



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

HÉLBYA STHEPHANNY DE OLIVEIRA SANTOS

**USO DE INIBIDORES DE PCSK9 COMO NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA
NO TRATAMENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA**

Barreiras – BA

2022

HÉLBYA STHEPHANNY DE OLIVEIRA SANTOS

**USO DE INIBIDORES DE PCSK9 COMO NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA
NO TRATAMENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal do Oeste da Bahia,
como requisito parcial para obtenção do
Diploma de Graduação no Curso de Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato

Barreiras – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Santos, Hélbya Sthephanny de Oliveira.

Uso de inibidores de pcsk9 como nova abordagem terapêutica no tratamento de hipercolesterolemia. / Hélbya Sthephanny de Oliveira Santos – 2022.

76f.

Orientador: Prof. Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Hipercolesterolemia. 2. Doenças cardiovasculares. 3. PCSK9. 4. LDLR I. Lavorato, Stefânia Neiva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 615.10711

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

HÉLBYA STHEPHANNY DE OLIVEIRA SANTOS

**USO DE INIBIDORES DE PCSK9 COMO NOVA ABORDAGEM
TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Graduação no Curso
de Farmácia.

Aprovado em 13 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Stefania Neiva

Lavorato:015352246

14

Assinado de forma digital por

Stefania Neiva

Lavorato:01535224614

Dados: 2022.07.15 13:35:25 -03'00'

Prof.^a Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato
(Orientadora)



Documento assinado digitalmente

PABLINNY MOREIRA GALDINO DE CARVALHO

Data: 13/07/2022 16:08:22-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Pablinny Moreira Galdino de Carvalho
(Membro)

Dr.^a Marcela de Moura Garcia Bini Dutra
(Membro)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre está ao meu lado, sempre me dando forças para superar os momentos difíceis e não me deixar desistir.

A minha orientadora, Prof.^a Stefânia, pela paciência, disposição, apoio, dedicação e pelos ensinamentos durante todo o processo.

Aos meus pais, por todo amor, carinho, apoio e por acreditarem nos meus sonhos.

Aos meus irmãos, especialmente Hércia, pelo amor, apoio, companheirismo e força.

Ao meu companheiro, Leoney, pelo apoio e pela força durante toda a graduação.

Aos meus grandes amigos, Fernando, Uelton e Giovana, pelo companheirismo, apoio, palhaçadas e momentos de alegria compartilhados.

RESUMO

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco associado a doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, as quais representam as principais causas de mortalidade no mundo. As estratégias terapêuticas para o tratamento da hipercolesterolemia centram-se em uso de fármacos como as estatinas, a ezetimiba, e as resinas sequestradoras de ácidos biliares. Todavia, essa abordagem apresenta limitações como intolerância em função dos eventos adversos, baixa adesão e resistência às estatinas. Considerando o impacto das DCV na população e as limitações na farmacoterapia atual, são necessárias estratégias adicionais ou alternativas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo acerca da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) e estratégias para se obter sua inibição, do ponto de vista molecular e clínico, como alvo terapêutico no tratamento de hipercolesterolemia. A pesquisa foi desenvolvida a partir da coleta de artigos ou publicações científicas usando seis bases de dados: SciELO, PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), o Portal de periódicos da CAPES, LILACS e Google Acadêmico. Esta revisão reúne informações estruturais sobre a PCSK9, seu papel no metabolismo do colesterol e seu mecanismo de regulação. Além disso, inclui dados sobre o mecanismo de ação e resultados clínicos referentes aos inibidores de PCSK9 atualmente disponíveis na clínica, bem como um levantamento de substâncias não peptídicas, de origem natural ou sintética, com propriedades moduladoras de PCSK9, que poderiam ser trabalhadas como potenciais candidatos a fármacos, superando as limitações farmacocinéticas e o alto custo dos atuais inibidores desse alvo molecular.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia. Doenças cardiovasculares. PCSK9. LDLR.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is an important risk factor associated with cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, which represent the main cause of mortality worldwide. Therapeutic strategies for the treatment of hypercholesterolemia focus on the use of drugs such as statins, ezetimibe and bile acid sequestrants. However, this approach has limitations such as intolerance of side effects, poor adherence and resistance to statins. Considering the impact of cardiovascular diseases on the population and the limitations of current pharmacotherapy, additional or alternative strategies are needed. Thus, the present work aimed to study the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and strategies to obtain its inhibition, from a molecular and clinical point of view, as a drug target in the treatment of hypercholesterolemia. The research was developed through a search of articles or scientific publications in six databases: SciELO, PubMed, Virtual Health Library (BVS), CAPES Periodic Portal, LILACS and Scholar Google. This review gathers structural information about PCSK9, its role in cholesterol metabolism and its regulatory mechanism. In addition, it includes data on the mechanism of action and clinical results regarding currently available PCSK9 inhibitors, as well as a survey of non-peptide natural or synthetic substances with PCSK9 modulating properties, which could be studied as potential drug candidates, overcoming the pharmacokinetic limitations and high cost of current inhibitors of this drug target.

Key words: Hypercholesterolemia. Cardiovascular diseases. PCSK9. LDLR

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
apo	Apolipoproteínas
AOS	Oligossacarídeo de alginato
BBR	Berberina
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
Cl_{int}	Depuração intrínseca
CV	Cardiovascular
DC	Domínio catalítico
DC₅₀	Concentração de degradação
DCV	Doenças cardiovasculares
DCVA	Doença cardiovascular aterosclerótica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DRCH	Domínio C-terminal
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGF-A	Domínio A de homologia de repetição semelhante a fator de crescimento epidérmico
FOXO3	Forkhead box O3
GCK	Glicoquinase
HeHF	Hipercolesterolemia familiar heterozigótica
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia familiar
HNF-1α	Fator nuclear dos hepatócitos 1 α
HMG-CoAR	Hidroximetilglutaril-coenzima A redutase
HL	Lipase hepática
HoHF	Hipercolesterolemia familiar homozigótica
HLM	Microsomas hepáticos humanos
IC₅₀	Concentração inibitória média
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
IgG1	Imunoglobulina do tipo G1
IgG2	Imunoglobulina do tipo G2

kDa	Quilodalton
LCAT	Lecitina colesterol:aciltransferase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica
LRP	Proteína relacionada a receptor de lipoproteína de baixa densidade
mAbs	Anticorpos monoclonais
NARC-1	Convertase 1 regulada por apoptose neural
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Volume percentual de ateroma
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
Pro	Pró-domínio
RLM	Microsomas hepáticos de ratos
R-IMPP	(<i>R</i>)- <i>N</i> -(isoquinolin-1-il)-3-(4-metoxifenil)- <i>N</i> -(piperidin-3-il)propanamida
SAMS	Sintomas musculares associados às estatinas
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SIRT6	Sirtuína-6
SP	Peptídeo sinal
SREBP-2	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 2
TAV	Volume total do ateroma
Tm	Temperatura de fusão
TRC	Transporte reverso de colesterol
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da lipoproteína.....	8
Figura 2 – As vias metabólicas exógena e endógena das lipoproteínas.....	10
Figura 3 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.....	20
Figura 4 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Inibidores de PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.....	21
Figura 5 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Alirocumabe. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.....	22
Figura 6 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Evolocumabe. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.....	23
Figura 7 – Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para pequenas moléculas inibidores de PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.....	24
Figura 8 – Organização e estrutura proteica da PCSK9. A) Representação dos domínios da PCSK9 que consistem em um peptídeo sinal (SP) (aminoácidos 1-30), um pró-domínio (Pro) (aminoácidos 31-152), um domínio catalítico (aminoácidos 153-452) e um domínio C-terminal (aminoácidos 453-692). VFAQ152SIP (laranja) representa a sequência de reconhecimento de clivagem B) Representação tridimensional da estrutura cristalográfica da PCSK9 (PDB ID 3BPS), com destaque para o pró-domínio (Pro) (fitas em cinza); o domínio catalítico (DC) (fitas em lilás), no qual se encontra a tríade catalítica (bastões amarelos); e domínio C-terminal (DRCH) (fitas em ciano) da PCSK9, complexada com o domínio EGF-A do receptor de LDL (LDLR) (verde). O íon cálcio é mostrado como uma esfera vermelha	26
Figura 9 – Tríade catalítica formada pelos resíduos de Asp ₁₈₆ , His ₂₂₆ e Ser ₃₈₆	27

Figura 10 – Representação da interação entre o LDLR e a PCSK9. O LDLR interage com o domínio catalítico da PCSK9 por meio de seu domínio EGF-A e com o pró-domínio desta por meio do seu domínio propulsor β . Os outros domínios em LDLR incluem o domínio C-terminal (domínio de ligação do ligante), domínios EGF-B e C, domínio O-glicosilado e domínio transmembrana (TM)	28
Figura 11 – Visão esquemática do papel da PCK9 no metabolismo do colesterol..	29
Figura 12 – Representação do mecanismo de regulação da PCSK9 através do SREPB-2	30
Figura 13 – Mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais.....	31
Figura 14 – Estrutura química do produto natural Berberina.....	37
Figura 15 – Estrutura química do produto natural Polidatina.....	38
Figura 16 – Estrutura química do produto natural Tanshinona IIA.....	38
Figura 17 – Estrutura química do produto natural Moracina C.....	39
Figura 18 – Estruturas químicas dos produtos naturais Esparosídeo A, hanabiratakeli A, Adenosina, e 5 α ,6 α -epoxi-(22E,24R)-ergosta8(14), 22-dieno-3 β ,7 β -diol.....	40
Figura 19 – Estruturas químicas dos produtos naturais Manglisina E, Esquisandrina C, Schinlignan D e Schisandrol B.....	41
Figura 20 – Estrutura química do produto natural Sauchinona	41
Figura 21 – Estrutura química do produto natural Eribraedina D.....	42
Figura 22 – Estrutura química do produto natural Pinostrobin.....	42
Figura 23 – Estruturas químicas dos produtos naturais Alicina, Mimosina, Swertiamarina e Forscolina.....	43
Figura 24 – Estruturas químicas dos produtos de origem marinha oligossacarídeo de alginato e fucoidan.....	44
Figura 25 – Estrutura química do composto R-IMPP ((R)-N-(isoquinolin-1-il)-3-(4-metoxifenil)-N-(piperidin-3-il)propanamida).....	45

Figura 26. Estratégia de planejamento de novos compostos a partir do nilotinibe e composto <i>hit</i> 3f.....	48
Figura 27 – Estrutura do inibidor alostérico de PCSK9 1 , identificado por estudos de espectrometria de massas/seleção por afinidade.....	50
Figura 28 – Estrutura do composto 16 (A) e sua forma de interação com o complexo PCSK9-LDLR (B) (PDB ID: 6U26). O domínio catalítico da PCSK9 está representado em fitas em lilás, os resíduos Arg ₄₇₆ , Arg ₄₅₈ , Arg ₃₅₇ e Asp ₃₆₀ na forma de bastões amarelos e domínio C-terminal (DRCH) como fitas em ciano.....	53
Figura 29 – Estrutura do composto sintético CB_36.....	53
Figura 30 – Estrutura do composto natural (S)-canadina.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS

β	beta
®	Marca registrada
α	Alfa
Δ	Delta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores referenciais e de alvo terapêutico do perfil lipídico para adultos com mais de 20 anos.....	13
Tabela 2 – Potência e propriedades dos análogos de R-IMPP.....	46
Tabela 3 – Dados de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) para os compostos 2 a 7.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
2.1 LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS	8
2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA	11
2.3 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS	13
2.3.1 Tratamento da hipercolesterolemia	13
2.3.1.1 Estatinas	14
2.3.1.1.1 <i>Limitações das Estatinas</i>	14
2.3.1.2 Resinas sequestradoras de ácidos biliares	15
2.3.1.3 Inibidor da absorção de colesterol	16
2.4 NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS: PCSK9	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 METODOLOGIA	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PCSK9	25
5.2 REGULAÇÃO DA PCSK9	29
5.3 INIBIDORES DE PCSK9	30
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas como a principal causa de mortalidade no mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 17,9 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2019, o que representa cerca de 32% de todas as mortes a nível mundial. Desses óbitos, 85% são atribuídos às ocorrências de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral e 75% ocorreram em países de baixa e média renda (OMS, 2017).

A hipercolesterolemia é um quadro clínico que se caracteriza pelo elevado nível de colesterol plasmático, sendo considerado um importante problema de saúde pública. Essa condição está associada ao aumento significativo do risco de desenvolvimento de DCV, ao contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose (BUNNOY et al., 2015). A aterosclerose se caracteriza pelo acúmulo de lipídeos, particularmente o colesterol, dentro das paredes dos vasos sanguíneos, ocasionando a formação de placas ateroscleróticas. Com isso, ocorre o estreitamento das artérias, obstruindo o fluxo sanguíneo para os tecidos, o que reduz o acesso dos tecidos a oxigênio e nutrientes (MELENDEZ et al., 2017).

Em relação ao atual manejo da hipercolesterolemia, as estatinas são os fármacos mais eficazes na redução do colesterol e na proteção de eventos cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (HAJAR, 2019). No entanto, o tratamento apresenta limitações, como a intolerância em função dos eventos adversos, falha na adesão, e resistência como no caso de alguns pacientes em que as estatinas não são suficientes para que os níveis ideais de lipoproteína de baixa densidade (LDL) sejam atingidos, o que implica em resultados insatisfatórios (KARR, 2017).

Considerando o grande impacto das DCV na população e as limitações na farmacoterapia atual, são necessárias estratégias adicionais ou alternativas para redução do LDL e, conseqüentemente, redução dos riscos cardiovasculares. Nesse sentido, torna-se interessante o estudo acerca da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) e as estratégias para sua inibição como uma abordagem adicional ao tratamento da hipercolesterolemia, sendo esse um mecanismo de ação de agentes hipocolesterolemiantes ainda pouco conhecido e com grandes possibilidades a ser explorado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LIPÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS

Os lipídeos são um grupo de compostos heterogêneos, insolúveis em água, entretanto solúveis em solventes orgânicos (FAHY et al., 2011). Do ponto de vista da clínica, os lipídeos plasmáticos de maior importância são os triglicerídeos e o colesterol (HEGELE, 2009).

Os triglicerídeos constituem a principal forma de armazenamento de energia (EVANS; HAUTON, 2016). O colesterol é um componente estrutural das membranas, precursor de hormônios esteroides e ácido biliares. Além disso, é também componente significativo do tecido nervoso, especificamente da mielina que reveste os nervos (ZÁRATE et al., 2016).

Por apresentarem baixa hidrossolubilidade, os lipídeos se deslocam pelo nosso organismo na forma de lipoproteínas. Essas moléculas são estruturas complexas, que possuem um cerne constituído de lipídeos hidrofóbicos como os triglicerídeos e ésteres de colesterol revestido por uma camada de fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas específicas denominadas apoproteínas (**Figura 1**) (RENSEN et al., 2001; SÁNCHEZ; GUILLÉN, 2004;).

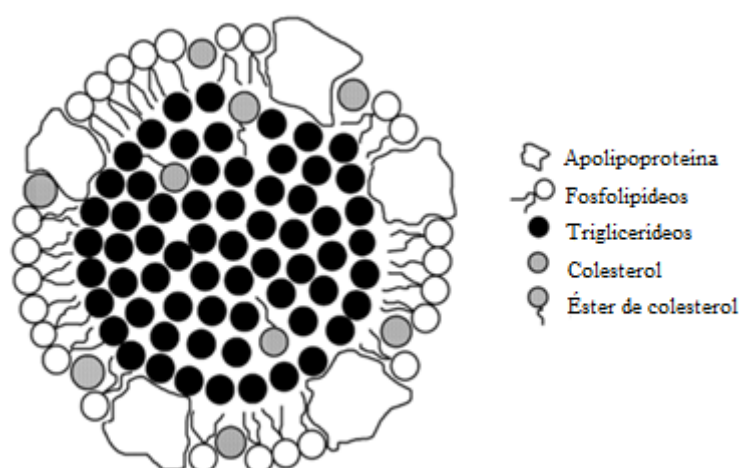


Figura 1. Representação esquemática da lipoproteína (Adaptado de Rensen et al., 2001).

As apolipoproteínas ou apoproteínas (apos) são responsáveis por estabilizar a estrutura das lipoproteínas, podendo também atuar como ligantes de receptores

de lipoproteínas ou como co-fatores para atividades enzimáticas no plasma (COHEN; ARMSTRONG, 2009).

As lipoproteínas plasmáticas podem ser classificadas de acordo com sua densidade relativa em: quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (*Intermediate Density Lipoprotein*, IDL), lipoproteínas de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*, LDL) e lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoprotein*, HDL) (RADER; HOBBS, 2017).

O metabolismo das lipoproteínas ocorre, sobretudo, por duas vias: a via exógena, que engloba a absorção e o transporte das gorduras dietéticas ao fígado e aos tecidos; e a via endógena, que compreende o transporte e o metabolismo das VLDL originadas no hepatócito (**Figura 2**). Existe também uma terceira via que abrange o transporte reverso do colesterol e o metabolismo das HDL (SILVA, 2015).

Na via exógena, os triglicerídeos e o colesterol provenientes da dieta são absorvidos pelas células intestinais e montados em quilomícrons contendo apoB-48. Estes quilomícrons são secretados na linfa e alcançam a circulação sistêmica. Os triglicerídeos dos quilomícrons são hidrolisados pela lipase lipoproteica (LPL), o que resulta na liberação de ácidos graxos que são capturados por miócitos e adipócitos. Por ação da enzima LPL, formam-se os quilomícrons remanescentes, que são ricos em colesterol. A remoção dos remanescentes de quilomícrons do plasma ocorre por meio de captação hepática via receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) e proteína relacionada a receptor lipoproteína de baixa densidade (LRP), que é dependente da expressão de apoE (ROTHER; COLLARD, 2001).

Na via endógena, o colesterol, principalmente na forma de éster de colesterol e os triglicerídeos são montados no fígado com adição de apolipoproteínas B100, CII, CIII e E, e secretados como partículas de VLDL. Os triglicerídeos das VLDL são hidrolisados pela LPL no capilar endotelial em tecidos extra-hepáticos do corpo, tendo como cofator a apo CII. Os ácidos graxos liberados podem ser armazenados no tecido adiposo ou oxidados nos músculos para obtenção de energia. Os remanescentes de VLDL transformam-se em IDL, sendo algumas captadas pelo receptor LDLR e LRP, o que requer o reconhecimento da apoE, e o restante convertido em LDL. A remoção do LDL ocorre via receptor LDLR por meio do reconhecimento da apo B100 (BRESLOW, 2000). Na **Figura 2**, apresentam-se as vias metabólicas das lipoproteínas.

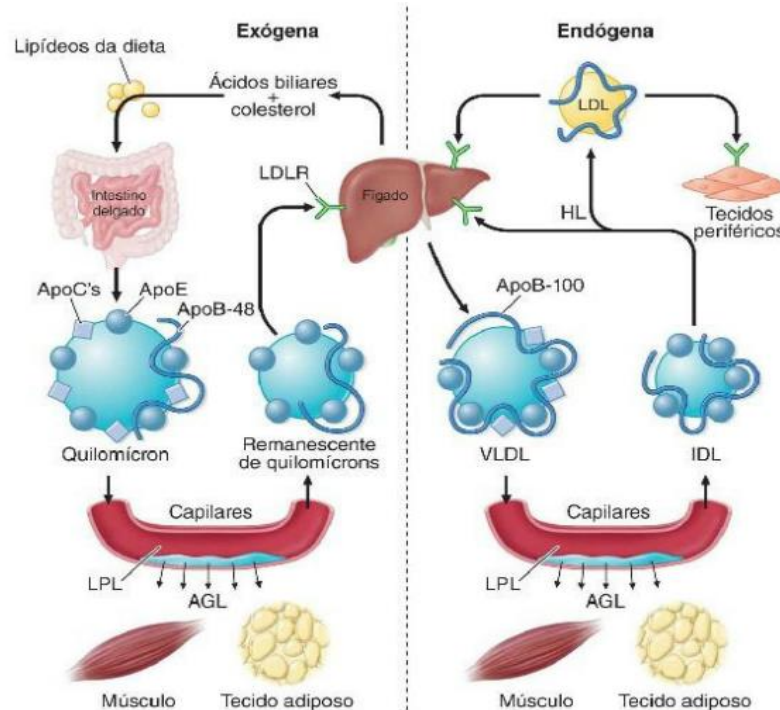


Figura 2. As vias metabólicas exógena e endógena das lipoproteínas. AGL, ácidos graxos livres; Apo, apolipoproteína; HL, lipase hepática; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de baixa densidade; LDLR, receptor de lipoproteína de baixa densidade; LPL, lipase lipoproteica; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa (adaptada de Rader e Hobbs, 2017).

O transporte reverso de colesterol (TRC) é a via pela qual ocorre o transporte do colesterol de células extra-hepáticas para o fígado e, possivelmente, intestino para excreção. O componente-chave do TRC é a lipoproteína de alta densidade (HDL), a qual possui como principal a apolipoproteína A-I (apoA-I). O processo de TRC ocorre em cinco etapas: 1) captação do colesterol das células por partículas aceptoras; 2) esterificação de colesterol dentro da HDL por ação da enzima lecitina colesterol: aciltransferase (LCAT); 3) transferência de colesterol para as lipoproteínas que contêm apolipoproteína B (apoB); 4) remodelagem de HDL; e 5) captação de colesterol HDL pelo fígado e também possivelmente pelo rim e intestino delgado por meio de receptores celulares de lipoproteína (SVIRIDOV; NESTEL, 2002).

2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA

As dislipidemias são alterações metabólicas que advêm em resposta a distúrbios nas concentrações lipídicas, as quais podem ser classificadas em hiperlipidemias, situação em que ocorre elevação dos níveis de lipoproteínas ou hipolipidemias, situação em que ocorrem baixos níveis plasmáticos de lipoproteínas (ESTÉBANEZ, 2019).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (Faludi et al., 2017), considerando dados laboratoriais, as dislipidemias podem ser classificadas de acordo com a fração lipídica alterada em:

- a) Hipercolesterolemia isolada: apresenta concentração elevada apenas de LDL (≥ 160 mg/dL);
- b) Hipertrigliceridemia isolada: apresenta concentração elevada apenas de triglicerídeos (≥ 150 mg/dL) que incide no aumento do número e/ou do volume de partículas ricas em triglicerídeos, como VLDL, IDL e quilomícrons.
- c) Hiperlipidemia mista: corresponde a valores aumentados de LDL (≥ 160 mg/dL) e triglicerídeos (≥ 150 mg/dL).
- d) HDL baixo: redução da concentração de HDL (homens: < 40 mg/dL; mulheres: < 50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL ou de triglicerídeos.

Etiologicamente, as hipercolesterolemias podem ser classificadas como primárias ou secundárias. As hipercolesterolemias primárias são aquelas que ocorrem devido a defeitos genéticos (SMIT; DIAMANT 2004). Enquanto que as hipercolesterolemias secundárias são aquelas decorrentes de doenças como hipotireoidismo e diabetes mellitus, de estilo de vida inadequado como o consumo de álcool e de medicamentos como contraceptivos orais, diuréticos tiazídicos e glicocorticóide (AGUAR et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2012).

A hipercolesterolemia primária pode ser de origem monogênica, em que a causa é inteiramente genética, ou de origem poligênica. A hipercolesterolemia poligênica é caracterizada por ser resultante da interação de fatores genéticos e nutricionais, como obesidade e dieta rica em gorduras (BHATNAGAR et al., 2008; BAUMANN; JAMESON, 2013).

Hipercolesterolemia familiar (HF) é o principal distúrbio de origem monogênica, que ocorre devido a mutações no gene LDLR (mais de 90% dos

casos), no gene APOB (3-4% dos casos) e no gene PCSK9 (1% dos casos) (RUIZ, 2017).

A HF é transmitida de forma autossômica dominante e pode se manifestar na forma homozigótica (HoHF) ou heterozigótica (HeHF). O indivíduo homozigótico apresenta níveis extremamente elevados de LDL, além de sinais clínicos como depósitos de colesterol na pele, córnea e tendões. Por outro lado, o indivíduo heterozigótico apresenta níveis plasmáticos de LDL mais baixo que a HoHF, sendo que geralmente não excede 190 mg/dL e os sinais clínicos são menos comuns (MERCHÁN et al., 2016).

A prevalência da forma homozigótica é de 1/1.000.000, sendo considerada doença muito rara. Nesses casos, ocorre o desenvolvimento de doenças como a aterosclerose no início da vida e mesmo que inicie tratamentos agressivos, os níveis de LDL ainda se mantêm elevados, ocasionando a morte por doenças cardíacas antes dos 30 anos de idade. Com a relação à forma heterozigótica, a prevalência é de 1/500 indivíduos, sendo um distúrbio muito mais comum. Além disso, apresentam alto risco de doenças cardíacas isquêmicas entre 30 e 50 anos, apesar de muitos usufruírem de uma vida normal (MATÍAS-PÉREZ et al., 2015).

Os valores de referência e de alvo terapêutico dos lipídeos para indivíduos com mais de vinte anos de idade conforme a Atualização da Diretriz Brasileira sobre Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (2017), estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores referenciais e de alvo terapêutico do perfil lipídico para adultos com mais de 20 anos

Lípidios	Com jejum (mg/dL)	Sem jejum (mg/dL)	Categoria Referencial
Colesterol Total	<190	<190	Desejável
HDL	>40	>40	Desejável
Triglicérides	<150	<175	Desejável
Categoria de risco			
LDL	<130	<130	Baixo
	<100	<100	Intermediário
	<70	<70	Alto
	<50	<50	Muito alto
Não HDL	<160	<160	Baixo
	<130	<130	Intermediário
	<100	<100	Alto
	<80	<80	Muito alto

FONTE: SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (Faludi et al., 2017).

2.3 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

2.3.1 Tratamento da hipercolesterolemia

Conforme a Sociedade Brasileira de Cardiologia (Faludi et al., 2017), a decisão para o início do tratamento farmacológico das dislipidemias depende do risco cardiovascular do paciente. Os pacientes de muito alto ou alto risco cardiovascular, o tratamento é baseado no uso de medicamentos em associação com as modificações do estilo de vida, enquanto que para os pacientes de risco moderado ou baixo, o tratamento inicial recomenda-se mudanças no estilo de vida, e secundariamente, o uso de medicamentos caso não consiga alcançar as metas estabelecidas do colesterol LDL.

Como mencionado anteriormente às medidas não farmacológicas para o tratamento da hipercolesterolemia são direcionadas às mudanças no estilo de vida o que incluem a intervenção dietética, a redução de peso corporal e a prática de exercícios físicos (DAVIDSON et al., 2002).

Em relação à terapia farmacológica, os fármacos utilizados para o tratamento da hipercolesterolemia incluem as estatinas, podendo ser administradas em associação à ezetimiba e resinas sequestradoras de ácidos biliares (MOSTAZA; LAHOZ, 2014).

2.3.1.1 Estatinas

As estatinas são fármacos que reduzem o conteúdo de colesterol celular ao inibir seletivamente a enzima HMG-CoA redutase, o que limita a biossíntese de colesterol, com consequente redução das concentrações de colesterol hepático. Como resultado ocorre a expressão elevada de receptores de LDL nas membranas das células hepáticas, o que leva ao aumento da remoção das partículas de LDL circulantes do sangue (SIRTORI, 2014).

As estatinas são usualmente indicadas para as terapias de prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana (WALLACE et al., 2003).

Além de exercer o papel na redução do colesterol, as estatinas desempenham diversos efeitos pleiotrópicos que incluem o aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico, modulação da função endotelial, propriedades antioxidantes, diminuição da resposta inflamatória e estabilização da placa de ateroma (DAVIGNON, 2004).

2.3.1.1.1 Limitações das Estatinas

As estatinas são fármacos geralmente bem tolerados e seguros. No entanto, eventos adversos relacionados à toxicidade muscular e alterações de enzimas hepáticas podem ocorrer em alguns pacientes (HU et al., 2012). Os eventos adversos dependem da dose, sendo o risco ampliado por interações medicamentosas que potencializam a ação das estatinas (GOLOMB; EVANS, 2008).

Os sintomas musculares associados às estatinas (SAMS) são uma das principais causas para os problemas relacionados à adesão e/ou interrupção do uso das estatinas, o que contribui para incidência de eventos cardiovasculares (STROES et al., 2015). As manifestações clínicas dos SAMS podem variar desde uma

fraqueza muscular, mialgia leve, alterações nos níveis de CK e mais gravemente, a rabdomiólise (CARVALHO; SPOSITO, 2016).

Nesse contexto, existem muitas variáveis relacionadas a adesão às estatinas como a idade, gênero, comorbidades, renda e a complexidade do tratamento, o que limita os benefícios do fármaco (MANN et al., 2010).

Entende-se por intolerância à estatina situação em que o paciente é incapaz de tolerar uma dose do fármaco necessária para diminuir o risco cardiovascular suficientemente em relação ao nível inicial, sendo resultado dos vários efeitos colaterais associados às estatinas que incluem os sintomas musculares, dor de cabeça, distúrbios do sono, dispepsia, náusea, erupção cutânea, artrite, entre outros (BANACH et al., 2015).

Além disso, em muitos pacientes, o tratamento utilizando as estatinas não é suficiente para que atinja os valores ideais de LDL, sendo que as principais causas são os níveis basais muito elevados de LDL, como por exemplo, na doença hipercolesterolemia familiar (KRÄHENBÜHL et al., 2016).

2.3.1.2 Resinas sequestradoras de ácidos biliares

A colestiramina e colestipol são as resinas sequestradoras de ácidos biliares mais antigas da classe. Há pouco tempo o colesevelam também foi inserido no mercado (CATAPANO et al., 2011).

Os sequestrantes de ácidos biliares se ligam aos ácidos biliares no intestino, os quais são removidos da circulação entero-hepática através da eliminação pela via fecal (STAELS, 2009). Como consequência, ocorre o aumento da síntese de ácidos biliares a partir do colesterol nos hepatócitos, que reduz transitoriamente os níveis de colesterol celular, com estímulo a síntese de receptores de LDL. Em decorrência disso, ocorre maior captação hepática de LDL do plasma e, consequentemente, redução da concentração plasmática de LDL (BARTER; RYE, 2016).

Os sequestrantes de ácidos biliares são considerados seguros, embora apresentem efeitos de natureza gastrointestinal como prisão de ventre, dor abdominal e náuseas, que podem resultar na descontinuação do tratamento (OUT et al., 2012).

2.3.1.3 Inibidor da absorção de colesterol

O ezetimiba é o primeiro fármaco representante da classe, que atua inibindo seletivamente a absorção do colesterol da dieta e biliar na borda em escova do intestino, ao bloquear o receptor Niemann-Pick C1. Como resultado da inibição, ocorre a redução do colesterol intra-hepático, estimulando a síntese de receptores de LDL. Esta regulação positiva do número de receptores de LDL promove a depuração do LDL da circulação sistêmica, com consequente diminuição dos níveis de colesterol no plasma (EATON, 2005).

A terapia combinada dos fármacos ezetimiba com estatina proporciona redução adicional considerável nos níveis de LDL, sendo considerado um regime bem tolerado com diversas estatinas (GAGNÉ et al., 2002).

2.4 NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS: PCSK9

As pró-proteína convertases representam uma família de nove enzimas que estão relacionadas à subtilisina bacteriana e à kexina de levedura e que possuem diversas funções como ativar hormônios polipeptídicos, proteínas de adesão e patógenos, bem como a regulação do colesterol, sendo consideradas alvos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (SEIDAH; PRAT, 2012).

A pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que originalmente era denominada como convertase 1 regulada por apoptose neural (NARC-1), foi descoberta e caracterizada no ano de 2003, sendo expressa no cromossomo humano 1 (SEIDAH et al., 2003).

A identificação da PCSK9 permitiu a elucidação de mecanismos relacionados a essa enzima. Foi constatado que a mutação de ganho de função naquele gene resultava em hipercolesterolemia familiar, enquanto que as mutações de perda de função eram responsáveis pela diminuição dos níveis de colesterol, com consequente redução na incidência de doenças cardiovasculares (ABIFADEL et al., 2003; ELGUINDY; YACOUNB, 2013).

A PCSK9 é uma enzima, codificada pelo gene PCSK9 que, quando ativa, é responsável pela regulação dos receptores de superfície celular, em particular o

receptor de LDL, expresso principalmente no fígado e que desempenha um papel fundamental na homeostase do colesterol. Nesse sentido, estão sendo investigadas diversas abordagens para a inibição da função da PCSK9 (PAGE, 2016).

Atualmente os anticorpos monoclonais (mAbs) são as estratégias terapêuticas de maior relevância clínica, sendo que pelo menos seis mAbs foram ou estão sendo desenvolvidos. Dentre esses, destacam-se o Alirocumab e Evolocumab que foram aprovados recentemente pelo FDA (CHAUDHARY et al., 2017). O Bococizumabe, outro mAb, foi suspenso por apresentar baixa eficácia relacionada a imunogenicidade (RIDKER et al., 2017).

Além disso, estudos recentes relatam a descoberta e otimização de ligantes não peptídicos para PCSK9 como estratégia de redução de seus níveis (PETRILLI et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Compreender o papel de inibidores da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), explorando aspectos moleculares e clínicos relacionados ao tratamento de hipercolesterolemia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aprofundar na compreensão do papel da PCSK9 no metabolismo lipídico;
- Analisar a enzima PCSK9 do ponto de vista molecular para compreensão de seu processo de inibição;
- Analisar, do ponto de vista molecular, os principais inibidores peptídicos de PCSK9 disponíveis na clínica;
- Avaliar os efeitos de inibidores peptídicos de PCSK9 nas frações lipídicas e melhora de quadro clínico de pacientes hipercolesterolêmicos;
- Avaliar propostas de inibidores não peptídicos de PCSK9, buscando compreender os aspectos estruturais relevantes no processo de inibição e modulação da atividade dessa enzima.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma revisão narrativa de literatura, sendo desenvolvido a partir de buscas nas plataformas SciELO, PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Portal de periódicos da CAPES, LILACS e Google acadêmico para a coleta de dados.

A busca dos estudos foi realizada nos meses de junho a setembro de 2021. Foram incluídos artigos ou publicações científicas que abordasse a temática, nos últimos 6 anos (2015 a 2021) e nos idiomas português, inglês e espanhol.

Foram aplicadas as seguintes palavras-chave: estrutura e função do alvo (*structure and function; estructura y función*), mecanismo de ação dos agentes modulares (*mechanism of action; mecanismo de acción*); eficácia e segurança dos agentes moduladores (*effectiveness and safety; eficacia y seguridad*), relação estrutura-atividade dos agentes moduladores (*structure-activity relationship; relación estructura-actividad*), farmacologia dos agentes moduladores (*pharmacology; farmacología*), pequenas moléculas inibidoras de PCSK9 (*small molecule PCSK9 inhibitors; inhibidores de PCSK9 de molécula pequeña*). Os nomes PCSK9, da classe farmacológica e/ou dos agentes moduladores desse alvo foram associados às palavras-chave supracitadas no momento da busca nos bancos de dados.

A seleção dos estudos aconteceu em três etapas, seguindo os critérios de inclusão. Inicialmente, os estudos foram selecionados pela leitura do título, e posteriormente, pela leitura dos resumos. A leitura na íntegra foi realizada para os estudos cujos os resumos foram selecionados. Além disso, os estudos encontrados em duplicatas nas bases de dados utilizadas tinham suas cópias excedentes desconsideradas.

Nas **Figuras 3, 4, 5, 6 e 7** estão descritas cada etapa de seleção, indicando-se o número de trabalhos encontrados e analisados em cada etapa, conforme os descritores utilizados nas pesquisas.

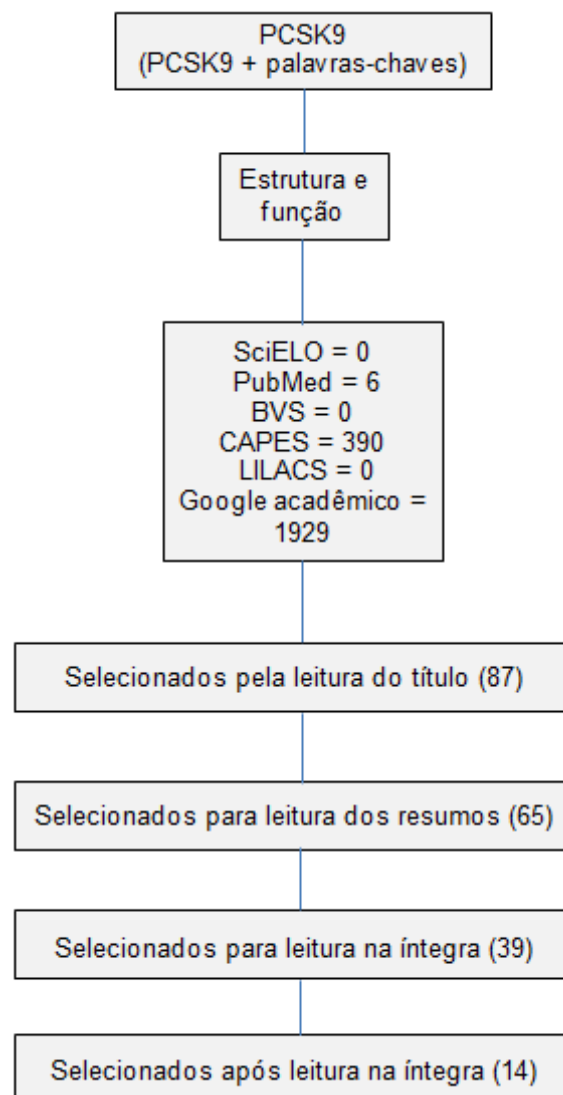


Figura 3. Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.

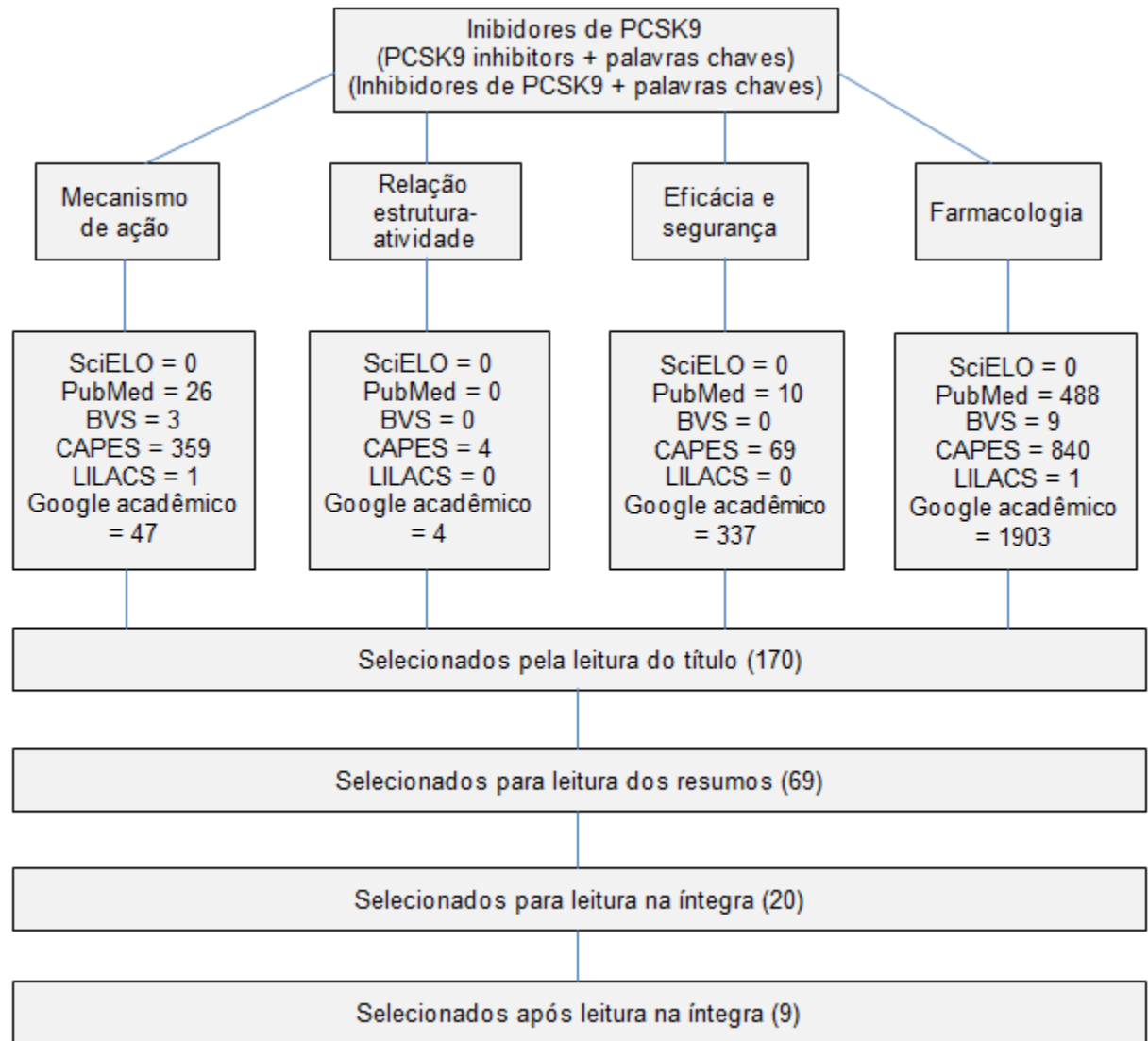


Figura 4. Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Inibidores de PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.

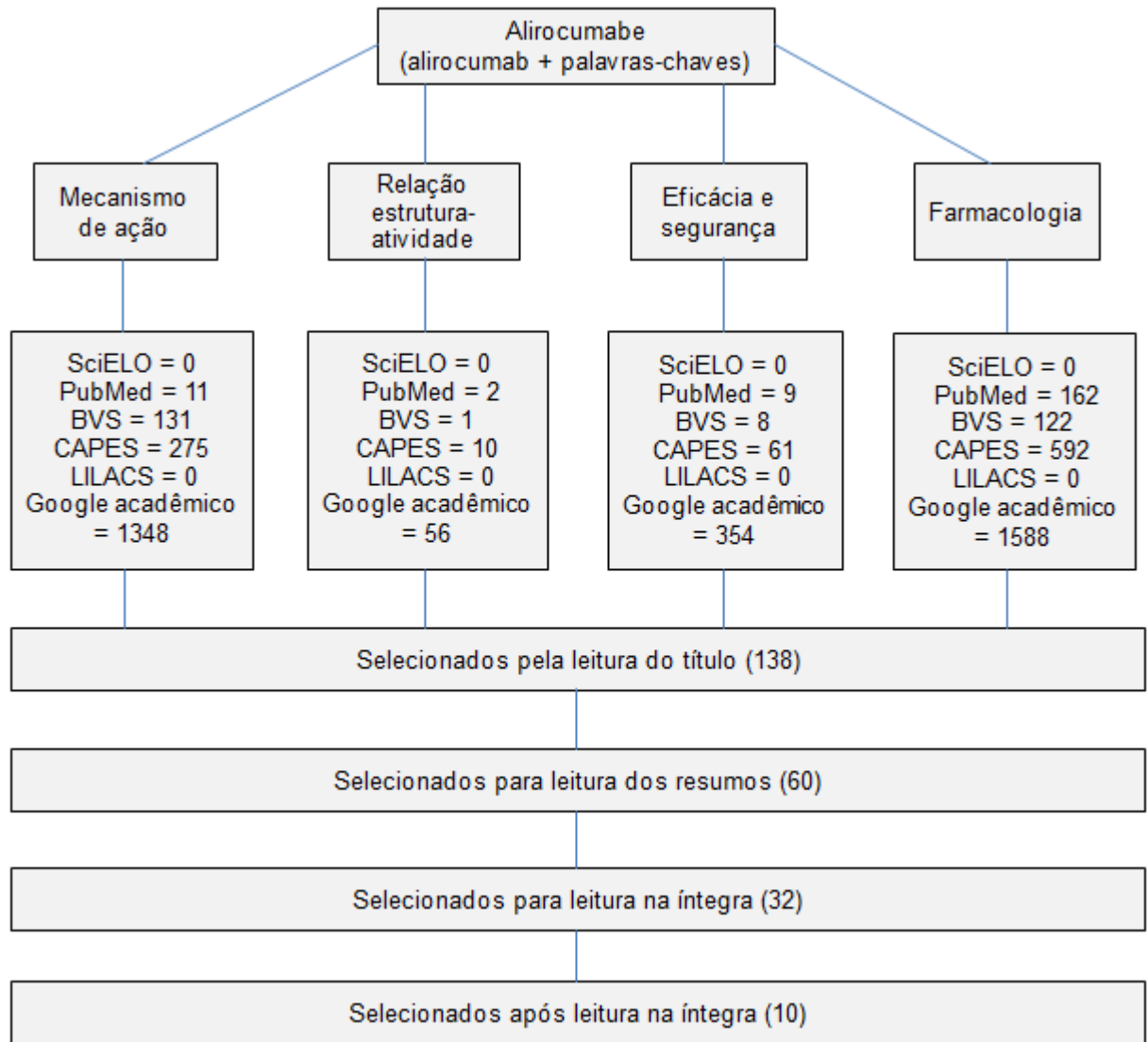


Figura 5. Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Alirocumabe. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.

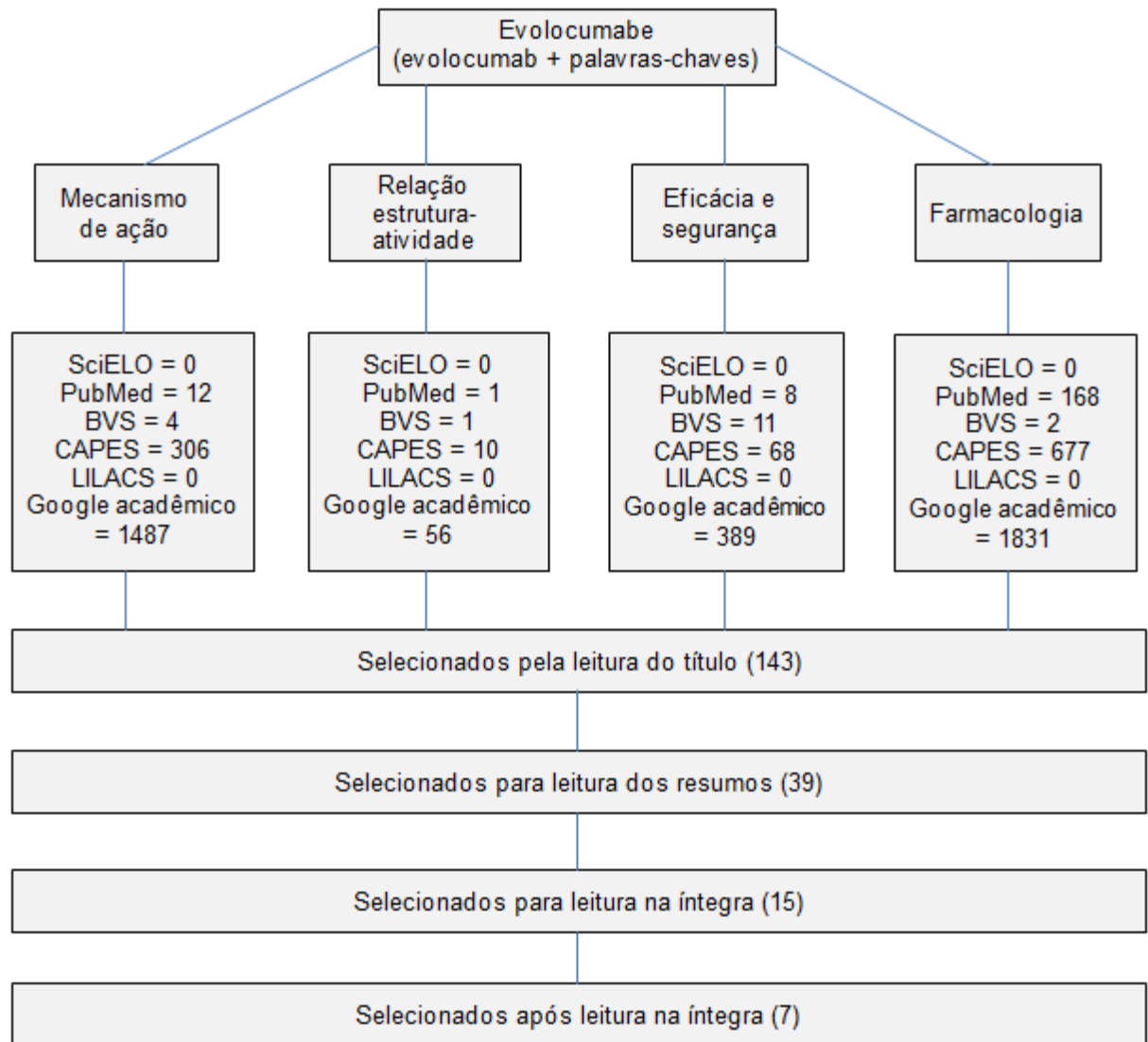


Figura 6. Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Evolocumabe. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.

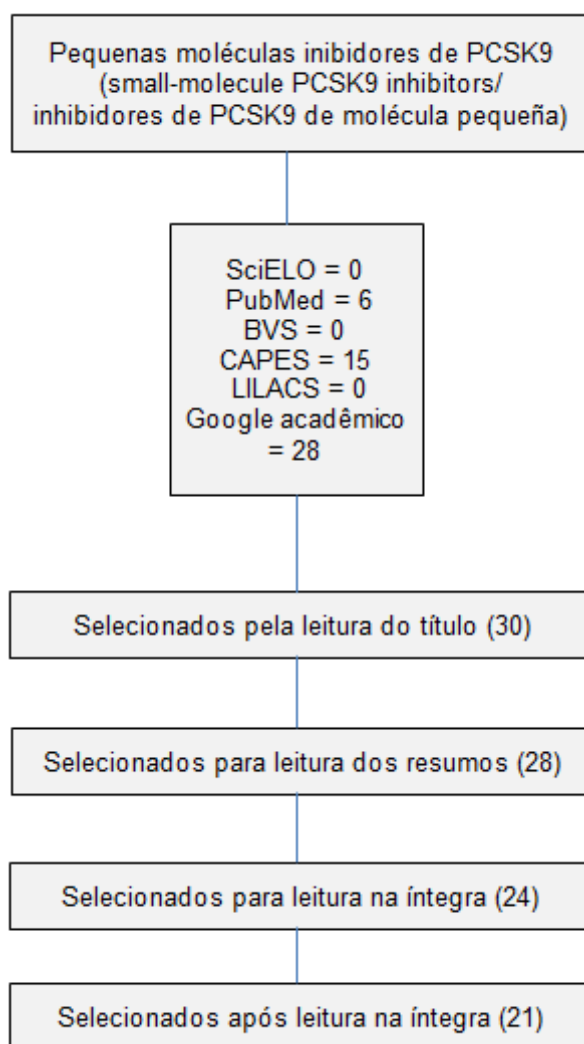


Figura 7. Fluxograma do processo de seleção dos estudos pesquisados para Pequenas moléculas inibidores de PCSK9. A quantidade selecionada em cada etapa está indicada entre parênteses.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PCSK9

O gene PCSK9 localiza-se no cromossomo 1p32, o qual é expresso principalmente no fígado e em níveis mais baixos nos rins, intestino e sistema nervoso central. A PCSK9 é sintetizada como um zimogênio de 75 kilodalton (kDa) e 692 aminoácidos, composta por peptídeo sinal, um pró-domínio, um domínio catalítico e um domínio C-terminal rico em cisteína e histidina (**Figura 8**) (BURKE et al., 2017; BERGERON et al., 2015).

Dentro do retículo endoplasmático, o peptídeo sinal é clivado e o zimogênio proPCSK9 sofre um processo autocatalítico que cliva a ligação entre Gln₁₅₂ e Ser₁₅₃ (**Figura 8A**) (MACCHI et al., 2019). Apesar da excisão do pró-domínio, este permanece associado ao domínio catalítico por meio de ligações de hidrogênio, o que bloqueia estericamente o sítio ativo da enzima (EVISON et al., 2020). Este processo autocatalítico possibilita a maturação e secreção da proteína (MONTAÑO-SOSA et al., 2017).

O domínio catalítico é composto pela tríade catalítica que consiste nos aminoácidos Asp₁₈₆, His₂₂₆ e Ser₃₈₆ (**Figura 8B** e **Figura 9**), sendo o responsável pela ligação entre a PCSK9 e o Domínio A de homologia de repetição semelhante a fator de crescimento epidérmico (EGF-A) no LDLR (**Figura 8B**). Em contrapartida, o domínio C-terminal da PCSK9 exerce um papel essencial no direcionamento dos LDLR para a degradação subsequente (MACCHI et al., 2019).

Em circunstâncias normais, o LDL liga-se ao LDLR e é endocitado por vesículas revestidas de clatrina. Após a internalização, o pH ácido dos endossomos favorece o rearranjo do receptor que adota conformação fechada, o que resulta na dissociação do LDL. Os LDLR retornam para a superfície da célula, enquanto que os endossomos que contém as partículas de LDL se fundem com os lisossomos, o que resulta na degradação de LDL, mediante a hidrólise de ésteres de colesterol e, consequentemente, liberação do colesterol (HESS et al., 2018; MELENDEZ et al., 2017).

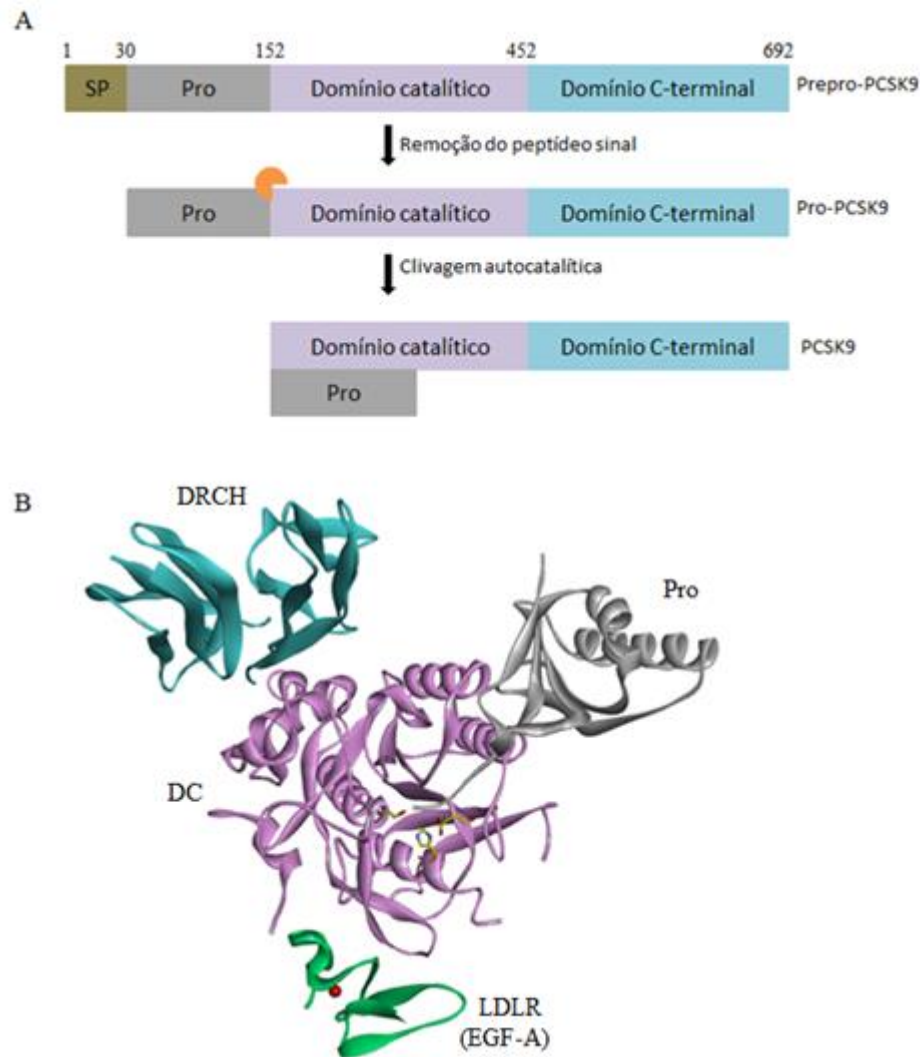


Figura 8. Organização e estrutura proteica da PCSK9. **A)** Representação dos domínios da PCSK9 que consistem em um peptídeo sinal (SP) (aminoácidos 1-30), um pró-domínio (Pro) (aminoácidos 31-152), um domínio catalítico (aminoácidos 153-452) e um domínio C-terminal (aminoácidos 453-692). VFAQ152SIP (laranja) representa a sequência de reconhecimento de clivagem (Adaptada de Ito e Santos, 2017). **B)** Representação tridimensional da estrutura cristalográfica da PCSK9 (PDB ID 3BPS), com destaque para o pró-domínio (Pro) (fitas em cinza); o domínio catalítico (DC) (fitas em lilás), no qual se encontra a tríade catalítica (bastões amarelos); e domínio C-terminal (DRCH) (fitas em ciano) da PCSK9, complexada com o domínio EGF-A do receptor de LDL (LDLR) (verde). O íon cálcio é mostrado como uma esfera vermelha.

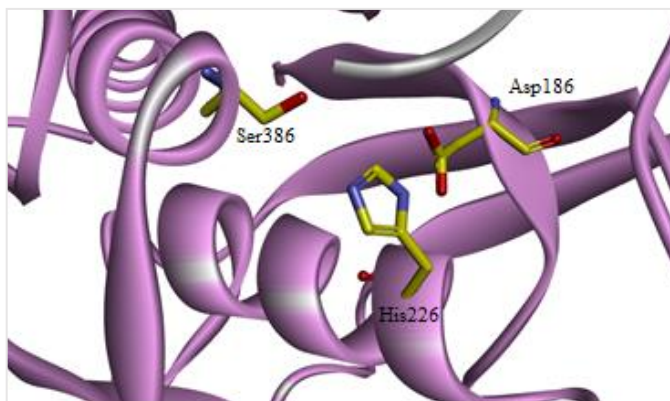


Figura 9. Tríade catalítica formada pelos resíduos de Asp₁₈₆, His₂₂₆ e Ser₃₈₆ (PDB ID 3BPS).

A PCSK9 pode interagir com o LDLR intracelular e extracelularmente. No meio intracelular, há a interação da PCSK9 com o LDLR antes de ocorrer a secreção de ambos, o que direciona o receptor para degradação lisossomal (MONTAÑO-SOSA et al., 2017). No meio extracelular, a PCSK9 secretada interage com o LDLR na superfície das células.

De modo específico, o domínio catalítico da PCSK9 liga-se ao domínio EGF-A do LDLR e é provável que esta ligação requeira cálcio, ocorrendo com estequiometria 1:1 em pH neutro do plasma (**Figura 8B**). O trecho ácido da porção N-terminal, situado na estrutura do pró-domínio da PCSK9, é responsável por regular negativamente a ligação entre a proteína e o receptor em pH neutro (SOBATI et al., 2020; MELENDEZ et al., 2017).

O complexo formado entre PCSK9 e LDLR é internalizado por endocitose em vesículas revestidas de clatrina. O pH ácido do endossomo aumenta a afinidade entre a PCSK9 e o receptor em comparação com o pH neutro. Nessas condições ácidas, ocorre a formação de interações iônicas entre o pró-domínio da PCSK9 e domínio propulsor β do LDLR, enquanto o domínio de ligação do ligante do LDLR, carregado negativamente, liga-se ao domínio C-terminal de PCSK9, carregado positivamente (**Figura 10**) (MELENDEZ et al., 2017).

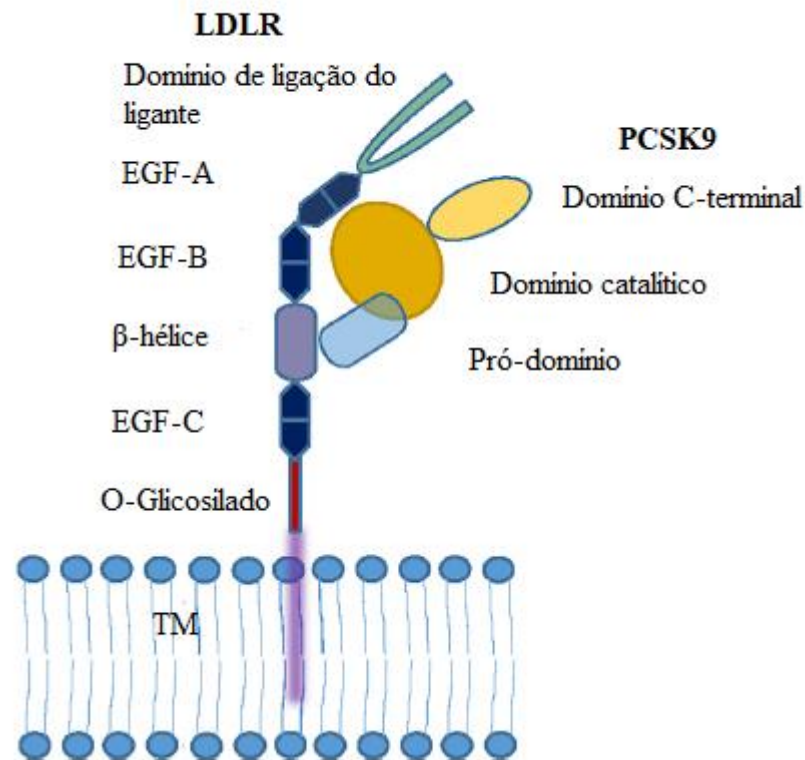


Figura 10. Representação da interação entre o LDLR e a PCSK9. O LDLR interage com o domínio catalítico da PCSK9 por meio de seu domínio EGF-A e com o pró-domínio desta por meio do seu domínio propulsor β . Os outros domínios em LDLR incluem o domínio C-terminal (domínio de ligação do ligante), domínios EGF-B e C, domínio O-glicosilado e domínio transmembrana (TM) (Adaptada de KLEIN-SZANTO; BASSI, 2019).

Desse modo, a PCSK9 mantém-se ligada ao LDLR, o que impede a alteração conformacional do receptor necessária para a sua reciclagem e o conduz para degradação nos lisossomos. Como consequência, ocorre a redução do número de LDLR disponíveis na membrana dos hepatócitos, o que leva ao aumento dos níveis plasmáticos de LDL (**Figura 11**) (TSOUKA et al., 2018; PEDRO-BOTET; BADIMÓN, 2016).

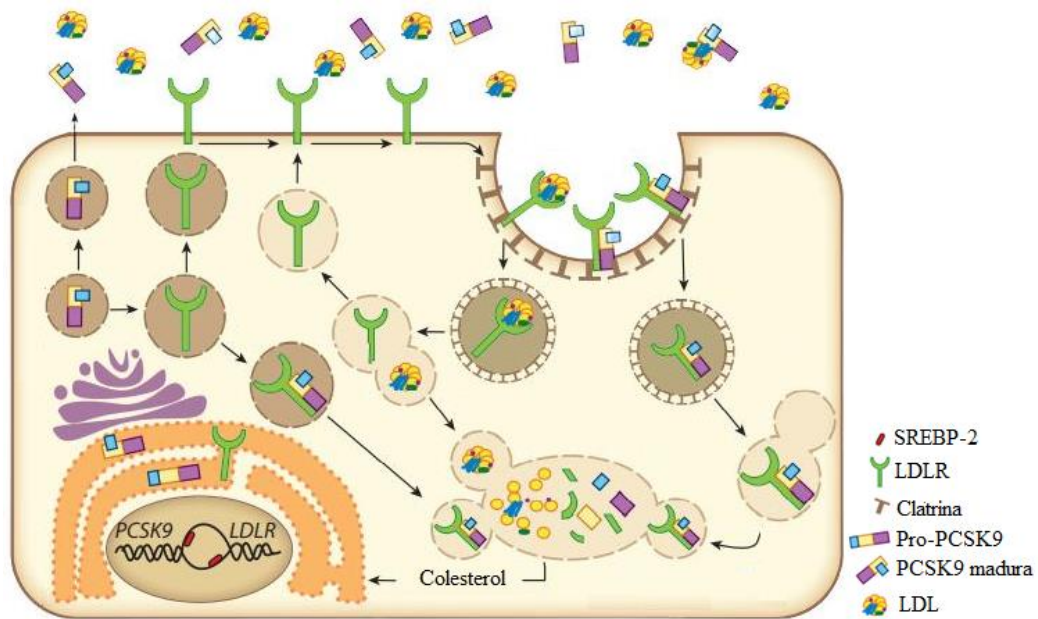


Figura 11. Visão esquemática do papel da PCSK9 no metabolismo do colesterol (Adaptada de Burke et al., 2017).

A PCSK9 secretada pode sofrer inativação enzimática por duas proteínas, a furina e a proteína convertase 5/6 na posição entre os aminoácidos Arg₂₁₈ e Gln₂₁₉. Além da forma intacta da proteína, a forma clivada também circula no sangue e pode interagir com LDLR, embora com atividade reduzida pela metade (PEDRO-BOTET; BADIMÓN, 2016).

5.2 REGULAÇÃO DA PCSK9

A expressão gênica de PCSK9 é regulada principalmente pela proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 2 (SREBP-2), um fator de transcrição ligado à membrana responsável pela regulação dos genes relacionados a homeostase do colesterol nas células, o que inclui o LDLR (REISS et al., 2018). Além disso, o fator nuclear dos hepatócitos 1 α (HNF-1 α) atua cooperativamente com a SREBP-2 para a transcrição da PCSK9 (ITO; SANTOS, 2017).

A proteína forkhead box O3 (FOXO3) pode regular negativamente a expressão do gene PCSK9 por modulação epigenética, em que promove o recrutamento da proteína sirtuína-6 (SIRT6) para a desacetilação das histonas e suprimir a atividade transcricional de HNF-1 α (GLERUP et al., 2017).

A depleção de colesterol ou a inibição da síntese de colesterol intracelular pode modular a transcrição de PCSK9 ao induzir a atividade da SREBP2. Desse modo, as estatinas, ao inibir a hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMG-COAR), ativam a SREBP-2. Essa ativação induz, de forma coordenada, a transcrição do LDLR e, paradoxalmente, da PCSK9, o que atenua o efeito hipolipemiante do fármaco. Esse mecanismo contrarregulador pode representar um modo de limitar a atividade do LDLR mediada pela PCSK9 (**Figura 12**) (BURKE et al., 2017; SHENDE et al., 2015).

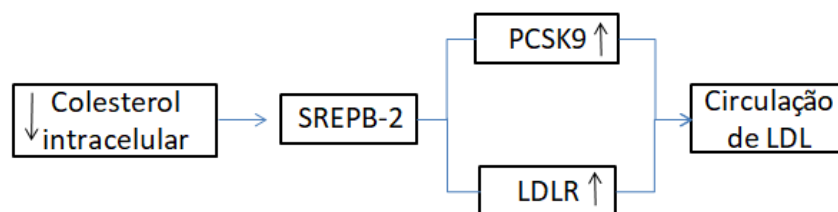


Figura 12. Representação do mecanismo de regulação da PCSK9 através do SREPB-2 (Adaptada de CUI et al, 2015).

5.3 INIBIDORES DE PCSK9

5.3.1 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAbs) ligam-se a PCSK9 circulante e inibe estericamente a interação da PCSK9 com o LDLR, o que impede a degradação do receptor. Como resultado, ocorre o aumento da quantidade de receptores disponíveis na superfície das células hepáticas o que permite a diminuição dos níveis de LDL (**Figura 13**) (FONTES-CARVALHO, 2019).

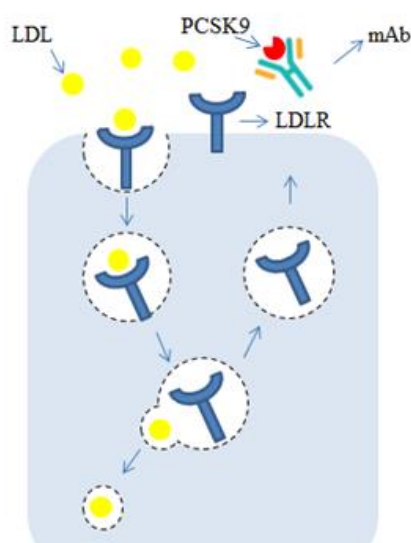


Figura 13. Mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais (Adaptada de Natarajan; Kathiresan, 2016).

A estrutura molecular dos mAbs consiste em duas cadeias pesadas covalentemente ligadas entre si por meio de ligações dissulfeto, de modo que cada uma delas é covalentemente ligada via ligações dissulfeto a uma cadeia leve kappa. Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leve formam a região que contém o sítio de ligação para PCSK9 (MANNIELLO; PISANO, 2016).

5.3.1.1 Alirocumabe

O alirocumabe foi o primeiro anticorpo monoclonal humano de imunoglobulina do tipo G1 (IgG1) aprovado pela FDA, estando em comercialização desde julho de 2015. Apresenta peso molecular de 146 kDa e pertence à nova classe de medicamentos, denominada de inibidores da PCSK9 (MANNIELLO; PISANO, 2016).

Desenvolvido pela empresa farmacêutica Sanofi/Regeneron e comercializado sob o nome comercial Praluent®, é indicado nos EUA como terapia complementar à dieta ou em monoterapia em pacientes adultos com HeHF em uso de estatina na máxima dose tolerada ou em pacientes com doença cardiovascular aterosclerótica (DCVA) que necessitem redução adicional do LDL (RAEDLER, 2016). Recentemente, a FDA (2021) aprovou seu uso para pacientes adultos com HoHF associados a outros tratamentos hipolipemiantes.

Na Europa, a aprovação inclui uso em adultos com hipercolesterolemia primária (HeHF e não familiar) ou dislipidemia mista em associação a outros hipolipemiantes, em pacientes que não conseguem alcançar as metas de LDL com uso de estatinas em dose máxima tolerada. Além disso, se aplica também a pacientes intolerantes a estatinas, em monoterapia ou em terapia combinada com outros hipolipemiantes (LANDMESSER et al., 2016). Vale ressaltar que o medicamento também foi aprovado pela ANVISA e encontra-se disponível comercialmente desde 2016 no Brasil (FERRARI et al., 2019).

O medicamento é administrado como injeção subcutânea em doses de 75 e 150 mg a cada duas semanas, apresenta tempo de meia-vida de 17 a 20 dias e biodisponibilidade de 85%. Em relação ao metabolismo, degrada-se em pequenos peptídeos e aminoácidos. A eliminação do alirocumabe em baixas concentrações ocorre através da ligação saturável ao alvo PCSK9, enquanto que em altas concentrações ocorre por meio do mecanismo de depuração de IgG endógena, via sistema reticuloendotelial (WIGGINS et al., 2018; CASTILLA-GUERRA et al., 2019).

O programa ODYSSEY reúne um conjunto de estudos clínicos de fase III que foram projetados com objetivo de avaliar o alirocumabe quanto à eficácia e segurança em diferentes cenários que incluem diferentes populações como pacientes heterozigotos, hipercolesterolemia primária, alto risco cardiovascular (CV), intolerância a estatinas e em combinações, com estatinas, ezetimiba ou em monoterapia (CHAUDHARY, 2017; MACHI, 2019).

Os estudos ODYSSEY HF I e ODYSSEY HF II avaliaram o alirocumabe a longo prazo em pacientes com HeHF não controlada em uso da estatina na máxima dose tolerada, em associação ou não a outro hipolipemiante. A terapia complementar com o alirocumabe produziu reduções significativas e consistentes dos níveis de LDL em 57,9% (HF I) e 51,4% (HF II), sendo também bem tolerado pelos pacientes em estudo, o que permitiu o alcance das metas de LDL < 70 mg/dL em 59,8% (HF I) e 68,2% (HF II) dos pacientes (KASTELEIN et al., 2015).

O comportamento do alirocumabe em pacientes com risco CV alto com hipercolesterolemia não controlada em tratamento com máxima dose de estatina tolerada, com ou sem outro hipolipemiante associado, foi analisado no estudo COMBO I, por um período de 52 semanas. O uso de alirocumabe como terapia adjuvante proporcionou uma redução de 48% nos níveis de LDL, além de boa

tolerância pelos pacientes, de modo que 75% deles alcançaram as metas de LDL < 70 mg/dL, sem aumento de reações adversas (KEREIAKES et al., 2015).

O estudo ODYSSEY COMBO II incluiu pacientes de características semelhantes ao COMBO I, porém foi feita a comparação entre o alirocumabe e ezetimiba como terapia complementar pelo período de 52 semanas. Os resultados mostraram uma redução superior do LDL para o grupo em uso de alirocumabe (50,6%) comparado ao grupo em uso de ezetimiba (20,7%). Além disso, 77% dos pacientes em uso de alirocumabe alcançaram as metas de LDL < 70 mg/dL em paralelo a 45,6% dos pacientes em uso de ezetimiba, não havendo também evidências de eventos adversos importantes (CANNON et al., 2015).

Em ODYSSEY LONG-TERM, o alirocumabe foi avaliado a longo prazo em pacientes com hipercolesterolemia primária com risco CV alto ou muito alto em uso da estatina na máxima dose tolerada, associada ou não a outro medicamento hipolipemiante. Até a 24ª semana de tratamento, a adição de alirocumabe à terapia permitiu a redução dos níveis de colesterol LDL em 62%, havendo manutenção desse efeito durante o período das 78 semanas de estudo (ROBINSON et al., 2015).

O estudo ODYSSEY MONO avaliou a monoterapia com alirocumabe e ezetimiba em pacientes com hipercolesterolemia primária com risco CV moderado no período de 24 semanas. Os resultados obtidos foram superiores para o alirocumabe, com redução dos níveis de LDL em 47,2%, comparado a redução de 15,6% para o ezetimiba. Além disso, apresentaram semelhanças em relação aos parâmetros de segurança e de eventos adversos (ROTH; MCKENNEY, 2015).

No ODYSSEY ALTERNATIVE, o alirocumabe e o ezetimiba foram estudados em pacientes com risco CV moderado, alto ou muito alto, com intolerância a estatinas, durante um período de 24 semanas. O tratamento com o alirocumabe permitiu uma redução significativa dos níveis de LDL (45%) em comparação ao tratamento com ezetimiba (14,6%) (MORIARTY et al., 2015).

O ODYSSEY OUTCOMES foi um estudo específico a longo prazo que avaliou a ocorrência de desfechos cardiovasculares após a administração de alirocumabe em pacientes com síndrome coronariana em terapia com a máxima dose de estatina tolerada. O risco do desfecho primário composto (morte por doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio não fatal, acidente vascular cerebral isquêmico fatal ou não fatal ou angina instável que requer hospitalização) foi significativamente menor no grupo em uso de alirocumabe (9,5%) quando comparado ao grupo

placebo (11,1%). Além disso, a redução dos níveis de LDL em 4 meses, 12 meses, 48 meses foi de 62,7%, 61,0% e 54,7%, respectivamente (SCHWARTZ et al., 2018).

5.3.1.2 Evolocumabe

O evolocumabe foi o segundo anticorpo monoclonal humano de imunoglobulina do tipo G2 (IgG2) da classe de inibidores de PCSK9 com peso molecular de 142 kDa, estando aprovado desde agosto de 2015 pela FDA (FALA, 2016).

Desenvolvido pela empresa Amagen e comercializado sob marca Repatha®, é indicado nos EUA como terapia complementar à dieta em pacientes adultos com HeHF ou HoHF em uso da máxima dose tolerada de estatina ou aqueles com DCVA que necessitem redução adicional dos níveis de LDL (FALA, 2016). Vale ressaltar que o medicamento também foi aprovado pela ANVISA e encontra-se disponível comercialmente desde 2016 no Brasil (FERRARI et al., 2019).

Na Europa, o público aprovado para uso inclui adultos com hipercolesterolemia primária (HeHF e não familiar) ou dislipidemia mista em associação a outras terapias hipolipemiantes em pacientes que não conseguem atingir as metas de LDL com a máxima dose de estatina tolerada. Pode ser usado também em pacientes adultos e adolescentes a partir de 12 anos com HoHF em associação a outros hipolipemiantes. Além disso, pode ser administrado isolado ou em combinação a outros hipolipemiantes em pacientes que são intolerantes a estatinas (LANDMESSER et al., 2016).

O medicamento é administrado como injeção subcutânea em doses de 140mg a cada duas semanas ou 420mg mensalmente, apresenta tempo de meia-vida de 11-17 dias e biodisponibilidade de 72%. Em relação ao metabolismo, degrada-se em pequenos peptídeos e aminoácidos. A eliminação do evolocumabe se dá de forma similar à descrita para o alirocumabe (WIGGINS et al., 2018; CASTILLA-GUERRA et al., 2019).

O programa PROFICIO compreende um conjunto de estudos clínicos de fase III com objetivo de avaliar o evolocumabe quanto à eficácia e segurança nas diferentes populações como pacientes intolerantes a estatinas, heterozigotos, homozigotos em monoterapia ou em combinação a outros hipolipemiantes (CHAUDHARY et al., 2017; CORRAL; RUIZ, 2017).

No estudo GAUSS-3 avaliou-se a administração de evolocumabe e ezetimiba pelo período de 24 semanas em pacientes intolerantes a estatinas devido a sintomas musculares e com níveis de LDL não controlados. Os resultados obtidos demonstraram uma redução superior nos níveis de LDL em pacientes em uso do evolocumabe (52,8%) comparado ao conjunto de pacientes em uso de ezetimiba (16,7%) (NISSEN et al., 2016).

O comportamento do evolocumabe em pacientes com HeHF em terapia com estatina, associada ou não a outros hipolipemiantes, foi analisado no estudo RUTHERFORD-2 pelo período de 12 semanas. O tratamento com evolocumabe foi bem tolerado e permitiu uma redução significativa dos níveis de LDL tanto em regime de dose a cada duas semanas (59,2%) quanto em regime de dose mensal (61,3%). Além disso, os eventos adversos foram semelhantes em ambos os grupos, sendo nasofaringite e sintomas musculares relatados com maior frequência no grupo em uso do anticorpo comparado ao grupo em uso de placebo, com índices de 9% versus 5% e 5% versus 1%, respectivamente (RAAL et al., 2015a).

No estudo TESLA (Parte B), avaliou-se o evolocumabe em pacientes com HoHF em terapia redutora de lipídios, com duração de 12 semanas. A adição de evolocumabe foi bem tolerada e possibilitou uma redução dos níveis de LDL em 30,9%, sem ocorrência de eventos adversos graves (RAAL et al., 2015b).

No estudo GLAGOV, foi analisado os efeitos do evolocumabe por 76 semanas na progressão da aterosclerose coronariana determinada, por ultrassom intravascular, em pacientes em terapia com estatinas. No desfecho primário de volume percentual de ateroma (PAV) a adição de evolocumabe resultou na diminuição de 0,95%, comparado com placebo que teve aumento de 0,05%. O desfecho secundário de volume total do ateroma normalizado (TAV) foi significativamente reduzido pelo evolocumabe (5,8mm³) comparado ao placebo (0,91mm³). Além disso, uma porcentagem maior de pacientes apresentou regressão da placa no grupo evolocumabe em comparação ao placebo para PAV (64,3% versus 47,3%) e para TAV (61,5 versus 48,9%) (NICHOLLS et al., 2016).

No estudo FOURIER, o evolocumabe foi avaliado em pacientes com DCVA e níveis de LDL $\geq$ 70mg/dL em terapia com estatina por um período de 48 semanas. O risco do desfecho primário composto (morte cardiovascular, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, hospitalização por angina instável ou revascularização coronariana) foi significativamente menor no grupo em uso de aliocumabe (9,8%)

quando comparado ao grupo placebo (11,3%), como também, o risco do desfecho secundário composto (morte cardiovascular, infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral) nos pacientes tratados com o anticorpo (5,9%) e comparado ao placebo (7,4%). Além disso, o evolocumabe permitiu a redução dos níveis de LDL para ≤ 70 mg/dL, ≤ 40 mg/dL e ≤ 25 mg/dL em 87%, 67%, 42% dos pacientes respectivamente, em comparação com 18%, 0,5% e menos de 0,1% respectivamente, dos pacientes no grupo placebo (SABATINE et al., 2017).

5.3.1.3 Bococizumabe

O Bococizumabe foi o terceiro anticorpo monoclonal da classe de inibidores de PCSK9. Porém, ao invés de totalmente humano como os dois mAbs mencionados anteriormente, o bococizumabe apresenta-se como anticorpo humanizado que contém aproximadamente 3% de sequência murina em sua estrutura, de modo que pode estimular com maior probabilidade a formação de anticorpos antifármaco (CAMPO, 2017; HESS et al., 2018).

O programa SPIRE englobava um conjunto de estudos clínicos projetados para avaliar a eficácia e a segurança do bococizumabe (RIDKER et al., 2016). No entanto, foi interrompido devido à produção de anticorpos antifármaco, o que resultou na atenuação significativa da resposta e da duração na redução do LDL. Ademais, entre os pacientes que não desenvolveram anticorpos antifármacos, ocorreu uma grande variabilidade individual na redução do LDL (RIDKER et al., 2017).

5.3.2 Inibidores não peptídicos

A administração de anticorpos monoclonais mencionados anteriormente constitui uma terapia bem-sucedida para manejo da hipercolesterolemia, principalmente em pacientes refratários às estatinas. No entanto, o alto custo e a via de administração limita o uso mais amplo desses medicamentos. A busca por substâncias não peptídicas como potenciais inibidores de PCSK9 para uso por via oral emergiu como uma alternativa desafiadora, dado que a região de interação do domínio EGF-A do LDLR com o domínio catalítico da PCSK9 consiste em uma superfície plana e sem bolsos hidrofóbicos, o que pode dificultar o desenvolvimento

de um inibidor com esse novo perfil com afinidade por essa região (LAVECCHIA; CERCHIA, 2019; EVISON et al., 2020).

Apesar da natureza desafiadora, a disponibilidade de uma substância não peptídica com ação direcionada a PCSK9 pode oferecer uma via de administração mais acessível e de baixo custo (EVISON et al., 2020; PETRILLI et al., 2020).

5.3.2.1 Produtos naturais

Uma série de produtos de origem natural tem sido estudada quanto ao seu potencial hipolipemiante. A berberina (BBR), um alcaloide isoquinolínico, é o principal composto bioativo de *Rhizoma coptidis*, uma erva medicinal chinesa usada tradicionalmente para o tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas (**Figura 14**). As propriedades farmacológicas da BBR despertaram o interesse de Dong e colaboradores (2015), que avaliaram o efeito do tratamento com BBR nos níveis de PCSK9 em modelos de animais hiperlipidêmicos. Neste estudo, os camundongos foram alimentados com dieta rica em gordura por quatro semanas e tratados com 200mg/kg/dia de BBR, enquanto um grupo de hamsters, de forma similar, foi tratado por uma semana com 100mg/kg/dia de BBR. Os resultados em ambos os grupos indicaram que a administração de BBR a camundongos e hamsters hiperlipidêmicos diminuiu as concentrações circulantes de PCSK9 e os níveis de mRNA de PCSK9 pela regulação negativa dos níveis do HNF-1 α através da via de degradação ubiquitina-proteassoma.

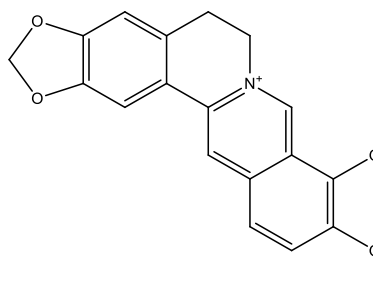


Figura 14. Estrutura química do produto natural Berberina (Adaptada de Xu et al., 2019).

A polidatina, um glicosídeo precursor do resveratrol, é um dos principais constituintes da planta *Polygonum cuspidatum* e que apresenta vários efeitos farmacológicos que incluem ação anti-inflamatória, hipoglicemiante, antioxidante, antialérgica, anticancerígena, hipolipemiante e efeitos de proteção cardiovascular (**Figura 15**). Nesse contexto, Wang e colaboradores (2016) investigaram o mecanismo pelo qual a polidatina atua no metabolismo lipídico e da glicose no diabetes mellitus tipo 2 em experimentos *in vivo* e *in vitro*. O estudo *in vitro* foi realizado em células HepG2 resistentes à insulina e *in vivo* em camundongos db/db tratados com polidatina. Os resultados em ambos os modelos experimentais mostraram que o tratamento com polidatina aumentou os níveis de LDLR e de GCK (glicoquinase) pela regulação negativa dos níveis de PCSK9, que estava elevada em células resistentes à insulina e também pela inibição direta da interação de PCSK9 e LDLR.

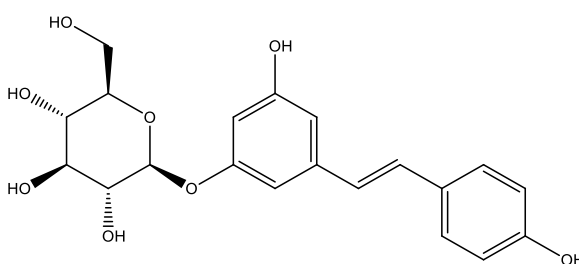


Figura 15. Estrutura química do produto natural Polidatina (Adaptada de Xu et al., 2019).

A Tanshinona II, um dos constituintes ativos isolados da erva medicinal *Salvia miltiorrhiza*, conhecida também como Danshen, é utilizada tradicionalmente em países asiáticos para o tratamento de doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose e distúrbios cerebrovasculares (**Figura 16**). Em relação ao metabolismo lipídico, Chen e colaboradores (2016) se propuseram a investigar o efeito hipocolesterolêmico da tanshinona IIA e os mecanismos subjacentes utilizando modelo experimental com células HepG2. Os resultados revelaram que a tanshinona II aumentou significativamente o nível de LDLR e a atividade de captação de LDL pela regulação positiva do nível de FOXO3a e supressão da atividade de HNF-1 α , o que levou a inibição da transcrição de PCSK9.

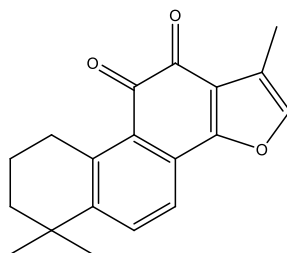


Figura 16. Estrutura química do produto natural Tanshinona IIA (Adaptada de Chen et al., 2016).

Morus alba, conhecida como amoreira, é uma espécie de planta que pertence à família Moraceae e que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antiobesidade, antidiabéticas e hipolipidêmicas. Recentemente, a investigação fitoquímica de um extrato clorofórmico de frutos secos e imaturos de *Morus alba* permitiu o isolamento e identificação de quinze constituintes químicos que foram submetidos ao ensaio de expressão de mRNA da PCSK9 em células HepG2. Entre os compostos testados, a Moracina C exibiu uma atividade significativa, com um valor de concentração inibitória média (IC_{50}) para inibição da expressão de 16,8 μ M (**Figura 17**) (PEL et al., 2017a).

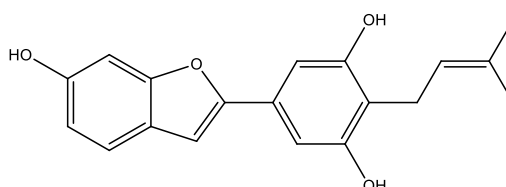


Figura 17. Estrutura química do produto natural Moracina C (Adaptada de Pel et al., 2017a).

Sparassis crispa é um cogumelo comestível e medicinal, conhecido como cogumelo couve-flor e que pertence à família das Sparassidaceae. Os corpos de frutificação de *S. crispa* possuem vários constituintes bioativos, como β -glicanos, derivados de benzoato, sesquiterpenóides e derivados do ácido maleico, dotados de inúmeras propriedades farmacológicas que são relevantes para a saúde humana, incluindo efeitos antitumorais, aumento da resposta hematopoiética, cicatrização de feridas, efeitos antimetastáticos, anti-hipertensivos e antidiabéticos. Recentemente, Bang e colaboradores (2017) isolaram quatorze compostos por cromatografia utilizando acetato de etila como solvente de extração dos corpos de frutificação de

S. crisper, sendo submetidos então ao ensaio de expressão de mRNA para PCSK9. Em particular, os compostos esparosídeo A, hanabiratakeliídeo A, adenosina, e 5 α ,6 α -epoxi-(22*E*,24*R*)-ergosta8(14),22-dieno-3 β ,7 β -diol (**Figura 18**) exibiram atividades inibitórias consideráveis quanto a expressão de mRNA, com valores de IC₅₀ de 20,07; 7,18; 18,46 e 8,23 μ M respectivamente.

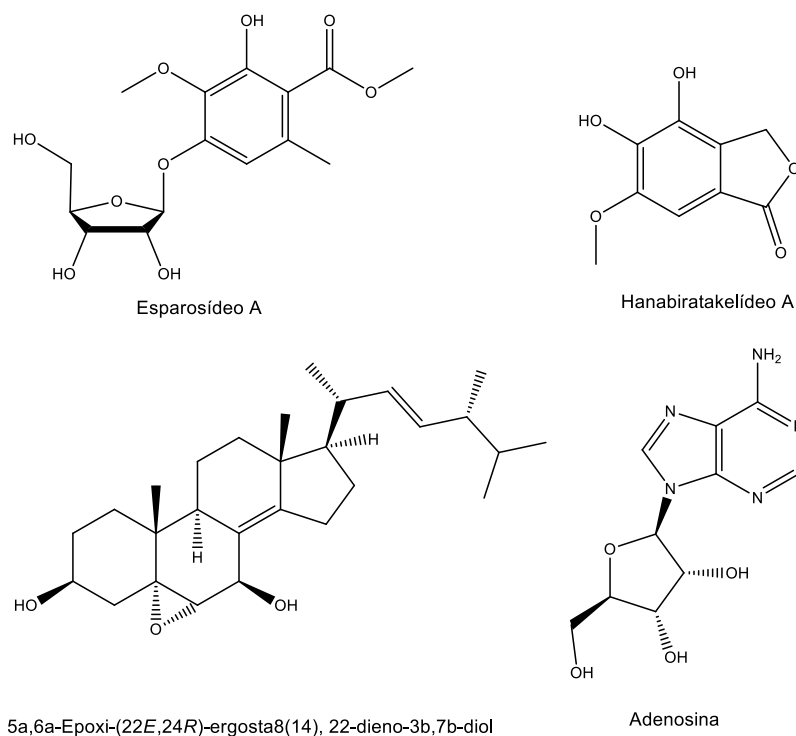


Figura 18. Estruturas químicas dos produtos naturais Esparosídeo A, hanabiratakeliídeo A, Adenosina, e 5 α ,6 α -epoxi-(22*E*,24*R*)-ergosta8(14), 22-dieno-3 β ,7 β -diol (Adaptada de Bang et al., 2017).

As lignanas são um grande grupo de polifenóis que apresentam atividades farmacológicas que são benéficas à saúde, como anticarcinogênica, anti-inflamatória e antioxidante. Investigações fitoquímicas dos frutos de *Schisandra chinensis* levaram ao isolamento de trinta compostos que foram testados quanto à capacidade de inibição da expressão de mRNA de PCSK9 em células HepG2. Entre os compostos testados, uma lignana do tipo tetraidrofurano, a manglisina E e três lignanas do tipo dibenzociclooctadieno, a esquisandrina C, schinlignana D e schisandrol B (**Figura 19**) exibiram atividade inibitória potente com valores IC₅₀ de 3,15; 3,15; 3,85; 0,36 e 1,10 mM respectivamente (PEL et al., 2017b). A Sauchinona, uma lignana isolada de *Saururus chinensis*, também demonstrou efeito no

metabolismo do colesterol em células HepG2, aumentando a expressão do LDLR pela regulação negativa dos níveis de PCSK9 (**Figura 20**) (CHAE et al., 2018).

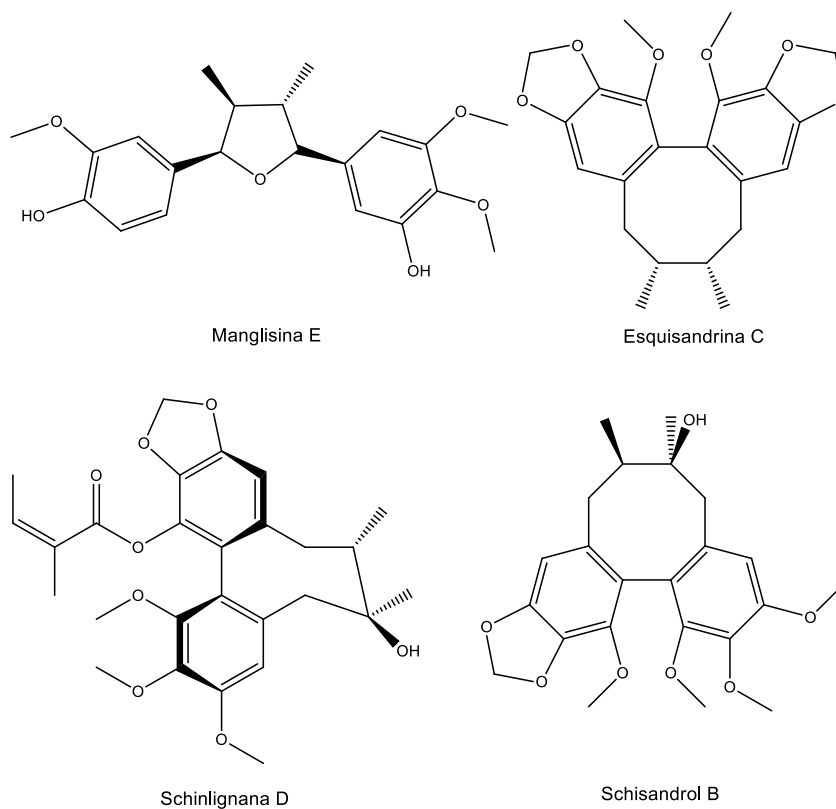


Figura 19. Estruturas químicas dos produtos naturais Manglisina E, Esquisandrina C, Schinlignana D e Schisandrol B (Adaptada de Pel et al., 2017b).

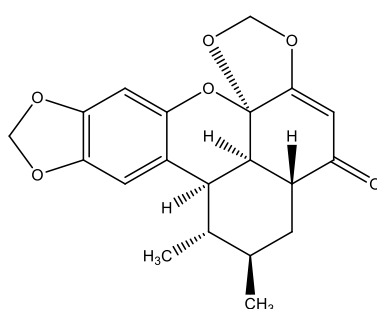


Figura 20. Estrutura química do produto natural Sauchinona (Adaptada de Masagalli et al., 2021).

A *Sophora tonkinensis* é uma erva usada tradicionalmente na China e na Coreia para o tratamento de dermatite, hemorragia gastrointestinal e inflamação de garganta. Investigações fitoquímicas das raízes secas e dos rizomas de *Sophora*

tonkinensis levaram ao isolamento e identificação de dezessete compostos que foram avaliados quanto aos seus efeitos na expressão de mRNA de PCSK9. Entre os compostos testados, a eribraedina D foi a que apresentou maior potencial inibitório da expressão em estudo, com valor de IC₅₀ de 7,8 µM (**Figura 21**) (AHN et al., 2019).

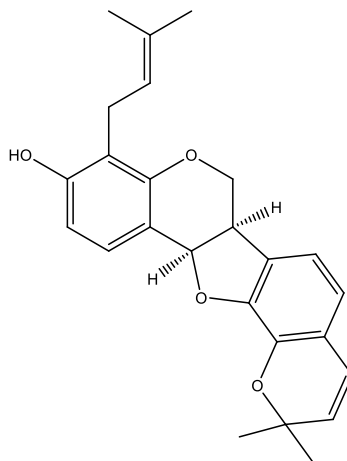


Figura 21. Estrutura química do produto natural Eribradina D (Adaptada de AHN et al., 2019).

A pinostrobin é uma flavonona que está presente no mel e em diversas plantas como *Pinus strobus*, *Cajanus cajan*, *Boesenbergia rotunda* e *Boesenbergia pandurata* e que demonstrou possuir inúmeras propriedades como antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e neuroprotetoras (**Figura 22**). Nesse contexto, Gao e colaboradores (2018) investigaram o efeito hipocolesterolêmico da pinostrobin e os mecanismos subjacentes utilizando modelo com células HepG2. Os resultados mostraram que a pinostrobin, na concentração de 40 µM, foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de maturação da proteína PCSK9 em células hepáticas, além de suprimir a atividade catalítica dessa proteína. Além disso, esse composto foi capaz de aumentar o nível de LDLR e a atividade de captação de LDL pela regulação positiva do nível de FOXO3a e supressão da atividade de HNF-1α, o que levou à inibição da transcrição de PCSK9.

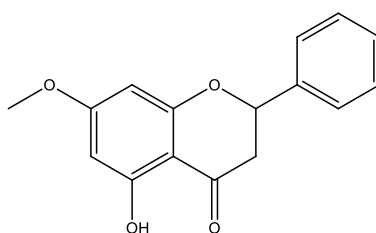


Figura 22. Estrutura química do produto natural Pinostrobin (Adaptada de Gao et al., 2018).

Basak e colaboradores (2018) investigaram a atividade hipolipidêmica das plantas *Allium sativum*, *Mimosa pudica*, *Enicostemma littorale*/*Swertia japônica* e *Coleus forskohlii* que contém a alicina, mimosina, swertiamarina e forscolina (**Figura 23**), respectivamente, como principais constituintes químicos. As substâncias foram analisadas de forma isolada e avaliadas a partir de estudos *in vitro*, utilizando como modelo duas linhagens de células hepáticas humanas (Huh7 e HepG2), quanto a sua capacidade de inibir a PCSK9 humana e de aumentar os níveis de LDLR. Os resultados observados para ambos os modelos de células hepáticas mostraram que os quatro fitocompostos promoveram o aumento da expressão de LDLR sem alterar significativamente os níveis de PCSK9. Em particular, a mimosina e forscolina exibiram atividade mais potente, o que levou aos autores a propor um mecanismo em que esses compostos poderiam atuar ligando-se ao domínio EGF-A do LDLR, o que impediria a ligação de PCSK9 e, conseqüentemente, reduziria a degradação de LDLR.

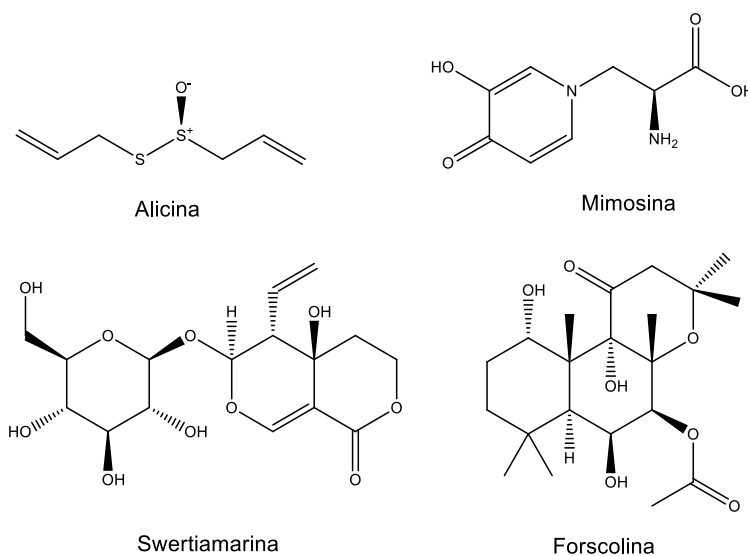


Figura 23. Estruturas químicas dos produtos naturais Alicina, Mimosina, Swertiamarina e Forscolina (Adaptada de Basak et al., 2018).

Os produtos naturais marinhos têm despertado o interesse em todo o mundo nas últimas cinco décadas. Nesse contexto, os produtos marinhos derivados de algas marrons que apresentavam atividade hipolipidêmica atraíram a atenção de

Yang e colaboradores (2015) que investigaram o mecanismo do oligossacarídeo de alginato (AOS) (**Figura 24**) no metabolismo do colesterol em células HepG2 e em camundongos. Os resultados mostraram que, no ensaio *in vitro*, a expressão de LDLR aumentou pela redução dos níveis de mRNA de PCSK9 decorrente da regulação negativa da expressão de HNF-1 α . No ensaio *in vivo*, o tratamento por via oral de camundongos com AOS durante duas semanas levou a um aumento da expressão de LDLR associada à capacidade do AOS em reduzir a expressão de PCSK9, o que resultou na diminuição dos níveis plasmáticos de LDL.

Outro produto marinho derivado da alga marrom *Ascophyllum nodosum*, o fucoidan (**Figura 24**), foi avaliado com relação ao seu potencial hipolipemiante. No estudo, foi utilizado modelo animal de camundongos mantidos com uma dieta rica em gordura e tratados por gavagem, avaliando-se duas concentrações de fucoidan. Após o período de seis semanas de tratamento, observou-se que o fucoidan foi capaz de reduzir em 51% e 76% a expressão da proteína PCSK9 nos grupos tratados com 50 e 200 mg/kg/dia, respectivamente, quando comparado com grupo controle, concluindo que o fucoidan é capaz de promover a expressão de LDLR pela regulação negativa de PCSK9 (YANG et al., 2019).

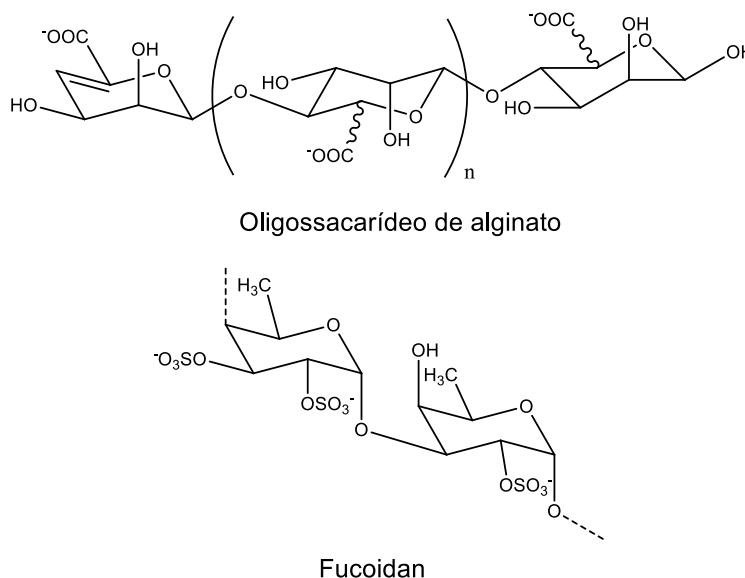


Figura 24. Estruturas químicas dos produtos de origem marinha oligossacarídeo de alginato e fucoidan (Adaptada de Zhang et al., 2018).

5.3.2.3 Substâncias sintéticas

Além de produtos naturais, compostos sintéticos têm sido explorados na busca por substâncias que modulem a ação da PCSK9 em humanos.

No trabalho de Petersen e colaboradores (2016), foi realizada uma triagem fenotípica de alto rendimento com 2,55 milhões de substâncias contra células CHO-K1 expressando uma forma recombinante de PCSK9, a fim de se identificar compostos que reduzissem o nível dessa proteína secretado pela célula ao meio. Nesse estudo, identificou-se o composto R-IMPP ((*R*)-*N*-(isoquinolin-1-il)-3-(4-metoxifenil)-*N*-(piperidin-3-il)propanamida) (**Figura 25**), que mostrou baixa citotoxicidade, indicando sua segurança para uso, e atividade anti-secretagoga de PCSK9, com uma IC_{50} de 4,8 μ M. Em investigações de mecanismo de ação desse composto, percebeu-se que R-IMPP não era capaz de afetar a transcrição de PCSK9 ou mesmo aumentar sua degradação, mas sim inibir sua síntese proteica. Foi sugerido por ensaios *in vitro* que o mecanismo de inibição da síntese proteica de PCSK9 baseia-se na ligação seletiva de R-IMPP a ribossomos 80S humanos, o que bloqueia a tradução de PCSK9, sendo o mecanismo dependente do reconhecimento de uma sequência específica do mRNA que codifica a região *N*-terminal da proteína, composta por um peptídeo sinal e uma porção de seu pró-domínio.

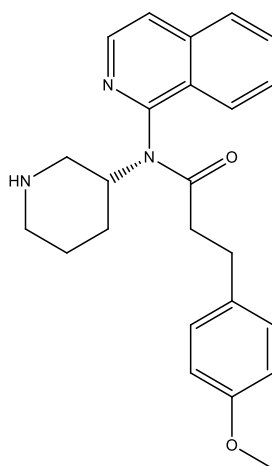
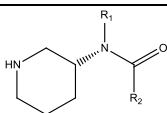
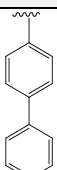
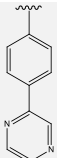
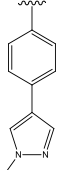
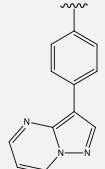
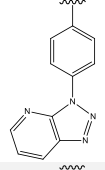
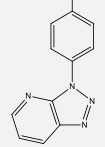


Figura 25. Estrutura química do composto R-IMPP (Adaptada de Petersen et al., 2016).

Considerando o sucesso de R-IMPP, análogos estruturais desse composto com propriedades farmacocinéticas otimizadas foram sendo propostos. As propriedades farmacocinéticas do R-IMPP, incluindo seu peso molecular, coeficiente de partição, avaliações de permeabilidade e segurança foram consideradas

adequadas a um potencial candidato a fármaco. No entanto, a depuração intrínseca (Cl_{int}) determinada *in vitro* com extratos microssomais hepáticos de rato (RLM = 510 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$) foi consideravelmente superior à encontrada em modelos microssomais hepáticos humanos (HLM = 20,6 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$), o que representou um obstáculo inicial à continuação de estudos *in vivo* com modelos animais. Com objetivo de melhorar a potência relacionada à capacidade de inibição de síntese proteica de PCSK9 e a depuração do composto nos ensaios *in vivo*, Londregan e colaboradores (2018) sintetizaram compostos com modificações estruturais em duas regiões da estrutura de R-IMPP, indicadas como R1 e R2, conforme mostrado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Potência e propriedades dos análogos de R-IMPP.

						
Composto	R ₁	R ₂	PCSK9 ProLuc IC ₅₀ (μM)	LipE ^a	RLM Cl_{int}^b ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	HLM Cl_{int}^c ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)
1a			54% ^d	2,4	10,7	50,7
1b			4,30	4,7	11,0	123
1c			1,06	5,1	13,3	-
1d			0,69	5,4	14,5	31,2
1e			0,39	5,4	21,8	-
1f			0,38	6,0	9,7	18,2

Fonte: Adaptada de Londregan et al., 2018

^aEficiência lipofílica. ^bDepuração intrínseca por microsomas hepáticos de rato. ^cDepuração intrínseca por microsomas hepáticos humanos. ^dEfeito percentual a 20 µM.

Na posição R1, o substituinte bifenila (**1a**, **Tabela 2**) conferiu uma melhor depuração intrínseca, porém houve diminuição na potência. Com isso em mente, foram sintetizados novos compostos com diversos substituintes em R1, gerando **1b**, **1c**, **1d** e **1e** (**Tabela 2**), que apresentaram perfis significativamente melhorados tanto com aumento da potência quanto com propriedades farmacocinéticas mais adequadas. Na posição R2, a troca do anel isoquinolínico por um sistema cloropiridínico proporcionou o desenvolvimento do composto **1f** (**Tabela 2**), com valores de depuração microsomais hepáticos satisfatórios e eficiência lipofílica (LipE) modestamente melhorada, sendo assim selecionado para estudos de segurança e eficácia *in vivo*, passando a assumir o nome PF-06446846 (LINTNER et al., 2017). A administração oral do composto reduziu os níveis plasmáticos de PCSK9 e colesterol total em ratos sem demonstrar sinais de toxicidade hepática. No entanto, PF-06446846 induziu efeitos adversos externos ao fígado, que incluem distúrbios hematopoiéticos, o que impediu o desenvolvimento clínico do composto. Em relação ao mecanismo de ação, de forma similar ao R-IMPP, o composto PF-06446846 manteve a ligação seletiva ao ribossomo 80S humano, inibindo a tradução de PCSK9 em torno do códon 34 (LINTNER et al., 2017).

Evison e colaboradores (2020) relatam que, ao se analisar do ponto de vista molecular a região de interação entre a PCSK9 e LDLR, a principal dificuldade em se conseguir substâncias de baixo peso molecular que consigam inibir essa interação proteína-proteína se dá por envolver uma superfície plana, sem bolsos de interação a serem explorados. Porém, uma análise pormenorizada do domínio catalítico da PCSK9 permitiu a identificação de um potencial bolso de interação nas proximidades da região de interação PCSK9-LDLR, mais especificamente na região C-terminal do pró-domínio, composto pelos resíduos His₂₂₆, Leu₂₃₀, Leu₂₅₃, Thr₂₆₄, Leu₂₈₆, Leu₂₈₉, Ala₂₉₀, Leu₂₉₇, Asn₃₁₇ e Ser₃₈₆. Foi hipotetizado então por esses pesquisadores que a ocupação desse sítio poderia prevenir a interação entre PCSK9 e LDLR. Com isso em mente, foi realizado um estudo de triagem computacional de substâncias com afinidade por esse sulco de interação adjacente, sendo o potencial de interação do fármaco nilotinibe identificado nessas análises.

O nilotinibe é um inibidor de BCR-ABL tirosina quinase, utilizado no tratamento de leucemia mieloide crônica. Esse fármaco teve sua ação inibitória da

função da PCSK9 validada por ensaios *in vitro*, apresentando uma IC_{50} de 15,9 μM , porém a atividade original contra quinases é um fator que limitaria seu uso para manejo de hipercolesterolemia. Comprovada a hipótese e com o objetivo de melhorar sua atividade contra PCSK9 e minimizar a sua atividade inibidora de quinase indesejada nesse contexto, foram propostas alterações em três porções da sua estrutura química do nilotinibe, indicadas como R, R1 e R2 na **Figura 26** (EVISON et al., 2020).

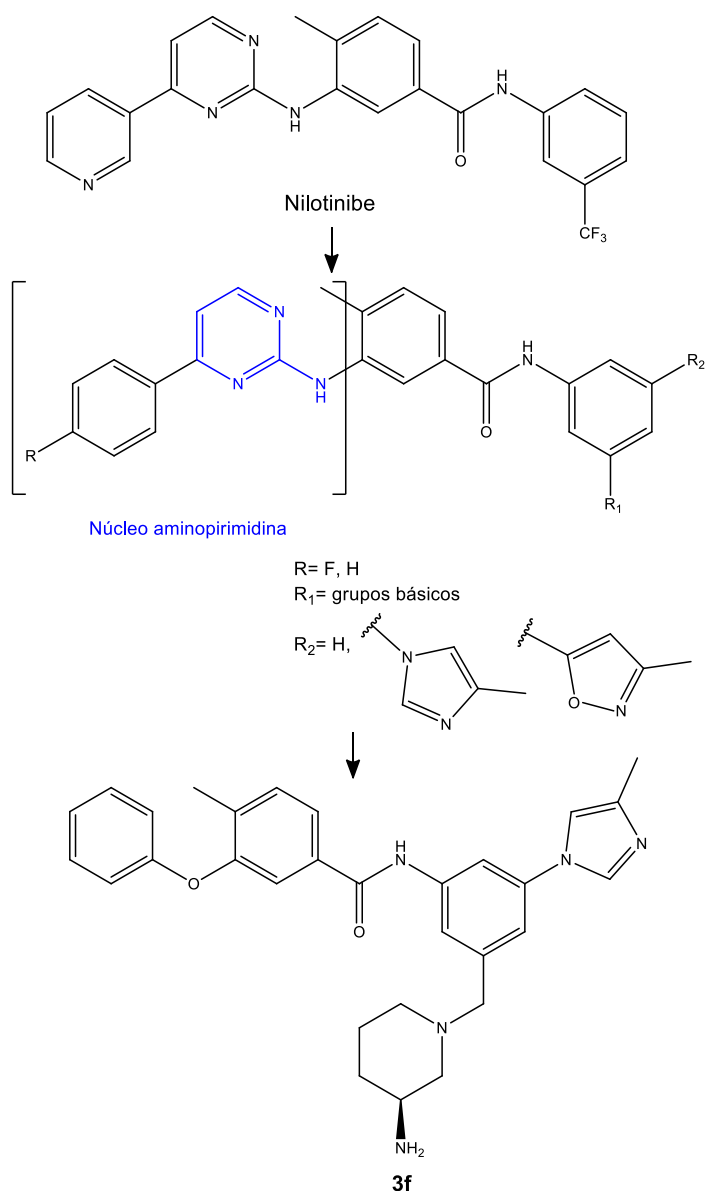


Figura 26. Estratégia de planejamento de novos compostos a partir do nilotinibe e composto *hit* **3f** (Adaptada de Evison et al., 2020).

Inicialmente, percebeu-se que a substituição do anel piridínico presente no nilotinibe por um grupo fenila não substituído reduzia consistentemente a atividade inibitória de quinase. Assim, sugeriu-se a introdução do átomo de flúor como substituinte no grupo arila, na posição R (**Figura 26**). A introdução do flúor foi sugerida por conferir estabilidade metabólica ao reduzir as chances de metabolismo do anel aromático. A introdução de grupos básicos como substituinte aromático em R₁ tinha como fundamentação uma interação potencial, observadas em análises computacionais, com a cadeia lateral ácida de Asp₂₁₂ de PCSK9 que poderia ser explorada. Por fim, como substituinte aromático em R₂, poderiam ser trabalhados sistemas heteroaromáticos, como imidazol e isoxazol a fim de se otimizar a interação com o alvo. Nas avaliações de atividade realizadas, foi constatado que a introdução do substituinte flúor na posição R no grupo arila não trouxe melhoras no contexto da inibição de PCSK9-LDLR. A introdução do grupo aminopiperidina como grupo básico em R₁ foi crucial para o aumento da potência inibitória, o que foi atribuído à interação sugerida. A substituição aromática em R₂ por um grupo metilisoxazol tende a reduzir a potência, sendo assim então mantido o grupo metilimidazol nessa posição nos demais derivados sintetizados, além de reduzir a seletividade de ação contra PCSK9 em relação às quinases. Por fim, a modificação na porção fenil-aminopirimidina, comum a inibidores de quinases, por grupos diversos e que reduzissem o volume dos compostos, como éteres de arila, contribuiu para garantir a seletividade (EVISON et al., 2020).

Entre os compostos testados, apenas o composto **3f** (**Figura 26**) demonstrou prevenir a interação PCSK9-LDLR a níveis nanomolares *in vitro* (IC₅₀ = 537 nM) e baixa atividade inibitória contra um painel de tirosina quinases (IC₅₀ > 10 µM), garantindo assim uma maior seletividade de ação e menor possibilidade de efeitos adversos. Além disso, o tratamento de animais com esse composto por dez dias na concentração de 16,4 mg/kg/dia permitiu uma redução significativa, mesmo que modesta, da concentração de colesterol plasmático nos animais tratados, indicando que a estratégia elaborada no trabalho pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores de PCSK9 (EVISON et al., 2020).

Petrilli e colaboradores (2020), utilizando a técnica de espectrometria de massa/seleção por afinidade, identificaram o composto **1** (**Figura 27**) como potencial ligante a um sítio alostérico da PCSK9, localizado na região entre o domínio catalítico e o domínio C-terminal da proteína. Quando bloqueado, a proteína assume

uma conformação inativa, o que faz com que perca sua função. Em um ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC), que mede a mudança na estabilidade térmica da proteína após a ligação do ligante, o composto **1** levou a uma variação da temperatura de fusão (ΔT_m) de 2,0°C, o que sugeriu que a molécula é capaz de estabilizar a PCSK9 por meio de interações não covalentes com os resíduos Arg³⁵⁷, Asp³⁶⁰ e Arg⁴⁵⁸.

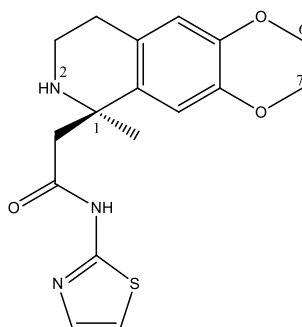


Figura 27. Estrutura do inibidor alostérico de PCSK9 **1**, identificado por estudos de espectrometria de massas/seleção por afinidade (Adaptada de Petrilli et al., 2020).

Considerando o efeito estabilizador do composto **1**, este foi selecionado para ser modificado nas posições 1 e 2 de sua estrutura (**Figura 27**), o que permitiria uma melhor compreensão de aspectos de relação estrutura-atividade. No entanto, as modificações realizadas na posição 1, próximo ao grupo amida, não foram bem toleradas e as tentativas de substituir ou remover o grupo amino na posição 2 foram deletérias, considerando a importância da interação da amina com o resíduo ácido de Asp³⁶⁰. Posteriormente, investigou-se o efeito de diferentes substituintes nas posições 6 e 7 (**Figura 27**), dando origem aos compostos **2** a **7**, mostrados na **Tabela 3**. Entre os compostos testados, **6** e **7** apresentaram os maiores ΔT_m em ensaio de DSC. Com relação a modificações na posição 7, foi constatado que a introdução do sistema aromático substituído com o grupo carboxila nos compostos **2-7** resultou em um aumento do ΔT_m , o que foi atribuído à interação do grupo ácido com a cadeia lateral do grupo guanidina do resíduo de Arg⁴⁵⁸. A introdução de um átomo de flúor na posição meta ao grupo etóxi resultou em maior ΔT_m , como observado para os compostos **3**, **6** e **7**, o que foi atribuído à ligação de hidrogênio adicional com o resíduo de Arg⁴⁷⁶. Com relação a modificações na posição 6, constatou-se que introdução do tetraidropirano foi tolerada, como pode ser

observado nos compostos **4**, **6** e **7**, e que o seu regioisômero, introduzido como substituinte no composto **5**, levou a uma diminuição no valor de ΔT_m , o que indica a importância da posição do oxigênio no anel para interação com o resíduo de Arg³⁵⁷ (Tabela 3).

Tabela 3. Dados de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) para os compostos **2** a **7**.

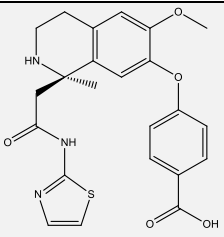
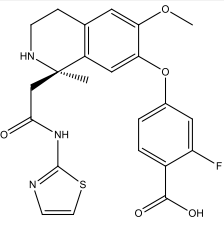
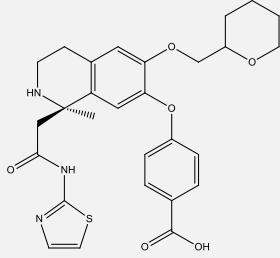
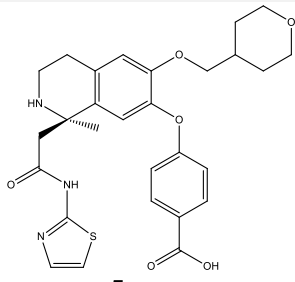
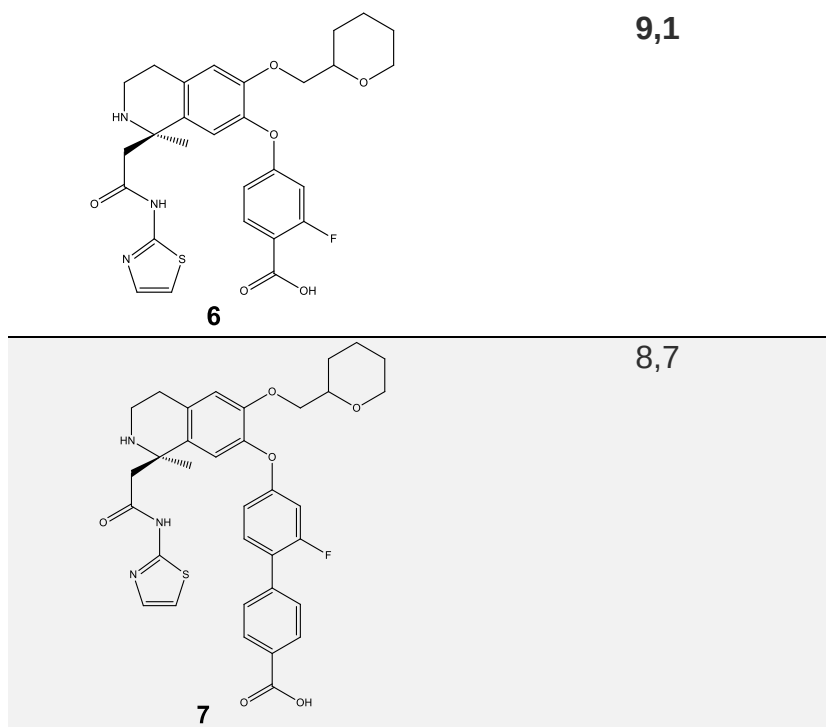
Estrutura	ΔT_m
 2	5,9
 3	7,1
 4	7,2
 5	4,0

Tabela 3. Dados de Calorimetria exploratória diferencial (DSC) para os compostos **2** a **7** (conclusão)



Fonte: Adaptada de Petrili et al., 2020

Uma última modificação proposta na posição 6 levou à proposta do composto **16** (**Figura 28A**), derivado do composto **7**, sendo esse o composto com maior destaque entre os planejados, considerando que **16** conseguiu reduzir os níveis intracelulares de PCSK9, apresentando concentração de degradação (DC_{50}) de 4,8 μ M da forma pro-PCSK9 e DC_{50} de 3,4 μ M da forma madura de PCSK9. Para o composto **16**, as interações cruciais com PCSK9 foram mantidas, mesmo com a introdução da fração Arg(Boc)₃ na posição 6, considerado um elemento de recrutamento de proteassoma independente de ubiquitina e que foi projetado para fora do sítio de ligação alósterico, conforme mostrado na **Figura 28B** (PETRILLI et al., 2020).

Min e colaboradores (2015) buscaram identificar potenciais inibidores da interação PCSK9-LDLR usando a abordagem de triagem *in silico*. Os resíduos de aminoácidos 367 a 381 da PCSK9, situados onde o domínio EGF(A) do LDLR se liga, foram designados como alvo dos potenciais inibidores. A simulação de docking molecular entre compostos químicos do banco de dados ChemBridge (em torno de

450 mil compostos) e a estrutura cristalográfica da PCSK9, usando o software GOLD, permitiu a seleção dos cem compostos com as melhores pontuações no estudo *in silico* para avaliação de suas atividades *in vitro* por meio de ensaio de ligação PCSK9-LDLR, análises por imunoblot dos níveis de LDLR e avaliação da captação celular de LDL. Em particular, o composto **CB_36** (**Figura 29**), que apresentou a maior pontuação de docking, foi capaz de inibir a interação PCSK9-LDLR, aumentar a quantidade de LDLR e a captação de LDL em células HepG2. Posteriormente, foi realizado ensaio *in vivo* e os resultados mostraram que o composto reduziu significativamente a concentração plasmática do colesterol total e de LDL em camundongos normais, sendo que este efeito não foi observado em camundongos knockout para PCSK9.

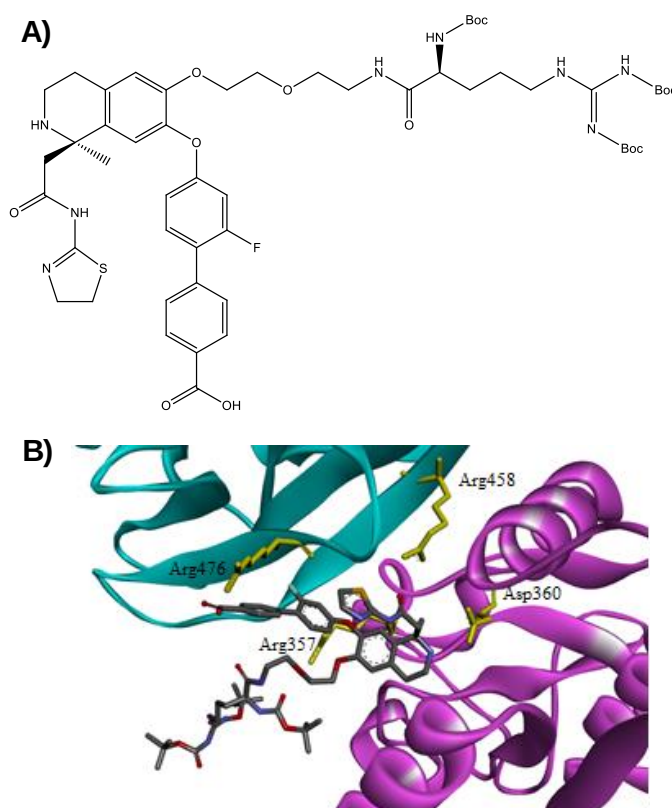


Figura 28. Estrutura do composto **16** (A) e sua forma de interação com o complexo PCSK9-LDLR (B) (PDB ID: 6U26). O domínio catalítico da PCSK9 está representado em fitas em lilás, os resíduos Arg₄₇₆, Arg₄₅₈, Arg₃₅₇ e Asp₃₆₀ na forma de bastões amarelos e domínio C-terminal (DRCH) como fitas em ciano (Adaptada de Petrilli et al., 2020).

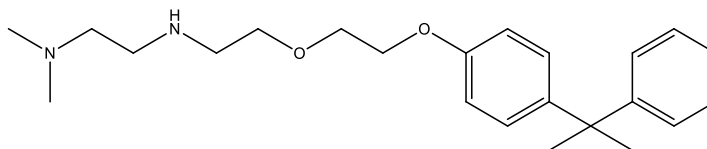


Figura 29. Estrutura do composto sintético **CB_36** (Adaptada de Min et al., 2015).

Zainab e colaboradores (2021) buscaram identificar potenciais inibidores direcionados a PCSK9 através da triagem *in silico*. Os anti-hipertensivos, pertencente a classe de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), como o captopril, zofenopril, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, fosinopril, cilazapril, moexipril, trandolapril, desempenham um papel essencial no retardo da progressão da aterosclerose, o que poderia sugerir um papel desses compostos como inibidores da PCSK9. A fim de compreender o potencial de interação desses compostos com essa proteína, foi realizado um estudo de docking molecular, sendo os compostos que formaram os complexos com a PCSK9 de menor energia de ligação selecionados para construção de modelos farmacofóricos. Os modelos selecionados foram posteriormente utilizados para identificação de compostos a partir do banco de dados ZINC com base nesses modelos farmacofóricos determinados, encontrando um total de 1033 moléculas, que foram submetidas a simulações de docking molecular com a estrutura cristalográfica da PCSK9 para entender suas interações. O docking molecular revelou os dez principais *hits* inibidores de PCSK9, incluindo substâncias de origem natural e sintética, como apomorfina, oxifenciclimina, (*R*) e (*S*)-canadina, naltrexona, ácido oxolínico, norfloxacin, hesperetina, labetalol e benorilato. Esses dez ligantes foram submetidos a estudos de dinâmica molecular na presença da proteína, para avaliação da estabilidade do complexo formado. Entre os complexos ligante-proteína, aquele formado por PCSK9 e (*S*)-canadina (**Figura 30**), um alcaloide benzilisoquinolínico, demonstrou alta estabilidade nos estudos de dinâmica molecular, sendo recomendado como *hit* para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores de PCSK9 em futuras pesquisas *in vitro*.

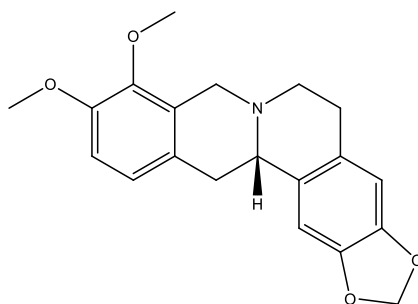


Figura 30. Estrutura do composto natural (*S*)-canadina (Adaptada de Zainab et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

O estudo molecular do alvo PCSK9 permitiu a compreensão do seu papel na regulação da atividade do LDLR no hepatócito, ressaltando sua importância na homeostase do colesterol. A PCSK9 pode interagir extracelularmente e intracelularmente com o LDLR e direcioná-lo à degradação lisossomal, o que reduz a quantidade de LDLR na superfície celular e, conseqüentemente, promove o aumento das concentrações plasmáticas de LDL, sendo sua expressão gênica modulada por fatores transcricionais como o SREBP-2, HNF1 α e FOXO3.

O desenvolvimento dos anticorpos monoclonais direcionados a PCSK9 constitui uma terapia bem-sucedida e mais avançada na atualidade, estando aprovados desde 2015 dois medicamentos, o alirocumabe e o evolocumabe, para uso em determinado público-alvo, enquanto que o terceiro anticorpo, o bococizimabe o estudo foi interrompido devido imunogenicidade. Os dois primeiros medicamentos demonstram grande eficácia na redução dos níveis de LDL, boa margem de segurança e bem tolerados. Contudo, o seu alto custo e a via de administração são limitações para o uso em geral.

A descoberta de substâncias não peptídicas e de baixo peso molecular capazes de inibir a PCSK9 e que possam ser usadas por via oral emergiram como um grande desafio devido à interface do sítio de interação das proteínas. Os estudos de potenciais inibidores relatam produtos naturais e sintéticos capazes de modular a PCSK9 de várias formas: inibindo a síntese e/ou a expressão de PCSK9, prevenindo a interação de PCSK9 e LDLR e direcionando a degradação por meio de um ligante. Como perspectivas futuras, esta revisão fornece informações para o desenvolvimento de novos agentes inibidores de PCSK9 considerando que os compostos *hits* de origem natural e sintética relatados podem servir como base para a identificação e planejamento de análogos mais potentes, seletivos e seguros. Por fim, esse campo ainda precisa ser mais explorado para que os inibidores não peptídicos de PCSK9 possam ser considerados de fato alternativas viáveis para o tratamento de hipercolesterolemia.

REFERÊNCIAS

ABIFADEL, Marianne et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nature genetics**, v. 34, n. 2, p. 154-156, 2003.

AGUAR, R. Boldova et al. Hiperlipidemias secundarias. Mecanismos etiopatogénicos. Impacto vascular y tisular de las hiperlipidemias. Historia natural. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 9, n. 18, p. 1105-1114, 2004.

AHN, Jongmin et al. Prenylated flavonoids from the roots and rhizomes of *Sophora tonkinensis* and their effects on the expression of inflammatory mediators and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. **Journal of natural products**, v. 82, n. 2, p. 309-317, 2019.

BARTER, Philip J.; RYE, Kerry-Anne. New era of lipid-lowering drugs. **Pharmacological reviews**, v. 68, n. 2, p. 458-475, 2016.

BASAK, Ajoy et al. Small Molecule Phytocompounds as Promoters of LDL-receptor and PCSK9 Inhibition: Potential Role as Non-statin Based Cardio-protective Agents. In: **Cardioprotective Natural Products: Promises And Hopes**. 2018. p. 277-318.

BANACH, Maciej et al. Statin intolerance—an attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel: This paper is also published in parallel in Archives of Medical Science [Banach M, Rizzo M, Toth PP, et al. Statin intolerance—an attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. Arch Med Sci 2015; 11 (1): 1–23]. **Expert opinion on drug safety**, v. 14, n. 6, p. 935-955, 2015.

BANG, Sunghee et al. New aromatic compounds from the fruiting body of *Sparassis crispa* (Wulf.) and their inhibitory activities on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mRNA expression. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 30, p. 6152-6157, 2017

BAUMANN. G. P.; JAMESON J. L.; Hipercolesterolemia e Hipertrigliceridemia. In LONGO, D. L. et al. **Manual de Medicina de Harrison**. 18 ed. Porto Alegre: AMGH, cap.189, p. 1172-1179, 2013.

BERGERON, Nathalie et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibition: a new therapeutic mechanism for reducing cardiovascular disease risk. **Circulation**, v. 132, n. 17, p. 1648-1666, 2015.

BHATNAGAR, Deepak; SORAN, Handrean; DURRENTON, Paul N. Hypercholesterolaemia and its management. **Bmj**, v. 337, 2008.

BRESLOW, Jan L. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary heart disease susceptibility. **Annual review of genetics**, v. 34, p. 233, 2000.

BUNNOY, Anurak et al. Monascus purpureus-fermented Thai glutinous rice reduces blood and hepatic cholesterol and hepatic steatosis concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.

BURKE, Amy C. et al. PCSK9: regulation and target for drug development for dyslipidemia. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 57, p. 223-244, 2017.

CAMPO, Rafael. Estudios clínicos con inhibidores de la PCSK9. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 24, p. 13-18, 2017.

CANNON, Christopher P. et al. 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**, v. 36, n. 19, p. 1186-1194, 2015.

CARVALHO, Luiz Sergio F. de; SPOSITO, Andrei C. Sintomas musculares relacionados ao uso de estatinas. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, p. f: 180-I: 189, 2016

CASTILLA-GUERRA, L.; FERNÁNDEZ-MORENO, M. C.; RICO-CORRAL, M. A. Cholesterol and stroke: role of PCSK9 inhibitors. **Neurología (English Edition)**, v. 34, n. 3, p. 198-203, 2019.

CATAPANO, Alberico L. et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). **Atherosclerosis**, v. 217, p. 1-44, 2011.

CHAUDHARY, Rahul et al. PCSK9 inhibitors: a new era of lipid lowering therapy. **World journal of cardiology**, v. 9, n. 2, p. 76, 2017.

CHAE, Hee-Sung et al. Sauchinone controls hepatic cholesterol homeostasis by the negative regulation of PCSK9 transcriptional network. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.

CHEN, Hung-Chen et al. Tanshinone IIA modulates low density lipoprotein uptake via down-regulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0162414, 2016.

COHEN, D. E.; ARMSTRONG, E. J. Farmacologia do metabolismo do colesterol e das lipoproteínas. In: GOLAN, D. E. et al. **Princípios de Farmacologia: A base fisiológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 23. p.384 - 403, 2009.

CORRAL, P.; RUIZ, A. J. Inhibidores de PCSK-9, efectos sobre el cLDL e implicaciones futuras: lo que se debe saber. **Hipertensión y riesgo vascular**, v. 34, n. 4, p. 176-183, 2017.

CUI, Chuan-Jue; LI, Sha; LI, Jian-Jun. PCSK9 and its modulation. **Clinica chimica acta**, v. 440, p. 79-86, 2015.

DAVIDSON, Michael H. et al. Management of hypercholesterolaemia in postmenopausal women. **Drugs & aging**, v. 19, n. 3, p. 169-178, 2002.

DAVIGNON, Jean. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. **Circulation**, v. 109, n. 23_suppl_1, p. III-39-III-43, 2004.

DONG, Bin et al. Inhibition of PCSK9 transcription by berberine involves down-regulation of hepatic HNF1 α protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 7, p. 4047-4058, 2015.

EATON, Charles B. Hyperlipidemia. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 32, n. 4, p. 1027-1055, 2005.

ELGUINDY, Ahmed; YACOUB, Magdi H. The discovery of PCSK9 inhibitors: A tale of creativity and multifaceted translational research. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2013, n. 4, p. 39, 2014.

ESTÉBANEZ, Beatriz C. et al. Estrategia para el diagnóstico de las dislipidemias. Recomendación 2018. **Rev. lab. clín**, p. e21-e33, 2019.

EVANS, Rhys D.; HAUTON, David. The role of triacylglycerol in cardiac energy provision. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 10, p. 1481-1491, 2016.

EVISON, Benny J. et al. A small molecule inhibitor of PCSK9 that antagonizes LDL receptor binding via interaction with a cryptic PCSK9 binding groove. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 6, p. 115344, 2020.

FAHY, Eoin et al. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1811, n. 11, p. 637-647, 2011.

FALA, Loretta. Repatha (evolocumab): second PCSK9 inhibitor approved by the FDA for patients with familial hypercholesterolemia. **American health & drug benefits**, v. 9, n. Spec Feature, p. 136, 2016.

FALUDI, André Arpad et al. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose–2017. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FERRARI, Filipe et al. PCSK9 inhibitors: clinical relevance, molecular mechanisms, and safety in clinical practice. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, p. 453-460, 2019

FONTES-CARVALHO, Ricardo et al. Guia prático para a utilização dos inibidores da PCSK9 em Portugal. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 38, n. 6, p. 391-405, 2019.

GAGNÉ, Claude et al. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. **The American journal of cardiology**, v. 90, n. 10, p. 1084-1091, 2002.

GAO, Wan-Yun et al. Pinostrobin inhibits proprotein convertase subtilisin/kexin-type 9 (PCSK9) gene expression through the modulation of FoxO3a protein in HepG2 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 24, p. 6083-6093, 2018.

GLERUP, Simon et al. Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease. **Basic research in cardiology**, v. 112, n. 3, p. 1-23, 2017.

GOLOMB, Beatrice A.; EVANS, Marcella A. Statin adverse effects. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 8, n. 6, p. 373-418, 2008.

HAJAR, Rachel. PCSK 9 inhibitors: A short history and a new era of lipid-lowering therapy. **Heart views: the official journal of the Gulf Heart Association**, v. 20, n. 2, p. 74, 2019.

HEGELE, Robert A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2009.

HESS, Connie N.; LOW WANG, Cecilia C.; HIATT, William R. PCSK9 inhibitors: mechanisms of action, metabolic effects, and clinical outcomes. **Annual review of medicine**, v. 69, p. 133-145, 2018.

HU, Miao; CHEUNG, Bernard MY; TOMLINSON, Brian. Safety of statins: an update. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 3, n. 3, p. 133-144, 2012.

ITO, Matthew K.; SANTOS, Raul D. PCSK9 inhibition with monoclonal antibodies: modern management of hypercholesterolemia. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 7-32, 2017.

IZQUIERDO, E. S. et al. Hiperlipidemias secundarias. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 19, p. 1137-1144, 2012.

KARR, Samantha. Epidemiology and management of hyperlipidemia. **The American journal of managed care**, v. 23, n. 9 Suppl, p. S139-S148, 2017.

KASTELEIN, John JP et al. ODYSSEY FH I and FH II: 78 week results with alirocumab treatment in 735 patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. **European heart journal**, v. 36, n. 43, p. 2996-3003, 2015.

KEREIAKES, Dean J. et al. 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**, v. 169, n. 6, p. 906-915. e13, 2015.

KLEIN-SZANTO, Andres JP; BASSI, Daniel E. Keep recycling going: new approaches to reduce LDL-C. **Biochemical pharmacology**, v. 164, p. 336-341, 2019.

KRÄHENBÜHL, Stephan; PAVIK-MEZZOUR, Ivana; VON ECKARDSTEIN, Arnold. Unmet needs in LDL-C lowering: when statins won't do!. **Drugs**, v. 76, n. 12, p. 1175-1190, 2016.

LAMIQUIZ-MONEO, Itziar et al. Variantes de un solo nucleótido asociadas con la hipercolesterolemia poligénica en familias diagnosticadas de hipercolesterolemia familiar. **Revista Española de Cardiología**, v. 71, n. 5, p. 351-356, 2018.

LAVECCHIA, Antonio; CERCHIA, Carmen. Recent advances in developing PCSK9 inhibitors for lipid-lowering therapy. **Future medicinal chemistry**, v. 11, n. 5, p. 423-441, 2019.

LANDMESSER, Ulf et al. European Society of Cardiology/European Atherosclerosis Society Task Force consensus statement on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors: practical guidance for use in patients at very high cardiovascular risk. **European Heart Journal**, v. 38, n. 29, p. 2245-2255, 2017.

LINTNER, Nathanael G. et al. Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain. **PLoS biology**, v. 15, n. 3, p. e2001882, 2017.

LONDREGAN, Allyn T. et al. Small Molecule Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibitors: Hit to Lead Optimization of Systemic Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5704-5718, 2018.

MACCHI, C. et al. Changes in circulating pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 levels—experimental and clinical approaches with lipid-lowering agents. **European journal of preventive cardiology**, v. 26, n. 9, p. 930-949, 2019.

MASAGALLI, Jagadeesh Nagarajappa et al. Synthesis of Moracin C and Its Derivatives with a 2-arylbenzofuran Motif and Evaluation of Their PCSK9 Inhibitory Effects in HepG2 Cells. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1327, 2021.

MANN, Devin M. et al. Predictors of nonadherence to statins: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 44, n. 9, p. 1410-1421, 2010.

MANNIELLO, Marina; PISANO, Michele. Alirocumab (Praluent): first in the new class of PCSK9 inhibitors. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 41, n. 1, p. 28, 2016.

MATÍAS-PÉREZ, Diana; PÉREZ-CAMPOS, Eduardo; GARCÍA-MONTALVO, Iván Antonio. Una visión genética de la hipercolesterolemia familiar. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. 6, p. 2421-2426, 2015.

MELLENDEZ, Quantil M. et al. Hypercholesterolemia: The role of PCSK9. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 625, p. 39-53, 2017.

MERCHÁN, A. et al. Familial Hypercholesterolemia: review article. **Rev Colomb Cardiol**, v. 23, n. S4, p. 4-26, 2016.

MIN, Dong-Kook et al. In silico screening of chemical libraries to develop inhibitors that hamper the interaction of PCSK9 with the LDL receptor. **Yonsei medical journal**, v. 56, n. 5, p. 1251-1257, 2015.

MONTAÑO-SOSA, Magaly et al. Inhibición de PCSK9: una nueva alternativa para reducir el colesterol y prevenir la enfermedad cardiovascular aterosclerosa. **Medicina interna de México**, v. 33, n. 2, p. 226-237, 2017.

MORIARTY, Patrick M. et al. Efficacy and safety of alirocumab vs ezetimibe in statin-intolerant patients, with a statin rechallenge arm: the ODYSSEY ALTERNATIVE randomized trial. **Journal of clinical lipidology**, v. 9, n. 6, p. 758-769, 2015.

MOSTAZA, José María; LAHOZ, Carlos. Nuevas pautas en el tratamiento de las dislipidemias. **Medicina Clínica**, v. 142, n. 7, p. 306-309, 2014.

NATARAJAN, Pradeep; KATHIRESAN, Sekar. PCSK9 inhibitors. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1037, 2016.

NICHOLLS, Stephen J. et al. Effect of evolocumab on progression of coronary disease in statin-treated patients: the GLAGOV randomized clinical trial. **Jama**, v. 316, n. 22, p. 2373-2384, 2016.

NISSEN, Steven E. et al. Efficacy and tolerability of evolocumab vs ezetimibe in patients with muscle-related statin intolerance: the GAUSS-3 randomized clinical trial. **Jama**, v. 315, n. 15, p. 1580-1590, 2016.

PAGE, Michael M.; WATTS, Gerald F. PCSK9 inhibitors—mechanisms of action. **Australian prescriber**, v. 39, n. 5, p. 164, 2016.

PEDRO-BOTET, Juan; BADIMÓN, Lina. PCSK9: estructura y función. PCSK9 y receptor de lipoproteínas de baja densidad. Mutaciones y cambios derivados de estas. **Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis**, v. 28, p. 3-8, 2016.

PEL, Pisey et al. Chemical constituents with proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mRNA expression inhibitory activity from dried immature *Morus alba* fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 26, p. 5316-5321, 2017a.

PEL, Pisey et al. Lignans from the fruits of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill inhibit proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression. **Phytochemistry**, v. 136, p. 119-124, 2017b.

PETERSEN, Donna N. et al. A small-molecule anti-secretagogue of PCSK9 targets the 80S ribosome to inhibit PCSK9 protein translation. **Cell chemical biology**, v. 23, n. 11, p. 1362-1371, 2016.

PETRILLI, Whitney L. et al. From screening to targeted degradation: strategies for the discovery and optimization of small molecule ligands for PCSK9. **Cell chemical biology**, v. 27, n. 1, p. 32-40. e3, 2020.

OUT, Carolien; GROEN, Albert K.; BRUFAU, Gemma. Bile acid sequestrants: more than simple resins. **Current opinion in lipidology**, v. 23, n. 1, p. 43-55, 2012.

RAAL, Frederick J. et al. PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9965, p. 331-340, 2015a.

RAAL, Frederick J. et al. Inhibition of PCSK9 with evolocumab in homozygous familial hypercholesterolaemia (TESLA Part B): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 385, n. 9965, p. 341-350, 2015b.

RADER DJ; HOBBS HH. Distúrbios do metabolismo das lipoproteínas. In: KASPER, Dennis L. et al. **Medicina interna de Harrison**. 19. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2017. v.1 e 2, cap. 421.

RAEDLER, Lisa A. Praluent (Alirocumab): First PCSK9 inhibitor approved by the FDA for hypercholesterolemia. **American Health & Drug Benefits**, v. 9, n. Spec Feature, p. 123, 2016.

REISS, Allison B. et al. PCSK9 in cholesterol metabolism: from bench to bedside. **Clinical Science**, v. 132, n. 11, p. 1135-1153, 2018.

RENSSEN, Patrick CN et al. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 251-276, 2001.

RIDKER, Paul M. et al. Evaluating bococizumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on lipid levels and clinical events in broad patient groups with and without prior cardiovascular events: Rationale and design of the Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of vascular Events (SPIRE) Lipid Lowering and SPIRE Cardiovascular Outcomes Trials. **American Heart Journal**, v. 178, p. 135-144, 2016.

RIDKER, Paul M. et al. Cardiovascular efficacy and safety of bococizumab in high-risk patients. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1527-1539, 2017.

ROBINSON, Jennifer G. et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 16, p. 1489-1499, 2015.

ROTH, Eli M.; MCKENNEY, James M. ODYSSEY MONO: effect of alirocumab 75 mg subcutaneously every 2 weeks as monotherapy versus ezetimibe over 24 weeks. **Future cardiology**, v. 11, n. 1, p. 27-37, 2015.

ROTHER, Anne L.; COLLARD, Charles D. Atherosclerosis and the genetic basis of lipoprotein disease. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 15, n. 2, p. 169-183, 2001.

RUIZ, Álvaro J. PCSK-9: papel en las hipercolesterolemias y anticuerpos monoclonales específicos inhibitorios. **Revista Colombiana de Cardiología**, v. 24, p. 4-12, 2017.

SABATINE, Marc S. et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 18, p. 1713-1722, 2017.

SÁNCHEZ, J. Merino; GUILLÉN, VF Gil. Hiperlipidemias. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 9, n. 23, p. 1512-1526, 2004.

SCHWARTZ, Gregory G. et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 22, p. 2097-2107, 2018.

SEIDAH, Nabil G. et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal

differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 928-933, 2003.

SEIDAH, Nabil G.; PRAT, Annik. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 5, p. 367-383, 2012.

SHENDE, Vikram Ravindra et al. Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver-specific knockdown of HNF1 α in normolipidemic mice [S]. **Journal of lipid research**, v. 56, n. 4, p. 801-809, 2015.

SILVA, PM. Metabolismo lipídico e diagnóstico das dislipidemias primárias. **Revista Fatores de Risco**, 38, 10-25, 2015.

SIRTORI, Cesare R. The pharmacology of statins. **Pharmacological research**, v. 88, p. 3-11, 2014.

SMIT, Jan WA; DIAMANT, Michaela. Genetically defined hyperlipidemia. **Pharmacogenomics**, v. 5, n. 3, p. 295-304, 2004.

SOBATI, Saeideh et al. PCSK9: a key target for the treatment of cardiovascular disease (CVD). **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 4, p. 502, 2020.

STAELS, Bart. A review of bile acid sequestrants: potential mechanism (s) for glucose-lowering effects in type 2 diabetes mellitus. **Postgraduate medicine**, v. 121, n. sup1, p. 25-30, 2009.

STROES, Erik S. et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy—European Atherosclerosis Society consensus panel statement on assessment, aetiology and management. **European heart journal**, v. 36, n. 17, p. 1012-1022, 2015.

SVIRIDOV, Dmitri; NESTEL, Paul. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 245-254, 2002.

TSOUKA, Aikaterini N; TELLIS, Constantinos C.; TSELEPIS, Alexandros D. Pharmacology of PCSK9 inhibitors: Current status and future perspectives. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 31, p. 3622-3633, 2018.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA approves add-on therapy for patients with genetic form of severely high cholesterol. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-add-therapy-patients-genetic-form-severely-high-cholesterol> (acesso em: 5 abril 2021).

XU, Shengtao et al. Small molecules as inhibitors of PCSK9: Current status and future challenges. **European journal of medicinal chemistry**, v. 162, p. 212-233, 2019.

WALLACE, Alan; CHINN, David; RUBIN, Greg. Taking simvastatin in the morning compared with in the evening: randomised controlled trial. **Bmj**, v. 327, n. 7418, p. 788, 2003.

WANG, Yu et al. Polydatin ameliorates lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus by downregulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). **Cardiovascular diabetology**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2016.

WIGGINS, Barbara S. et al. Evolocumab: considerations for the management of hyperlipidemia. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 20, n. 4, p. 1-13, 2018.

WHO. World Health Organization [homepage na Internet]. Cardiovascular Diseases (CVDs) 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> Acesso em: 05 jun. 2022.

YANG, Ji Hye et al. Alginate oligosaccharide enhances LDL uptake via regulation of LDLR and PCSK9 expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1393-1400, 2015.

YANG, Zixun et al. Fucoindan A2 from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* lowers lipid by improving reverse cholesterol transport in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 20, p. 5782-5791, 2019.

ZAINAB, Rida et al. Finding inhibitors for PCSK9 using computational methods. **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0255523, 2021.

ZÁRATE, Arturo et al. Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento. **Archivos de cardiología de México**, v. 86, n. 2, p. 163-169, 2016.

ZHANG, P., SHAO, Z., LI, L. et al. Molecular characterisation and biochemical properties of phosphomannomutase/phosphoglucomutase (PMM/PGM) in the brown

seaweed *Saccharina japonica*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 2687–2696, 2018.