambos responsáveis pela inibição extracelular do PCSK9. Uma breve descrição destas terapêuticas, resumida na Figura 6, é apresentada de seguida.



**Figura 6 –**  
**Diferentes estratégias de inibição da PCSK9**

**Passo 1:**

Nos hepatócitos a SREBP-2 regula a transcrição de diversos lípidos e proteínas, incluindo o R-LDL e a PCSK9.

**Passo 2:** a PCSK9 é processada no retículo endoplasmático para uma forma madura.

**Passo 3:** a PCSK9 passa posteriormente pelo complexo de Golgi antes de ser segregada.

**Passo 4:** o RLDL liga LDL, sem haver ligação ao PCSK9, sendo este complexo internalizado

em endossomas. **Passo 5:** o RLDL é reciclado para a superfície da célula. **Passo 6:** a PCSK9 regula o número de RLDL, através da sua ligação a estes recetores, que impede a sua reciclagem à superfície da célula. **Passo 7:** a PCSK9 ligada a estes recetores acompanha-os na sua destruição no lisossoma impedindo a sua reciclagem. Várias estratégias para interferir com a função de PCSK9 são evidenciadas pelas letras dentro dos octógonos vermelhos: pequenos interferentes de RNA (siRNAs) (A) podem bloquear a transcrição do RNA mensageiro da PCSK9, enquanto que pequenos inibidores moleculares (B) podem interromper o processamento de PCSK9, levando à diminuição da PCSK9 funcional; outras duas abordagens estão relacionadas com a inibição da função extracelular do PCSK9, incluindo anticorpos monoclonais anti-PCSK9 (mAbs) (C) e (D) péptidos miméticos que impedem a ligação da PCSK9 com o RLDL. (Adaptado de Giugliano e Sabatine, 2015).

Até à data, os anticorpos monoclonais são a estratégia que tem apresentado mais sucesso na inibição da PCSK9 (Ahn e Choi, 2015) (Tabela 2).

**Tabela 2 –** Abordagens terapêuticas inibidoras da PCSK9 aprovadas e em desenvolvimento para o tratamento de hiperlipidemia (Banerjee *et al.*, 2016).

Drug/Drug-lead	Agent	Indication	Current phase	Sponsor/Sponsors
Alirocumab	Fully Humanized monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Approved	Sanofi/Regeneron
Evolocumab	Fully Humanized monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Approved	Amgen
Bococizumab	Humanized monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Phase-III	Pfizer
LGT-209	Monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Phase- II	Novartis
LY3015014	Monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Phase- II	Eli Lilly
1D05-Ig2	Monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Phase- II	Merck
1B20	Monoclonal Ab	Hypercholesterolemia	Phase- II	Merck
SX-PCK9	Peptide-mimetic inhibitor binding to the EGfA domain of PCSK9	Hypercholesterolemia	Preclinical	Serometrix/Schering-Plough
BMS-962476	Fusion protein employing Adnectin technology	Cardiovascular disease	Preclinical	Bristol-Myers Squibb
ISIS 394814	Antisense Oligonucleotide (ASO)	Hypercholesterolemia	Preclinical	IONIS Pharmaceuticals/Santaris Pharmaceuticals
ALN-PCS02	si-RNA Oligonucleotide	Hypercholesterolemia	Preclinical	Anylam Pharmaceuticals
TBD	CRISPR-CAS9 gene-editing strategy to correct aberrant PCSK9 gene sequence	Hypercholesterolemia	Preclinical	United States National Institute of Health
PCSK9 vaccine	Generation of long-lasting PCSK9-specific antibodies	Hypercholesterolemia	Preclinical	AFFIRIS/Pfizer
TBD	Small Molecules inhibiting PCSK9-LDL receptor interaction	Hypercholesterolemia	Preclinical	Shifa Biomedical

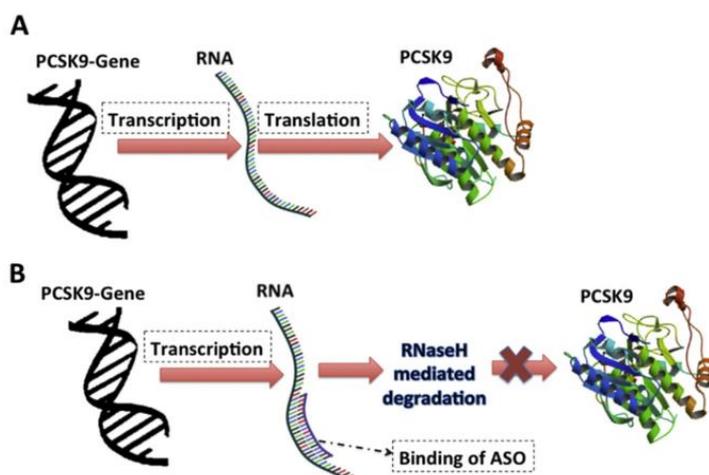
**Péptidos miméticos**

Um péptido mimético (Figura 6 – D), tal como o próprio nome indica, tem como objetivo mimetizar a interação entre o domínio do RLDL e do PCSK9. Assim sendo, impedirá a ligação

da PCSK9 ao LDL prevenindo a sua degradação o que culminará numa maior captação de LDL e diminuição da concentração sérica de C-LDL. (Akram *et al.*, 2010). Os péptidos miméticos são concebidos como inibidores competitivos que mimetizam o domínio de ligação EGF-A dos LDL que interage com a PCSK9 (Urban *et al.*, 2013).

#### Pequenas moléculas inibidoras

Outra estratégia promissora passa pelas pequenas moléculas inibidoras (Figura 6 – B) ainda em desenvolvimento e que poderão ser administradas por via oral. Estas encontram-se em fase de estudos pré-clínicos (Tabela 2) e têm demonstrado ser um desafio. Como a estabilidade destas moléculas no plasma é baixa, o desafio passa pela produção de uma molécula potente e ao mesmo tempo estável e que não seja degradada no sistema gastrointestinal (Banerjee *et al.*, 2016). Por outro lado, tem sido complicado desenvolver uma molécula cujo alvo é a interface plana e larga de ligação entre o LDL e a PCSK9. Contudo, é de realçar que dadas as suas reduzidas dimensões, estas moléculas podem ser direcionadas para afetar o PCSK9 quer a nível intracelular – interferindo no processamento/secreção de PCSK9 maduro, quer a nível extracelular – impedindo a ligação entre o LDL e a PCSK9 (Urban *et al.*, 2013).



**Figura 7 – Mecanismo de ação de oligonucleótidos antisense (ASO).** (A) Na ausência de ASO, o gene PCSK9 é transcrito para o mRNA, que, por sua vez, é traduzido na proteína. (B) Os ASO reduzem os níveis de um mRNA alvo, facilitando a sua degradação pela ribonuclease H (RNase H), reduzindo, deste modo, o teor de PCSK9 (Banerjee *et al.*, 2016).

#### Silenciamento de genes

As técnicas para inibir a PCSK9, através do silenciamento de genes, passam pela utilização de oligonucleótidos *antisense* e siRNA (Urban *et al.*, 2013).

Os oligonucleótidos antisense (ASO) podem ser definidos como pequenos análogos de ácidos nucleicos de cadeia simples, que são capazes de se ligar ao mRNA por complementaridade de bases, ocorrendo, deste modo, um processo de hibridação. Assim

impedem a tradução do mRNA. Este impedimento ocorrerá devido à ativação de nucleases celulares (Ribonuclease H-RNase H), que degradam o RNA hibridizado, não se formando a PCSK9 imatura (Figura 7). Estudos demonstraram que em ratos com uma dieta rica em

gorduras, a administração intra-peritoneal de ASO causou uma redução em 90% do mRNA para síntese da PCSK9, reduzindo, por sua vez, em 53% o Ct plasmático graças ao aumento da expressão hepática dos RLDL. Tais factos culminaram na redução em 38% das concentrações séricas de C-LDL (Akram *et al.*, 2010; Liu, 2015; Urban *et al.*, 2013).

Outra técnica passa pelo uso de siRNA (Figura 6 – A), ou seja, pequenas moléculas de cadeia dupla de RNA interferente que também atuam por impedimento do processo pós transcrição (tradução). Assim o mRNA será degradado impossibilitando-se a formação de novas enzimas de PCSK9. Experiências demonstraram que siRNAs, administrados por via intravenosa, tendo como alvo o mRNA PCSK9, são bastante efetivos reduzindo os níveis de C-LDL em 70% em ratos e 50% em primatas; quando administrados em adultos humanos os teores plasmáticos de PCSK9 diminuíram até 70%, levando a um decréscimo do C-LDL até 40% ao longo de uma observação de 30 dias. Este método mostrou também ser da dose dependente (McKenney, 2015).

#### *Vacina contra PCSK9*

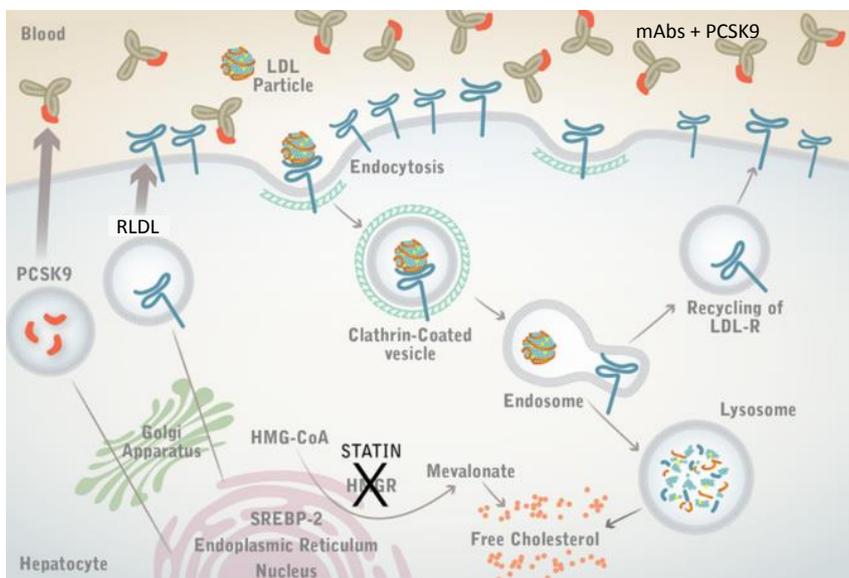
Resumidamente, esta estratégia passa pela estimulação do sistema imunitário para a produção anticorpos de longa duração e de alta afinidade para a PCSK9. Alguns ensaios pré-clínicos realizados demonstraram uma elevada potencialidade com uma redução significativa dos teores plasmáticos de C-LDL após três a quatro vacinações e com uma duração até 10 meses. Estudos referentes a esta estratégia estão a ser realizados pela Pfizer que está a desenvolver uma vacina anti-PCSK9 e cujos ensaios clínicos estão previstos para ter início em 2016 (Banerjee *et al.*, 2016).

#### *Anticorpos monoclonais (mAbs)*

A estratégia mais promissora para inibir a degradação de RLDL mediada por PCSK9 parece ser a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs). Em 2009, o primeiro mAb (Evolocumab) foi administrado por via intravenosa a macacos, tendo-se verificado uma redução em 80% do C-LDL no plasma. Nos anos seguintes, um grande número de outros mAbs começaram a ser desenvolvidos e testados em ratos e primatas (Urban *et al.*, 2013). O mecanismo de ação destes anticorpos monoclonais passa pelo seu reconhecimento dos epítomos da PCSK9 localizados na região do domínio catalítico (domínio que interage com os RLDL). Assim, os anticorpos conseguem ligar-se à PCSK9 impedindo a ligação entre a PCSK9 e os RLDL, permitindo o escape dos RLDL à degradação mediada por esta protease, o que culmina num aumento de RLDL à superfície dos hepatócitos refletido numa e numa diminuição das concentrações séricas de LDL (Banerjee *et al.*, 2016). Esta terapêutica inovadora pode ser utilizada em monoterapia ou combinação com outras terapêuticas já existentes. Estudos

demonstraram que estes anticorpos podem ser utilizados de modo sinérgico com as estatinas no sentido de aumentar a densidade de LDL à superfície dos hepatócitos. Assim, as estatinas atuam a nível do colesterol endógeno, diminuindo a sua síntese enquanto os anticorpos monoclonais inibem a PCSK9 que deixa de se ligar aos LDL, o que leva ao aumento do número destes recetores e ao aumento da captação de LDL para o interior das células (Akram *et al.*, 2010) (Figura 8).

Existem, atualmente, duas estratégias terapêuticas com anticorpos monoclonais aprovadas, atuando como inibidores da PCSK9, em indivíduos



**Figura 8 – Combinação de estatinas com mAbs.** O impacto dos mAbs na relação dinâmica da PCSK9, LDL, e C-LDL em doentes a receber tratamento com estatinas (McKenney, 2015).

com hipercolesterolemia familiar heterozigótica e homozigótica, doença cardíaca aterosclerótica, em indivíduos intolerantes ou que não reagem adequadamente à terapêutica com estatinas, em associação com estas ou com outra classe terapêutica utilizada na redução dos teores plasmáticos de C-LDL. O Evolocumab (AMG 145, nome comercial Rephata<sup>®</sup>) desenvolvido pela Amgen foi o primeiro medicamento a ser aprovado pela Agência Europeia do medicamento (EMA) em Julho de 2015 e pela *Food and Drug Administration* (FDA) um mês depois (Tabela 2). O Alirocumab (SAR236553 / REGN727) (nome comercial Praluent<sup>®</sup>) desenvolvido pela Regeneron e Sanofi foi o primeiro medicamento a ser aprovado pela FDA em julho de 2015 tendo sido posteriormente aprovado (Setembro de 2015) a ser utilizado na União Europeia (EU) pela EMA. Mais recentemente, surgiu o Bococizumab (RN316), um anticorpo humanizado (cujos locais de ligação do antigénio são de origem animal) contra PCSK9 que ainda está em fase de desenvolvimento (fase III) pela Pfizer (Banerjee *et al.*, 2016).

Assim, podemos destacar dois tipos mAbs totalmente humanos (Alirocumab e Evolocumab) e um terceiro, um anticorpo humanizado (Bococizumab) (McKenney, 2015). Para além destes, outros anticorpos monoclonais encontram-se em desenvolvimento por grandes indústrias farmacêuticas, tais como: LGT-209 (fase- II) pela Novartis; LY3015014 (fase- II) pela Eli Lilly; ID05-Ig2 e IB20 (ambos em fase- II), pela Merck (Banerjee *et al.*, 2016) (Tabela 2).

Segue-se uma breve descrição da farmacocinética destes anticorpos e das principais características dos dois anticorpos anti-PCSK9 já aprovados e comercializados.

- Características Farmacocinéticas e Farmacodinâmicas dos anticorpos anti-PCSK9

A maioria dos anticorpos disponíveis no mercado são administrados pelas vias intravenosa, subcutânea (SC), ou intramuscular (IM) Após administração, a absorção sistémica ocorre através da circulação linfática e por difusão destes anticorpos para os vasos sanguíneos na proximidade do local de administração. A absorção do fármaco é relativamente lenta, atingindo-se o pico de concentração máxima dos anticorpos no sangue passados 2 a 8 dias, com uma biodisponibilidade absoluta que varia entre 50 a 100%, dependendo do catabolismo pré-sistémico e absorção sistémica. Contrariamente aos fármacos constituídos por pequenas moléculas, que geralmente são eliminados pela via renal ou hepática, os mAbs são eliminados por diferentes mecanismos, sendo provável que sigam as vias de eliminação das imunoglobulinas, resultando na degradação em pequenos péptidos e aminoácidos individuais. O tempo de semivida médio dos mAbs para a PCSK9 tem sido reportado como 2,5-3 dias e a eliminação do complexo PCSK9-mAbs parece ser mediada por um mecanismo similar à degradação dos RLDL aquando da sua ligação com a PCSK9 (via endossoma / lisossoma). Assim, os anticorpos podem ser manipulados para escapar a esta degradação prolongando o tempo de semivida para 6 dias, aumentando assim a duração do efeito hipolipemiante. No entanto, estes dados requerem ainda uma melhor clarificação (Giunzioni e Tavori, 2015).

- Evolocumab (Repatha<sup>®</sup>) e Alirocumab (Praluent<sup>®</sup>)

O Alirocumab e o Evolocumab são indicados como terapêuticas farmacológicas adjuvantes às medidas não farmacológicas como a dieta. Podem ser associados à utilização de estatinas mesmo quando usadas na dose máxima tolerada. São utilizados para o tratamento da FH ou DCV nas quais é necessária uma diminuição ainda maior do nível de C-LDL. Ambos os fármacos atuam inibindo a ligação da PCSK9 aos RLDL, com o aumento dos RLDL e maior “clearance” de LDL.

O Praluent<sup>®</sup> apresenta-se numa dose única em canetas pré-cheias e cada embalagem contém 1 ou 2 canetas pré-cheias. Cada uma destas tem 1 mL deste composto numa concentração de 75 mg/mL ou 150 mg/ml. Já o Repatha<sup>®</sup> apresenta-se em seringas pré-cheias ou dispositivo auto-injector com 1 ml com uma concentração de 140 mg/ml. A dose recomendada para iniciar o Praluent<sup>®</sup> passa pela administração subcutânea de 75 mg de duas em duas semanas. Caso os teores de C-LDL pretendidos não sejam alcançados, a dosagem

pode ser aumentada para 150 mg administradas de duas em duas semanas. Quanto à dose recomendada para iniciação do Repatha<sup>®</sup> varia de acordo com as indicações médicas, podendo variar entre 140 mg a cada 2 semanas ou 420 mg uma vez por mês, sendo esta última utilizada nos casos mais graves.

A eficácia de ambos os fármacos encontra-se devidamente demonstrada através de vários estudos realizados. A aprovação do Praluent<sup>®</sup> foi baseada em 5 estudos duplamente cegos, controlados por placebo que envolveram um total de 3499 pacientes (36% com FH e 54% com DCV). Todos os pacientes receberam a dose máxima tolerada de estatinas associadas ou não a outro tipo de terapêuticas. Em todos os ensaios foi verificada uma redução significativa dos teores plasmáticos de C-LDL em 39 a 59%. Por sua vez, a aprovação do Repatha<sup>®</sup> foi baseada em 4 estudos duplamente cegos, controlados por placebo, que envolveram aproximadamente 813 pacientes. Do mesmo modo, todos os pacientes receberam a dose máxima tolerada de estatinas associadas ou não a outro tipo de terapêuticas. Em todos os ensaios foi verificada uma redução satisfatória dos teores de C-LDL em 31 a 61%.

Para ambos os fármacos, as reações adversas mais comuns passaram por nasofaringite, reações no local da injeção, gripe, infeção do trato urinário, diarreia, bronquite, sinusite, etc. Alguns problemas cognitivos e reações de imunogenicidade foram questões preocupantes associadas à segurança destes fármacos. Assim sendo, apesar do Praluent<sup>®</sup> e Repatha<sup>®</sup> terem demonstrado ser extremamente eficazes na redução dos teores de C-LDL, ainda existem poucos dados sobre a evolução dos estados clínicos e sobre a segurança a longo prazo destes fármacos. Atualmente, encontram-se a decorrer estudos que procuram dar resposta a estas preocupações (Amgen, 2016; Giugliano *et al.*, 2015; Giunzioni *et al.*, 2015; Puri *et al.*, 2016; Sanofi US and Regeneron Pharmaceuticals, 2016).

## 7. Conclusão

Atualmente, as dislipidémias são um problema de saúde pública com o qual nos devemos preocupar sendo um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas. As estatinas comprovaram ser compostos insuperáveis no seu efeito preventivo e terapêutico das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Contudo, 60 a 70% dos pacientes com eventos cardiovasculares clínicos mantêm, persistentemente, altos teores plasmáticos de C-LDL, mesmo com as doses máximas recomendadas de estatinas (Corral, 2014). Por outro lado, alguns indivíduos demonstram ser intolerantes ou até mesmo não responder a estas terapêuticas. Assim, surgiram os inibidores

da PCSK9, uma enzima que demonstrou ser um novo alvo terapêutico para a diminuição da hipercolesterolemia-LDL e, conseqüentemente, do risco de aterosclerose (Ahn *et al.*, 2015). Contudo, estudos recentes têm demonstrado que a PCSK9 é uma proteína multifuncional, intervindo em vários processos fisiológicos para além do seu papel bem definido no metabolismo das LDL. Estas funções adicionais e independentes, predominantemente extra-hepáticas, podem ser agrupadas em "funções pleiotrópicas" da PCSK9. Assim, existem evidências de que a PCSK9 pode atuar na regulação da pressão arterial, na regeneração hepática, influenciar a integridade pancreática e a homeostase de glicose, ter atividade antiviral e anti malária, intervir no processo de diferenciação de neurónios e regular a apoptose. Algumas destas funções ainda estão em estudo e requerem clarificação (Banerjee *et al.*, 2016). No entanto, a inibição da PCSK9 poderá influenciar, de algum modo, cada uma destas funções, especialmente quando a utilização destes inibidores é realizada a longo prazo. Por outro lado, a hipótese de que PCSK9 está diretamente envolvida nos processos inflamatórios que contribuem para a aterosclerose através de mecanismos independentes da hipercolesterolemia-LDL, fazem destes inibidores fármacos potenciais interessantes para o tratamento da doença aterosclerótica.

Os anticorpos monoclonais são a terapêutica de inibição da PCSK9 mais avançada atualmente, apresentando grande margem de segurança e uma reduzida incidência de efeitos secundários. Esta estratégia trouxe esperança a todos os indivíduos diagnosticados com aterosclerose e que não têm meios, até agora, para a controlar. No entanto, o reverso da medalha passa por questões ainda em aberto e por esclarecer. A segurança a longo prazo dos mAb ainda está por determinar e para além disso, será que níveis demasiado reduzidos de C-LDL acarretarão conseqüências negativas para o organismo? Estas e muitas questões terão que ser ainda esclarecidas num futuro próximo (Cheng *et al.*, 2016). De fato, "a ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez" (George Bernard Shaw).

## 8. Bibliografia

- AHN, C.; CHOI, S. - New drugs for treating dyslipidemia: Beyond statins. **Diabetes and Metabolism Journal**. 39:2 (2015) 87–94. doi: 10.4093/dmj.2015.39.2.87.
- AKRAM, O.; BERNIER, A.; PETRIDES F.; WONG, G.; LAMBERT, G. - Beyond LDL cholesterol, a new role for pcsk9. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 30:7 (2010) 1279–1281. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.209007.
- AMGEN - **Repatha (evolocumab)** [Em linha], atual. 2016. [Consult. 6 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:https://www.repathahcp.com/>.
- BANERJEE, Y.; SANTOS, R.; AL-RASADI, K.; RIZZO, M. - Targeting PCSK9 for therapeutic gains: Have we addressed all the concerns? **Atherosclerosis**. 248:2 (2016) 62–75. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.018.
- BELL, D.; HOOPER, A.; WATTS, G.; BURNETT, J. - Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. **Vascular Health and Risk Management**. 8:1 (2012) 651–659. doi: 10.2147/VHRM.S28581.
- BOURBON, M.; RATO, Q. - Estudo Português de hipercolesterolemia familiar: Apresentação do estudo e resultados preliminares. **Revista Portuguesa de Cardiologia**. 25:11 (2006) 999–1013.
- BURNETT, J. - **Coronary Artery Disease: Lipid Metabolism**. In *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. Kaplan, L.A. and Pesce, A.J., Eds (2010), Mosby, Inc., Elsevier, pp. 691–728.
- CHENG, J.; OEMRAWSINGH, R.; BOERSMA, E. - PCSK9 in relation to coronary plaque inflammation: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. **Atherosclerosis**. 248 (2016) 117–122. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.010.
- CORRAL, P. - Back to basics: PCSK9 as a new target for the LDL receptor. **Arquivos brasileiros de cardiologia**. 102:1 (2014) e5–8. doi: 10.5935/abc.20130248.
- DAVIGNON, J.; DUBUC, G.; SEIDAH, N. - The influence of PCSK9 polymorphisms on serum low-density lipoprotein cholesterol and risk of atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**. 12:5 (2010) 308–315. doi: 10.1007/s11883-010-0123-6.
- DELUCIA, R.; PLANETA, C.; GALLACIA, M. - **FARMACOLOGIA INTEGRADA - Uso Racional de Medicamentos** [Em linha]. 5ª edição ed. São Paulo : [s.n.] Disponível em WWW:<URL:http://www.uc.pt/bcsuc/Documentos/farmacologia2>.
- EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY - Dislipidemia. Portugal. [Em linha]2011) 1–50. Disponível em  
WWW:<URL:http://www.spc.pt/FS/AreaCientifica/recomendacoes/dislipidemias\_v2011.pdf>.
- FAK, F., TREMOROLI, V.; BERGSTON, G.; BACKHED, F. - Oral microbiota in patients with atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 243:2 (2015) 573–578. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.097.
- FUNDAÇÃO PORTUGUESA DE CARDIOLOGIA - **Dislipidemia** [Em linha], atual. 2016.

[Consult. 27 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.fpcardiologia.pt/saude-do-coracao/factores-de-risco/dislipidemia/>>.

- GIUGLIANO, R.; SABATINE, M. - Are PCSK9 Inhibitors the Next Breakthrough in the Cardiovascular Field? **Journal of the American College of Cardiology**. 65:24 (2015) 2638–2651. doi: 10.1016/j.jacc.2015.05.001.

- GIUNZIONI, I.; TAVORI, H. - New developments in atherosclerosis: clinical potential of PCSK9 inhibition. **Vascular health and risk management**. 11 (2015) 493–501. doi: 10.2147/VHRM.S74692.

- GUO, Y.; ZHANG, W.; LI, J. - PCSK9 and lipid lowering drugs. **Clinica Chimica Acta**. 437 (2014) 66–71. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.008.

- GUPTA, S. - LDL Cholesterol, Statins and PCSK 9 Inhibitors. **Indian Heart Journal**. 67:5 (2015) 419–424. doi: 10.1016/j.ihj.2015.05.020.

- KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A. - **BASIC and CLINICAL PHARMACOLOGY**. 12 edition ed. United States : [s.n.]. ISBN 978-0-07-176402-5.

- KOŁODZIEJCZAK, M.; NAVARESE, E. - Role of PCSK9 antibodies in cardiovascular disease: Critical considerations of mortality and neurocognitive findings from the current literature. **Atherosclerosis**. 247 (2016) 189–192. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.011.

- LI, S.; GUO, Y.; XU, R.; ZHANG, Y. - Plasma PCSK9 levels are associated with the severity of coronary stenosis in patients with atherosclerosis. **International journal of cardiology**. 174:3 (2014) 863–4. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.224.

- LIU, M. - Antihyperlipidemic therapies targeting PCSK9: Novel therapeutic agents for lowering low-density lipoprotein cholesterol. **International Journal of Cardiology**. 195 (2015) 212–214. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.150.

- LUSIS, A. - Insight Review Articles. **Nature**. 407:September (2000) 233–241. doi: 10.1038/35025203.

- MARAIS, A.; KIM, J.; WASSERMAN, S.; LAMBERT, G. - PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. **Pharmacology & therapeutics**. 145 (2015) 58–66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.07.004.

- MARQUES DA SILVA, P. - Metabolismo lipídico e diagnóstico das dislipidemias primárias. **Fatores de Risco**. 2015) 10–25.

- MCKENNEY, J. - Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies. **Journal of Clinical Lipidology**. 9:2 (2015) 170–186. doi: 10.1016/j.jacl.2015.01.001.

- MG, G.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. - Fisiopatologia e aspetos inflamatórios da aterosclerose Physiopathology and inflammatory aspects of atherosclerosis. **Scientia Medica**. 2005).

- MSD - **Aterosclerose** [Em linha], atual. 2009. [Consult. 28 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.manuaismsd.pt/?id=52>>.

- NORDESTGAARD, B.; CHAPMAN, M.; HUMPHRIES, E. - Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent

coronary heart disease. (2013) doi: 10.1093/eurheartj/eh273.

- PURI, R.; NISSEN, E. - Impact of PCSK9 inhibition on coronary atheroma progression: Rationale and design of Global Assessment of Plaque Regression with a PCSK9 Antibody as Measured by Intravascular Ultrasound (GLAGOV). **American Heart Journal**. 176 (2016) 83–92. doi: 10.1016/j.ahj.2016.01.019.

- ROBINSON, J.; HEISTAD, D.; FOX, K. - Atherosclerosis stabilization with PCSK-9 inhibition: An evolving concept for cardiovascular prevention. **Atherosclerosis**. 243:2 (2015) 593–597. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.023.

- SANOFI US AND REGENERON PHARMACEUTICALS - **Praluent (alirocumab)** [Em linha], atual. 2016. [Consult. 6 jun. 2016]. Disponível em

WWW:<URL:https://www.praluent.com/>.

- SILVA, P. - **A aterosclerose** [Em linha], atual. 2015. [Consult. 28 mai. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.spaterosclerose.org/spa-nos-media/item/77-a-aterosclerose-in-evitavel.html>.

- STOCK, J. - Improving the care of high-risk patients: The potential of PCSK9. **Atherosclerosis**. 232:2 (2014) 420–422. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.050.

- TAVORI, H.; RASHID, S.; FAZIO, S. - On the function and homeostasis of PCSK9: Reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. **Atherosclerosis**. 238:2 (2015) 264–270. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.017.

- URBAN, D.; POSS, J.; BOHM, M.; LAUFS, U. - Targeting the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**. 62:16 (2013) 1401–1408. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.056.

- WHO - **Relatório Mundial de Saúde - Capítulo 4** [Em linha], atual. 2002. [Consult. 26 mai. 2016]. Disponível em

WWW:<URL:http://www.who.int/whr/2002/chapter4/en/index4.html>.

- **WHO, Cardiovascular diseases (CVDs)** - [Em linha]. [S.l.] : World Health Organization, 2016, atual. 2016. [Consult. 26 mai. 2016]. Disponível em

WWW:<URL:http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.

- XIE, W.; LIU, J.; WANG, M.; QI, Y. - Association between plasma PCSK9 levels and 10-year progression of carotid atherosclerosis beyond LDL-C: A cohort study. **International Journal of Cardiology**. 215 (2016) 293–298. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.04.103.

- ZHANG, Y.; ZHU, C.; XU, R.; LI, J. - Relation of circulating PCSK9 concentration to fibrinogen in patients with stable coronary artery disease. **Journal of Clinical Lipidology**. 8:5 (2014) 494–500. doi: 10.1016/j.jacl.2014.07.001.