

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS
E TOXICOLÓGICAS

JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS E
HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CORRELAÇÃO COM TERAPIA
FARMACOLÓGICA**

Belo Horizonte

2019

JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS E
HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CORRELAÇÃO
COM TERAPIA FARMACOLÓGICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Iêda de Fátima
Oliveira Silva - UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula
Lucas Mota - UFMG

Belo Horizonte
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS E HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: CORRELAÇÃO COM TERAPIA FARMACOLÓGICA


JÚNEA PAOLUCCI DE PAIVA SILVINO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 27 de março de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Ieda de Fátima Oliveira Silva - Orientadora
UFMG


Prof. ANA PAULA LUCAS MOTA
UFMG


Prof. Mauro Vinícius Bolívar Malachuk
Instituto de Pesquisa e Pós-graduação da Faculdade


Prof. Adilson de Paula Sabino
UFMG

Belo Horizonte, 27 de março de 2019.

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu marido Ricardo e a meus filhos Lucas e Bernardo, pelo quanto foram compreensivos e pacientes nos momentos em que me fiz ausente para dedicar à medicina e à ciência. Dedico também aos meus exemplos Tio Agostinho, Tio Ângelo, Tio Alberto Augusto e Tio Ruy, médicos do meu seio familiar que me mostraram sempre o amor à profissão. Dedico também, in memoriam, aos meus queridos pai e mãe, que tenho certeza, mesmo espiritualmente, devem estar orgulhosos de tudo que construí.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida e pelas oportunidades colocadas no meu percurso como provas de que teria que seguir em frente.

Agradeço à cidade de Bom Despacho que, mesmo não sendo filha da terra, me recebeu como se fosse. Pelo apoio em todas as minhas causas em prol da melhoria da vida das pessoas portadoras de doenças incuráveis, em especial aos pacientes portadores de Hipercolesterolemia Familiar que sempre se disponibilizam para meus projetos.

Agradeço a toda minha família, marido, filhos, sogro e sogra, irmãos, irmãs, cunhados, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas pelo apoio e interesse pelo meu trabalho, sempre me dando suporte e me incentivando.

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, a todos os professores e professoras da Faculdade de Farmácia em especial às professoras e orientadoras Iêda de Fátima Oliveira Silva e Ana Paula Lucas Mota do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, que abriram essa oportunidade de ingressar nesta instituição conceituada, que interessaram pelo meu projeto e que me acolheram. A vocês, muito obrigada, foi muito gratificante a convivência e os ensinamentos.

Agradeço aos laboratórios Márcio Jardim (Bom Despacho) e Analisi (Moema) e toda a equipe de bioquímicos e biomédicos, em especial ao Márcio Jardim e André pela parceria nas coletas e captação dos pacientes para execução do projeto, bem como, nas análises efetuadas em seus respectivos laboratórios.

Agradeço as minhas amigas e parceiras Alessandra Lovato, Rita Duarte, Maira, Pâmela, que muito colaboraram para a execução dos experimentos, sem a ajuda e dedicação de vocês, esse projeto não se concretizaria.

Agradeço às minhas secretárias e amigas, principalmente à Polliana, que além de auxiliarem no meu consultório, marcando e remarcando várias vezes a minha agenda para que eu pudesse me apresentar aos compromissos da pós-graduação, também me auxiliaram na busca e organização das coletas. Sem elas, também não seria possível a realização desse trabalho.

Agradeço a atenção, carinho, apoio e amizade da professora Karina Gomes Braga Borges que me auxiliou em projetos e trabalhos apresentados em eventos científicos.

Agradeço à professora Graça, todo incentivo e atenção ao meu projeto.

Agradeço à pesquisadora e bióloga do INCOR (Instituto do Coração do HC da USP), Cinthia Elim Jannes e toda a sua equipe, pela parceria que dará continuidade ao estudo desses pacientes.

Agradeço à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença genética de transmissão autossômica dominante, sendo, porém uma doença subdiagnosticada e subtratada. O objetivo desse estudo foi avaliar os parâmetros do perfil lipídico, inflamatório e hemostático em portadores de HF comparando os indivíduos tratados (estatina + ezetimiba) com os não-tratados. Neste estudo foram selecionamos casos-índices de HF atendidos no ambulatório de Endocrinologia da Prefeitura de Bom Despacho, com diagnóstico clínico definitivo, provável e possível pelos critérios de *Simon Broome* e *Dutch MEDPED* e, subsequente foi feito o rastreamento em cascata dos familiares com valores de colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular (LDLc) > 190 mg/dL em adultos e > 160 mg/dL em crianças. O estudo incluiu 80 pacientes de 3 a 85 anos de idade, de ambos os sexos, distribuídos em 02 grupos de tratados (T= 53) e não-tratados (NT= 27). O perfil lipídico, colesterol total (CT), colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular (HDLc) e triglicérides (TG), foi determinado pelo método Enzimático Colorimétrico e, LDLc pela equação de *Friedwald*, a proteína c reativa ultrasensível (PCRus) pelo Teste Rápido Quantitativo, a proproteína convertase subtilisina/kexina 9 (PCSK9) por ELISA, e o teste de geração de trombina (GT) pelo método do *Calibrated Automated Thrombogram* (CAT). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Minitab versão 2017. Diferenças significativas foram observadas quanto ao tratamento e sexo para o perfil lipídico, as mulheres não-tratadas apresentaram maiores níveis de CT, LDLc e Não-HDL e, quando tratadas, maiores níveis de HDLc e TG que os homens. Quanto ao uso da terapia hormonal, as mulheres em uso, apresentaram elevação significativa dos parâmetros de hemostasia e da PCRus em relação às não usuárias. Na análise de comparação entre faixas etárias, os indivíduos mais idosos se apresentaram mais hipercoaguláveis e com valores mais altos de forma significativa para o TG e PCSK9. E, a PCSK9 se correlacionou positivamente com os parâmetros do perfil lipídico e hemostasia nos grupos T e NT. Em síntese o uso da terapia combinada mostrou-se superioridade na redução do perfil lipídico e hemostático.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia familiar. PCSK9. Inflamação. Terapia farmacológica. Geração de trombina.

ABSTRACT

Familial Hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder from an autosomal dominant inheritance, being, however, a kind of disease sub-diagnosed and mistreated. This paper aim to assess the parameters of lipid profile, inflammatory and homeostasis with individuals suffering from FH by comparing patients treated (statin + ezetimibe) and those who were no treated though. For this study FH index-cases were selected from patients who were seen by physician at the ambulatory of Endocrinology City-hall of Bom Despacho City, with a clinical diagnostic, probable and possible by Simon Broome & Dutch MEDPED. In addition, a familiar screening cascade was performed for value of cholesterol present in the lipoprotein of low molecular weight (LDLc) $> 190\text{mg/dL}$ in adults and $> 160\text{ mg/dL}$ in children. This study included 80 males and females individuals from 03 to 85 years old, distributed into two treated groups (T=53) and not-treated (NT=27). The lipid profile, total cholesterol (TC), cholesterol present in the lipoprotein of high molecular weight (HDLc) and triglycerides (TG), which was determined by enzymatic colorimetric method and, LDLc by *Friedwald* equation, the protein C reactive ultra-sensitive (PCRus) by rapid quantitative test, the proprotein convertase subtilisina/kexina 9 (PCSK9) by ELISA, and the thrombin generation test (TG) by *Calibrated Automated Thrombogram* method (CAT). Estatistic analyses were performed by Minitab program version 2017. Significant differences were observed concerned to the treatment and gender towards the lipid profile, the women in the group not-treated have shown high levels of TC, LDLc and non-HDL and, for those women who were treated, higher levels of HDLc and TG contrary to the men. By considering hormonal therapy treatment, the women have presented increase significant homeostasis parameters and PCRus related those women who were not taken hormonal therapy. By comparing age group, elderly individuals have presented more hypercoagulated and presenting a higher significant values towards TG and PCSK9. PCSK9 has correlated positively towards the lipid profile parameters and homeostasis in the groups T as well as NT. In summary, the use of this combined therapy has shown a superiority reduction of lipid profile and homeostasis.

Keywords: Familial hypercholesterolemia. PCSK9. Inflammation. Pharmacological therapy. Thrombin generation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Metabolismo dos lipídeos.....	21
Figura 02: Representação da estrutura da PCSK9.....	22
Figura 03: Mecanismo de ação da PCSK9 no LDLR.....	23
Figura 04: Esquema de auto-regulação do colesterol intracelular.....	23
Figura 05: Xantoma tendinoso em tendão de Aquiles.....	25
Figura 06: Arco corneano.....	25
Figura 07: Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.....	32
Figura 08: Sistema da proteína C ativada.....	34

LISTA DE TABELA

Tabela 01 Critérios diagnósticos para a HF, baseado nos critérios da <i>Dutch Lipid Clinic Network</i> (DLCN).....	26
Tabela 02. Resultados do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e GT dos participantes do estudo (n=80).....	51
Tabela 03. Comparação entre os grupos NT e T, de acordo os seguintes parâmetros laboratoriais.....	53
Tabela 04. Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9(ng/mL), PCRus (mg/L) e GT (min, nM/min, nM, min) entre os grupos NT e T, comparando Homens (H) e Mulheres (M).....	54
Tabela 05. Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL), PCRus (mg/L) e GT (min, nM/min, nM, min) entre os grupos NT e T, comparando Jovens (J) e Adultos (A).....	55
Tabela 06. Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL), PCRus (mg/L) e GT(min, nM/min, nM, min) dos 80 participantes do estudo subdivididos em faixas etárias.....	56
Tabela 07. Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL), PCRus (mg/L) e GT (min, nM/min, nM, min) dos 80 participantes do estudo subdivididos em faixas etárias, comparando os subgrupos de idade 2 a 2.....	57
Tabela 08. Resultados do teste de GT(min, nM/min, nM, min) comparando os grupos de participantes NT e T, de acordo com as faixas etárias (3 a 17), (18 a 40) e (41 a 85) anos.....	57
Tabela 09. Resultados do perfil lipídico, PCSK9 e GT no grupo de Tcomparando osdois tipos de tratamento, estatina e ezetimiba + estatina.....	58
Tabela 10. Resultados das variáveis idade, perfil lipídico,PCSK9, PCRus e GT entre os grupos de mulheres sem e com terapia hormonal (n=46)	60
Tabela 11. Resultados dos coeficientes de correlação do teste de <i>Sperman</i> ($\rho > 0,3$ e $p < 0,05$) para os parâmetros analisados e o grupo NT (n=27).....	61
Tabela 12. Resultados dos coeficientes de correlação do teste de <i>Sperman</i> ($\rho > 0,3$ e $p < 0,05$) para os parâmetros analisados e o grupo T (n=53).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

apo-A1 - apolipoproteína A1

apo-B48 - apolipoproteína B48

apo-B100 - apolipoproteína B100

apo-E- apolipoproteína E

AT - Anti-trombina

CAT - *Calibrated Automated Thrombogram*

CETP - Proteína de transferência de ésteres de colesterol

CT - Colesterol total

DAC - Doença arterial coronariana

DCV - Doença cardiovascular

DGAT-2 - Enzima diacilglicerol aciltransferase-2

DLCN - *Dutch lipid clinic network*

EGF - Fator de crescimento epidermal

ETP - Endogenous thrombin potential

FT - Fator tissular

FII - fator II da coagulação

FV - Fator V da coagulação

FVII - Fator VII da coagulação

FVIII - Fator VIII da coagulação

FIX - Fator IX da coagulação

FX - Fator X da coagulação

FXI - Fator XI da coagulação

FXII - Fator XII da coagulação

FXIII - Fator XIII da coagulação

FvW- Fator de von willebrand

GPR109A-Receptor específico ligado à proteína G

GT - Geração de trombina

HDLc - Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular

HF - Hipercolesterolemia familiar

HMG-CoA - Hidroxi-metil-glutaril coenzima A

HMG-CoA redutase - Hidroxi- metilglutaril coenzima-A redutase

HNF1 - Fator nuclear 1

IDLc - Colesterol presente na lipoproteína de peso molecular intermediário

IL-1 α - Interleucina-1 α

JAK/STAT - Via janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição

LDLc- Colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular

LDLR-Receptor do colesterol da lipoproteína de baixa densidade

LDLox - Lipoproteína de baixo peso molecular oxidada

Lp(a)-Lipoproteína (a)

LPS - Lipopolissacárides

LRP1 - Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade

MTP - Proteína transferência microssômica

NARC1 - Convertase reguladora de apoptose neural 1

NF κ B - Fator nuclear kappa-light-enhancer

NPC1-L1 - *Niemann-pick C1-like 1*

NT - Grupo de participantes não-Tratados

PC - Proteína C

PCa- Proteína C ativada

PCR - Proteína c reativa

PCRus - Proteína C reativa ultrasensível

PCSK9-Proteína convertase subtilisina/kexina 9

ttPeak-Time to peak

PS - Proteína S

SB - *Simon e Broom* register group

SOCS 3 - Supressor de sinalização de citocinas 3

SREBP-1 - *Sterol regulatory element-binding protein 1*

SREBP-2 - *Sterol regulatory element-binding protein 2*

T - Grupo de participantes tratados

TAFI - Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina

TG - Triglicérides

TFPI - Inibidor da via do fator tecidual

TNF α - Fator necrose tecidual α

TP - Tempo de protrombina

TTPA - Tempo de tromboplastina parcial

US MEDPED - *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program*

VLDLc- Colesterol presente na lipoproteína de muito baixo peso molecular

VLDLR- Receptor do colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

1- INTRODUÇÃO	17
2 - FUNDAMENTO TEÓRICO	20
2.1 - Lipídeos e Metabolismo	20
2.2- Estrutura e papel fisiológico da PCSK9 no metabolismo do LDLc	21
2.3 – Hipercolesterolemia Familiar	24
2.3.1 - Diagnóstico da HF.....	24
2.3.2 - Rastreamento em cascata.....	26
2.3.3 - Metabolismo da LDLc na HF	27
2.3.4 - Mutação no LDLR	27
2.3.5- Mutação na apo-B	28
2.3.6- Mutação da PCSK9	28
2.4 - Tratamento Farmacológico	29
2.4.1- Estatinas.....	29
2.4.2- Inibidores de absorção de colesterol intestinal	29
2.4.3-Sequestrantes de ácidos biliares.....	30
2.4.4- Ácido nicotínico/niacina.....	30
2.4.5- Inibidores da PCSK9.....	30
2.5- Cascata da Coagulação e marcadores da hipercoagulabilidade e sistema fibrinolítico	31
2.5.1- Modelo de cascata da coagulação baseado em superfícies celulares	31
2.5.2- Geração de Trombina	34
2.5.3- Coagulação e Lipoproteínas.....	35
2.5.4- Coagulação e PCSK9	36
2.6 - Proteína C Reativa	36
2.6.1- Inflamação e PCR	37

2.6.2- Inflamação e PCSK9	37
2.6.3- Inflamação e Coagulação.....	39
3- JUSTIFICATIVA	40
4- OBJETIVOS.....	41
4.1- Objetivo Geral.....	41
4.2- Objetivos Específicos	41
5- METODOLOGIA.....	43
5.1- Aspectos Éticos.....	43
5.2- Casuística.....	43
5.3 - Protocolo de estudo	43
5.4 - Critérios de Inclusão.....	44
5.5 - Critérios de Exclusão.....	44
5.6 - Coleta das amostras para o estudo laboratorial.....	45
5.7 - Delineamento experimental.....	46
5.8- Métodos.....	46
5.8.1- Colesterol total	46
5.8.2- HDL colesterol.....	46
5.8.3- Triglicérides	47
5.8.4- LDLc	47
5.8.5- não-HDL.....	47
5.8.6- PCRus.....	47
5.8.7- PCSK9.....	48
5.8.8- Geração de Trombina	49
5.8.9- Análise estatística.....	49
6- RESULTADOS.....	51
7- DISCUSSÃO	63

8- CONCLUSÃO.....	72
9- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
10- LISTA DE ANEXOS.....	88
10.1 – Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	88
10.2 – Apêndice A - Termos de Consentimento e Assentimento Livre e Esclarecido	89
10.3- Apêndice B -Ficha clínica dos participantes.....	97
10.4- Certificado de Apresentação.....	99

1- INTRODUÇÃO

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença genética de transmissão autossômica dominante, caracterizada por níveis elevados da fração de colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular (LDLc) na corrente sanguínea, tendo como consequência a doença coronariana aterosclerótica precoce nesses pacientes, podendo resultar em infarto agudo do miocárdio e angina de peito (NORDESTGAARD *et al.*, 2013; TURGEON *et al.*, 2016; SHARIFI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

O diagnóstico clínico da HF em adultos é baseado em elevadas taxas do LDLc acima de 190 mg/dL e colesterol total (CT) acima de 310 mg/dL; em crianças e adolescentes não tratados LDLc \geq 160 mg/dL e CT \geq 230 mg/dL, associado ou não à presença de sinais físicos como xantomas tendinosos, que são depósitos de gordura principalmente nos tendões extensores das mãos, tendão de aquiles e patelar, um certo grau de arco corneano como sinal de depósito de colesterol na região da íris dos olhos e, história pessoal ou familiar de doença coronariana aterosclerótica precoce (NORDESTGAARD *et al.*, 2013; SHARIFI *et al.*, 2015; TURGEON *et al.*, 2016; YOUNGBLOM *et al.*, 2016).

A principal alteração no metabolismo lipídico tanto na infância quanto na adolescência é a HF, representada por lesões ateroscleróticas caracterizadas por níveis elevados de CT e LDLc, história familiar de hipercolesterolemia com morte prematura decorrente de doença cardiovascular em parentes de primeiro grau (DIRISAMER *et al.*, 2003).

A avaliação de marcadores laboratoriais envolvidos na patogênese e evolução da aterosclerose coronariana, tais como: o perfil lipídico convencional incluindo CT, LDLc, colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular (HDLc), triglicerídeos (TG) e a lipoproteína (a)[Lp(a)], fazem parte do acompanhamento da HF. A pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), a qual interfere no ciclo biológico do receptor de LDLc (LDLR) favorecendo a sua degradação e a proteína C reativa ultrasensível (PCRus), marcador inflamatório, são marcadores que podem dimensionar o risco cardiovascular em portadores de HF (LIMA *et al.*, 2007; HORTON *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; URBAN *et al.*, 2013). A doença aterosclerótica inicia silenciosamente na infância, progride durante a adolescência e início da idade adulta acarretando a doença cardiovascular (DCV) em adultos jovens (MCMAHAN *et al.*, 2006). Por outro lado, em pacientes com doença vascular arterial, já foram reportadas alterações dos parâmetros de geração de trombina (GT) que refletem a

aterosclerose (e seus fatores de risco) e vinculando-se ao risco de aterotrombose recorrente (coronariana ou acidente vascular cerebral) conforme revisado por Ten Cate (2012). Reforçando esta afirmativa, Smid *et al.* (2013) reportaram que pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) apresentaram aumento de GT comparados aos controles. Ainda, em consonância com estudos prévios, pacientes com hipertensão, conhecido fator de risco para doenças cardiovasculares, apresentaram aumento do potencial de geração de trombina quando comparados aos controles normais (ELIAS *et al.*, 2019). Entretanto, os estudos com foco em alterações hemostáticas e doenças cardiovasculares são limitados e carecem de estudos adicionais.

Os portadores da doença do sexo masculino, se não tratados farmacologicamente, mais de 50% deles irão apresentar um episódio coronariano antes dos 60 anos de idade (CTTC, 2010; NORDESTGAARD *et al.*, 2013). Com o tratamento, essas taxas diminuem chegando a equivaler a incidência igual a uma população normal. Em um estudo de meta-análise, foi observado que com o uso das estatinas obteve-se melhor eficácia e segurança na redução do LDLc de 2-3 nmol/L (36-54 mg/dL) com o tratamento farmacológico, reduzindo os riscos de eventos cardiovasculares em 40-50% (Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration 2010).

O tratamento farmacológico da HF baseia-se fundamentalmente na redução intensiva do LDLc. A recomendação para tratamento de primeira linha seria o uso de estatinas de meia-vida longa em doses mais elevadas (Rosuvastatina, Atorvastatina). As estatinas são drogas que atuam inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase) a etapa limitante da síntese do colesterol intracelular (VAUGHAN *et al.*, 2004). Em resposta à redução de colesterol livre nos hepatócitos, é produzida a ativação da via *sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP 2) que aumentam a transcrição e a expressão do gene do receptor de LDLc e um aumento da quantidade de receptores funcionais no hepatócito (VAUGHAN *et al.*, 2004).

A ezetimiba é outro fármaco que atua inibindo a absorção de colesterol na borda em escova do intestino delgado, através da interação com a proteína transportadora intestinal de esteróis *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1-L1), promovendo com isso a redução do aporte de colesterol do intestino para o fígado, e portanto, a carga de colesterol dos quilomícrons (GE *et al.*, 2008; DAVIS *et al.*, 2011). O uso dessas duas classes de medicamentos está aprovado em crianças portadoras de HF (CASTRO & OLIVEIRA, 2009; SBC, 2012). Como tratamento

adicional, inclui os sequestrantes de ácidos biliares, ácido nicotínico, que não farão parte deste estudo devido à baixa efetividade na prática clínica (CASTRO & OLIVEIRA, 2009). Cumpre ressaltar ainda a dificuldade de encontrá-los no mercado brasileiro (sequestrantes de ácidos biliares) e seus efeitos adversos gastrointestinais muito intensos em crianças no caso do ácido nicotínico, como miopatia, hiperuricemia e insuficiência hepática fulminante (CASTRO & OLIVEIRA, 2009).

Embora a triagem de indivíduos com risco de doença arterial coronariana (DAC) por meio de dosagens de lipídeos e lipoproteínas, fatores de risco modificáveis, já seja realizada na prática clínica, estudos adicionais envolvendo novos biomarcadores podem trazer *insights* no que se refere à predição de maior risco de DAC. O advento de novos marcadores de risco de DAC pode ser vantajoso do ponto de vista social, epidemiológico e econômico. Neste contexto, o presente estudo espera contribuir para um melhor entendimento sobre as alterações lipídicas, particularmente da PCSK9, e do potencial de geração de trombina, parâmetros ainda pouco explorados, e a relação destes com a HF.

2 - FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 - Lipídeos e Metabolismo

O colesterol da dieta, após sofrer ação dos ácidos biliares formando micelas, é absorvido nos enterócitos da porção do jejuno médio e íleo terminal do intestino delgado na presença da proteína transportadora do colesterol, a NPC1-L1, situada na porção apical da membrana na borda em escova dessas células. Os TG dietéticos são digeridos no duodeno e absorvidos no íleo proximal por meio da ação das lipases pancreáticas e intestinais e, na presença de ácidos biliares, eles são hidrolisados em glicerol, monoglicérides e ácidos graxos. Após a absorção, os lipídeos são agrupados novamente nas células epiteliais intestinais por meio da proteína de transferência microssômica (MTP) no retículo endoplasmático dos enterócitos. A combinação de triglicérides, colesterol, fosfolipídeos e apolipoproteína B-48 (apo-B48) formam os quilomícrons. Os quilomícrons são rapidamente captados através dos receptores hepáticos, os quais reconhecem a apo-B48 e a apolipoproteína E (apo-E), onde serão utilizados para a formação do colesterol presente na lipoproteína de muito baixo peso molecular (VLDLc) (BAYNES & DOMINICZAK, 2005; TIETZ, 2008; SBC, 2017) **Figura 01**.

Com a lipólise progressiva, o VLDLc se transforma em colesterol presente na lipoproteína de peso molecular intermediário (IDLc) e subsequente em LDLc. Os TG presentes no VLDLc e LDLc são posteriormente removidos pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) que troca pelos ésteres de colesterol do HDLc. Embora quase todas as células expressem receptores para LDLc, a maior parte do LDLc retorna para o fígado através do LDLR, que reconhece a apolipoproteína B100 (apo-B100) presente no LDLc (BAYNES & DOMINICZAK, 2005; TIETZ, 2008; SBC, 2017) **Figura 01**.

Figura 01- Metabolismo dos lipídeos

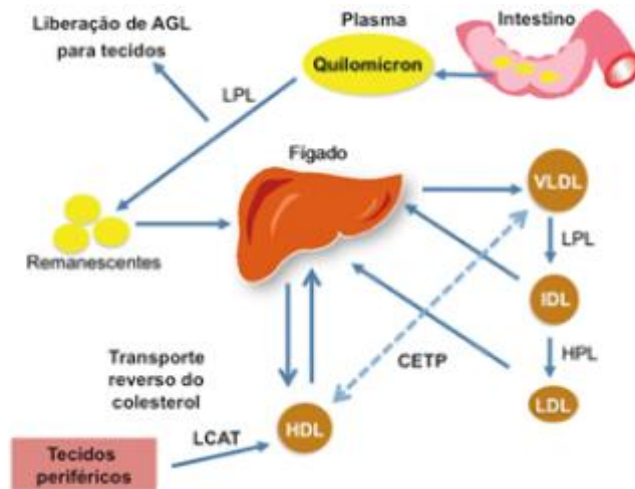


Figura 01 - Ciclos de transporte de lípidos no plasma. As lipoproteínas participam de três ciclos básicos de transporte de lípidos no plasma: (1) ciclo exógeno, no qual as gorduras são absorvidas no intestino e chegam ao plasma, sob a forma de quilomícrons, e, após degradação pela lipase lipoproteica (LPL), são direcionadas ao fígado ou tecidos periféricos; (2) ciclo endógeno, em que os lipídeos hepáticos se direcionam aos tecidos periféricos; a VLDL é secretada pelo fígado e, por ação da LPL, transforma-se em IDL e, posteriormente, em LDL, a qual carrega os lípidos, principalmente o colesterol, para os tecidos periféricos; (3) transporte reverso do colesterol, os lipídeos, principalmente o colesterol dos tecidos, retorna ao fígado; as HDL nascentes captam colesterol não esterificado dos tecidos periféricos pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), formando as HDL maduras; por meio da CETP, ocorre também a transferência de ésteres de colesterol da HDL para outras lipoproteínas, como as VLDL. AGL: ácidos graxos livres; HPL: lipase hepática. **Fonte:** Segundo Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2017.

2.2- Estrutura e papel fisiológico da PCSK9 no metabolismo do LDLc

A PCSK9 foi descoberta no ano de 2003, pelo pesquisador Seidah e, tendo sido inicialmente nomeada NARC-1. Tal proteína pertence à família proproteína convertase, sendo o nono membro da mesma, por tal motivo foi nomeada como PCSK9 (SEIDAH *et al.*, 2003; HORTON *et al.*, 2007; URBAN *et al.*, 2013; CORRAL, 2014). A PCSK9 é um zimogênio de 692 aminoácidos dos quais os resíduos de 1 a 30 constituem o peptídeo sinal. O restante dela é dividido em três domínios: o pró-domínio (N-terminal), o domínio catalítico e um domínio C-terminal rico em histidina e cisteína. O domínio catalítico é mediado por interação direta com o fator de crescimento epidermal (EGF). O domínio C-terminal é necessário pela sua capacidade de induzir a degradação do LDLR. O papel do domínio C-terminal é fortemente apoiado por dados usando um anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio C-terminal, que inibe a capacidade da PCSK9 de degradar o LDLR nas células e, diminui o LDLc

plasmático em macacos *Cynomolgus* (NI *et al.*, 2010; SCHIELE *et al.*, 2014; SCHULZ & SCHÜTLER, 2017). Sua síntese ocorre em muitos tecidos, mas principalmente no fígado e intestino delgado (ABIFADEL *et al.*, 2003; HORTON *et al.*, 2007; LAMBERT *et al.*, 2012; URBAN *et al.*, 2013; LEREN, 2014) **Figura 02.**

Figura 02– Representação da estrutura da PCSK9

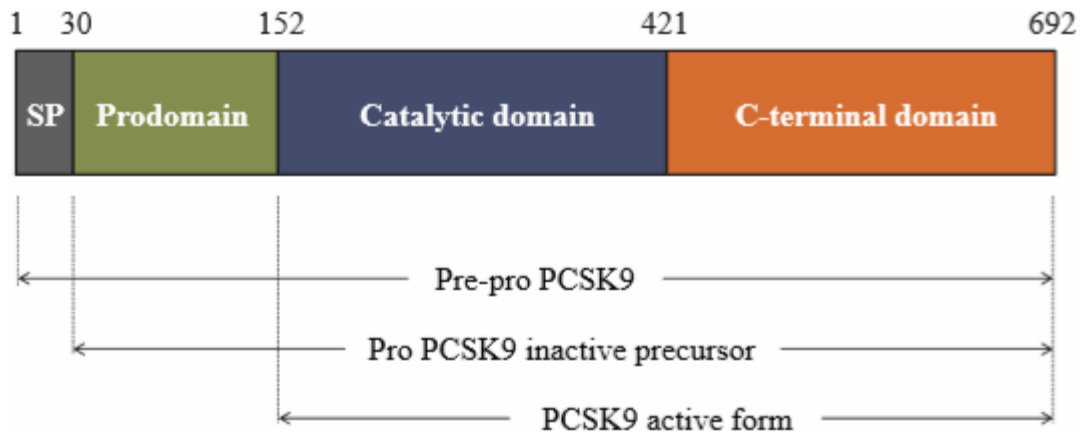


Figura 02- Estrutura da proteína PCSK9. A PCSK9 compreende de um peptídeo sinal (SP) com 1-30 aminoácidos, um pró-domínio (aminoácidos de 31-152), domínio catalítico (aminoácidos de 153-421) e um domínio C-terminal (aminoácidos de 422-692). O peso molecular da pró-PCSK9 é 75 kDa, e da forma madura de 62 kDa. Após a clivagem autocatalítica no retículo endoplasmático, o pró-domínio é separado do de 62 kDa, a PCSK9 proteína madura, e, ambos são secretados após a formação do complexo pro-seguimento PCSK9. SP- peptídeo sinal. PCSK9- proproteína convertase subtilisina/Kexina tipo9. **Fonte:** Segundo Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2017.

O mecanismo pelo qual a PCSK9 reduz a atividade do LDLR foi elucidado por Lagace e cols. em 2006, quando demonstraram que a PCSK9 circulante se liga ao LDLR e ao LDLc para ser internalizado pela célula. Normalmente, o LDLR liga-se ao LDLc removendo-o da circulação mediando a sua endocitose através de fossetas revestidas com clatrina. O pH baixo dos endossomos faz com que o LDLR se dissocie do LDLc e retorne para a superfície celular enquanto a partícula de LDLc é degradada nos lisossomos e, o colesterol é utilizado pela célula. Quando o LDLR se liga ao LDLc com a participação da PCSK9, também é endocitado pelo mesmo mecanismo dependente de clatrina, porém a ligação da PCSK9 e LDLR em meio ácido é mais forte e, então, ocorre a degradação lisossomal de todo o complexo (LDLc + LDLR + PCSK9) (STEIN & RAAL, 2014; MCKENNEY & FAHA, 2015; SCHULZ & SCHLÜTER, 2017) **Figura 03.**

Figura 03 – Mecanismo de ação da PCSK9 no LDLR

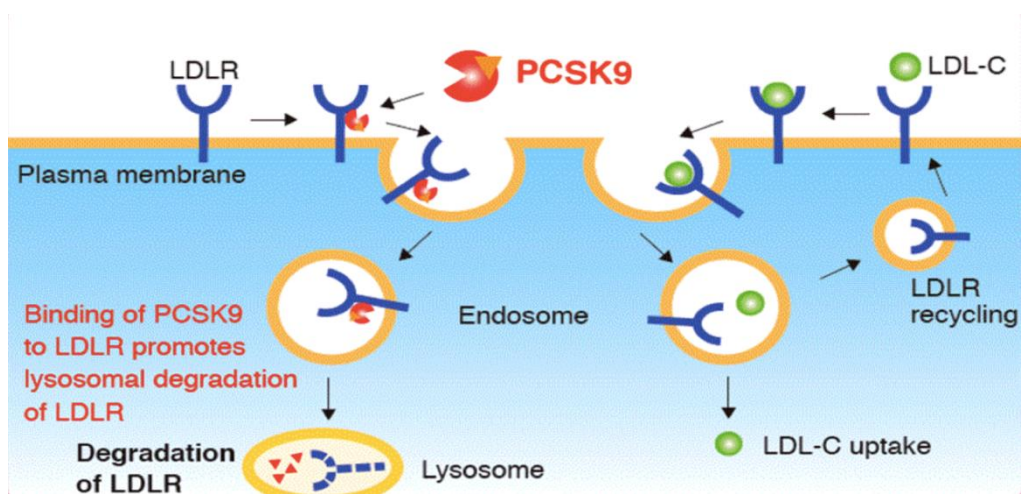


Figura 03 - Mecanismo da participação da PCSK9 no LDLR. A PCSK9 circulante que se liga ao LDLR e sofre endocitose e degradação lisossomal do receptor. Enquanto, se a PCSK9 não ligar ao LDLR, este sofre endocitose, é reciclado e retorna à superfície das células para novas captações de LDLc. **Fonte:** Segundo Caltag Medsystems, PCSK9 – Target for the next blockbuster drug, 2014.

A PCSK9 é codificada pelo gene PCSK9, localizada no cromossomo 1p32.3, com 22-Kb de comprimento e 12 exons. A transcrição dessa pró-proteína é modulada pelo fator de transcrição SREBP2, sendo o mesmo fator de transcrição para LDLR, demonstrando a auto-regulação na homeostase do colesterol intracelular, prevenindo a captação excessiva de colesterol pelo LDLR (URBAN *et al.*, 2013) **Figura 04.**

Figura 04- Esquema de auto-regulação de colesterol intracelular

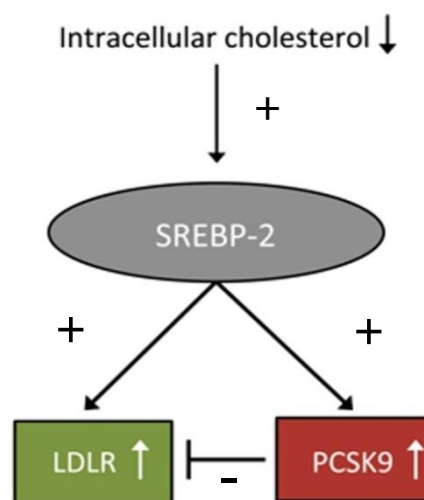


Figura 04- Esquema de auto-regulação da homeostase do colesterol intracelular. O baixo nível de colesterol intracelular ativa a via SREBP-2 mediando a expressão de LDLR, ocasionando o aumento da captação hepática de LDLc. Concomitantemente, SREBP-2 induz a expressão da PCSK9, aumentando a degradação hepática de LDLR, prevenindo então a captação excessiva de colesterol para preservar a homeostase. **Fonte:** Modificado segundo Journal of the American College Cardiology, 2013.

2.3 – Hipercolesterolemia Familiar

A HF é uma das causas genéticas mais comuns que pode levar à DAC devido aos altos níveis de LDLc circulante, os quais levam ao rápido desenvolvimento de aterosclerose precoce. Na prática, a HF está sendo diagnosticada no momento em que o indivíduo, na idade adulta jovem, apresenta algum evento cardiovascular. Os pacientes com HF requerem tratamento farmacológico criterioso, às vezes com associação de múltiplas drogas para reduzir os níveis de LDLc (NORDESTGAARD *et al.*, 2013; TURGEON *et al.*, 2016).

A prevalência mundial da forma heterozigótica é estimada numa proporção 1:200 a 1:500 indivíduos e a forma homozigótica, que é a mais rara, encontra-se numa prevalência em torno de 1:300.000 a 1:1.000.000, sendo esta a forma mais grave da doença (GOLDSTEIN *et al.*, 2001; AUSTIN *et al.*, 2004; NORDESTGAARD *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que existam entre 402.000 a 607.000 casos de HF e que menos de 1% são diagnosticados e tratados apropriadamente (JANNES *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016).

As mutações genéticas conhecidas até o momento que podem causar a HF são: 1) mutação no gene que codifica o LDLR nos hepatócitos (MOLTUSKI *et al.*, 1989). Mais de 1.800 mutações são descritas neste receptor, representando 85-90% dos casos de HF em todo mundo (LEIGH, 2008; COOPER, 2011); 2) mutação no gene que codifica a apoB-100, neste caso o LDLR não reconhece a apoB-100 como ligante e, o LDLc não é endocitado, aumentando seus níveis na corrente sanguínea (SORIA *et al.*, 1989; WHITFIELD *et al.*, 2004) e; 3) mutação com ganho de função da família do gene da pró-proteína convertase, cujo produto é a PCSK9. Esta codifica a proteína convertase reguladora de apoptose neural 1 (NARC1) e, participa do catabolismo do LDLR e, com isso, ocorre uma degradação acelerada do receptor, impedindo o catabolismo adequado do LDLc (SEIDAH *et al.*, 2003; ABIFADEL *et al.*, 2003; URBAN *et al.*, 2013; CORRAL, 2014). Independente das mutações genéticas que dificultam o metabolismo do LDLc (LDLR, apo-B e PCSK9), o fenótipo clínico será sempre de valores elevados da fração LDLc (PEREIRA *et al.*, 2012).

2.3.1 - Diagnóstico da HF

O diagnóstico clínico da HF é baseado em sinais clínicos de depósito de colesterol extravascular, como a presença de xantomas tendinosos e/ou arco corneano (**Figuras 05 e 06**). Contudo, também é dosado o perfil lipídico, a anamnese do paciente como o histórico familiar positivo para DCV prematura e ainda, a presença de níveis elevados de colesterol em

familiares. Os testes genéticos são utilizados para confirmação do diagnóstico, tendo em vista que a presença dos sinais clínicos, apesar de levantar grande suspeita de HF, muitas vezes não resulta em um diagnóstico correto (BOUHAIRIE & GOLDBERG, 2015).



Figura 05– Xantoma tendinoso em tendão de aquiles – Fonte: *Harrison – Princípios de Medicina Interna*, 19ª Ed, 2016.



Figura 06- Arco corneano. Fonte: SBC 2012

Existem três critérios diagnósticos clínicos para HF: o *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN), *US Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program* (US MEDPED) e o *Simon Broome Register Group* (SB), em que o escore é calculado a partir de dados específicos considerando as características clínicas do paciente. Embora não esteja disponível até o momento uma validação para a classificação da HF na população brasileira, é recomendada pela I Diretriz Brasileira de HF, a *Dutch MEDPED* (junção do critério DLCN e US MEDPED) com inclusão dos critérios de *Simon Broome Register Group*. O escore DLCN leva em consideração o histórico familiar ou pessoal de DAC prematura, sinais físicos e, níveis elevados de LDLc e, sugere ainda análise genética se a pontuação for > 5 . O diagnóstico definitivo de HF é dado quando o escore for > 8 (SBC, 2012; CATAPANO *et al.*, 2017). Os critérios de diagnósticos para a HF, baseados nos critérios da *Dutch MEDPED* foram os seguidos neste estudo, **conforme tabela 01**, abaixo.

Tabela 01: Critérios diagnósticos para a HF, baseado nos critérios da *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN)

Parâmetro	Pontos
História familiar	
- Parente de 1º grau portador de doença vascular/coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)OU - Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total > 290 mg/dL*	1
- Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano OU - Parente de 1º grau < de 16 anos com colesterol total > 260 mg/dL*	2
História clínica	
- Paciente portador de doença arterial coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	2
- Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	1
Exame físico	
Xantoma tendinoso	6
Arco corneano < 45 anos	4
Nível de LDLc (mg/dL)	
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Análise do DNA	
Presença de mutação funcional do gene do receptor de LDLc, da apo-B100 ou da PCSK9*	8
Diagnóstico de HF	
certeza se	8
provável se	6 – 8
possível se	3 – 5

* Modificado do *Dutch MEDPED*, adotando critério presente na proposta do *SimonBroome Register Group*.

2.3.2 - Rastreamento em cascata

A estratégia de melhor custo-efetivo para o diagnóstico de HF é o rastreamento em cascata, o qual consiste em rastrear as mutações em parentes de primeiro grau de indivíduos em que a mutação causal para HF tenha sido identificada. Os indivíduos diagnosticados como portadores de HF por meio de teste genético são chamados de casos-índice, sendo, a partir deles rastreados os parentes de primeiro grau e, subsequentemente, os demais parentes (segundo e terceiro graus), com abordagem genética combinada a análise de exames do perfil lipídico dos familiares suspeitos, exame físico com pesquisa de sinais clínicos da HF (xantomias, arco corneano). Como primeira abordagem pode-se também realizar o teste genético no qual se busca a mesma alteração do caso-índice (LEREN *et al.*, 2004; KLOSE *et al.*, 2014).

2.3.3 - Metabolismo da LDLc na HF

A LDLc é a fração do colesterol que se apresenta mais elevada na HF. Sendo composta por ésteres de colesterol e, uma parte proteica, apo-B100, que corresponde a 25% de sua massa, sendo reconhecida por receptores celulares. As LDLc são resultantes da degradação da VLDLc, ricas em triglicérides, na superfície dos capilares as quais sofrem lipólise contínua pela ação da lipase lipoproteica (PEREIRA *et al.*, 2012).

Brown & Goldstein (1976) descreveram ainda nesta década, a existência da endocitose da LDLc mediada por receptor e, os defeitos que resultavam na deficiência da função dos receptores, a hipercolesterolemia. Mutações genéticas afetam o LDLR, resultando em diminuição da endocitose desta lipoproteína e, associação com HF (CIVEIRA *et al.*, 2004).

Em condições de baixa função do LDLR hepático, a síntese de novo do colesterol é aumentada por ativação da via SREBP-2 para compensar a baixa captação de LDLc. Esta situação resulta em um aumento concomitante na secreção da PCSK9, como evidência pelos elevados níveis de PCSK9 em indivíduos com HF (RAAL *et al.*, 2013; LAGACE, 2014).

2.3.4 - Mutação no LDLR

O gene que codifica o receptor humano para LDLc compreende aproximadamente 45 mil pares de bases de DNA e localiza-se no cromossomo 19. Moltuski *et al.* (1989) detectaram pela primeira vez uma mutação no braço curto do cromossoma 19, sendo determinado como gene de defeito, nos receptores de LDLc dos hepatócitos. Mais de 1.800 mutações desse receptor foram descritas, o que representa 85-90 % dos casos de HF em todo mundo (LEIGH, 2008; COOPER, 2011; DNA DIAGNOSTICK VOON FAMILIAIRE HYPERCHOLESTEROLEMIA, 2011). A HF é mais comumente atribuível a mutações no gene LDLR, resultando em redução da sua função (parcial ou completa) com incapacidade de remoção do LDLc circulante. O receptor pode ser negativo ou defeituoso, dependendo do impacto da mutação sobre a proteína resultante. O receptor negativo expressa pouca ou nenhuma função. O receptor defeituoso expressa isoformas de LDLR, com afinidade reduzida ao LDLc na superfície dos hepatócitos (HOBBS *et al.*, 1990; HOBBS *et al.*, 1992; CIVEIRA *et al.*, 2004).

2.3.5- Mutação na apo-B

O gene da apo-B possui 42 Kb e é formado por 29 éxons e 28 íntrons originando duas isoformas de proteínas: uma pequena, denominada de apo-B48, e, uma maior denominada apo-B100. A apo-B48 é produzida no intestino e faz parte dos quilomícrons. A apo-B100 é sintetizada no fígado e, constitui a apolipoproteína das várias lipoproteínas, VLDLc, IDLc e LDLc. O segundo defeito descrito, que provoca a HF, foi relacionado ao gene que codifica a apo-B100. A mutação no gene da apo-B modifica a estrutura da apo-B100. Com isso, o LDLR não reconhece a apo-B100 como ligante e, o LDLc não é captado, acumulando na corrente sanguínea, levando a um fenótipo de HF muito semelhante ao produzido por mutações em outros genes, referida como defeito familiar da apo-B (FDB, *Familial Defective apoB*). Somente uma mutação da apo-B foi descrita até então, a Arg3500Gln que representa 5-10% das causas de HF (WHITFIELD *et al.*, 2004).

2.3.6- Mutação da PCSK9

O terceiro defeito a ser descrito para a HF é a mutação do gene que codifica a expressão da PCSK-9, com ganho de função, também conhecido como HF-3 e, representa 1% das causas de HF. Mutações no gene que codifica a proteína PCSK9 com ganho de função, participam do catabolismo do LDLR, ocasionando uma degradação acelerada do receptor, impedindo a captação adequada do LDLc da corrente sanguínea (SEIDAH *et al.*, 2003; ABIFADEL *et al.*, 2003; URBAN *et al.*, 2013; AWAN *et al.*, 2014).

A partir desta descoberta, muitas outras alterações genéticas de ganho de função foram identificadas, 20 diferentes mutações já foram descritas e, além de numerosas mutações de perda de função, as quais foram relacionadas com baixas concentrações plasmáticas de LDLc. Assim, pode-se estabelecer uma relação entre a participação da PCSK9 na metabolização dos lipídeos, aumentando ou diminuindo a degradação do LDLR dependendo do nível de colesterol intracelular. Baixos níveis de LDLc intracelular em resposta ao tratamento com estatinas ativa a via do SREBP-2, resultando em co-expressão do LDLR e da PCSK9 (ABIFADEL *et al.*, 2003; SEIDAH *et al.*, 2003; URBAN *et al.*, 2013; NORDESTGAARD *et al.*, 2013; AWAN *et al.*, 2014).

2.4 - Tratamento Farmacológico

A indicação do tratamento farmacológico para HF ocorre quando as concentrações de LDLc são maiores que 190 mg/dL, de forma isolada sem manifestação prévia de doença cardiovascular, após aplicação de medidas de estilo de vida saudável. Indivíduos com LDLc \geq 160 mg/dL, mas que apresentam fatores de risco cardiovascular, devem ser tratados. Considerando os altos níveis de colesterol basal em pacientes com HF, uma redução de 50% obtida com o tratamento medicamentoso é considerada de real valor terapêutico. Pacientes com HF e que apresentam maiores riscos necessitam de uma intensificação da terapêutica para alcançarem reduções significativas de LDLc (NICE, 2008; SBC, 2012).

2.4.1- Estatinas

As estatinas são agentes hipolipemiantes que exercem os seus efeitos por meio da inibição da enzima HMG-CoA redutase que é fundamental na síntese do colesterol, leva a uma redução do colesterol intracelular, com isso, têm-se um aumento na expressão de LDLR, resultando também em aumento da captação do LDLc circulante. Existem diferenças entre as várias estatinas no mercado, no que tange às propriedades farmacocinéticas, bem como coeficiente de hidrofobicidade, via hepática de metabolização (principalmente a via do citocromo-P450 e isoenzimas), meia-vida plasmática e eficácia na redução lipídica (FONSECA, 2005), propriedades essas que fazem a diferença para o tratamento da HF. As estatinas de maior potência em reduzir os níveis de LDLc são as de escolha. Os efeitos pleiotrópicos são descritos com o uso das estatinas, como propriedades antiinflamatórias, melhora da função endotelial e benefícios na hemostasia (FONSECA, 2005).

2.4.2- Inibidores de absorção de colesterol intestinal

A ezetimiba inibe a absorção de colesterol na borda em escova do intestino delgado, atuando seletivamente nos receptores NPC1-L1, inibindo o transporte de colesterol na forma de quilomícrons. A inibição da absorção de colesterol, em grande parte do colesterol biliar, leva à diminuição dos níveis de colesterol hepático e ao estímulo de síntese de LDLR, com consequente redução do nível plasmático de LDLc, de 10% a 25%. A adição da ezetimiba à estatina tem sido recomendada quando a meta de LDLc não é atingida com o tratamento com estatinas (SBC, 2013).

2.4.3- Sequestrantes de ácidos biliares

Os sequestrantes de ácidos biliares são grandes polímeros que ligam os ácidos biliares carregados negativamente e sais biliares no intestino delgado, reduzindo a absorção enteral de colesterol. Como resultado ocorre depleção do colesterol celular hepático, estimulando a síntese de LDLR e colesterol endógeno. Como consequência desse estímulo à síntese, pode ocorrer aumento da produção da VLDLc e, conseqüentemente, dos TG plasmáticos (SBC, 2013).

2.4.4- Ácido nicotínico/niacina

A niacina atua no tecido adiposo periférico, leucócitos e células de Langerhans por meio de sua ligação com um receptor específico ligado à proteína G, o GPR109A. A ativação da GPR109A inibe as lipases hormônios-sensitivas nos adipócitos e, diminui a liberação de ácidos graxos livres na circulação. Em paralelo, a niacina inibe a atividade da enzima diacilglicerol aciltransferase-2 (DGAT-2) nos microsossomos dos hepatócitos e, assim, a síntese hepática de TG. Destas ações resulta uma menor disponibilidade de TG intra-hepático e, por consequência, o aumento no catabolismo de apo-B e, menor secreção de VLDLc e LDLc. Porém, seus efeitos colaterais ocasionam abandono ao tratamento (em torno de 25%), ainda assim, não há evidência de benefício com esse fármaco em indivíduos com LDLc controlado (SBC, 2013).

2.4.5- Inibidores da PCSK9

A funcionalidade e o número de LDLR expressos na superfície dos hepatócitos é primordial para a captação adequada de LDLc, e, após internalização do LDLc pelo endossomo, o LDLR tem a capacidade de retornar à superfície celular para mais captação de LDLc, por 150 vezes, até que ocorra a sua degradação através da ligação com a PCSK9 sintetizada pelo núcleo celular e secretada pelos hepatócitos. Mutações com ganho de função da PCSK9 podem ocasionar hipercolesterolemia e, em contrapartida, mutações com perda de função desta proteína pode ocasionar o oposto, hipocolesterolemia e redução de DCV. Foi, então, desenvolvido os inibidores da PCSK9 que previnem a ligação desta proteína ao LDLR e subseqüente degradação lisossomal do receptor aumentando a quantidade de LDLR funcionantes na superfície dos hepatócitos e maior depuração das partículas circulantes de LDLc no plasma (WIGGINGS *et al.*, 2018). No Brasil, dois inibidores de PCSK9 totalmente humanizados foram aprovados para comercialização em 2016, na forma de injeções

subcutâneas a cada 02 semanas ou 01 vez por mês. Esta classe de drogas apresenta redução intensa nas concentrações de LDLc em relação ao placebo, em média de 60%. Estudos com o evolocumabe e alirocumabe, apresentaram benefícios em diminuir também outras lipoproteínas pró-aterogênicas como Não-HDL, apo-B, TG e Lp(a) e aumentar HDLc e apo-A1 (SABATINE *et al.*, 2015; ROBINSON *et al.*, 2015).

2.5- Cascata da Coagulação e marcadores da hipercoagulabilidade e sistema fibrinolítico

Em condições normais, o sangue se mantém fluido através do equilíbrio entre os constituintes pró-coagulantes e anticoagulantes (TRIPODI & MANUCCI, 1996). A partir de um desequilíbrio entre esses mecanismos, há um desencadeamento de reações culminando com a formação do trombo e o estancamento da hemorragia (LOURENÇO, 1997). Durante 50 anos, foi aceito um modelo de “cascata da coagulação”, segundo o qual a coagulação ocorreria por meio de ativação proteolítica sequencial de pro-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, converte a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina (ZAGO *et al.*, 2005). Com o avanço no entendimento da coagulação, observou-se que a hipótese da cascata não reflete completamente os eventos da hemostasia *in vivo* (HOFFMANN, 2003a). Dessa forma, foi desenvolvido um modelo para a hemostasia baseado em superfícies celulares que substituiu o modelo clássico da cascata da coagulação (PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007; MONROE & HOFFMAN, 2009; VINE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010).

2.5.1- Modelo de cascata da coagulação baseado em superfícies celulares

No modelo de cascata da coagulação baseado em superfícies, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de fator tissular (FT) na corrente sanguínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Dessa forma, o FT é exposto na circulação sanguínea pela lesão endotelial e de células vizinhas ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos (NEMERSON, 1988). Nesse entendimento atual do processo hemostático, considera a inter-relação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de fases: iniciação, amplificação, propagação e finalização, **Figura 07**.

Figura 07– Modelo de Coagulação baseado em superfícies celulares

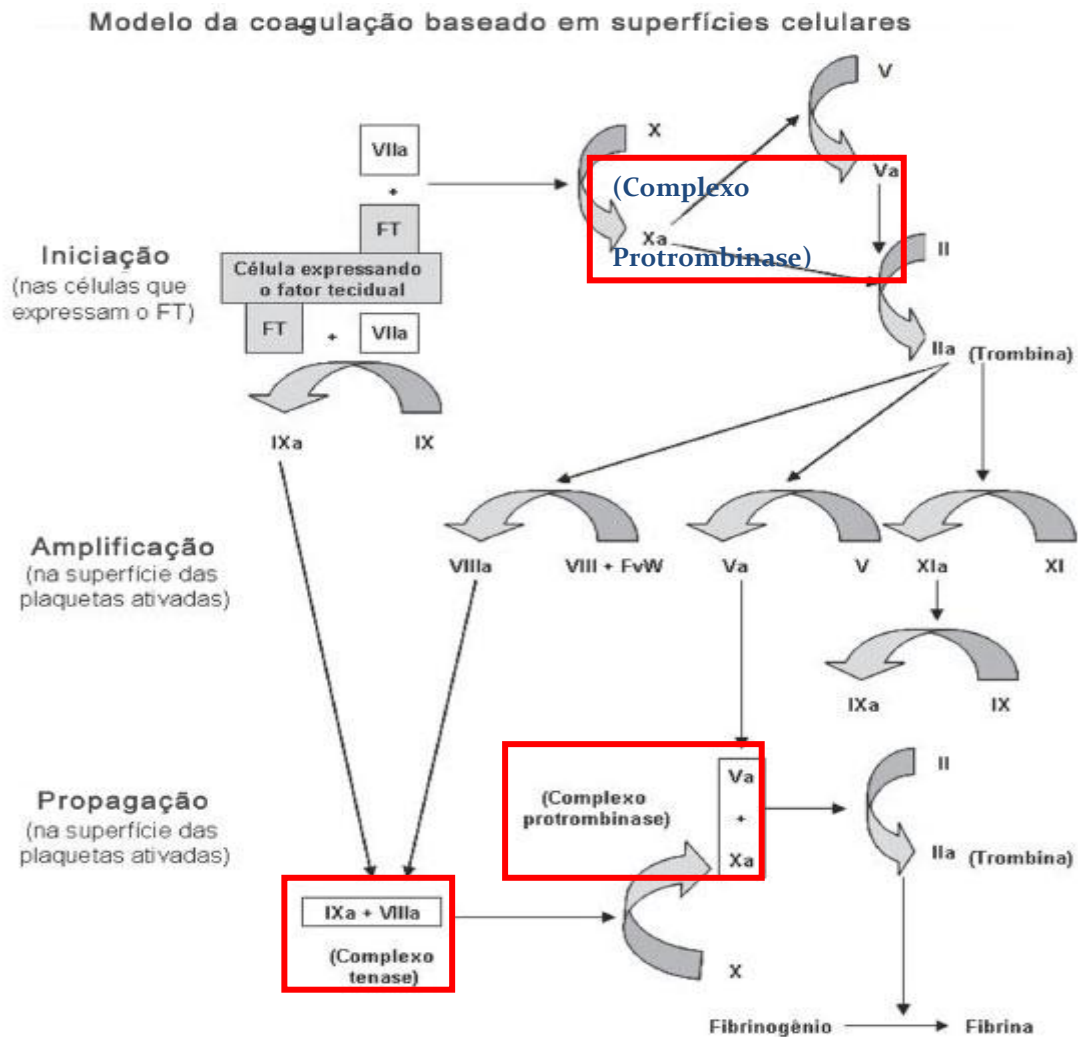


Figura 07-Fonte: FERREIRA, C.N. et al. O novo modelo da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares e suas implicações. 2010 v.32, n.5 p.416-421, Modificado da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

i-Iniciação: o processo de coagulação ocorre quando as células que expressam FT em sua superfície são expostas aos componentes do sangue no sítio da lesão (HANDIN *et al.*, 2003; VINE, 2009). O FT uma vez ligado ao fator VII (FVII), forma um complexo FT/FVIIa ativado (FT/FVIIa) que vão ativar o FX e FIX (PÉREZ & BOVER, 2007; MONROE & HOFFMAN, 2009; BOUCHER & TRAUB, 2009). O FXa associado ao seu cofator FVa, forma o complexo denominado protrombinase que vai transformar a protrombina (Fator II) em trombina em pequenas quantidades que não são suficientes para promover o tampão de fibrina, mas é de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (HOFFMANN, 2003a; BOUCHER & TRAUB, 2009; VINE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010) **Figura 07.**

ii-**Amplificação**: pequenas quantidades de trombina produzidas pelas células que expressam o FT podem interagir com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW. Dessa forma, inicia-se o processo hemostático culminando com a formação de fibrina estável que consolida o tampão plaquetário inicial. Este processo resulta na hemostasia secundária (HANDIN *et al.*, 2003; BOUCHER & TRAUB, 2009). Com a ativação, as plaquetas alteram a permeabilidade das membranas, permitindo a saída de íons cálcio e saída de fosfolípidos com carga negativa que atraem os fatores da coagulação para sua superfície, além de liberar FV parcialmente ativado (HANDIN *et al.*, 2003; PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007). A trombina formada na fase de iniciação também ativa o FV e FVIII. O complexo de FVIII/FvW dissocia permitindo que o FvW medie a agregação plaquetária no sítio da lesão. A trombina também ativa o FIX e FXI na superfície da plaqueta durante essa fase. Por mecanismos quimiotáticos, os fatores são atraídos à superfície das plaquetas, dando início à fase de propagação (PÉREZ-GÓMEZ & BOVER, 2007; MONROE & HOFFMAN, 2009; VINE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2010)

Figura 07.

iii-**Propagação**: caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção de complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas (VINE, 2009). Primeiramente, o FIX ativado durante a fase de iniciação, pode agora se ligar ao FVIII ativado na superfície das plaquetas formando um complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa (HOFFMAN, 2003b). Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. A trombina é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (RIDDEL *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010). A trombina produzida na fase de iniciação também ativa o fator XIII, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina e o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), que modula a fibrinólise (GREEN, 2006) **Figura 07.**

iv-**Finalização**: para controlar a disseminação da ativação da coagulação, intervêm quatro anticoagulantes naturais: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), proteína S (PS) e a anti-trombina (AT). O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio, que

forma um complexo quaternário FT/FVIIa/FXa/TFPI inativando os fatores e, portanto, limitando a coagulação (MALÝ *et al.*, 2007). As proteínas C e S são dois outros anticoagulantes naturais, dependentes de vitamina K, com capacidade de inativar os cofatores pro-coagulantes FVa e FVIIIa (SHEARER, 1995; VALEN *et al.*, 1996). A PC quando ligada ao receptor endotelial de proteína (EPCR) é ativada pela trombina ligada à proteína transmembrânica trombomodulina (TM) na superfície das células endoteliais intactas (ÖHLIN *et al.*, 1996). A PC ativada (PCa) se dissocia do EPCR tendo sua atividade aumentada pela interação com outro cofator inibidor, a PS (NESHEIM, 2003). Outro anticoagulante natural é a AT cuja atividade é inibir a trombina e outras serino-proteases, tais como FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (ELIAS *et al.*, 1993). As células endoteliais produzem uma variedade de glicosaminoglicanos que funcionam como sítios de ligação de alta afinidade para AT, que são cruciais para uma rápida inativação da trombina (FRANCO, 2001a; VINE, 2009) **Figura 08**.

Figura 08- Sistema da proteína C ativada

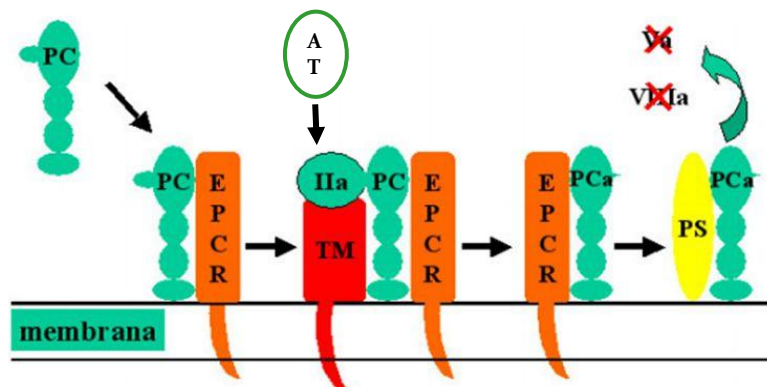


Figura 08 - Sistema da proteína C ativada. A ligação da trombina (IIa) ao receptor endotelial trombomodulina (TM) modifica as propriedades da trombina, transformando-a em um potente anticoagulante, por ativar a PC, que, juntamente com seu cofator (PS), inativa os fatores VIIIa e Va, suprimindo a gênese de trombina. EPCR "endothelial PC receptor. **Fonte:** Modificada segundo Fisiologia da Coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina, Ribeirão Preto, 34, 2001.

2.5.2- Geração de Trombina

A geração de trombina é um processo chave que determina a extensão de um processo trombótico. A trombina é crucial para a formação de um coágulo de fibrina estável. Durante sua vida ativa, a trombina exerce uma infinidade de ações altamente reguladas no sangue e na

parede do vaso, incluindo a coagulação do fibrinogênio. A geração inapropriada de trombina pode levar a processos patológicos, dos quais os principais são doenças hemorrágicas ou trombóticas. O sistema de coagulação é usualmente investigado por meio de dois testes clássicos de coagulação *in vitro*, o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP), que avaliam apenas o tempo de início da formação do coágulo e não refletem inteiramente o equilíbrio hemostático global (BERNTORP & SALVAGNO, 2008). O TTPA e o TP permitem a identificação da conectividade entre as atividades componentes identificadas como necessárias para a coagulação plasmática e definem o conceito de vias de coagulação intrínseca e extrínseca, que convergem no ponto de formação do complexo protrombinase. Contudo, os mecanismos estabelecidos pelos testes *in vitro* nem sempre são espelhados nas patologias humanas associadas a hemorragias ou trombozes. O teste de GT em condições *in vitro*, que imitam mais de perto o que ocorre *in vivo*, leva a uma nova investigação do equilíbrio entre pro-coagulantes e anticoagulantes em pacientes com vários distúrbios hemostáticos. Ensaios de GT não só fornecem uma avaliação global da hemostasia, além da estimativa de correlacionar mais de perto com um fenótipo de hipercoagulabilidade ou hipocoagulabilidade quando comparado com os testes de coagulação tradicionais como o TP e TTPA que não são sensíveis para avaliação de estado hipercoagulável (HEMKER *et al.*, 2003; BERNTORP & SALVAGNO, 2008).

2.5.3- Coagulação e Lipoproteínas

A ativação dos fatores de coagulação é seguida da produção da via extrínseca (FT + Fator VIIa + Fosfolípidos + Cálcio), intrínseca e comum (Fator Va + Fator Xa + Fator II + Fosfolípidos + Cálcio). Essas ativações são moduladas pelo HDL. Diferente das lipoproteínas aterogênicas, LDL e VLDL, que estimulam a secreção de FT e a ativação da via extrínseca, a HDL por si só não estimula a secreção de FT a partir de células endoteliais e monócitos, sendo a síntese de FT estimulada pela VLDL e inibida pela HDL. A atividade inibitória da HDL se deve pela presença do fator inibição tecidual (TFPI) presente nesta lipoproteína (LIMA & COUTO, 2006). Moyer *et al.* (1998) demonstraram que, embora a trombina seja gerada na superfície das partículas da HDL, esse processo é vinte vezes menos expressivo do que quando ela é gerada nas superfícies das partículas de lipoproteínas ricas em triglicérides. Verificou-se também aumento da atividade da protrombinase em dislipidemias onde há maior concentração de lipoproteínas ricas em triglicérides e diminuição da HDL plasmática (MOYER *et al.*, 1998; ROTA *et al.*, 1998; LIMA & COUTO, 2006). A partícula de HDL também tem efeito

anticoagulante através do estímulo da PCa, que tem importante papel na inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa da coagulação. O aumento da atividade da PCa é ainda maior devido ao estímulo da PS pela HDL, ou seja, há um efeito anticoagulante sinérgico entre as PCe PS. Essa característica anticoagulante da HDL é devida à presença de anticoagulantes naturais, como a cardioplipina e a fosfatidiletanolamina. A modulação do processo de coagulação pela HDL é acompanhada da inibição da secreção de citocinas, fator necrose tecidual α (TNF- α) e interleucina-1 α (IL-1 α) que aumentam tanto a coagulação quanto a fibrinólise (LIMA & COUTO, 2006).

2.5.4- Coagulação e PCSK9

Estudos em populações com mutações de perda de função da PCSK9 mostraram moderada redução da LDLc, mas muito mais significativa redução de DAC, implicando que a PCSK9 pode associar a doenças cardiovasculares muito além do efeito no LDLc. O FT é um receptor transmembrana para o fator VII/VIIa (FVII/VIIa), formando o complexo FT + FVIIa que é o maior iniciador celular da cascata de coagulação levando a trombose, deposição de fibrina e ativação plaquetária, e então eventos cardiovasculares. Estudos prévios demonstraram que, a hiperlipidemia promove expressão de FT. Wang *et al.* (2016) hipotetizaram que o nível de PCSK9 plasmático tem positiva associação com FT em pacientes com DAC. Foi constatado, nesse estudo, que ambos os níveis plasmáticos de PCSK9 e FT estão significativamente aumentados em pacientes com DAC, quando comparados com pacientes sem DAC (WANG *et al.*, 2016).

2.6 - Proteína C Reativa

O papel da inflamação na fisiopatogenia da aterosclerose e ocorrência de eventos aterotrombóticos já é evidente no quadro de DAC. Com o peso destas evidências, a aterosclerose passou, gradualmente, de um modelo de doença crônico-degenerativa e, exclusivamente de pacientes de idade avançada, para um modelo de doença inflamatória crônica subclínica, presente já na infância e que avança, de forma generalizada, mas com alguns sítios de predileção, durante toda a vida, até que, por comprometimento extenso dos vasos ou por complicação aterotrombótica, determina a apresentação clínica de uma DCV (SANTOS *et al.*, 2003).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado em resposta às diversas citocinas indicando um processo de inflamação ativa sistêmica. A

inflamação tem papel potencial no início, na progressão e na desestabilização das placas da doença aterosclerótica. O mecanismo pelo qual a PCR pode estar associada à trombose seria por meio da ativação do fator tissular de monócitos. No momento, em que os macrófagos se infiltram na parede vascular, citocinas são liberadas e modulam a migração, proliferação e a função das células inflamatórias (RUSSEL *et al.*, 1999).

A PCRus é um método desenvolvido para avaliar a PCR, considerada um biomarcador inflamatório sistêmico subclínico cuja associação com enfermidades cardiovasculares é melhor comprovada. Evidências sugerem ainda que a PCR também participe ativamente do processo aterosclerótico (ISHIKAWA *et al.*, 2003; INOUE *et al.*, 2005).

2.6.1- Inflamação e PCR

Por se tratar de um processo inflamatório, além das citocinas, as proteínas de fase aguda positivas são marcadores na patogênese da aterosclerose, principalmente a PCR (RUSSEL *et al.*, 1999). O desenvolvimento de dosagem da PCRus tem sido instrumento na exploração do papel desse marcador na predição de um possível evento vascular, pois tem demonstrado sua habilidade em prever eventos coronarianos em homens e mulheres aparentemente saudáveis, pois sinaliza a inflamação crônica subclínica (LIBBY *et al.*, 2002; RIDKER *et al.* 2002, SANTOS *et al.*, 2003; LIMA *et al.* 2007). A PCRus tem sido frequentemente associada ao risco cardiovascular e sua determinação parece ser útil na estratificação de pacientes, demonstrando que a inflamação tem importante papel na formação de placas ateromatosas, com redução do fluxo sanguíneo distal e evolução para oclusão completa do vaso ou acidente vascular agudo (LOWE, 2005). A determinação da PCRus parece perder a correlação com risco cardiovascular em indivíduos diabéticos, tabagistas, obesos, em uso de anti-inflamatórios ou na presença de infecções (SBC, 2001).

2.6.2- Inflamação e PCSK9

Estudos experimentais indicam que o aumento da expressão da PCSK9 pode acelerar a aterosclerose por promover inflamação e disfunção endotelial por mecanismos independentes do LDLc (URBAN *et al.*, 2013), ou seja, a PCSK9 por si só representa um fator independente para desenvolvimento e manutenção da aterosclerose, tornando um alvo terapêutico potencialmente efetivo (LI & LI, 2015).

A inflamação modula a expressão e liberação de PCSK9. A lipoproteína de baixo peso molecular oxidada (LDLox), um dos maiores fatores pró-inflamatórios no desenvolvimento da aterosclerose, também aumenta a expressão da PCSK9 nas células endoteliais por alterar a secreção de citocinas inflamatórias como a IL-1 α , a interleucina 6 (IL-6) e o TNF- α , provocando a apoptose das células endoteliais. A PCSK9 é também detectada e liberada pelas células musculares lisas vasculares (SCHULZ & SCHLÜTER, 2017). O aumento do TNF- α leva a ativação da via Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT), suprimindo a transcrição de PCSK9 em células HepG2 *in vivo*. Por outro lado, o supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3), que é um regulador negativo de JAK/STAT, induz a expressão de PCSK9 por meio da ativação de SREBP-1. Embora SREBP-1a e SREBP-1c preferencialmente ativem genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e TG, seu SREBP-2 homólogo preferencialmente transcreve genes envolvidos na via biossintética do colesterol. A este respeito, a PCSK9 parece ser regulada pelo SREBP-2 e SREBP-1c (RUSCICA *et al.*, 2016).

A PCSK9, também interage com outros receptores, como a proteína 1 relacionada ao LDLR (LRP1), que está relacionada com a atividade catalítica de PCSK9 (CANUEL *et al.*, 2013). Estudos experimentais mostraram que a PCSK9 é marcadamente induzida por diversos estímulos inflamatórios, como lipopolissacárides (LPS), resultando em um aumento significativo de LDLc (LI & LI, 2015). A LRP1, que é regulada pela PCSK9, antagoniza os efeitos pró-inflamatórios dos LPS e do TNF- α . Enquanto a ativação da LRP1 deprime o fator nuclear *kappa-light-enhancer* da sinalização de células B ativadas (NF κ B), a LRP1 extracelular ativa cinases ativadas por estresse como a p38-MAPK (MAY, 2013). Enquanto a ativação da LRP1 atenua a inflamação causada por LPS, o próprio LPS aumenta a expressão de PCSK9 e, portanto, diminui a expressão hepática de LDLR (CANUEL *et al.*, 2013; SCHULZ & SCHLÜTER, 2017). Além disso, a citocina resistina inflamatória induz a expressão de PCSK9 em hepatócitos humanos (MELONE *et al.*, 2012). Curiosamente, o domínio C-terminal da PCSK9 apresenta semelhança estrutural com a resistina, sugerindo uma relação estrutural e funcional entre a sinalização de citocinas e a PCSK9 (HAMPTON *et al.*, 2007). A PCR aumenta a expressão de PCSK9 ativando a proteína p38 mitogênica ativada por p38 (p38-MAPK) via de HNF1 em células HepG2. O gene PCSK9 contém um sítio de ligação do fator nuclear 1 do hepatócito altamente conservado (HNF1) e o HNF1 α , o mesmo mostrou cooperar com SREBP-2 para regular a expressão de PCSK9 nas células HepG2 e no fígado (CUI *et al.*, 2016; SCHULZ & SCHLÜTER, 2017).

2.6.3- Inflamação e Coagulação

O fator nuclear de transcrição do NFκB é um mediador central de inflamação de múltiplas ligações com processos trombóticos, pois seu papel é sinalizar em vários tipos celulares, dentro da vasculatura e da circulação, que estão envolvidos em processos trombo-inflamatórios. Todas as células que expressam o NFκB, medeiam importantes funções em interações celulares, com sobrevivência e diferenciação, bem como a expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de coagulação. Mesmo as plaquetas que são células anucleadas, contém membros da família do NFκB e suas moléculas sinalizadoras com as quais estão envolvidas em ativação plaquetária e circuitos de *feedback* secundários (MUSSBACHER *et al.*, 2019).

A resposta de células endoteliais à inflamação e ativação do NFκB é caracterizada por indução de moléculas de adesão promovendo ligação e transmigração de leucócitos, enquanto, simultaneamente aumenta seu potencial trombogênico. Sinalizações parácrinas vindas de células endoteliais, ativa o NFκB das células musculares lisas e causa um fenótipo modificado para estado “sintético” associado à diminuição de proteínas contráteis (MUSSBACHER *et al.*, 2019). Os monócitos reagem a situações inflamatórias com aumento da expressão de FT e, após diferenciação para macrófagos alteram sua polarização. Os neutrófilos respondem com aumento de sua vida útil e expõem seu DNA com a formação de armadilhas extra-celulares e, induzem também a fortes respostas na coagulação, podendo causar microtrombos que são importantes na imobilização de patógenos, um processo chamado de imunotrombose. Esse complexo celular se liga a inflamação e a trombose pela não repressão na formação das armadilhas extracelulares vindas dos neutrófilos ou pela perda da camada endotelial levando à ruptura mecânica ou erosão que resulta na rápida ativação agregação plaquetária e a manifestação de doenças trombo-inflamatórias (MUSSBACHER *et al.*, 2019).

3- JUSTIFICATIVA

A prevalência da DCV na HF varia entre 14 e 30% nos diferentes estudos, dependendo dos critérios e métodos utilizados para realizar o diagnóstico da DCV (HIROBE *et al.*, 1982; ALONSO *et al.*, 2002; SBC, 2012). A maior preocupação nestes pacientes portadores de HF é a avaliação de parâmetros de doença aterosclerótica subclínica que poderia melhorar a estratificação dos riscos nesses indivíduos, por se tratar de uma patologia que mantém níveis elevados de LDLc desde a infância. Os escores clínicos clássicos utilizados para estratificar as dislipidemias utilizam parâmetros que subestimam esses indivíduos (escore de *Framingham* ou escore Europeu). Em primeiro lugar, são escores populacionais utilizados para predizer o risco individual. Segundo, baseiam-se na idade cronológica, ou seja, indivíduos jovens são classificados com baixo risco. Terceiro, que as mulheres também são classificadas com baixo risco. E finalmente quarto, o fator tabagismo é apenas classificado de forma categórica, sim ou não, e não discrimina o tempo de exposição e a intensidade, quantidade que fuma (SBC, 2012).

Até o momento, mesmo sabendo do grande impacto da apo-B100 na aterogênese, níveis circulantes de PCSK9, avaliação da hipercoagulabilidade por meio do teste de GT e ainda, a avaliação do *status* inflamatório com a dosagem da PCRus, esses marcadores não fazem parte dos protocolos de rotina do perfil lipídico convencional (CT/frações e TG).

Diante desse cenário, justifica-se estudar a PCSK9 que está envolvida no controle dos níveis da LDLc, uma vez que seu papel foi descoberto a partir da observação de que indivíduos que apresentam mutações acompanhadas de aumento da sua função, têm hipercolesterolemia e DAC. Enquanto as mutações que inativam essa proteína levam a diminuição dos níveis de colesterol e do risco de DAC. Estratégias direcionadas na sua inativação podem ser boas opções terapêuticas na redução do colesterol e do risco cardiovascular associado. A proposta desse estudo foi avaliar esses marcadores em associação aos parâmetros de hemostasia em portadores de hipercolesterolemia familiar na tentativa de avaliar o risco cardiovascular, bem como o impacto do uso de drogas hipolipemiantes nesses indivíduos, orientar qual a melhor escolha terapêutica, evidenciando segurança e eficácia no tratamento, ou até a possibilidade de candidatos às novas classes de drogas existentes, que objetivam a participação da PCSK9 no metabolismo lipídico.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Avaliação e correlação da PCSK9 com os parâmetros do perfil lipídico, inflamatório e hemostático em portadores de HF da região de Bom Despacho, tratados com estatina em monoterapia, terapia conjugada com ezetimiba e não tratados. Investigação da melhor opção terapêutica para os participantes do estudo com relação à redução nos níveis de LDLc. E, ainda o efeito do uso ou não de drogas hipolipemiantes sob os parâmetros bioquímicos e hemostáticos evidenciando a segurança e eficácia dos tratamentos disponíveis.

4.2- Objetivos Específicos

- i- Avaliação do perfil lipídico pelo método convencional mediante dosagens de CT, TG, LDLc, HDLc e o cálculo do não-HDL nos indivíduos com diagnóstico de HF definitivo, provável e possível na região de Bom Despacho e, estabelecer dados característicos para a população estudada;
- ii- Avaliação dos níveis plasmáticos da PCSK9 pelo método ELISA;
- iii- Avaliação do perfil inflamatório por meio da PCRus pelo teste rápido quantitativo por imunodeteção;
- iv- Avaliação da hemostasia utilizando os parâmetros do teste de GT pelo método CAT (*Calibrated Automated Thrombogram*);
- v- Avaliação do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e parâmetros hemostáticos pelo teste de GT em indivíduos com HF sem tratamento, em tratamento com hipolipemiantes e, investigar as diferenças dos parâmetros estudados entre os 2 grupos;
- vi- Avaliação dos marcadores estudados nos indivíduos com HF sem tratamento, em tratamento com hipolipemiantes e, investigar diferenças desses marcadores entre os 2 grupos, analisando os parâmetros sexo e faixa etária;
- vii- Avaliação da influência da monoterapia com estatinas e da terapia conjugada com ezetimiba sob os níveis plasmáticos dos marcadores analisados e investigar possíveis diferenças dos parâmetros estudados entre os 2 grupos;

viii- Avaliação da influência da terapia hormonal em mulheres adultas portadoras de HF quanto ao perfil lipídico, inflamatório e hemostático;

ix- Avaliação da influência do tabagismo e do uso de anti-agregantes plaquetários sob os marcadores analisados;

x- Estabelecer possíveis correlações entre os níveis plasmáticos de PCSK9, com os seguintes parâmetros: perfil lipídico, componentes do teste de GT e inflamatório nos participantes com HF, subdivididos em diferentes faixas etárias.

5- METODOLOGIA

5.1- Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) (Projeto CAAE –76387417.6. 0000.5149) (**Anexo A**). Os participantes selecionados tiveram o esclarecimento sobre a pesquisa e os que estavam de acordo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**). Os TLCEs dos menores de 18 anos foram assinados pelos pais ou responsáveis legais e responderam também a um questionário com perguntas de interesse clínico e da pesquisa (Ficha Clínica) (**Apêndice B**). Incluíram-se no estudo crianças, jovens e adultos com faixa etária que compreendia de 03 a 85 anos, inicialmente pelos casos-índices de HF e, posteriormente eram convocados os familiares de 1º e 2º grau que apresentaram valores de LDLc compatíveis com diagnóstico clínico de HF e, a presença de sinais característicos da doença.

5.2- Casuística

- Pacientes com diagnóstico clínico de HF de acordo com os critérios *Dutch* MEDPED, com escores para diagnóstico de certeza (08 pontos), residentes na Cidade de Bom Despacho e região, foram considerados casos-índices. Obtivemos um total de 14 casos-índices.

- Os casos-índices foram selecionados no ambulatório de Endocrinologia da prefeitura de Bom Despacho e, consultório particular, por levantamento de dados de prontuários. Subsequentemente, por meio de rastreamento em cascata, parentes de 1º e 2º grau foram convocados e incluídos, observando níveis de LDLc > 190 mg/dL em adultos e LDLc > 160 mg/dL em menores de 18 anos. Encontramos 34 indivíduos com diagnóstico de certeza; 20 indivíduos com diagnóstico provável e 15 indivíduos com diagnóstico possível.

5.3 - Protocolo de estudo

O grupo de participantes (n=80) foi dividido em 02 diferentes subgrupos:

Pacientes não tratados (NT) (n=27) e 2) Pacientes tratados (T) com Ezetimiba com doses de 5/10 mg (n=2); Sinvastatina 20/40 mg (n=13); Rosuvastatina 10/20 mg (n=6); Atorvastatina 10/20/40 mg (n=17); Lomitapide 5 mg + Atorvastatina 20 mg (n=2); Ezetimiba 10 mg + Atorvastatina 10/20/40/80 mg (n=10) e Ezetimiba 10 mg + Rosuvastatina 10/20 mg (n=3).

Para a realização do presente estudo transversal, foram medidos os níveis séricos de PCSK9, tendo sido investigada sua associação com parâmetros sanguíneos e outros, potencialmente relacionados à PCSK9.

O estudo também apresentou algumas limitações como a não concordância de alguns membros das cascatas em participar do estudo, o que restringiu o número amostral. Outros indivíduos, sabidamente portadores da doença, apresentaram altos níveis de TG (> 300 mg/dL) que também foram excluídos do estudo.

5.4 - Critérios de Inclusão

5.4.1 - Faixa etária de jovens (3 a 17 anos) e adultos (18 a 85 anos).

5.4.2- Ambos os sexos.

5.4.3- Uso ou não de hipolipemiantes – Ezetimiba, Sinvastatina, Rosuvastatina, Atorvastatina, Lomitapide.

5.4.4- Uso de outros medicamentos como anti-diabéticos, anti-hipertensivos, hormônio tireoideano, contraceptivos e terapia hormonal, anti-agregantes plaquetários (AAS e Clopidogrel) e tabagismo foram registrados, mas não foram colocados como exclusão dos participantes.

5.5 - Critérios de Exclusão

- Doenças hepáticas (Transaminases alteradas, alcoolismo crônico), hematológicas (história passada de trombose venosa, TEP), doenças renais (RFG < 60 ml/min), doenças inflamatórias (Artrite Reumatóide, doenças auto-imunes), diabetes mellitus descompensada (HbA1c > 7,0%), obesidade (IMC > 30 Kg/m² para adultos e IMC > Percentil 95 para crianças) o IMC foi calculado dividindo o peso pela altura ao quadrado do participante, doenças tireoidianas descompensadas (TSH ultrasensível > 5,33 UI/mL) e Triglicérides > 300 mg/dL. As informações necessárias para a exclusão foram obtidas por meio de prontuário do ambulatório da prefeitura de Bom Despacho e consultório particular e, as informações foram registradas na ficha clínica da pesquisa (**Apêndice B**).

5.6 - Coleta das amostras para o estudo laboratorial

As amostras foram obtidas por meio de parcerias com laboratórios nas cidades de Bom Despacho (Laboratório Márcio Jardim) e Moema (Laboratório Análisi) para facilitar o acesso dos pacientes à coleta.

Foram coletados 25,0 mL de sangue venoso (10,0 mL sem anticoagulante – 2 tubos, 10,0 mL em citrato de sódio 3,2% - 2 tubos e 5,0 mL em EDTA- 1 tubo) após jejum de 12 horas, em tubos de Sistema Vacutainer® (Becton- Dickinson), de cada participante que preencheu os critérios de inclusão e, assinou o termo de consentimento.

A ordem da coleta seguiu a recomendação do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a fim de eliminar possíveis interferências. A primeira coleta foi nos tubos contendo citrato de sódio, seguida da coleta nos tubos sem anticoagulante e finalizada com o tubo contendo EDTA.

As amostras de sangue obtidas em tubo de citrato de sódio foram centrifugadas de acordo com protocolo estabelecido pelo setor de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG para obtenção do plasma pobre em plaquetas. O tubo da coleta foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (RPM) por 15 minutos, dois terços superiores do sobrenadante foram transferidos para tubo de ensaio e uma nova centrifugação foi realizada a 3.000 RPM por mais 15 minutos. Apenas dois terços superiores do sobrenadante foram distribuídos em 03 alíquotas de 500,0 µL e estocados à -80°C para posterior determinação do teste de Geração de Trombina. O outro tubo de citrato foi centrifugado a 1.500 RPM para separação do plasma, as alíquotas foram distribuídas em 03 alíquotas de 500,0 µL e estocadas a -80°C para futuras determinações.

As amostras de sangue obtidas sem anticoagulante foram centrifugadas a 1.500 RPM por 15 minutos para separação do soro, distribuídas em 06 alíquotas de 500,0 µL sendo utilizada uma alíquota para determinação do CT, HDLc, LDLc, não-HDL e TG de acordo com a bula do kit e as demais alíquotas foram estocadas a -80°C para posterior determinação da PCRus e outras dosagens que forem necessárias.

As amostras de sangue obtidas com anticoagulante EDTA, uma alíquota de sangue total foi reservada após separação do plasma por centrifugação a 1.500 RPM por 15 minutos. O sangue total e as alíquotas do plasma também foram estocados -80°C. O sangue total será utilizado

para extração futura de DNA e o plasma em EDTA foi distribuído em 03 alíquotas de 500,0 µL e estocado a -80°C para posterior determinação de PCSK9. No momento da análise, foram descongeladas e processadas de acordo com a indicação de cada fabricante.

5.7 - Delineamento experimental

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- CT, HDLc, LDLc, não-HDL, TG para perfil lipídico convencional.
- PCRus, para avaliação do perfil inflamatório.
- PCSK9, para avaliação dos níveis circulantes.
- GT, para avaliação da hemostasia.

5.8- Métodos

5.8.1- Colesterol total

A determinação do Colesterol Total foi realizada no soro utilizando o conjunto diagnóstico COLESTEROL MONOREAGENTE K83– BIOCLIN[®] cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico-COD-PAP. O ensaio foi realizado utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático da marca BIOCLIN 2200.

5.8.2- HDL colesterol

A determinação do HDL colesterol foi realizada no soro, utilizando o conjunto de diagnóstico HDL DIRETO K071 – BIOCLIN[®] cujo princípio permite a determinação direta sem a necessidade de precipitação prévia nem tratamento da amostra. São utilizados reagentes que realizam a dosagem seletiva do colesterol ligado ao HDLc. As superfícies LDLc, VLDLc e dos quilomícrons são estabilizadas pela adsorção do poliânion e não sofrem a ação das enzimas modificadas presentes no reagente. O HDLc, no entanto, se solubiliza pela ação de um detergente, permitindo a ação enzimática sobre o colesterol ligado a ele. Desta forma, a intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de colesterol HDLc na amostra. O ensaio foi realizado utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático da marca BIOCLIN 2200.

5.8.3- Triglicérides

A determinação do TG foi realizada em soro utilizando o conjunto diagnóstico TRIGLICÉRIDES MONOREAGENTE K117– BIOCLIN® cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico após sofrer peroxidação na presença da peroxidase, originando um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de TG. O ensaio foi realizado utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático da marca BIOCLIN 2200.

5.8.4- LDLc

A determinação do LDLc foi estimada pela utilização do procedimento simplificado descrito por *FRIEDEWALD* et al. (1972). Neste método, os níveis de CT, TG e HDLc previamente determinados tendo as concentrações expressas em mg/dL e, a obtenção da fração LDLc foi feita utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{LDLc} = \text{Colesterol Total} - [\text{HDLc} + (\text{TG}/5)]$$

Essa determinação não é adequada para ser usada com amostras nas quais as concentrações de TG excedam 400 mg/dL, bem como em presença de quilomícrons e cabe ressaltar que nenhum participante enquadrou-se nessa limitação da fórmula. Os que apresentaram TG > 300 mg/dL foram automaticamente excluídos do trabalho.

5.8.5- não-HDL

A determinação do VLDLc colesterol foi estimado como TG plasmático dividido por cinco (TG/5). Após a obtenção do resultado do VLDLc, este foi somado ao LDLc para obtenção do valor de não-HDL.

5.8.6- PCRus

A determinação da PCRus foi realizada por teste rápido quantitativo em soro pelo conjunto com analisador FINECARE FIA METER para determinar quantitativamente a Proteína C Reativa (PCR), presente em amostras de soro através da imunodeteção por fluorescência, tendo como princípio utilizando o modo de imunodeteção em “sanduíche” quando uma amostra é adicionada ao poço de reação. Anticorpos marcados com fluorescência anti-PCR se ligam ao antígeno PCR presente na amostra. A mistura migra pela matriz de nitrocelulose da tira de reação por ação capilar e os complexos de anticorpo-PCR circulantes são capturados pelo anticorpo anti-PCR imobilizado na tira de teste. Assim, quanto maior a

concentração de PCR na amostra mais os complexos que se formam e se acumulam na tira de reação. A intensidade do sinal de anticorpos fluorescentes detectados pelo FINECARE FIA METER reflete a quantidade de PCR capturados durante a reação, o FINECARE FIA METER indica a sua concentração na amostra de sangue. O limite de detecção pelo método foi de 0,5 mg/L. É desejável que a PCRus esteja abaixo de 3,0 mg/L. Foi utilizado 5,0 µL de soro e transferido para o tubo contendo a solução tampão do Kit, homogeneizado por 1 minuto e retirado 75,0 µL da mistura para amostra ser analisada no equipamento.

5.8.7- PCSK9

Para a quantificação dos níveis plasmáticos de PCSK9, foi realizado o ensaio imunoenzimático quantitativo (ELISA sanduíche) de alta sensibilidade.

As concentrações plasmáticas em EDTA de PCSK9 foram medidas por ELISA usando um kit comercial disponível (R & D Systems®, Minneapolis-USA, número de catálogo DPC 900), de acordo com as instruções do fabricante e foram expressas em ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio, utilizando três amostras de concentração conhecida, foi de 4,1-6,5% e 4,1-5,9%, respectivamente. A sensibilidade foi de 0,03 e a linearidade de 104,0 ng/mL, respectivamente.

Este ensaio emprega a técnica de imunensaio enzimático sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para PCSK9 humano foi pré-revestido sobre uma microplaca. Padrões e amostras foram pipetados nos poços e todo PCSK9 presente foi ligado ao anticorpo imobilizado. Após a lavagem de quaisquer substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal ligado à enzima, específico para PCSK9 humano foi adicionado aos poços. Após lavagem para remover o excesso de anticorpo-enzima, adicionou-se uma solução de substrato aos poços e desenvolvimento de cor é proporcional à quantidade de PCSK9 ligada no passo inicial. O desenvolvimento da cor é interrompido com solução de parada e a intensidade da mesma é medida em ($\lambda = 540$ nm).

A leitura da dosagem de PCSK9 foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas Spectra Max-340 e Versa Max microplatereader (Molecular Devices® USA). A curva de calibração para a determinação dos níveis de PCSK9 foi construída utilizando-se os calibradores, fornecidos pelo fabricante. Amostras de plasmas-controle específicos também fornecidos pelo fabricante foram utilizadas para verificar o desempenho do ensaio. As

concentrações dos parâmetros analisados foram obtidas interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão.

5.8.8- Geração de Trombina

A determinação da GT foi realizada em plasma pobre em plaqueta utilizando o método *Calibrated Automated Thrombogram (CAT - Thrombinoscope BV®)*. Em uma placa de 96 poços, foram separados 03 poços para cada amostra. No primeiro poço foi adicionado o calibrador que contém uma concentração conhecida de trombina e, no segundo e terceiro poços, para desencadear a geração de trombina, foram adicionados o fator tissular em baixa e alta concentração, respectivamente. Em cada um deles foram adicionados 80,0µL de plasma pobre em plaqueta (PPP) das amostras a serem testadas e 5,0 µL do tampão composto por HEPES, NaCl e albumina (HNBSA). No poço separado para o calibrador, além de 80,0 µL de PPP e 5,0 µL de HNBSA foram adicionados 20,0 µL do reagente *Thrombin Calibrator (STAGO®)*. Uma vez preenchida a placa com as amostras de plasma a serem testadas e seus respectivos calibradores, a placa foi colocada no fluorímetro (*Fluoroskan Ascent Thermo Laboratories®*) para incubação a 37°C por 10 minutos. Após a incubação foram adicionados somente nos poços com as amostras de PPP a serem testadas, 20,0 µL do fator tissular (FT) em alta, *PPP Reagent High (STAGO®)* e em baixa concentração, *PPP Reagent Low (STAGO®)*, cada reagente em um dos dois poços remanescentes por amostra. Em seguida, 20,0 µL do substrato fluorescente-CaCl₂ (*Fluca-Kit – STAGO®*) foi dispensado em todos os poços e foi realizada leitura da placa por 60 minutos.

O *software Thrombinoscope®* foi utilizado para construção da curva de tempo (min) *versus* concentração de trombina (nM) e para o cálculo dos seguintes parâmetros de GT: *Lagtime*, *time topeak (ttPeak)*, *endogenous thrombin potential(ETP)* e *peak*. A curva formada foi obtida, cineticamente na tela do computador.

5.8.9- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo Programa Minitab, versão 17. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e os dados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (Q1 e Q3). Foram utilizados os testes de *Kruskal Wallis* para comparação de medianas de três ou mais grupos, *Mann-Whitney* para comparação

de dois grupos e o qui-quadrado de *Pearson* para a distribuição percentual das faixas etárias. As correlações entre PCSK9 plasmático e outros parâmetros do estudo foram realizadas utilizando o teste de correlação de *Spearman*. O nível de significância estatística foi considerado como valor de $p < 0,05$.

6- RESULTADOS

6.1- Características dos participantes do estudo, níveis séricos do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e teste de GT

Neste estudo foram avaliados 80 indivíduos, incluídos após avaliação dos respectivos prontuários para averiguação da presença de comorbidades como diabetes mellitus descontrolada, disfunções tireoideanas (hipotireoidismo e hipertireoidismo) descompensadas. Por meio do prontuário médico foi verificado que alguns pacientes estavam em uso de anti-hipertensivos. No entanto, apresentavam níveis pressóricos dentro da normalidade no momento do preenchimento da ficha clínica, uma vez que foram feitas medidas da pressão arterial. Os dados antropométricos como peso e altura também foram analisadas. Aqueles participantes que não se enquadraram dentro dos critérios de inclusão foram retirados do estudo.

Tabela 02- Características dos participantes incluindo perfil lipídico, PCSK9, PCRus e GT dos participantes do estudo (n=80)

Parâmetro	Valores em mediana
CT (mg/dL)	254 (192-326)
HDLc (mg/dL)	55 (47-65)
LDLc (mg/dL)	179 (118-251)
não-HDL(mg/dL)	206 (131-269)
TG (mg/dL)	95 (66-135)
PCSK9 (ng/mL)	774 (594-897)
PCRus (mg/L)	2,7 (1,1-5,1)
LagtimeLTF (min)	8,1 (7,0-9,5)
ETPLTF(nM/min)	1730,2 (1496,3-2079,0)
PeakLTF (nM)	264,5 (199,9-330,9)
ttPeakLTF (min)	12,0 (10,3-13,6)
LagtimeHTF (min)	2,7 (2,3-3,0)
ETPHTF (nM/min)	2002,0 (1800,0-2427,3)
PeakHTF(nM)	377,6 (337,7-442,4)
ttPeakHTF (min)	5,3 (4,7-5,7)

CT= Colesterol Total, HDLc= Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular LDLc= Colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular, Não-HDLc= Colesterol não HDL, TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9, PCRus= Proteína C Reativa ultra-sensível, LagtimeLTF= LagtimeLowTissueFactor, ETPLTF= ETP LowTissueFactor, PeakLTF= PeakLowTissueFactor, ttpeakLTF= timetopeakLowTissueFactor, LagtimeHTF= LagtimeHighTissueFactor, ETPHTF= ETP HighTissueFactor, PeakHTF= PeakHighTissueFactor, ttpeakHTF= timetopeakHighTissueFactor. n= número de participantes. Valores expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3).

As frequências dos parâmetros sexo e idade (em faixas etárias), relativas e absolutas, foram apresentadas de forma estratificada por categorias. Quanto à faixa etária jovem (3 a 17 anos) os indivíduos do sexo masculino representaram 60,0% dos participantes, com n=10, enquanto os do sexo feminino representaram 40,0%, com n=7. Dentre os participantes adultos com faixa etária entre 18 e 85 anos, houve maior prevalência de mulheres com uma porcentagem de 73,0% em relação aos homens 27,0%, sendo n= 46 e n= 17, respectivamente; p= 0,014. Isto significa que a porcentagem entre homens e mulheres foi diferente entre os participantes jovens e adultos no presente estudo.

Todos os parâmetros foram expressos como mediana e intervalo interquartil (Q1 e Q3). No presente estudo foram considerados os seguintes valores para o perfil lipídico como referência: HDLc \geq 40 mg/dL; LDLc \leq 160 mg/dL; TG \leq 150 mg/dL, para ambos os sexos. Com exceção do HDLc e TG que se mostraram dentro dos intervalos de referência, para os demais parâmetros pode-se verificar a existência de valores fora da faixa considerada desejável. Para os valores de PCRus $>$ 5,0mg/L, foi adotado o valor de 5,1mg/L, e para PCRus $<$ 0,5mg/L, foi adotado o valor de 0,4 mg/L, como referências. O valor mediano para a PCSK9 dos 80 participantes deste estudo correspondeu a 774 ng/mL.

Além da dosagem dos níveis de PCSK9 e dos parâmetros sanguíneos representados pelo perfil lipídico de jejum (CT, HDLc, LDLc e TG) potencialmente relacionados à PCSK9, os dados da hemostasia também foram analisados sendo representados pelo teste de GT incluindo *Lagtime*, *ETP*, *Peak* e *time to peak* em baixa e alta concentração de FT, os resultados são apresentados na **Tabela 02**.

6.2- Comparação dos níveis séricos do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e do teste de GT entre os participantes do estudo

Tabela 03- Comparação entre os grupos NT e T, de acordo os seguintes parâmetros laboratoriais

Parâmetro	NT (n=27)	T (n=53)	p
CT (mg/dL)	333 (300-402)	211 (173-260)	0,001
LDLc (mg/dL)	260 (204-333)	135 (97-185)	0,001
não-HDL(mg/dL)	278 (252- 357)	149 (117-209)	0,001
TG (mg/dL)	119 (72-151)	87 (60-126)	0,037
PCSK9 (ng/mL)	713 (484-811)	816 (627-952)	0,021
tpeakLTF(min)	13,0 (10,6-14,8)	11,6 (10,3-13,2)	0,058
tpeakHTF(min)	5,3 (5,2-6,2)	5,2 (4,6- 5,7)	0,039

CT= Colesterol Total, HDLc= Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular, LDLc= Colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular, Não-HDLc= Colesterol não HDL, TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9, tpeakLTF= time to peak Low Tissue Factor, tpeakHTF= time to peak High Tissue Factor. NT= Não-Tratados, T= Tratados. n= número de participantes. Teste U de Mann-Whitney; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilício (Q1-Q3).

Ao analisar os níveis séricos do perfil lipídico comparando os indivíduos NT (n=27) e T (n=53), o grupo dos NT apresentou valores plasmáticos mais elevados em relação ao grupo dos T para todos os parâmetros do perfil lipídico CT, LDLc, não-HDL e TG de forma significativa ($p < 0,05$), exceto para o HDLc. O grupo T apresentou maiores valores para a PCSK9 (816 ng/mL) em relação ao grupo dos NT (713 ng/mL) com $p = 0,021$. Quanto aos dados obtidos por meio do teste de GT, pode-se perceber que o grupo NT apresentou uma maior GT, caracterizada pelo aumento significativo dos parâmetros *time to Peak (Low TF)* ($p = 0,058$) e para o mesmo teste realizado com o fator tissular em alta concentração (*High TF*) ($p = 0,039$), todos os dados citados são demonstrados na **tabela 03**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, quando comparados os grupos NT e T.

6.4- Comparação dos níveis séricos do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e do teste de GT entre os grupos NT e T, de acordo com o sexo

Tabela 04- Resultados do perfil lipídico em (mg/dL) e do teste de GT (min, nM) entre os grupos NT e T, comparando Homens (H) e Mulheres (M)

Parâmetro	NT (H n=12)	NT (M n=15)	T (H n= 15)	T (M n=38)	p ^a	p ^b
CT	291 (259-382)	393 (321-451)	184 (167-239)	223 (185-280)	0,012	0,069
HDLc	49 (45- 54)	55 (46-60)	50 (46- 60)	59 (51-67)	0,232	0,043
LDLc	223 (196-309)	307 (247-344)	119 (86-178)	140 (101-200)	0,023	0,206
não-HDL	248 (209-331)	342 (265-380)	129 (113-197)	165 (118-223)	0,040	0,173
TG	110 (72- 135)	132 (72-179)	59 (41-95)	94 (81-133)	0,283	0,019
LagtimeLTF	7,8 (7,0-9,9)	9,3(7,7-10,9)	9,0 (8,2 - 9,8)	7,5(6,5-8,7)	0,283	0,011
ttpeakLTF	11,6 (9,6-14,5)	13,3 (12,0 -14,9)	12,6 (12,2 - 14,3)	11,0 (9,6-13)	0,495	0,006
PeakHTF	369,0 (330,5-392,3)	404,4 (311- 471)	340 (330 - 400)	383 (362-446)	0,188	0,019

CT= Colesterol Total, HDLc = Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular, LDLc = Colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular, não-HDL= Colesterol não HDL, TG= Triglicérides, Lagtime LTF= Lagtime Low Tissue Factor, ttpeak LTF= time to peak Low Tissue Factor, Peak HTF= Peak High Tissue Factor. NT= Não-Tratados, T= Tratados. n= número de participantes. Teste *U* de *Mann-whitney*; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3). p^a: NT (H) versus NT (M) e p^b:T (H) versus T (M). p< 0,05.

Ao analisar as variáveis biológicas no grupo de NT, encontramos diferença significativa ($p < 0,05$) entre os indivíduos do sexo feminino e masculino, para o perfil lipídico CT, LDLc, não-HDL, sendo que as mulheres apresentaram valores maiores que os homens. Para os outros parâmetros não foi verificada diferença entre os indivíduos do sexo feminino e masculino, conforme **tabela 04**. Avaliando as variáveis no grupo de T, com relação aos indivíduos do sexo masculino e feminino, encontramos diferença entre as medianas, com maiores valores para as mulheres, para as seguintes variáveis HDLc ($p = 0,043$), TG ($p = 0,019$), *Peak (HighTF)* ($p = 0,019$), enquanto as variáveis *Lagtime (LowTF)* ($p = 0,011$) e *time to peak (LowTF)* ($p = 0,006$) foram maiores nos homens versus mulheres, **Tabela 04**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, quando comparados os grupos NT e T, de acordo com o sexo.

6.5- Comparação dos níveis séricos do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e do teste de GT, entre os grupos dos NT e T, de acordo com a faixa etária para os indivíduos Jovens (3 a 17 anos) e Adultos (18 a 85 anos)

Tabela 05- Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL), e GT (nM/min, nM) entre os grupos NT e T, comparando Jovens (J) e Adultos (A)

Parâmetro	NT (J n=7)	NT (A n=20)	T (J n=10)	T (A n=43)	p ^a	p ^b
TG	110 (62-132)	121 (86-151)	60 (48-85)	95 (73-33)	0,268	0,033
PCSK9	614 (526- 825)	714 (481-805)	637 (576-800)	830 (675-999)	1,000	0,033
ETPLTF	1575 (1199-2040)	1777 (1627-2197)	1403 (1163-1565)	1805 (1646-2198)	0,086	0,001
PeakLTF	253 (227-291)	267 (174-330)	190 (170-242)	292 (239-354)	0,956	0,006
ETPHTF	1586 (1415-2510)	2128(1920-2667)	1569 (1292-1845)	2065(1853-2437)	0,036	0,001
PeakHTF	345 (308-426)	389 (330-466)	333 (284-370)	388 (357-445)	0268	0,002

TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9, ETP LTF= ETP Low Tissue Factor, Peak LTF= Peak Low Tissue Factor, ETPHTF= ETP HighTissue Factor, Peak HTF= Peak High Tissue Factor. NT= Não-Tratados, T= Tratados. n= número de participantes. Teste *U* de *Mann-whitney*; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3). p^a: NT (J) versus NT (A) e p^b:T (J) versus T (A). p< 0,05.

Ao analisar as variáveis biológicas no grupo de NT, encontramos diferença significativa entre os indivíduos Jovens e Adultos, somente para o parâmetro de hemostasia *ETP (High TF)* sendo que os Adultos apresentaram valores maiores que os Jovens (p= 0,036), indicando uma maior geração de trombina nesses indivíduos. No grupo T com relação aos indivíduos Jovens e Adultos, encontramos diferença entre as medianas, com maiores valores para os Adultos em relação aos Jovens, para as seguintes variáveis TG (p= 0,033), PCSK9 (p= 0,033), *ETP (Low TF)* (p=0,001) e *(High TF)* (p=0,001); *Peak (Low TF)* (p= 0,006) e *(High TF)* (p= 0,002), indicando uma maior geração de trombina em indivíduos Adultos, **Tabela 05**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, quando comparados os grupos NT e T de acordo com a faixa etária, jovens de 3 a 17 anos e adultos 18 a 85 anos.

Os grupos NT e T juntos foram divididos em 03 subgrupos, Jovens (3 a 17) anos e, para os indivíduos Adultos, 02 subgrupos com as seguintes faixas etárias (18 a 40) e (41a 85) anos, uma vez que a maioria dos participantes em tratamento eram indivíduos Adultos, conforme dados apresentados na **tabela 05**. Foram utilizados os testes de *Kruskal-Wallis* para a mediana idade e, o qui-quadrado de *Pearson* para a distribuição percentual das 03 faixas etárias (p= 0,019 e p= 0,018), respectivamente. Para as análises entre os grupos do estudo, no NT (n= 27) a mediana foi 27 anos e o intervalo interquartilico (Q1- Q3) de 17 a 38 anos e no T (n= 53)

mediana 44 (21-54) anos. O grupo NT era composto por um menor número de indivíduos com menor faixa etária (18 a 40) anos, enquanto o grupo T, era composto por um maior número de participantes com maior faixa etária (41 a 85) anos.

Novas análises foram então realizadas e, diferenças significativas foram encontradas entre os 03 subgrupos em faixas etárias para as seguintes variáveis TG ($p= 0,031$), PCSK9 ($p= 0,001$), *ETP Low TF* ($p= 0,001$) e *High TF* ($p= 0,001$), *Peak Low TF* ($p=0,048$) e *High TF* ($p= 0,006$), prevalecendo valores mais altos dessas variáveis nos 02 subgrupos de Adultos, **Tabela 06**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, quando comparados os 80 participantes do estudo subdivididos em 03 faixas etárias.

Tabela 06- Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL) e GT (nM/min, nM) dos 80 participantes do estudo subdivididos em faixas etárias

Parâmetro	3 a 17 anos (n=17)	18 a 40anos(n=28)	41 a 85 anos (n=35)	p
TG	68 (51-116)	95 (56-134)	110 (83-152)	0,031
PCSK9	627 (546 -804)	649 (488-827)	843 (748-1042)	0,001
ETPLTF	1430 (1183-1600)	1816 (1628- 2196)	1785 (1642-2198)	0,001
PeakLTF	227 (183-260)	279 (208 -328)	283 (241-354)	0,048
ETPHTF	1575 (1368-1891)	2085 (1848-2462)	2078 (1911-2651)	0,001
PeakHTF	333 (293-381)	389 (331-463)	390 (363-446)	0,006

TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9, ETPLTF= ETP LowTissueFactor, PeakLTF= PeakLowTissueFactor, ETPHTF= ETP HighTissueFactor, PeakHTF= Peak HighTissueFactor. T= Tratados. n= número de participantes, J= jovens e A= adultos. Teste de *Kruskal-wallis*; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3). $P < 0,05$.

Para os parâmetros que apresentaram diferenças significativas, uma análise comparativa foi feita entre as 03 faixas etárias utilizando o teste de Kruskal-Wallis 2 a 2. Na comparação de Jovens (3 a 17 anos) e adultos (18 a 40 anos), diferença significativa foi encontrada para os seguintes parâmetros do teste de GT *ETP (Low TF e High TF)* e *Peak (High TF)*, a faixa etária de 18 a 40 anos apresentou valores maiores para essas variáveis em relação à faixa etária de 3 a 17 anos ($p < 0,05$). Na comparação entre as faixas etárias (18 a 40) e (41 a 85) anos, observou-se diferença significativa somente para a variável PCSK9, a faixa etária de 41 a 85 anos apresentou maiores níveis em relação à de 18 a 40 anos ($p= 0,001$). Na comparação entre as faixas etárias (3 a 17) e (41 a 85) anos, da mesma forma, os indivíduos com a maior faixa etária apresentaram os valores maiores para todas as variáveis: TG, PCSK9 *ETP (Low TF e High TF)*, *Peak (Low TF e High TF)* com $p < 0,05$, **Tabela 07**. Para os demais parâmetros não foram

observadas diferenças significativas, quando comparados os 80 participantes do estudo subdivididos em 03 faixas etárias.

Tabela 07-Resultados do perfil lipídico em (mg/dL), PCSK9 (ng/mL), e GT (nM/min, nM) dos 80 participantes do estudo subdivididos em faixas etárias, comparando os subgrupos de idade 2 a 2

Parâmetro	3 a 17 anos (n=17)	18 a 40 anos (n=28)	41 a 85 anos (n=35)	p ^a	p ^b	p ^c
TG	68 (51-116)	95 (55-134)	110 (83-152)	0,325	0,119	0,009
PCSK9	627(546-804)	649 (488-826)	843 (748-1042)	0,842	0,001	0,002
ETPLTF	1430(1183-1600)	1816 (1628-2196)	1785 (1642-2198)	0,001	0,873	0,001
PeakLTF	227(283-260)	279 (208-328)	283(241-354)	0,143	0,387	0,011
ETPHTF	1575(1368-1891)	2085(1848-2462)	2078(1911-2651)	0,001	0,628	0,001
PeakHTF	333(293-381)	389 (331-463)	390 (363-445)	0,015	0,653	0,001

TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína ConvertaseSubtilisina/Kexinatipo 9, ETPLTF= ETP LowTissueFactor, PeakLTF=Peak Low Tissue Factor, ETPHTF= ETP High TissueFactor, PeakHTF= Peak High TissueFactor. n= número de participantes. Teste de *Kruskal-wallis*; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3). p^a(3 a 17 versus18 a 40 anos), p^b (18 a 40 versus41 a 85 anos) e, p^c (3 a 17 versus 41 a 85 anos). p< 0,05.

6.6- Comparação dos níveis séricos do teste de GT, entre os grupos dos NT e T, de acordo com as faixas etárias (3 a 17), (18 a 40) e (41 a 85) anos

Tabela 08 - Resultados do teste de GT (min, nM, min) comparando os grupos de participantes NT e T, de acordo com as faixas etárias (3 a 17), (18 a 40) e (41 a 85) anos

Parâmetro	3 a 17 anos (n=17)		18 a 40 anos (n=28)		41 a 85 anos (n=35)		p ^a	p ^b	p ^c
	NT (n=7)	T(n=10)	NT(n=14)	T(n=14)	NT (n= 6)	T (n=29)			
LagtimeLTF	9,3 (7,7-10,0)	8,8 (8,0-9,7)	7,6 (7,0-8,6)	7,4 (6,0- 8,8)	10,7 (7,9-11,7)	7,8 (6,6-9,4)	0,526	0,613	0,022
PeakLTF	253 (227-291)	190 (170-242)	295 (165- 369)	246 (223-323)	199 (187- 286)	298 (245-370)	0,097	0,679	0,040
tpeakLTF	13 (10,3-14,6)	12,5 (11,9-13,8)	11,8 (9,8-13,7)	11,2 (8,9-12,8)	14,6 (12,8- 16,6)	11,2 (10,1-13,1)	0,696	0,435	0,005
tpeakHTF	5,6 (5,0 -6,3)	5,5 (4,6-6,8)	5,3 (5,0-5,8)	4,9 (4,3-5,2)	5,7 (5,1-6,6)	5,3 (4,5-5,8)	0,380	0,041	0,137

LagtimeLTF= LagtimeLowTissueFactor, PeakLTF= PeakLowTissueFactor, tpeakLTF= timetopeakLowTissueFactor, tpeakHTF= timetopeakHightissueFactor. NT= Não-Tratados, T= Tratados. n= número de participantes. Teste de *Kruskal-wallis*;e exato de *Fischer* os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3) . p^a: NT (3 a 17 anos) versus T (3 a 17 anos), p^b: NT (18 a 40 anos) versus T (18 a 40 anos) e p^c: NT (41 a 85 anos) versus T (41 a 85 anos).p< 0,05.

No grupo com faixa etária de 18 a 40 anos, foi observado que a mediana para as variáveis *ETP (Low TF)* e *ETP (High TF)* apresentou maiores valores, conforme dados na **tabela 07**. Foram então avaliados os parâmetros do teste de GT nas 03 faixas etárias para verificação se haveria alguma diferença entre os grupos NT e T, após ajuste de idade. Para tanto foi utilizado os testes de *Kruskal-Wallis* para a medianade idade, e o exato de *Fisher*, com distribuição percentual das 03 faixas de idade. Na faixa de 3 a 17 anos não foi encontrada nenhuma diferença entre NT e T. Na faixa de 18 a 40 anos, foi encontrada diferença na variável *time to peak (High TF)*, com maiores valores para o grupo NT em relação ao T ($p= 0,041$). Para a faixa etária de 41 a 85 anos, houve diferença significativa para os seguintes parâmetros, *Lagtime (Low TF)*, *Peak (Low TF)* e *time to peak (Low TF)*, as variáveis *Lagtime (Low TF)* e *time to peak (Low TF)* foram maiores no grupo NT ao passo que o *Peak (Low TF)* apresentou-se com maiores valores no grupo T, mostrando uma maior GT no grupo T em relação ao NT, pois o grupo T apresentou concentração máxima de trombina (*Peak*) e menor tempo para atingir tal concentração (*time to peak*), **Tabela 08**.

6.7- Comparação dos níveis séricos do perfil lipídico, PCSK9 e teste de GT para o grupo T, de acordo com o tipo de tratamento

Tabela 09-Resultados do perfil lipídico, PCSK9 e GT no grupo de Tcomparando osdois tipos de tratamento, monoterapia (estatina) e terapia conjugada (ezetimiba + estatina)

Parâmetro	Monoterapia (n=36)	Terapia conjugada (n=13)	p
CT (mg/dL)	238 (192-289)	158 (144-201)	0,001
LDLc (mg/dL)	152 (120-201)	83 (67-120)	0,001
não-HDL (mg/dL)	178 (138-224)	95 (76-140)	0,001
ETPLTF (nM/min)	1801 (1657-2259)	1563 (1360-1808)	0,024
ETPHTF (nM/min)	2053 (1899-2475)	1780 (1468-2198)	0,009

CT= Colesterol Total, LDLc= Colesterol presente na lipoproteína de baixo peso molecular, não-HDL= Colesterol não HDL,ETPLTF= ETPLowTissueFactor, ETPHTF= ETP HighTissueFactor. n= número de participantes. Teste *U* de *Mann-whitney*; os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3). $p < 0,05$.

No grupo T (n=53), foram avaliados os parâmetros de perfil lipídico, PCSK9, PCRus e teste de GT para comparação entre os tipos de tratamentos (Ezetimiba; Estatinas; Ezetimiba+ Estatinas; Lomitapide + Estatinas). No entanto, somente foram avaliados os tratamentos Estatinas e Ezetimiba + Estatinas, uma vez que para os outros dois tipos de tratamentos o

número de participantes que faziam o uso era pequeno. Portanto, somente os tratamentos com Estatinas (n=36) e Ezetimiba + Estatinas (n=13) foram considerados. O resultado da análise das variáveis entre estes tratamentos apresentaram diferenças significativas para as seguintes variáveis CT (p= 0,001), LDLc (p= 0,001), não-HDL (p= 0,001), *ETP (Low TF)* (p= 0,024) e (*High TF*) (p= 0,009), os participantes que utilizavam o tratamento com Estatina apresentaram maiores valores em relação ao tratamento conjugado, tanto para o perfil lipídico quanto para os parâmetros do teste de GT, **Tabela 09**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, quando comparados os dois tipos de tratamento.

Os participantes em tratamento do grupo T foram ainda subdivididos em faixas etárias de (3 a 17), (18 a 40) e (41 a 85) anos para comparar o efeito do tratamento Estatina e Ezetimiba + Estatina. No entanto devido ao tamanho amostral muito baixo, não foi possível realizar os testes. O grupo na faixa etária de 3 a 17 anos apresentava somente 06 participantes no total, entre os quais 03 pacientes faziam uso de Estatina e 03 de Ezetimiba + Estatina. E para a faixa etária 18 a 40 anos, somente 04 pacientes faziam uso da associação Ezetimiba + Estatina.

6.8- Níveis do perfil lipídico, PCSK9 e GT no grupo de Mulheres Adultas em uso de terapias hormonais

No presente estudo, dentre as 46 mulheres adultas, 13 eram usuárias de terapia hormonal, contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal e, 33 não usuárias. A avaliação das variáveis foi feita no grupo das 13 mulheres em uso de hormônios, em razão desse tipo de terapia interferir nas variáveis de perfil lipídico e do teste de GT. Quanto aos resultados no grupo das 46 mulheres, foi encontrada diferença significativa em relação à idade (p= 0,020), uma vez que o número de mulheres sem terapia hormonal era maior que o número de mulheres com terapia hormonal.

Tabela 10- Resultados das variáveis idade, PCRus e GT entre os grupos de mulheres sem e com terapia hormonal (n=46)

Parâmetro	Terapia Hormonal		p
	Não (n=33)	Sim (n=13)	
Idade (anos)	48 (39-60)	36 (27-47)	0,020
PCRus (mg/L)	2,9 (1,2-5,1)	5,1 (3,4-5,1)	0,037
LagtimeLTF(min)	8,0 (7,0-9,4)	6,5 (5,3-7,4)	0,002
ETPLTF (nM/min)	1765 (1608-2005)	2279 (1736-2879)	0,035
PeakLTF(nM)	270 (224-321)	333 (301-497)	0,008
tpeakLTF (min)	12,0 (10,6-13,3)	9,0 (7,7-11,3)	0,004
LagtimeHTF(min)	2,7 (2,3-3,2)	2,3 (2,1-2,7)	0,028
PeakHTF(nM)	389 (367-444)	463 (393-543)	0,016
tpeakHTF (min)	5,3 (4,7-5,6)	4,5 (4,1-5,0)	0,007

PCRus= Proteína C Reativa ultra-sensível, LagtimeLTF= LagtimeLowTissueFactor, ETPLTF= ETPLowTissueFactor, PeakLTF=PeakLowTissueFactor, tpeakLTF= timetopeakLowTissueFactor, LagtimeHTF= LagtimeHighTissueFactor, PeakHTF=Peak High TissueFactor, tpeakHTF= timetopeak HighTissueFactor. n=número de participantes. Teste deKruskal-wallis. Os dados foram expressos em mediana e intervalo interquartilico (Q1-Q3). $p < 0,05$.

Dentre as participantes do estudo que estavam em uso de hormônios, 08 se encontravam na faixa etária de (18 a 40) e 05 (41 a 85 anos). As mulheres em uso de terapia hormonal, apresentaram maiores valores de PCRus, em relação aquelas que não faziam uso de hormônios, $p = 0,037$, indicando uma alteração no perfil inflamatório dessas mulheres. Além disso, os parâmetros de avaliação da GT apresentaram diferenças significativas as variáveis *Lagtime (Low TF)* ($p = 0,002$) e *(High TF)* ($p = 0,028$), *ETP (Low TF)* ($p = 0,035$), *Peak (Low TF)* ($p = 0,008$) e *(High TF)* ($p = 0,016$), *time to peak (Low TF)* ($p = 0,004$) e *High TF* ($p = 0,007$), onde as variáveis *ETP (Low TF)*, *Peak (Low TF)* e *(High TF)* foram maiores nas mulheres com terapia indicando uma maior geração de trombina nessas mulheres e, portanto, se apresentaram mais hipercoaguláveis. Ao passo que as outras variáveis *Lagtime (Low TF)*, *time to peak (Low TF)*, *Lagtime (High TF)* e *time to peak (High TF)*, mostraram maiores valores nas mulheres sem terapia hormonal, ou seja, essas mulheres se apresentaram mais hipocoaguláveis, **Tabela 10**. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos de mulheres em uso ou não de terapia hormonal.

Ao analisar as variáveis relacionadas aos pacientes em uso de medicamentos que interferem com os parâmetros da coagulação como os anti-agregantes plaquetários, devido ao

tamanho de amostra muito baixo, não foi possível realizar os testes. O grupo apresentava somente 05 participantes no total, entre os quais 04 pacientes faziam parte do grupo T (Estatina) e apenas 01 do NT. O tabagismo também não foi considerado devido ao número muito reduzido de participantes, sendo que apenas 02 relataram ter o hábito.

6.9- Análise de correlação entre os parâmetros analisados do perfil lipídico, PCSK9, PCRus e do teste de GT entre os grupos NT e T

Na análise de correlação entre os pares de variáveis consideradas e, os grupos NT e T, o coeficiente de correlação não paramétrico de *Spearman* foi aplicado para avaliar a força da associação entre as variáveis quantitativas. Na **tabela 11** são apresentados os resultados para as variáveis nas quais o valor absoluto do coeficiente foi maior que 0,3 ($\rho < - 0,3$ ou $\rho > 0,3$) e que foi considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o grupo NT e na **tabela 12** para o grupo T. A análise de correlação dos parâmetros com os 2 grupos juntos não foi feita devido ao fato das variáveis serem afetadas pelo tratamento.

Tabela 11- Resultados dos coeficientes de correlação de *Spearman* ($\rho < - 0,3$ ou $\rho > 0,3$ e $p < 0,05$) para os parâmetros analisados e o grupo NT (n=27)

Parâmetro	CT	LDLc	não-HDL	TG	PCSK9	PCRus
PCSK9 (ng/mL)	0,595	0,536	0,572	0,615	-	-
ETPLTF (nM/min)	0,404	-	-	-	-	-
PeakLTF (nM)	-	-	-	-	0,400	-
ETPHTF (nM/min)	-	-	-	-	-	0,396
PeakHTF (nM)	0,454	-	0,419	-	-	-

CT= Colesterol Total, LDLc= Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular, não-HDL= Colesterol não HDL, TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína ConvertaseSubtilisina/Kexina tipo 9, PCRus= Proteína C Reativa ultrasensível, ETPLTF= ETP LowTissueFactor, PeakLTF= PeakLowTissueFactor, ETPHTF= ETP High TissueFactor, PeakHTF= Peak High TissueFactor. n=número de participantes.

Para o grupo de NT, na análise de correlação aos pares de variáveis foi verificada associação positiva da PCSK9 com o CT ($\rho = 0,595$; $p = 0,001$), LDLc ($\rho = 0,536$; $p = 0,004$), não-HDL ($\rho = 0,572$; $p = 0,002$) e TG ($\rho = 0,615$; $p = 0,001$). Para os parâmetros do teste de GT foi verificada correlação positiva entre o ETP (*Low TF*) com o CT ($\rho = 0,404$; $p = 0,037$) e Peak (*Low TF*) com PCSK9 ($\rho = 0,400$; $p = 0,039$), ETP (*High TF*) com PCRus ($\rho = 0,396$; $p = 0,041$) e

do *Peak (High TF)* com CT ($\rho= 0,454$; $p= 0,017$) e com o não-HDL ($\rho= 0,419$; $p= 0,030$), conforme **Tabela 11**.

Tabela 12- Resultados dos coeficientes de correlação de *Spearman* ($\rho < - 0,3$ ou $\rho > 0,3$ e $p < 0,05$) para os parâmetros analisados e o grupo T (n=53)

Parâmetro	CT	LDLc	não-HDL	TG	PCSK9	PCRus
PCSK9 (ng/mL)	0,378	-	0,320	0,376	-	-
ETPLTF (nM/min)	-	-	-	0,487	-	-
PeakLTF (nM)	-	-	-	0,487	0,391	0,342
ETPHTF (nM/min)	-	-	-	0,392	-	-

CT= Colesterol Total, LDLc= Colesterol presente na lipoproteína de alto peso molecular, não-HDL= Colesterol não HDL, TG= Triglicérides, PCSK9= Pró-proteína ConvertaseSubtilisina/Kexina tipo 9, PCRus= Proteína C Reativa ultrasensível, ETPLTF= ETP LowTissueFactor, PeakLTF= PeakLowTissueFactor, ETPHTF= ETP HighTissueFactor.

Para o grupo de T, na análise de correlação aos pares de variáveis foi verificado associação positiva da PCSK9 com o CT ($\rho= 0,378$; $p= 0,006$), e não-HDL ($\rho= 0,320$; $p= 0,021$) e TG ($\rho= 0,376$; $p= 0,006$). Para os parâmetros do teste de GT foi verificada correlação positiva entre o *ETP (Low TF)* com o TG ($\rho= 0,487$; $p= 0,001$); *Peak (Low TF)* com o TG ($\rho= 0,484$; $p= 0,001$), PCSK9 ($\rho= 0,391$; $p= 0,004$) e com a PCRus ($\rho= 0,342$; $p= 0,012$), *ETP (High TF)* com TG ($\rho= 0,392$; $p= 0,004$), conforme **Tabela 12**.

6.10- Análise de correlação entre os parâmetros: PCSK9 versus do teste de GT

Para finalizar, foi feita a correlação linear de *Spearman* entre PCSK9 e as variáveis do teste de GT, separadamente para cada uma das três faixas de idade (3 a 17), (18 a 40) e (41 a 85) anos. Para todas as faixas etárias, juntas, foi encontrada uma correlação negativa da PCSK9 com a variável *time to peak (Low TF)* ($\rho= - 0,352$; $p= 0,001$) e positiva com *Peak (Low TF)* ($\rho=0,414$; $p= 0,001$).

Foi encontrada também correlação negativa da PCSK9 com as variáveis *Lagtime (Low TF)* ($\rho= - 0,485$; $p= 0,009$) e *time to peak (Low TF)* ($\rho= - 0,603$; $p= 0,001$) para a faixa etária de 18 a 40 anos, porém, a PCSK9 foi correlacionada positivamente com *ETP (Low TF)* ($\rho=0,578$; $p= 0,001$), *Peak (Low TF)* ($\rho= 0,652$; $p= 0,001$) e *Peak (High TF)* ($\rho= 0,537$; $p=0,003$). No entanto, para a faixa etária de (3 a 17) e (41-85) anos, nenhuma correlação foi encontrada.

7- DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos que o perfil lipídico aterogênico que compreende as dosagens do CT, LDLc e não-HDL estavam aumentados, enquanto a fração HDLc e TG estavam dentro da normalidade nos indivíduos do grupo NT, apresentando valores que caracterizam o diagnóstico clínico da doença. O grupo T apresentou uma redução significativa das frações do CT, LDLc e não-HDL e, ainda redução do TG e aumento do HDLc, enquanto que para a PCSK9 houve um aumento significativo no grupo T em relação ao grupo NT. Essa resposta já é esperada com o uso de estatina, pois o mecanismo de ação da droga é inibir a HMG-CoA redutase, enzima responsável pela síntese de colesterol intracelular. A redução desse colesterol leva ao aumento da expressão de LDLR e da PCSK9 pela ativação da via de SREBP-2 (URBAN *et al.*, 2013). Vários autores também reportaram esse aumento plasmático da PCSK9 em paralelo ao uso de estatina, Guo *et al.* (2013) verificaram um aumento da PCSK9 de 5 a 7 %, em indivíduos com uso de 10 mg de atorvastatina por 08 semanas, enquanto com o uso de atorvastatina de 20 mg pelo mesmo período foi verificado um aumento ainda maior da PCSK9 de 35%, sugerindo claramente que há um efeito dose-resposta da atorvastatina sobre os níveis da PCSK9, ou seja, quanto maiores as doses da atorvastatina, maiores serão os níveis circulantes da PCSK9. Sahebkar *et al.* (2015), por meio de estudo de metanálise, investigaram se o mesmo efeito acontece com outros tipos de estatinas e constataram que as maiores elevações de PCSK9 ocorrem com as estatinas lipofílicas (atorvastatina, sinvastatina, pitavastatina e fluvastatina) comparando com as estatinas hidrofílicas (rosuvastatina e pravastatina), verificaram que o aumento da PCSK9 com as estatinas é dependente da dose e da natureza dessas drogas. Outro fármaco presente neste estudo foi a ezetimiba, que comparado à estatina, tem poucos estudos relacionados ao seu efeito sobre os níveis da PCSK9. Em um estudo pré-clínico com a ezetimiba em monoterapia por 07 meses, verificou-se um aumento significativo dos níveis da PCSK9 em 37% em macacos *Cynomolgus* dislipidêmicos (HENTZE *et al.*, 2013). Outros autores em um estudo de metanálise verificaram que não houve elevação significativa dos níveis de PCSK9 com uso da terapia combinada de estatina/ezetimiba comparando com a estatina em monoterapia (SAHEBKAR *et al.*, 2015).

O pareamento com sexo e com a idade entre os grupos NT e T, separadamente, foi necessário para que os resultados fossem analisados intragrupo, e verificar quais parâmetros se diferenciam quando os indivíduos são pareados pelo sexo (homens *versus* mulheres) e pela idade (jovens *versus* adultos).

Quando os participantes foram pareados pelo sexo, foi observado que no grupo NT, as mulheres apresentam CT, LDLc e não-HDL mais altos que os homens. Enquanto, no grupo T, as mulheres mostraram valores mais altos que os homens no perfil lipídico para a fração HDLc e para TG. No grupo de T, o uso da estatina pode explicar o aumento significativo de HDLc, pois o tratamentos com hipolipemiantes têm como objetivo o aumento do HDLc com estatinas e prevenção de eventos cardiovasculares. Da mesma forma, foi demonstrado pelo *LIPID Study Group* (1998) o acompanhamento de 9.014 participantes, que 4.512 receberam estatina (pravastatina) e 4.502 receberam placebo, no final dos cinco primeiros anos do estudo, os participantes que receberam estatina tiveram um aumento significativo de HDLc em 5 % a mais que o grupo que recebeu placebo, porém não fizeram discriminação entre os homens e as mulheres. No entanto, discordante dos resultados do presente estudo, os níveis de TG no estudo (*LIPID Study Group*, 1998) foram reduzidos com o uso da estatina em 11% em relação ao grupo placebo. Uma explicação, para níveis de TG mais alto no presente estudo, poderia estar relacionado a níveis de estrógeno nas mulheres, em uso de terapia hormonal. Persson e colaboradores (2012) demonstraram o perfil lipídico de 31 mulheres submetidas à fertilização *in vitro*, as quais foram colocadas sob altas taxas de estrógeno endógeno por estimulação de FSH recombinante, uma redução nos valores do VLDLc e LDLc com níveis de HDLc inalterado, e, concomitantemente apresentando aumento do TG em 37%. Outros autores em estudos de coorte tentam explicar também as diferenças no gênero e a influência que a idade pode exercer na mudança do perfil lipídico (JOUSILAHTI *et al.*, 1999; FREEDMAN *et al.*, 2004; VITALE *et al.*, 2009). Jousilahti *et al.* (1999) acompanharam 14.786 homens e mulheres por meio de um estudo prospectivo na Finlândia por quase 07 anos, com medidas de fatores de risco cardiovascular iguais para ambos os sexos, dentre eles o perfil lipídico e, constataram que mulheres em pré-menopausa apresentavam baixas concentrações de CT, LDLc, TG e, níveis de HDLc mais alto em relação aos homens. O risco cardiovascular aumentou marcadamente com a idade em ambos os sexos. Os homens têm aumento do risco em torno dos 45 a 55 anos, enquanto nas mulheres aumenta bruscamente após a menopausa (ROMERO-MORALEDA *et al.*, 2015). As mulheres no pré-menopausadas têm gordura na região glútea mais proeminente, ao passo que nos homens o padrão de obesidade é andróide e a gordura visceral é fonte importante de liberação de ácidos graxos livres e, mediadores inflamatórios, que contribuem para anormalidades lipídicas (REGITZ-ZAGROSEK *et al.*, 2007). Gu e colaboradores (2015) também em um estudo retrospectivo de 230.000 indivíduos na China, entre os anos de 2009 a 2015 observaram um aumento na dislipidemia naquele país. A população urbana foi a mais

afetada nos indivíduos acima de 20 anos, ambos os sexos, foram analisados com dosagens do perfil lipídico de jejum. Esses autores observaram que os homens foram afetados com uma média de idade entre 40 a 59 anos, e as mulheres na pós-menopausa.

Lakoski *et al.* (2009) avaliaram os níveis de PCSK9 numa população multiétnica, incluindo homens e mulheres não menopausadas, sem tratamento de estatinas, revelando diferença entre os sexos, onde mulheres apresentaram PCSK9 maior que os homens, mesmo após ajuste com idade, etnicidade, IMC, pressão arterial, estado de menopausa, glicose de jejum, nível de LDLc, HDLc, TG e PCR. Os autores também encontraram valores maiores da PCSK9 em mulheres na pós-menopausa do que em mulheres na pré-menopausa. Os achados evidenciam que há uma redução da PCSK9 circulante estrógeno-induzida e que também aumenta o gene de expressão do LDLR, em parte por via pós-transcricional, além de aumentar o *clearance* das lipoproteínas que contém a apo-B pelos receptores de LDLc nos hepatócitos (PERSSON *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram reportados por Cui e colaboradores (2010) que também estudaram os níveis de PCSK9 em 2.719 adultos chineses, encontrando níveis levemente mais altos em mulheres em comparação aos homens, e as mulheres pós-menopausadas tinham níveis significativamente mais elevados que mulheres pré-menopausadas. Os níveis de PCSK9 encontrados foram correlacionados com múltiplas variáveis metabólicas incluindo idade, IMC, perfil lipídico, glicemia de jejum e pressão arterial. Enquanto que, para os homens encontraram correlação positiva da PCSK9 com CT, TG e pressão arterial sistólica, nas mulheres, encontraram correlação positiva com CT, idade e pressão arterial diastólica, indicando que a PCSK9 pode ser um biomarcador do estado metabólico e de doença cardiovascular (CUI *et al.*, 2010). Estudos com a PCSK9 mostram efeitos desta proteína no metabolismo lipídico em adição ao papel nos LDLR, incluindo os alvos conhecidos dessa proteína como os receptores de VLDLc (VLDLR) (POIRIER *et al.*, 2008). Estudos em camundongos com PCSK9-*Knockout* ou PCSK9-transgênicos, revelaram que a baixa da PCSK9 melhora a entrada de TG e ácidos graxos nos adipócitos viscerais pelos VLDLR, ocasionando uma redução da hipertrigliceridemia pós-prandial (LE MAY *et al.*, 2009; LAGACE, 2014; LI e LI, 2015).

Os grupos NT e T quando pareados entre jovens e adultos, somente os adultos tratados do presente estudo apresentaram maiores valores de forma significativa para TG e PCSK9 em relação aos jovens tratados. McKenney *et al.* (2012) descrevem uma associação positiva entre a PCSK9 plasmática e TG na população em geral e, quando se tinha a inibição da PCSK9 por

anticorpos específicos, observaram associação na redução dos níveis de TG. Esses estudos corroboram com os nossos resultados de aumento de TG e PCSK9 no grupo de T de adultos se analisarmos uma maior representação por mulheres adultas em tratamento.

Após a divisão dos grupos NT e T, de acordo com a faixa etária em anos, as análises para os parâmetros TG e PCSK9 apresentaram diferenças estatísticas, com valores mais altos para a faixa etária de maior idade. Em acordo com os nossos resultados, esses resultados também são encontrados em vários outros estudos (POIRIER *et al.*, 2008; LAKOSKI *et al.* 2009; CUI *et al.*, 2010). E ainda, com relação ao tipo de tratamento entre os grupos tratados com estatina e com a associação ezetimiba + estatina, diferenças foram encontradas para as variáveis do perfil lipídico CT, LDLc e não-HDL com valores mais reduzidos para todos os parâmetros no grupo em tratamento com ezetimiba + estatina. Em pacientes com HF heterozigotos o tratamento com estatinas mais potentes ou com terapias combinando estatinas + ezetimiba, pode-se atingir níveis de LDLc menores que 100 mg/dl. De acordo com nossos resultados, a terapia combinada também se mostrou ser mais eficaz na redução do perfil lipídico aterogênico (CT, LDLc e não-HDL) em acordo com os estudos de OGURA, 2017. O uso de estatina está indicado para terapias de prevenção primária e secundária como primeira opção como já foi demonstrado em *trials* comparando o uso de várias estatinas ou a mesma estatina em várias doses como uma terapia agressiva na redução do LDLc na HF (MCKENNEY *et al.*, 2012; NORDESTGAARD *et al.*, 2013, OGURA, 2017). No entanto, a aprovação do tratamento com as estatinas mais potentes e, em altas doses, oferece um acréscimo limitado na redução do LDLc e, também um aumento da incidência de efeitos colaterais. Já a associação da estatina com a ezetimiba, a qual atua na inibição da NCP1L1 e a absorção intestinal de colesterol, proporciona um incremento na redução dos níveis de LDLc de 12 a 19%, segundo KASTELEIN *et al.*, 2008. Em estudos, comparando placebo e a ezetimiba associada com estatina, foi observado redução em eventos CV em pacientes com estenose aórtica degenerativa e doença renal crônica em uso da terapia combinada (ROSSEBO *et al.*, 2008; BAIGENT *et al.*, 2011). Kastelein e colaboradores (2008) conduziram um estudo randomizado durante 02 anos com 720 pacientes portadores de HF, em que 363 usaram somente sinvastatina e 357 usaram terapia combinada de sinvastatina + ezetimiba, acompanharam o perfil lipídico e a medida da camada íntima da carótida. Após 24 meses de tratamento, verificaram uma redução no LDLc entre os grupos de 16,5%, sendo maior a redução no grupo com terapia combinada (sinvastatina + ezetimiba) e verificaram também reduções significativas de TG e PCR no mesmo grupo, porém, não observaram modificações na camada íntima arterial entre os 02 grupos.

Na análise comparativa entre as mulheres adultas que estavam em uso ou não de terapia hormonal, o perfil lipídico não mostrou diferença entre os dois grupos. No entanto, a PCRus apresentou valores maiores nas mulheres com terapia hormonal de forma significativa em relação às mulheres sem a terapia, portanto, apresentaram mais inflamadas e menos protegidas do ponto de vista cardiovascular. Níveis de PCR estão aumentados em mulheres aparentemente saudáveis em uso de terapia hormonal e com isso, acredita-se que a terapia estrogênica pode agravar ou estimular processos inflamatórios em mulheres predispostas, podendo contribuir para progressão de aterosclerose e processo trombótico, estudos também estão em acordo com os nossos dados (KURTZ *et al.*, 2011; LAKRYC *et al.*, 2015). No entanto, este efeito ainda não está totalmente elucidado segundo Hodis *et al.*, 2008 e Lakryc, 2015.

Lakoski e Herrington (2005) verificaram em estudos observacionais e randomizados, diferenças nas concentrações de PCR e IL-6 com relação à terapia hormonal e mostraram que os níveis de PCR estão elevados na maioria das mulheres na pós-menopausa e terapia hormonal oral. Blumenfeld e colaboradores (2007) verificaram também em estudo caso-controle que a PCR em mulheres que faziam uso de reposição hormonal, as quais foram observadas por nove meses ou mais, se mostrou significativamente aumentada com o uso da terapia hormonal oral nessas mulheres. Um estudo conduzido na população brasileira, foram avaliadas 44 mulheres eutróficas em fase reprodutiva, na idade de 18 a 28 anos e distribuídas em 02 grupos, um em uso de contraceptivos com pelo menos 01 ano e, o outro sem o uso de contraceptivos, as mulheres em uso de contraceptivo oral apresentavam os maiores valores de PCR (PETTO *et al.*, 2013). Ridker *et al.*(2007) avaliaram o poder preditivo de fatores de risco não tradicionais na predição de eventos cardiovasculares e, acompanharam 24.588 mulheres aparentemente saudáveis por 10,2 anos nos Estados Unidos. Os autores observaram que existe uma acuidade prognóstica superior aos modelos cujos escores são baseados apenas em variáveis tradicionais, como o escore de predição de risco cardiovascular (*The Reynolds Risk Score*), escore simplificado e que incluiu a PCR.

Analisando os parâmetros de hemostasia, encontramos na comparação entre o grupo NT e T, diferença significativa no *time to peak* com baixa e alta concentração de fator tissular, com o grupo NT mostrando valores maiores do que no grupo T, portanto, mostra maior geração de trombina no grupo de NT. Passando às análises dos parâmetros de hemostasia nos grupos separados com ajustes para sexo e idade, no grupo NT não mostrou diferença entre os sexos, porém mostrou diferença entre jovens e adultos, com valores maiores de *ETP* com alta

concentração de FT nos adultos. No grupo T, mostrou diferença entre homens e mulheres, tanto na avaliação de *lagtime* e *time to peak Low TF* e *Peak High TF*, onde as mulheres mostraram ser mais hipercoaguláveis que os homens, tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca da coagulação. Ainda no grupo T, comparando as idades, os adultos mostraram mais hipercoaguláveis do que os jovens, com alterações tanto em *ETP* e *Peak Low TF* quanto em *ETP* e *Peak High TF*. Na avaliação dos parâmetros de hemostasia em relação aos grupos de idade, os adultos mostraram ser mais hipercoaguláveis em comparação com as outras faixas etárias. No global, a população feminina apresenta perfil pró-trombótico, como Cheryl e colaboradores (2017) mostraram num estudo que recrutaram 64 voluntários normais, com 21 homens e 43 mulheres, com mediana idade de 44 (20 e 79) anos, foram submetidos ao ensaio de GT pelo método de CAT, em que todos mostravam perfil normal de coagulação, contagem de plaquetas e nenhuma outra anormalidade sanguínea e mesmo após análises multivariadas, incluindo idade e etnia, a diferença entre os sexos permaneceu estatisticamente diferente. Neste mesmo estudo, na comparação de idade, os indivíduos mais velhos (> 50 anos) tiveram mais perfil para hipercoagulabilidade em todos os parâmetros. Conforme esperado, o perfil lipídico sofreu menos efeito do tratamento hipolipemiante nos adultos. Estes também apresentaram maior geração de trombina, sinalizando para hipercoagulabilidade, o que se traduz por valores mais elevados de *ETP* e *Peak* com *Low* e *High TF*. De fato, a idade tem sido apontada como um fator importante para o aumento do potencial de geração de trombina (FAVALORO *et al.*, 2014). Porém, é possível que um perfil lipídico já muito alterado previamente e que vem se mantendo ainda com alguma alteração apesar do tratamento, possa estar contribuindo também para este perfil hipercoagulável mais expressivo em adultos. Esses resultados corroboram com os resultados do nosso estudo que, mesmo após a divisão dos grupos pelas faixas etárias, os 02 subgrupos de adultos mostraram mais hipercoaguláveis em relação aos jovens. Nestas faixas etárias, os níveis de TG e da PCSK-9 aumentaram significativamente com a idade conforme esperado. Em relação aos parâmetros de geração de trombina, estes também se mostraram mais elevados (*ETP* e *Peak* com *Low* e *High TF*) com o envelhecimento. Assim, estes parâmetros se elevaram nas faixas de 18 a 40 anos e de 41 a 85 anos, com maior expressão na primeira, provavelmente devido ao uso de contraceptivos orais por algumas mulheres desta faixa etária. Tal uso indubitavelmente contribuiria para elevação dos parâmetros citados, configurando um perfil de hipercoagulabilidade.

Quando as análises dos parâmetros de GT foram feitas com os subgrupos de idade, comparando NT e T em cada faixa etária, foi verificado que a faixa de 41 a 85 anos apresentou

lagtime, *Peak* e *time to peak Low TF* alterados mostrando que o grupo T estava mais hipercoagulável que o grupo NT. Os nossos resultados estão discordantes daqueles encontrados na literatura (SANGUIGNI *et al.*, 2005; MOBARREZ *et al.*, 2011; OWENS-III *et al.*, 2014; UNDAS *et al.*, 2014; TRIPODI *et al.*, 2014). Uma das justificativas para explicar os resultados encontrados no presente estudo, poderia estar relacionada com o número de participantes de cada grupo, pois o grupo T (n=29) evidencia um número maior de participantes que o grupo NT (n=6).

Na avaliação no grupo T, onde foi feita a comparação entre os tipos de tratamento (estatina *versus* estatina+ezetimiba), os parâmetros de GT mostraram maiores valores de *ETP Low TF* e *High TF* no grupo de monoterapia (estatina) em relação ao grupo de terapia conjugada (estatina+ezetimiba). Conjuntamente, a redução no perfil lipídico também foi maior na terapia conjugada (estatina+ezetimiba) do que no grupo monoterapia (estatina). Os valores maiores de *ETP* em *Low* e *High TF* verificados no grupo de monoterapia mostraram que, esses indivíduos estão mais hipercoaguláveis que os do grupo de terapia conjugada. Alguns estudos corroboram com nossos resultados como o de Tripodi *et al.* (2014) que estudaram em um grupo de 51 pacientes, o potencial endógeno através do estudo de coagulação com baixa concentração de FT que era medido antes e após 02 meses de tratamento com a estatina e mostrou redução dos níveis de colesterol total e aumento de HDLc, e o potencial endógeno de geração de trombina foi reduzido após o tratamento, suportando a hipótese de que há uma ligação entre estatinas e coagulação através da capacidade de reduzir geração de trombina em pacientes com hipercolesterolemia, que levou à concluir que as estatinas reduzem níveis de colesterol na hipercolesterolemia ao mesmo tempo que reduz trombina, principalmente pelo seu efeito potencial de redução de trombina endógena. Portanto, intervenções terapêuticas que ajudam na redução do colesterol plasmático levam à redução de inflamação sistêmica como demonstrado pela redução de PCR por terapias hipolipemiantes (KINLAY, 2007). Também efeitos benéficos das estatinas na redução de geração de trombina podem ser medidas, em parte, através da redução de fatores de coagulação como reportados em estudos prévios (PORRECA *et al.*, 2000; MORISHITA *et al.*, 2002; ADAMS *et al.*, 2013). Numa revisão de literatura, foram descritos os efeitos das estatinas na expressão de FT e coagulação, em que reduz a expressão de FT leucocitário, das micropartículas FT positivo e consequentemente a coagulação. Esses estudos sugerem que, a atividade anticoagulante pelas estatinas é dada em parte, pela sua habilidade em reduzir expressão de FT de monócitos em pacientes com DCV (OWENS-III *et al.*, 2013) que é o chamado “efeito pleiotrópico”. Outros estudos também mostram o aumento de expressão da

Trombomodulina (TM) pelas estatinas e ativação da via de anticoagulantes naturais (PC e PS) (SHI *et al.*, 2003; UNDA *et al.*, 2014). A combinação de estatina com ezetimiba parece ter resultado em redução da ativação da cascata de coagulação limitando a geração de trombina, ou seja, limitando o potencial trombótico. No entanto, estudos mais robustos com foco nesta questão merecem ser desenvolvidos já que nossos resultados sugerem que o tratamento combinado (estatina + ezetimiba) pode ter vantagem sob o ponto de vista lipídico e hemostático. Uma revisão da literatura sobre esta importante questão não revelou qualquer relato, o que pode abrir uma interessante perspectiva de novos estudos com esta abordagem específica.

Avaliando as mulheres adultas e terapia hormonal, os parâmetros de GT mostraram aumentados nas mulheres com o uso de terapia hormonal feminina (contraceptivos e reposição) onde o *ETP*, *Peak* e *time to peak Low TF* e *High TF* mostraram valores compatíveis com perfil de hipercoagulabilidade nessas mulheres. Os testes realizados com baixa concentração de FT (*Low TF*) são mais sensíveis para detectar alterações da via intrínseca e deficiência de Inibidor da via de fator tissular (TPFI), pois esses fatores requerem uma reação mais lenta para ter seu efeito, indicando a influência da terapia hormonal feminina, ocasionando uma alteração nesta via com consequente desequilíbrio na hemostasia e predispondo ao estado pró-trombótico, como alguns estudos relatam aumento dos níveis sanguíneos de fator VIII, diminuição de anticoagulantes naturais como a PC e seu cofator PS (BRITO *et al.*, 2011; PADOVAN e FREITAS, 2015). A análise do perfil lipídico, inflamatório (PCRus) e do teste de GT entre mulheres que usam ou não terapia hormonal revela um indiscutível efeito do uso de hormônios sobre a hemostasia, com ativação desta, conforme já amplamente descrito na literatura (TCHAIKOVSKI *et al.*, 2007; MOHAMED *et al.*, 2018). Consequente ao aumento da PCRus nas usuárias de hormônios, pode-se inferir um perfil inflamatório mais expressivo, que também interfere na coagulação aumentando os níveis plasmáticos de FVIII da coagulação e redução dos níveis plasmáticos de PS repercutindo nos parâmetros do teste de GT incluindo redução de *Lagtime* e *time to peak* e aumento de *ETP* e *Peak*, tanto com *Low* e *High TF*, implicando em um estado de hipercoagulabilidade em usuárias de terapias hormonais (TCHAIKOVSKI *et al.*, 2007; MOHAMED *et al.*, 2018).

Nas análises de correlação, no grupo NT foi verificada correlação positiva entre o perfil lipídico e os parâmetros de GT *ETP Low TF* e *Peak High TF*. A PCSK9 também teve correlação positiva com *Peak Low TF* e a PCRus com *ETP High TF*, mostrando perfil de

hipercoagulabilidade nestes indivíduos. A relação de altos níveis de lipídios com aumento de coagulação já foi bem demonstrada por meio de estudos clínicos (OWENS-III *et al.*, 2013; UNDAS *et al.*, 2014; TRIPODI *et al.*, 2014). O mesmo resultado é esperado com a PCSK9 e PCRus que corroboram com estudos que demonstram as correlações com hipercolesterolemia e doença aterosclerótica. Wang e colaboradores (2016) hipotetizaram que os níveis de PCSK9 plasmáticos podem estar associados de forma independente e positiva com FT em pacientes diabéticos que apresentam DAC, mas sugerem que futuros estudos serão necessários para entendimento deste mecanismo. No grupo de T, as correlações também foram positivas entre o perfil lipídico e parâmetros de GT, sendo mais com TG e mostrando tendência à hipercoagulação nesses indivíduos. A PCSK9 e PCRus também mantiveram as correlações positivas.

Finalmente, a correlação da PCSK9 com os parâmetros de GT com as faixas etárias extremas (jovens e adultos acima de 41 anos) não foi encontrada. Porém, a correlação da PCSK9, na faixa etária de 18 a 40 anos, foi negativa com *Lagtime Low TF*, o que significa que quando a PCSK9 subiu e a *Lagtime Low TF* desceu, e a PCSK9 teve correlação positiva com *ETP Low TF* e *Peak Low TF*, ou seja, quando ela subiu, esses também subiram mostrando tendência à hipercoagulação ativada pela via intrínseca que é avaliada pela *Low TF*. Até o momento, não temos dados de nenhum estudo para respaldar essa correlação. Mas, existem algumas particularidades nesse grupo da faixa de 18 a 40 anos (n=28): 1) por ser composto mais por mulheres adultas, sendo NT (H=7 e M=7) e T (H=3 e M=11) e; 2) dessas 18 mulheres adultas nessa faixa etária, 08 estavam em uso de terapia hormonal (grupo NT=3 e grupo T=5), hipotetizando a influência da terapia hormonal feminina nos resultados da hemostasia.

Em suma: no presente estudo, as mulheres mostraram níveis mais altos de CT, LDLc e não-HDL em relação aos homens. As mulheres tratadas, mostraram aumento de HDLc. Os jovens quando tratados apresentaram redução dos níveis de perfil lipídico aterogênico e hemostático. O uso da terapia combinada (estatina + ezetimiba) mostrou superioridade no tratamento dos portadores de HF. Mulheres em terapia hormonal apresentam maiores valores de PCR e ativação do sistema hemostático. A PCSK9 se correlacionou positivamente com níveis de perfil lipídico aumentado e idade avançada e, parâmetros de tendência à hipercoagulabilidade correlacionaram positivamente com PCSK9 e perfil lipídico.

8- CONCLUSÃO

A combinação de estatina com ezetimiba parece ter resultado na redução da ativação da cascata de coagulação limitando a geração de trombina, com isso limita o potencial trombótico e, ainda mostrou-se superioridade na redução do perfil lipídico.

9- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fim de propiciar um melhor entendimento sobre as variáveis analisadas neste estudo e sua relação com HF e com o tratamento desta, seguem algumas considerações:

Uma das limitações no presente estudo foi o número amostral para especificação de cada tratamento quanto ao tipo de estatina, dose usada e o tempo de tratamento. Se procedesse para cada um desses itens, o n amostral seria muito pequeno para as análises.

Outra limitação foi o número de participantes da faixa etária mais avançada (41 a 85 anos), em que os parâmetros analisados sofrem mais alterações. Quando os parâmetros de geração de trombina foram analisados em função dos tratados e não tratados, e de acordo com a faixa etária, observou-se uma coerência com os resultados prévios, ou seja, uma tendência à hipercoagulabilidade nas faixas de idade mais avançadas, particularmente nos não tratados, em relação à faixa de 03 a 17 anos, porém, com destaque outra vez para a faixa de 18 a 40 anos. No entanto, chama a atenção que na faixa de 41 a 85 anos, os tratados apresentaram maior potencial de geração de trombina, traduzidos por aumento da *ETP* e redução de *time to peak* com *Low TF*; e redução do *time to peak* e *Lagtime* com *High TF*. Uma hipótese para explicar este efeito paradoxal do tratamento poderia ser o n amostral muito maior no grupo T em relação ao NT.

Na faixa etária de 18 a 40 anos, onde a correlação da PCSK9 com a hemostasia foi positiva, também tivemos maior número de mulheres em uso de terapia hormonal, porém não sabemos se o número de usuárias de terapia pode ser impactante nos resultados de coagulação, ou se poderá ser um dado inédito neste trabalho. O que nos faz pensar em prosseguir as investigações em um grupo maior, avaliando a coagulação nessa faixa etária, mulheres portadoras de HF sem uso de terapia hormonal, para conseguir novas conclusões a respeito desse tema.

REFERÊNCIAS

- ABIFADEL, M.; VARRET, M.; RABÈS, J. P.; ALLARD, D.; OUGUERRAM, K.; DEVILLERS, M.; CRUAUD, C.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; ERLICH, D.; DERRÉ, A. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. **Nature Genetics**, v. 34, p. 154-156, 2003.
- ADAMS, N.B.; LUTSEY, P.L.; FOLSOM, A.R.; HERRINGTON, D.H.; SIBLEY, C.T.; ZAKAI, N.A.; Statin therapy and levels of hemostatic factors in a healthy population : the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v.11, p. 1078-1084, 2013.
- ALONSO, R.; CASTILLO, S.; CIVEIRA, S.; PUZO, J.; CRUZ, J.J.; POCOVI, M.; MATA, P., Hipercolesterolemia familiar heterocigota em España. **Medicina Clinica**, v.118, n.13, p. 487-92, 2002.
- AUSTIN, M.A.; HUTTER, C.M.; ZIMMERN, R.L.; HUMPHRIES, S.E. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. **American Journal of Epidemiology**, v.160, n.5, p. 407-420, 2004.
- AWAN, Z.; SEIDAH, N. G.; MBIKAY, M.C.M. PCSK9: A key modulator of cardiovascular health. **Circulation Research**, v.114, p.1022-1036, 2014.
- BAIGENT, C.; LANDRAY, M.J.; REITH, C.; EMBERSON, J.; WHEELER, D.C.; TOMSON, C.; WANNER, C.; KRANE, V.; CASS, A.; CRAIG, J.; NEAL, B.; LAI, L.J.; HOOL, S.; LEVIN, A.; AGODOA, L.; GAZIANO, M.; KASISKE, B.; WALKER, R.; COLLINS, R. et al. SHARP Investigators. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v.377, p. 2181-2192, 2011.
- BAYNES, J.W.; DOMINICZAK M.H., **Bioquímica Médica**. 2ª edição. Ed. Elsevier, 2005.
- BERNTORP, E.; SALVAGNO, G.L. Standardization and Clinical Utility of Thrombin-Generation Assays. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.34, n.7, p. 670-682, 2008.
- BLUMENFELD, Z.; BOULMAN, N.; LEIBA, R.; SIEGLER, E.; SHACHAR, S.; LINN, R.; LEVY, Y. High C-reactive protein levels are associated with oral hormonal menopausal therapy but not with intrauterine levonorgestrel and transdermal estradiol. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.67, n.3, p. 257-263, 2006.
- BOUCHER, B.A.; TRAUB, O. Achieving hemostasis in the surgical Field. **Pharmacotherapy**, v.29, n.7, p. 2S-7S, 2009.
- BOUHAIRIE, V. E.; GOLDBERG, A. C. Familial Hypercholesterolemia. **Cardiology Clinics**, v.33, n.2, p.169-179, 2015.

- BRITO, M.B.; NOBRE, F.; VIEIRA, C.S. Contracepção hormonal e sistema cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.96, n.4, p. e81-e89, 2011.
- BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. **Science**, v.191, n.4223, p.150-4, 1976.
- CANUEL, M.; SUN, X.; ASSELMIM, M.C.; PARAMITHIOTIS, E.; PRAT, A.; SEIDAH, N. G. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). **PLoSOne**, v.8, p. e641-45, 2013.
- CASTRO, P. S.; OLIVEIRA, F.L. Prevenção da aterosclerose e tratamento medicamentoso de anormalidades lipídicas de alto risco em crianças e adolescentes. **Jornal de Pediatria – Sociedade Brasileira de Pediatria**, v.85, n.1, p. 6-14, 2009.
- CATAPANO, A.L.; PIRILLO, A.; NORATA, G.D. Anti-PCSK9 antibodies for the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: patient selection and perspectives. **Vascular Health and Risk Management**, v.13, p. 343-351, 2017.
- CIVEIRA, F., International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.173, n.1, p. 55-68, 2004.
- CHERYL, N.G.; RIGANO, J.; TACEY, M. Significant age, race and gender differences in global coagulation assays parameters in normal population. **Thrombosis Research**, v.154, p. 80-83, 2017.
- COOPER, D.N., Institute of Medical Genetics in Cardiff. The human gene mutation database. [Cited in 2011 Nov 11]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Acesso em Nov 2018.
- CORRAL, P. De volta ao básico: PCSK9 como novo alvo para o receptor LDL. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.102, n.1, p. e5-e8, 2014.
- CTTC - Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170, 000 participants in 26 randomised trials. **Lancet**, v. 376, p.1670-81, 2010.
- CUI, Q.; JU, X.; YANG, T.; ZHANG, M.; TANG, W.; CHEN, Q.; HU, Y.; HAAS, J.V.; TROUTT, J.; PICKARD, R.T.; DARLING, R.; KONRAD, R.J.; ZHOU, H.; CAO, G. Serum PCSK9 is associated with multiple factors in a large Han Chinese population. **Atherosclerosis**, v.213, p.632-636, 2010.
- CUI, C.J.; LI, S.; ZHU, C.G.; SUN, J.; DU, Y.; ZHANG, Y.; WU, N.Q.; GUO, Y.L.; XU, R.X.; GAO, Y.; LI, J.J. Enhanced pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by

C-reactive protein through p38MAPK-HNF1 α pathway in HepG2 cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.20, p. 2374-2383, 2016.

DAVIS, H.R.Jr; TERSHAKOVEC, A.M.; TOMASSINI, J.E.; MUSLINER, T. Intestinal sterol transporters and cholesterol absorption inhibition, **Current Opinion in Lipidology**, v.22, p.467-78, 2011.

DIRISAMER, A; HACHEMIAN, N.; BUCEK, R.A.; WOLF, F.; REITER, M.; WIDHALM, K. The effect of low-dose simvastatin in children with familial hypercholesterolemia: a 1-year observation. **European Journal of Pediatrics**, v.162, p. 421- 425, 2003.

DNA Diagnostiek voo Familiaire Hyper Cholesteromia. [Cited in 2011 Nov 12]. Available from: <http://www.jojogenetics.nl>. Acesso em Nov 2018.

ELIAS, A.; BONFILS, S.; DAOUD-ELIAS, M.; GAUTHIER, B.; SIÉ, P.; BOCCALON, H.; BONEU, B. Influence of long term oral anticoagulants upon prothrombin fragment 1+2, thrombin-antithrombin III complex and D-dimer levels in patients affected by proximal deep vein thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v.69, n.4, p.302-305, 1993.

ELIAS, A.; ROCK, W.; ODETALLA, A.; RON, G.; SCHWARTZ, N.; SALIBA, W.; ELIAS, M. Enhanced thrombin generation in patients with arterial hypertension. **Thrombosis Research**, v.174, p.121-128, 2019.

FAVALORO, E.J.; FRANCHINI, M.; LIPPI, G. Aging hemostasis: changes to laboratory markers of hemostasis as we age - a narrative review. **Seminars of Thrombosis and Hemostasis**, v.40, n.6, p.621-633, 2014.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. The cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.5, p. 416-421, 2010.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das Estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, n.5, p. 9-14, 2005.

FRANCO, R.F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. **Medicina**, Ribeirão Preto v.34, p. 229-23, 2001.

FREEDMAN, D.S.; OTVOS, J.D.; JEYARAJAH, E.J.; SHALAUROVA, I.; CUPPLES, L.A.; PARISE, H.; D'AGOSTINO, R.B.; WILSON, P.W.F.; SCHAEFER, E.J. Sex and age differences in lipoprotein sub-classes measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. **Clinical Chemistry**, v.50, n.7, p. 1189-1200, 2004.

GE, L.; WANG, J.; QI, W.; MIAO, H.H.; CAO, J.; QU, Y.X.; LI, B.L.; SONG, B.L. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. **Cell Metabolism**, v.7, n.6, p.508-19, 2008.

GOLDSTEIN, J.K.; BROWN, M.S.; SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D.; CHILDS, B.; KINZLERR, W. Familial hypercholesterolemia: The Metabolic and molecular bases of inherited disease. **New York: MC Graw-Hill**, 8^a Ed., p. 2863- 2901, 2001.

GREEN,D. Coagulation Cascade.**Hemodialysis Internacional**, v.10, p. s2-s4, 2006.

GU, T.; ZHOU, W.; SUN, J.; WANG, J.; ZHU, D.; BI, Y. Gender and age differences in lipid profile among Chinese Adults in Nanjing: A retrospective Study of over 230.000 individuals from 2009 to 2015. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v.126, n.7, p. 429-436, 2015.

GUO, Y.L.; LIU, J.; XU, R.X.; ZHU, C.G.; WU, N.Q.; JIANG, L.X.; Li, J.J. Short-term impact of low-dose atorvastatin on serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. **Clinical Drug Investigation**, v.33, p. 877-883, 2013.

HAMPTON, E.N.; KNUTH, M.W.; LI, J.; HARRIS, J.L.; LESLIE, S.A.; SPRAGGON, G. The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9A reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p. 14604–14609, 2007.

HANDIN, R.I.; LUX, S.E.; STOSSEL, T.P. **Blood-Principles and practice of hematology**. 2^a edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2304, 2003.

HEMKER, H.; GIENSEN, P.; AL DIERI, R.; REGNAULT, V.; SMEDT, E.; WAGENVOORD, R.; LECOMPTE, T.; BÉGUIN, S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v.33, n.1, p. 4-15, 2003.

HENTZE, H.; JENSEN, K.K.; CHIA, S.M.; JOHNS, D.G.; SHAW, R.J.; DAVIS, H.R.; SHIH, S.J.; WONG, K.K. Inverse relationship between LDL cholesterol and PCSK9 plasma levels in dyslipidemic cynomolgus monkeys: effects of LDL lowering by ezetimibe in the absence of statins. **Atherosclerosis**, v.231, p. 84-90, 2013.

HIROBE, K.; MATSUZAWA, Y.; ISHIKAWA, K.; TARUI, S.; YAMAMOTO, A.; NAMBU, S.; FUJIMOTO, K. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v. 44, n.2, p. 201-210, 1982.

HOBBS, H.H.; RUSSELL, D.W.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. The LDL receptors locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. **Annual Review of Genetics**, v.24, p. 133-170, 1990.

HOBBS, H.H.; BROWN, M.; GOLDSTEIN, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia.**Human Mutation**, v.1, n.6, p. 445-466, 1992.

HODIS, H.N.; ST-JOHN, J.A.; XIANG, M.; CUSHMAN, M.; LOBO, R.A.; MACK, W.J. Inflammatory markers and progression of subclinical atherosclerosis in healthy postmenopausal women (from the Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial). **American Journal of Cardiology**, v.101, n.8, p.1131-1133, 2008.

HOFFMANN, M. A cell-base model of coagulation and role of factor VIIa. **Blood Review**, v.17 (supl.1), p. s1- s5, 2003a.

HOFFMANN, M. Remodeling of blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16, n.1-2, p. 17-20, 2003b.

HORTON, J. D.; COHEN, J.C.; HOBBS, H.H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, n.2, p.71-77, 2007.

INOUE, T.; KATO, T.; UCHIDA, T.; SAKUMA, M.; NAKAJIMA, A.; SHIBAZAKI, M.; IMOTO, Y.; SAITO, M.; HASHIMOTO, S.; HIKICHI, Y.; KOICHI, N. Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting. **Journal of American College of Cardiology**, v. 46, n.2, p. 239-245, 2005.

ISHIKAWA, T.; HATAKEYAMA, K.; IMAMURA, T.; DATA, H.; SHIBATA, Y.; HIKICHI, Y.; ASADA, Y.; ETO, T. Involvement of C-reactive protein obtained by directional coronary atherectomy in plaque instability and developing restenosis in patients with stable or unstable angina pectoris. **American Journal of Cardiology**, v.91, n.3, p. 287-292, 2003.

JANNES, C.E.; DIAS, R.S.; SILVA, P.R.S.; TUROLLA, L.; GAGLIARDI, A.C.M.; MARSIGLIA, J.D.C.; CHACRA, A.P.; MINAME, M.H.; ROCHA, V.Z.; SALGADO-FILHO, W.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Familial hypercholesterolemia in Brazil: cascade screening program, clinical and genetic aspects. **Atherosclerosis**, v. 238, p. 101-107, 2015.

JOUSILAHTI, P.; VARTIAINEN, E.; TUOMILEHTO, J.; PUSKA, P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. **Circulation**, v.99, p. 1165-1172, 1999.

KASTELEIN, J.J.P.; AKDIM, F.; STROES, E.S.G.; ZWINDERMAN, A.H.; BOTS, M.L.; STALENHOEF, A.F.H.; VISSEREN, F.L.J.; SJIBRANDS, E.J.G.; TRIP, M.D.; STEIN, E.A.; GAUDET, D.; DUIVENVOORDEN, R.; VELTRI, E.P.; MARAIS, D.; GROOT, E. for the ENHANCE Investigators. Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 14, p. 1431-1442, 2008.

KINLAY, S. Low-density lipoprotein-dependent and independent effects of cholesterol-lowering therapies on C-reactive protein. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n.20, p. 2003-2009, 2007.

KLOSE, G.; LAUFS, U.; MÄRZ, W.; WINDLER, E. Familial Hypercholesterolemia: Developments in Diagnosis and Treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 111, p. 523-529, 2014.

KURTZ, E.G.; RIDKER, P.M.; ROSE, L.M.; COOK, N.R.; EVERETT, B.M.; BURING, J.E.; REXRODE, K.M. Oral postmenopausal hormone therapy, C-reactive protein, and cardiovascular outcomes. **Menopause**, v.18, n.1, p. 23-9, 2011 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/gme.0b013e3181e750dd>. 20. Acesso em Fev 2019.

LAGACE, T.A.; CURTIS, D. E.; GARUTI, R.; MCNUTT, M.C.; PARK, S.W.; PRATHER, H.B.; ANDERSON, N.N.; HO, Y.K.; HAMMER, R.E.; HORTON, J.D. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.11, p.2995-3005, 2006.

LAGACE, T.A. PCSK9 and LDL degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. **Current Opinion in Lipidology**, v. 25, p. 387-393, 2014.

LAKOSKI, S.G.; HERRINGTON, D.M. Effects of hormone therapy on C-reactive protein and IL-6 in postmenopausal women: a review article. **Climateric**, v.8, n.4, p. 317-326, 2005.

LAKOSKI, S.G.; LAGACE, T.A.; COHEN, J.C.; HORTON, J.D.; HOBBS, H.H. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.94, p. 2537- 2543, 2009.

LAKRYC, E.M.; MACHADO, R.B.; SOARES-JR, J.M.; BARACAT, E.C. What is the influence of hormone therapy on homocysteine and crp levels in postmenopausal women? **Clinics**, v.70, n.2, p.107-113, 2015.

LAMBERT, G.; SJOUKE, B.; CHOQUE, B.; KASTELEIN, J. J. P.; HOVINGH, G. K. The PCSK9 decade. **Journal of Lipid Research**, v.53, p. 2515-2524, 2012.

LE MAY, C.; KOURIMATE, S.; LANGHI, C.; CHETIVEAUX, M.; JARRY, A.; COMERA, C.; COLLET, X.; KUIPERS, F.; KREMPF, M.; CARIOU, B.; COSTET, P. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, v.29, p. 684-690, 2009.

LEIGH, S.E.A.; FOSTER, H.A.; WHITTALL, R.A.; HUBBART, C.S.; HUMPHRIES, S.E. Update an analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia data base. **Annals of Human Genetics**, v.72, p.485-498, 2008.

LEREN, T. P.; MANSHAUS, T.; SKOVHOLT, U.; SKODJE, T.; NOSSEN, I. E.; TEIE, C.; SORENSEN, S.; BAKKEN, K.S. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. **Seminars in Vascular Medicine**, v.4, n.1, p. 75-85, 2004.

- LEREN, T. P. Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. **Atherosclerosis**, v.237, n.1, p.76-81, 2014.
- LI, S.; LI, J. PCSK9: A key factor modulating atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.22, n.3, p. 221-30, 2015.
- LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, n.25, p.3481-8, 2005.
- LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.3, p. 169-178, 2006.
- LIMA, L.M.; CARVALHO M.G.; LOURES-VALE, A.A.; NETO C.P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J.A.; SOUSA, M.O. Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.2, p. 83-86, 2007.
- LIPID Study Group, The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. **New England Journal of Medicine**, v.339, p. 1349-1357, 1998.
- LOURENÇO, D.M. Mecanismos envolvidos na formação do trombo. **Revista Sociedade de Cardiologia**, v.7, n.3, p.333-338, 1997.
- LOWE, G. D. O. Circulating inflammatory markers and risk of cardiovascular and non-cardiovascular disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.3, n.8, p.1618-1627, 2005.
- MALÝ, M.A.; TOMASOV, P.; HÁJEK, P.; BLASKO, P.; HRACHOVINOVÁ, I.; SALAJ, P.; VESELKA, J. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. **Physiological Research**, v.56, p.685-695, 2007.
- MAY, P. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in inflammation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n.2, p. 134-137, 2013.
- MCKENNEY, J.M.; KOREN, M.J.; KEREIAKES, D.J.; HANOTIN, C.; FERRAND, A.C.; STEIN, E.A. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. **Journal American College of Cardiology**, v.59, p.2344-2353, 2012.
- MCKENNEY, J.M.; FAHA, F.N.L.A. Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies. **Journal of Clinical Lipidology**, v.9, p.170-186, 2015.

MICHAHAN, C.A.; GIDDING, S.S.; MALCOM, G.T.; TRACY, R.E.; STRONG J.P.; MCGILL, H.C. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. **Pediatrics**, v.118, p.1447-1455, 2006.

MELONE, M.; WILSIE, L.; PALYHA, O.; STRACK, A.; RASHID, S. Discovery of a new role of human resistin in hepatocyte low-density lipoprotein receptor suppression mediated in part by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. **Journal of the American College of Cardiology**, v.59, p.1697–1705, 2012.

MOBARREZ, F.; HE, S.; BRÖIJERSEN, A.; WIKLUND, B.; ANTOVIC, A.; EGBERG, N.; JÖRNESKOG, G.; WALLÉN, H. Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v.106, p. 344-352, 2011.

MOHAMED, A.B.O.; KELCHTERMANS, H.; KONINGS, J.; VAN DAAL, J.; AL MARZOUKI, A.; HARAKEH, S.; DE LAAT, B. The effects of oral contraceptive usage on thrombin generation and activated protein C resistance in Saudi women, with a possible impact of the body mass index. **PLoSOne**, v. 25, n.13, p.e0206376, 2018.

MONROE, D.M.; HOFFMANN, M. The coagulation cascade in cirrhosis. **Clinics in Liver Disease**, v.13, p. 1-9, 2009.

MORISHITA, E.; MINAMI, S.; ISHINO, C.; KANNO, M.; UOTANI, C.; ASAKURA, H., MATSUDA, T.; NAKAO, S. Atorvastatin reduces plasma levels of factor VII activity and factor II antigen in patients with hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.9, p. 72-77, 2002.

MOTTA, N.A.V.; FUMIAN, M.M.; CASTRO, J.P.; BRITO, F.C.F.; Inflamação e Aterosclerose: Novos Biomarcadores e Perspectivas Terapêuticas. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 26, n.5, p.390-99, 2013.

MOTULSKI, A.G. Genetic Familial Hypercholesterolemia and its diagnosis. **Atherosclerosis**, v.9, n.1, p.13-7, 1989.

MOYER, M. P.; TRACY, R. P.; TRACY, P.B.; VEER, C. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.18, n.3, p.458-65, 1998.

MUSSBACHER, M.; SALZMANN, M.; BROSTJAN, C.; HOESEL, B.; SCHOERGENHOFER, C.; DATLER, H.; HOHENSINNER, P.; BASÍLIO, J.; PETZELBAUER, P.; ASSINGER, A.; SCHMID, J. Cell type-specific roles of NF-κB linking inflammation and thrombosis. **Frontiers in immunology**, v.10, p. 1-31, 2019.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE (NICE) Clinical guidelines and evidence review for familial hypercholesterolemias: the identification and management of adults and children with familial hypercholesterolemia. **Clinical guidelines** 71, 2008. Disponível em: <http://www.nice.org.uk/CG71>. Acesso em Out 2018.

NEMERSON, Y. Tissue factor and haemostasis. **Blood**, v.71, p.1-8, 1998.

NESHEIM, M. Thrombin and fibrinolysis. **Chest**, v.124, n.3, p.33S-39S, 2003.

NI, Y.G.; CONDRA, J.H.; ORSATTI, L.; SHEN, X. ; MARCO, S.; PANDIT, S.; BOTTOMLEY, M.J.; RUGGERI, L.; CUMMINGS, R.T.; CUBBON, R.M.; SANTORO, J.C.; EHRHARDT, A.; LEWIS, D.; FISHER, T.S.; HA, S.; NJIMOLUH, L.; MADEIRA, D.D.; HAMMOND, H.A.; WISNIEWSKI, D.; VOLPARI, C.; NOTO, A.; LO SURDO, P.; HUBBARD, B.; CARFÍ, A.; SITLANI, A. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. **Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.12882–12891, 2010.

NORDESTGAARD, B.G.; CHAPMAN, M.J.; HUMPHRIES, S.E.; GINSBERG, H.N.; MASANA, L.; DESCAMPS, O.S.; WIKLUND, O.; HEGELE, R.A.; RAAL, F.J.; DESFECHE, J.C.; WIEGMAN, A.; SANTOS, R.D.; WATTS, G.F.; PARHOFER, K.G.; HOVINGH, G.K.; KOVANEN, P.T.; BOILEAU, C.; AVERNA, M.; BORÉN, J.; BRUCKERT E.; CATAPANO, A.L.; KUIVENHOVEN, J.A.; PAJUKANTA, P.; RAY, K.; STALENHOF, A.F.H.; STROES, E.; TASKINEN, M.J; HANSEN, A.T. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. **European Heart Journal**, v.34, n.45, p.:3478- 349, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh273>, Acesso em Ago 2018.

OGURA, M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. **Journal of Cardiology**, 2017 Disponível em : <http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2017.07.002> . Acesso em Dez 2108.

ÖHLIN, A.K.; MORSER, J.; ÖHLIN, H. Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. **Thrombosis Research**, v.82, n.4, p.313-322, 1996.

OWENS-III, A.P.; BYRNES, J.R.; MACKMAN, N. Hyperlipidemia, tissue factor, coagulation, and simvastatin. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.24, p. 95-98, 2014.

PADOVAN, F.T.; FREITAS, G. Anticoncepcional oral associado ao risco de trombose venosa profunda. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.9, p. 73-77, 2015.

PEREIRA, A.C.; GAGLIARDI, A.C.M.; LOTTENBERG, A.M.; CHACRA, A.P.M.; FALUDI, A.A.; SPOSITO, A.C.; CASELLA-FILHO, A.; ARAÚJO, D.B.; CESENA, F.H.Y.; RIBEIRO-FILHO, F.F.; FONSECA, F.A.H.; XAVIER, H.T.; GIULIANO, I.; CATANI, L.H.; BERTOLAMI, M.C.; MINAME, M.H.; IZAR, M.C.; MONTE, O.; SANTOS, R.D.; MARANHÃO R.C.; ALVES R.J.; MARTINEZ T.; MACHADO V.A.; ROCHA V.Z.; SALGADO-FILHO, W. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v.99, n.2, p.1-44, 2012.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. La nueva cascada de La coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Revista Española de Cardiología**, v.60, n.12, p.1217-1219, 2007.

PERSSON, L.; HENRICKSSON, P.; WESTERLUND, E.; HOVATTA, O.; ANGELIM, B.; RUDLING, M. Endogenous estrogen lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.32, p. 810-814, 2012.

PETTO, J.; PEREIRA, L.S.; SANTOS, A.C.N.; GIESTA, B.A., MELO, T.A.; LADEIA, A.M.T. Inflamação subclínica em mulheres que utilizam contraceptivo oral. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v.26, n. 6, p. 465-471, 2013.

POIRIER, S.; MAYER, G.; BENJANNET, S.; BERGERON, E.; MARCINKIEWICZ, J.; NASSOURY, N.; MAYER, H.; NIMPF, J.; PRAT, A.; SEIDAH, N.G. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 2363-2372, 2008.

PORRECA, E.; DI FEBBO, C.; AMORE, C.; DI CASTELNUOVO, A.; BACCANTE, G.; DONATI, M.B.; CUCURRULLO, F.; IACOVIELLO, L. Effect of lipid-lowering treatment on factor VII profile in hyperlipidemic patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v.84, p. 789-793, 2000.

RAAL, F.J.; PANZ, V.; IMMELMAN, A.; PILCHER, G. Elevated PCSK9 levels in untreated patients with heterozygous or homozygous familial hypercholesterolemia and response to high-dose statin therapy. **Journal of American Heart Association**, 2013 Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/jaha.112.000028>. Acesso em Fev 2019.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; LEHMKUHL, E.; MAHMOODZADEH, S. Gender aspects of the role of the metabolic syndrome as a risk factor for cardiovascular disease. **Gender Medicine**, v.4, Supl.2, p. S162-S177, 2007.

RIDDEL Jr, J.P.; AOUIZERAT, B.E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D.P. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v.24, n.3, p.123-131, 2007.

RIDKER, P.M. et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. **New England Journal of Medicine**, v.347, n.20, p.1557-1565,2002.

RIDKER, P.M.; BURING, J.E.; RIFAI, N.; COOK, N.R. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women. The Reynolds Risk Score. **Journal American Medical Association**, v.297, n.6, p. 611-619, 2007.

ROBINSON, J.G.; FARNIER, M.; KREMPF, M; BERGERON, J.; LUC, G.; AVERNA, M.; STROES, E.S.; LANGSLET, G.; RAAL, F.J.; SHAHAWY, M.E.; KOREN, MJ.; LEPOR, N.E. et al. of the ODYSSEY LONG TERM Investigators. Efficacy and safety of aliocumab in reducing lipids and cardiovascular events.**New England Journal of Medicine**, v.372, n.16, p. 1489-99, 2015.

ROMERO-MORALEDA, B.; LOZANO, A.B.P.; MARTÍNEZ, E.M.; LÓPEZ-PLAZA, B.; CANDELA, C.G.; MONTERO, F.J.C. Lipid Profile response to weight loss program in overweight and obese patient is related with gender and age. **Nutrición Hospitalaria**, v.31, n.6, p. 2455-2464, 2015.

ROSS, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v.340, n.2, p.115-26, 1999.

ROSSEBO, A.B.; PEDERSEN, T.R.; BOMAN, K.; BRUDI, P.; CHAMBERS, J.B.; EGSTRUP, K.; GERDTS, E.; GOHLKE-BÄRWOLF, C.; HOLME, I.; KESÄNIEMI, Y.A.; MALBECQ, W.; NIENABER, C.A. et al. of SEAS Investigators. Intensive lipid lowering with sinvastatin and ezetimibe in aortic stenosis.**New England Journal of Medicine**, v.359, n.13, p.1343-56, 2008.

ROTA, S.; MCWILLIAM, N. A.; BAGLIN, T. P.; BYRNE, C. D. Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin. **E.Blood**. v.91, p.508-515, 1998.

RUSCICA, M.; RICCI, C.; MACCHI, C.; MAGNI, P.; CRISTOFANI, R.; LIU, J.; CORSINI, A.; FERRI, N. Suppressor of Cytokine Signaling-3 (SOCS-3) Induces Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Expression in Hepatic HepG2 Cell Line. **The Journal of Biological Chemistry**, v.291, p. 3508-3519, 2016.

RUSSEL, R. Mechanisms of disease: atherosclerosis an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p.115-126, 1999.

SABATINE, M.S.; GIULIANO, R.P.; WIVIOTT, S.D.; RAAL, F.J.; BLOM, D. J.; ROBINSON, J.; BALLANTY, N.E.; SOMARANTE, R.; LEGG, J.; WASSERMAN, S; SCOTT, R.; KOREN, M.J. et al. of Open-Label Study of Long-Term Evaluation against LDL-Cholesterol

- (OSLER) Investigators. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. **New England Journal of Medicine**, v.372, n.16, p. 1500-1509, 2015.
- SANGUIGNI, V.; PASQUALE, P.; LENTI, L.; FERRO, D.; BELLIA, A.; CARNEVALE, R.; TESAURO, M.; SORGE, R.; LAURO, R.; VIOLI, F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and Thrombin Generation in Hypercholesterolemic patients. **Circulation**, v.111, p. 412-419, 2005.
- SANTOS, W. B.; MESQUITA, E. T.; VIEIRA, R. M. R.; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A.. Proteína-C-Reativa e Doença Cardiovascular. As Bases da Evidência Científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.80, p.452- 456, 2003.
- SAHEBKAR, A.; SIMENTAL-MENDÍA, L.E.; GUERRERO-ROMERO, F.; GOLLEDGE, J.; WATTS, G.F. Effect of statin therapy on plasma proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) concentrations: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.17, p. 1042- 1055, 2015.
- SCHIELE, F.; PARK, J.; REDEMANN, N.; LUIPPOLD, G.; NAR, H. An antibody against the C terminal domain of PCSK9 lowers LDL cholesterol levels in vivo. **Journal of Molecular Biology**, v.426, p.843–852, 2014.
- SCHULZ, R.; SCHLÜTER, K. D. PCSK9 targets important for lipid metabolism. **Clinical Research in Cardiology Supplements**, v.12, p. 2–11, 2017.
- SEIDAH, N.G.; BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; MARCINKIEWICZ, J.; JASMIN, S.B.; STIFANI, S.; BASAK, A.; PRAT, A.; CHRÉTIENET, M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.100, p.928-933, 2003.
- SHARIFI, M.; RAKHIT, R.D.; HUMPHRIES, S.E.; NIAR, D. Cardiovascular risk stratification in familial hypercholesterolaemia. **Heart**, v.102, p.1003-1008, 2016.
- SHEARER, M.J. Vitamin K. **Lancet** ,v.345, p.229-234, 2003.
- SHI J.; JUNRU, W.; HUAIEN, Z.; WEN, L.; JACOB, J.; DAYUAN, M.; JAWAHAR, L.M.; USHA, P.; PEI, L.; LOUIS, M.F; MARTIN, H-J. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v.14, n.6, p. 575-585, 2003.
- SILVA, P.R.S.; JANNES, C.E.; MARSIGLIA, J.D.C.; KRIEGER, J.E.; SANTOS, R.D.; PEREIRA A.C. Predictors of cardiovascular events after one year of molecular screening for Familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.250, p.144-150, 2016.

SMID, M.; DIEELIS, A.W.; SPRONK, H.M.; RUMLEY, A.; VAN OERLE, R.; WOODWARD, M.; TEN CATE, H.; LOWE, G. Thrombin generation in the Glasgow Myocardial Infarction Study. **PLoS One**, v. 24, n.8, p.e669-677, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.77, n.3, p.1-48, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n.2, p. 1-44,2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia- V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose- **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, p. 1-18, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA- Departamento de aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia - Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.109, n.2, p.1-62, 2017.

SORIA, L.F.; LUDWIG, E.H.; CLARKE, H.R.; VEJA, G.L.; GRUNDY, SM; MCCARTHY, B.J. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100 – **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 86, n.2, p.587-591, 1989.

SOUZA, J.R.M., OLIVEIRA, R.T.; BLOTTA, M.H.S.L.; COELHO, O.R. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, n.2, p.94-99, 2008.

STEIN, E.A.; RAAL, F.J. New Therapies for Reducing Low-Density Lipoprotein Cholesterol. **Endocrinology and Metabolism Clinics**,v.43:1007- 1033, 2014.

TCHAIKOVSKI, S.N.; VAN-VLIET, H.A.; THOMASSEN, M.C.; BERTINA, R.M.; ROSENDAAL, F.R.; SANDSET, P.M.; HELMERHORST, F.M.; TANS, G.; ROSING, J. Effect of oral contraceptives on thrombin generation measured via calibrated automated thrombography. **Thrombosis and Haemostasis**, v.98, n.6, p.1350- 1356, 2007.

TEN CATE, H. Thrombin generation in clinical conditions. **Thrombosis Research**, v.129, n.3, p.367-370, 2012.

TIETZ **Fundamentos de Química Clínica**, BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D.E.; SAWYER, B.G.6ª edição. Ed. Elsevier, 2008.

TRIPODI, A.; MANNUCCI, P.M. Markers of activated coagulation and their usefulness in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 42, n.5, p. 664-669, 1996.

TRIPODI, A.; PELLEGATTA, F.; CHANTARANGKUL, V.; GRIGORE, L.; GARLASCHELLI, K.; BARAGETTI, A.; LEMMA, L.; CATAPANO, A. Statins decrease thrombin generation in patients with hypercholesterolemia. **European Journal of Internal Medicine**, v.25, 449-451, 2014.

TURGEON, R.D.; BARRY, A.R.; PEARSON, G.J. Familial hypercholesterolemia. Review of diagnosis, screening and treatment. **Clinical Review**, v.62, p. 32-37, 2016.

UNDAS, A.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.E.; MANN, K. Anticoagulant effects of statins and their clinical implications. **Thrombosis Haemostasis**, v.111, p.392-400, 2014.

URBAN, D.; PÖS, J.; BÖHM, M.; LAUFS, U. Targeting the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 for the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n.16, p. 1401-1408, 2013.

VALEN, G.; SIGURDARDOTTIR, O.; VAAGE, J. Systemic release of thrombomodulin, but not from the cardioplegic, reperfused heart during open heart surgery. **Thrombosis Research**, v.83, n.4, p.321-328, 1996.

VAUGHAN, C.J.; GOTTO-JR, A.M. Update on statins. **Circulation**, v.110, p.886-892, 2004.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v.28, n.1, p. 1-7, 2009.

VITALE, C.; MENDELSON, M.E.; ROSANO, G.M.C. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. **Nature Reviews Cardiology**, v.8, n.8, p. 532-542 et al., 2009.

WANG M.; LI, Y-F.; GUO, Y-G.; CHEN, M-M.; JIANG, Z-L.; SONG, J-Y. Positive correlation between plasma PCSK9 and tissue factors levels in patients with angiographically diagnosed coronary artery disease and diabetes mellitus. . **Journal of Geriatric Cardiology**, v.13, n.4, p.312-315, 2016.

WIGGINS, S. W.; SENFIELD, J.; KASSAHUN, H.; LIRA, A.; SOMARATNE, R. Evolocumab: Considerations for the Management of Hyperlipidemia. **Current Atherosclerosis Reports**, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11883-018-0720-3>. Acesso Nov 2018.

WHITFIELD, A.J.; BARRET, P.H.; VAN BOCKXMEER, F. M.; BURNETT, J.R. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. **Clinical Chemistry**, v.50, n.10, p. 1725- 32, 2004.

YOUNGBLOM. E.; PARIANI, M.; KNOWLES, J. W. Familial Hypercholesterolemia. **Gene Reviews**, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK174884/> Acesso em Nov 2018.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. Edição **Revista Atualizada**. São Paulo: Atheneu, 1101, 2005.

10- LISTA DE ANEXOS

10.1 – Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG




UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE 76387417.6.0000.5149

Interessado(a): Profa. Iêda de Fátima Oliveira Silva
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 01 de novembro de 2017, o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação de marcadores bioquímicos, inflamatórios e hemostáticos em portadores de hipercolesterolemia familiar: correlação com tratamento farmacológico" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Profa. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

10.2 – Apêndice A - Termos de Consentimento e Assentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(TCLE) (Maiores de 18 anos)

Carta convite ao participante do estudo: você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa. Caso queira participar é importante que leia estas informações sobre o estudo e seu papel nesta pesquisa. TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação de Marcadores Bioquímicos, Inflamatórios e Hemostáticos em Pacientes Portadores de Hipercolesterolemia Familiar: Correlação com Tratamento Farmacológico.”

Caso haja o entendimento da natureza da pesquisa e os riscos de sua participação é imprescindível seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Sua decisão em participar é totalmente voluntária. O presente estudo tem como objetivo determinar exames clínicos laboratoriais do sangue, relacionados com o aumento de colesterol no sangue e suas consequências como alterações cardiovasculares. Se concordar em participar deste estudo você será solicitado a:

- Responder um questionário sobre hábitos de vida, uso de medicamentos e dados pessoais como peso e idade.
- Fornecer uma amostra de sangue. A coleta será realizada no ambulatório de Endocrinologia da prefeitura e consultório particular de Bom Despacho. Nesta amostra de sangue serão analisados marcadores que possam influenciar no desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias. Como exemplo, o colesterol.

Cabe ao pesquisador manter sigilo das informações coletadas durante a pesquisa. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a sua identidade, que é confidencial.

Os riscos aos quais você irá se submeter são os mesmos existentes em qualquer procedimento da mesma natureza, ou seja, os mesmos existentes para coletas de sangue. Além do risco relacionado à punção venosa, o paciente irá responder a uma entrevista que poderá causar constrangimento ou desconforto. Você poderá sentir dor durante a retirada de sangue, porém sem a presença de hematoma no local da punção venosa. Se por ventura ocorrer algum problema durante a coleta, você terá o devido atendimento, pois, estará em ambiente hospitalar. A classificação do risco da pesquisa é baixa.

É importante que esteja consciente de que a sua participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar do estudo a qualquer momento. No caso de desistência do estudo, você deverá notificar ao pesquisador para que o mesmo possa retirar todos os resultados relacionados à sua amostra de sangue e não acesse mais informações sobre o seu registro.

Na pesquisa, pretendemos utilizar parte dessas amostras de sangue coletadas para estudos futuros. As mesmas serão armazenadas a -80°C em freezer da Faculdade de Farmácia da UFMG, por 05 anos. Também usaremos as informações do prontuário médico sobre dados de sua saúde. Não será necessário nenhum novo procedimento médico para realizar essa pesquisa.

Não haverá custos por participar dessa pesquisa nem gasto, pois os participantes vão para o atendimento no ambulatório de endocrinologia da prefeitura e, ou consultório particular de Bom Despacho para seus exames de rotina. Nem benefício direto a não ser os exames de rotina fornecidos e, nem compensação financeira. Porém, outras pessoas com Hipercolesterolemia Familiar poderão se beneficiar com os dados que serão obtidos da pesquisa.

Esse termo será assinado em duas vias e uma das vias ficará em sua posse.

Caso você tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, entre em contato, por telefone, com os responsáveis pelo estudo, cujos nomes estão relacionados a seguir: Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva - telefone (31)3409-6897. Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: iedafos@farmacia.ufmg.br; Júnea Paolucci de Paiva Silvino- telefone (37)9882-3672. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: juneapaolucci@gmail.com.

OBSERVAÇÃO: Este termo está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas em seres humanos.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Consentimento:

Li as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro estar ciente sobre os métodos a serem utilizados para o estudo, as inconveniências bem como aos riscos e benefícios.

Declaro que me foi dado tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Declaro que o participante e/ou seu representante legal recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele(a) compreendeu as explicações.

Assinatura do pesquisador e Carimbo

Data

(02 vias)

Qualquer dúvida sob o aspecto ético deste projeto, favor entrar em contato com: COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax (31) 3409-4592. Email: coep@prpq.ufmg.br

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) (Para os pais ou responsáveis)

O(A) seu(sua) filho(a) está convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa. TÍTULO DO PROJETO: “Avaliação de Marcadores Bioquímicos, Inflamatórios e Hemostáticos em Pacientes Portadores de Hipercolesterolemia Familiar: Correlação com Tratamento Farmacológico.” Caso permita que ele(a) participe, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o papel nesta pesquisa. Caso haja o entendimento da natureza da pesquisa e os riscos da participação do menor é imprescindível o seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Sua decisão em permitir que o menor participe é totalmente voluntária. O presente estudo tem como objetivo realizar exames laboratoriais no sangue do seu(a) filho(a). Se concordar na participação da criança ou do adolescente, saiba que será solicitado a ele(a) o seguinte:

- Responder um questionário sobre hábitos de vida, uso de medicamentos e dados pessoais como peso e idade.
- Fornecer uma amostra de sangue. A coleta será realizada no ambulatório de Endocrinologia da prefeitura e consultório particular de Dom Despacho. Nesta amostra de sangue serão analisados marcadores que possam influenciar no desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias. Como exemplo, o colesterol.

Cabe ao pesquisador manter sigilo das informações coletadas durante a pesquisa. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a identidade da criança ou adolescente, que é confidencial.

Os riscos aos quais seu filho(a) irá se submeter são os mesmos existentes em qualquer procedimento da mesma natureza, ou seja, os mesmos existentes para coletas de sangue. Além do risco relacionado à punção venosa, o paciente irá responder a uma entrevista que poderá causar constrangimento ou desconforto. Você poderá sentir dor durante a retirada de sangue, porém sem a presença de hematoma no local da punção venosa. Se por ventura ocorrer algum problema durante a coleta, você terá o devido atendimento, pois, estará em ambiente hospitalar. A classificação do risco da pesquisa é baixa.

É importante que esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar do estudo a qualquer momento. No caso de desistência do estudo, você deverá notificar ao pesquisador para que o mesmo possa retirar todos os resultados relacionados à amostra de sangue e não acesse mais informações sobre o registro.

Na pesquisa, pretendemos utilizar parte dessas amostras de sangue coletadas para estudos futuros. As mesmas serão armazenadas a -80°C em freezer da Faculdade de Farmácia da UFMG, por 05 anos. Também usaremos as informações do prontuário médico sobre dados de saúde. Não será necessário nenhum novo procedimento médico para realizar essa pesquisa.

Não haverá custos por participar dessa pesquisa nem gasto, pois os participantes vão para o atendimento no ambulatório de endocrinologia da prefeitura e, ou consultório particular de Bom Despacho para seus exames de rotina. Nem benefício direto a não ser os exames de rotina fornecidos e, nem compensação financeira. Porém, outras pessoas com Hipercolesterolemia Familiar poderão se beneficiar com os dados que serão obtidos da pesquisa.

Esse termo será assinado em duas vias e uma das vias ficará em sua posse.

Caso você tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, entre em contato, por telefone, com os responsáveis pelo estudo, cujos nomes estão relacionados a seguir: Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva - telefone (31)3409-6897. Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: iedafos@farmacia.ufmg.br; Júnea Paolucci de Paiva Silvino- telefone (37)9882-3672. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: juneapaolucci@gmail.com.

OBSERVAÇÃO: Este termo está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas em seres humanos.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Consentimento:

Li as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro estar ciente sobre os métodos a serem utilizados para o estudo, as inconveniências bem como aos riscos e benefícios.

Declaro que me foi dado tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Declaro que o participante e/ou seu representante legal recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele(a) compreendeu as explicações.

Assinatura do pesquisador e Carimbo

Data

(02 vias)

Qualquer dúvida sob o aspecto ético deste projeto, favor entrar em contato com: COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax (31) 3409-4592. Email: coep@prpq.ufmg.br

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE) (Crianças de 5 a 9 anos)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem o nome: “Avaliação de Marcadores Bioquímicos, Inflamatórios e Hemostáticos em Pacientes Portadores de Hipercolesterolemia Familiar: Correlação com Tratamento Farmacológico.” Nessa pesquisa nós precisaremos coletar um pouco de seu sangue para avaliar se você tem problemas com gordura no sangue. Nós também iremos fazer perguntas a você e a sua mãe ou pai, para saber dados de sua saúde.

Você só participa se quiser. Se não quiser participar da pesquisa, não tem problema. A médica irá te atender da mesma forma.

O(A) seu(sua) filho(a) está convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa. Caso permita que ele(a) participe, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o papel nesta pesquisa. Caso haja o entendimento da natureza da pesquisa e os riscos da participação do menor são imprescindíveis o seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Sua decisão em permitir que o menor participe é totalmente voluntária. O presente estudo tem como objetivo realizar exames laboratoriais no sangue. Se concordar na participação da criança ou do adolescente, saiba que será solicitado a ele(a) o seguinte:

- Responder um questionário sobre maneiras de vida se usa algum remédio e dados pessoais como peso e idade.
- Fornecer uma amostra de sangue. A coleta será realizada no ambulatório de Endocrinologia da prefeitura e consultório particular de Dom Despacho. Nesta amostra de sangue serão analisados marcadores que possam influenciar no desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias. Como exemplo, o colesterol.

Cabe ao pesquisador manter sigilo das informações coletadas durante a pesquisa. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a identidade da criança ou adolescente, que é confidencial.

Os riscos aos quais seu filho(a) irá se submeter são os mesmos existentes em qualquer procedimento da mesma natureza, ou seja, os mesmos existentes para coletas de sangue. Além do risco relacionado à punção venosa, o paciente irá responder a uma entrevista que poderá causar constrangimento ou desconforto. Você poderá sentir dor durante a retirada de sangue, porém sem a presença de hematoma no local da punção venosa. Se por ventura ocorrer algum problema durante a coleta, você terá o devido atendimento, pois, estará em ambiente hospitalar. A classificação do risco da pesquisa é baixa.

É importante que esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar do estudo a qualquer momento. No caso de desistência do estudo, você deverá notificar ao pesquisador para que o mesmo possa retirar todos os resultados relacionados à amostra de sangue e não acesse mais informações sobre o registro.

Na pesquisa, pretendemos utilizar parte dessas amostras de sangue coletadas para estudos futuros. As mesmas serão armazenadas a -80°C em freezer da Faculdade de Farmácia da UFMG, por 05 anos. Também usaremos as informações do prontuário médico sobre dados de saúde. Não será necessário nenhum novo procedimento médico para realizar essa pesquisa.

Não haverá custos por participar dessa pesquisa nem gasto, pois os participantes vão para o atendimento no ambulatório de endocrinologia da prefeitura e, ou consultório particular de Bom Despacho para seus exames de rotina. Nem benefício direto a não ser os exames de rotina fornecidos e, nem compensação financeira. Porém, outras pessoas com Hipercolesterolemia Familiar poderão se beneficiar com os dados que serão obtidos da pesquisa.

Esse termo será assinado em duas vias e uma das vias ficará em sua posse.

Caso você tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, entre em contato, por telefone, com os responsáveis pelo estudo, cujos nomes estão relacionados a seguir: Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva - telefone (31)3409-6897. Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: iedafos@farmacia.ufmg.br; Júnea Paolucci de Paiva Silvino- telefone (37)9882-3672. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: juneapaolucci@gmail.com.

OBSERVAÇÃO: Este termo está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas em seres humanos.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Consentimento:

Li as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro estar ciente sobre os métodos a serem utilizados para o estudo, as inconveniências bem como aos riscos e benefícios.

Declaro que me foi dado tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Declaro que o participante e/ou seu representante legal recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele(a) compreendeu as explicações.

Assinatura do pesquisador e Carimbo

Data

(02 vias)

Qualquer dúvida sob o aspecto ético deste projeto, favor entrar em contato com: COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax (31) 3409-4592. Email: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE) (Crianças/adolescentes: faixa etária de 10 a 18 anos)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem o nome: “Avaliação de Marcadores Bioquímicos, Inflamatórios e Hemostáticos em Pacientes Portadores de Hipercolesterolemia Familiar: Correlação com Tratamento Farmacológico.” Nessa pesquisa nós precisaremos coletar um pouco de seu sangue para avaliar se você tem problemas com gordura no sangue. Nós também iremos fazer perguntas a você e a sua mãe ou pai, para saber dados de sua saúde.

Você só participa se quiser. Se não quiser participar da pesquisa, não tem problema. A médica irá te atender da mesma forma.

O(A) seu(sua) filho(a) está convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa. Caso permita que ele(a) participe, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o papel nesta pesquisa. Caso haja o entendimento da natureza da pesquisa e os riscos da participação do menor são imprescindíveis o seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Sua decisão em permitir que o menor participe é totalmente voluntária. O presente estudo tem como objetivo realizar exames laboratoriais no sangue. Se concordar na participação da criança ou do adolescente, saiba que será solicitado a ele(a) o seguinte:

- Responder um questionário sobre maneiras de vida se usa algum remédio e dados pessoais como peso e idade.
- Fornecer uma amostra de sangue. A coleta será realizada no ambulatório de Endocrinologia da prefeitura e consultório particular de Dom Despacho. Nesta amostra de sangue serão analisados marcadores que possam influenciar no desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias. Como exemplo, o colesterol.

Cabe ao pesquisador manter sigilo das informações coletadas durante a pesquisa. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a identidade da criança ou adolescente, que é confidencial.

Os riscos aos quais seu filho(a) irá se submeter são os mesmos existentes em qualquer procedimento da mesma natureza, ou seja, os mesmos existentes para coletas de sangue. Além do risco relacionado à punção venosa, o paciente irá responder a uma entrevista que poderá causar constrangimento ou desconforto. Você poderá sentir dor durante a retirada de sangue, porém sem a presença de hematoma no local da punção venosa. Se por ventura ocorrer algum problema durante a coleta, você terá o devido atendimento, pois, estará em ambiente hospitalar. A classificação do risco da pesquisa é baixa.

É importante que esteja consciente de que a participação neste estudo de pesquisa é completamente voluntária e que pode recusar-se a participar do estudo a qualquer momento. No caso de desistência do estudo, você deverá notificar ao pesquisador para que o mesmo possa retirar todos os resultados relacionados à amostra de sangue e não acesse mais informações sobre o registro.

Na pesquisa, pretendemos utilizar parte dessas amostras de sangue coletadas para estudos futuros. As mesmas serão armazenadas a -80°C em freezer da Faculdade de Farmácia da UFMG, por 05 anos. Também usaremos as informações do prontuário médico sobre dados de saúde. Não será necessário nenhum novo procedimento médico para realizar essa pesquisa.

Não haverá custos por participar dessa pesquisa nem gasto, pois os participantes vão para o atendimento no ambulatório de endocrinologia da prefeitura e, ou consultório particular de Bom Despacho para seus exames de rotina. Nem benefício direto a não ser os exames de rotina fornecidos e, nem compensação financeira. Porém, outras pessoas com Hipercolesterolemia Familiar poderão se beneficiar com os dados que serão obtidos da pesquisa.

Esse termo será assinado em duas vias e uma das vias ficará em sua posse.

Caso você tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, entre em contato, por telefone, com os responsáveis pelo estudo, cujos nomes estão relacionados a seguir: Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva - telefone (31)3409-6897. Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: iedafos@farmacia.ufmg.br; Júnea Paolucci de Paiva Silvino- telefone (37)9882-3672. Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Email: juneapaolucci@gmail.com.

OBSERVAÇÃO: Este termo está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas em seres humanos.

Rubrica do pesquisador:

Rubrica do participante:

Consentimento:

Li as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro estar ciente sobre os métodos a serem utilizados para o estudo, as inconveniências bem como aos riscos e benefícios.

Declaro que me foi dado tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmo também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Declaro que o participante e/ou seu representante legal recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem adequada e compreensível e que ele(a) compreendeu as explicações.

Assinatura do pesquisador e Carimbo

Data

(02 vias)

Qualquer dúvida sob o aspecto ético deste projeto, favor entrar em contato com: COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax (31) 3409-4592. Email: coep@prpq.ufmg.br

10.3- Apêndice B -Ficha clínica dos participantes

FICHA CLÍNICA DO PACIENTE

PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS

PROJETO DE PESQUISA “Avaliação de Marcadores Bioquímicos, Inflamatórios e Hemostáticos em Pacientes Portadores de Hipercolesterolemia Familiar: Correlação com Tratamento Farmacológico.”

I – IDENTIFICAÇÃO:

1.Nome: _____

2. Data de nascimento: ____/____/____ (estudo aplicado a crianças e adultos)

3.Endereço: _____ 4.Telefone: _____

CEP: _____

5.Data da entrevista pelo pesquisador: ____/____/____

6. Código de identificação nas amostras _____

() Grupo HF

() Grupo Controle

____ Número da amostra (será inserido pelo pesquisador)

II – DADOS QUE SERÃO RETIRADOS DO QUESTIONÁRIO APLICADO AS PARTICIPANTES

1. Idade na data da coleta do sangue _____

2. Se participante do grupo HF:

Utiliza medicamento hipolipemiante? () Sim () Não.

Se a resposta for afirmativa, qual medicamento usa? _____ Dose _____

Há quanto tempo utiliza o medicamento em questão? _____

3. Se participante do grupo Controle:

Utiliza medicamento? () Sim () Não.

Se a resposta for afirmativa, qual medicamento usa? _____

Há quanto tempo utiliza o medicamento em questão? _____

4. Apresenta alguma das patologias abaixo?

() Doenças hepáticas

() Doenças hematológicas

() Insuficiência Renal Crônica

- () Síndrome nefrótica
- () Doença autoimune
- () Doença maligna
- () *Diabetes mellitus*
- () Obesidade (IMC >30 para adultos) ou IMC acima do ideal para a idade de criança.
- () Doença inflamatória aguda
- () Doenças tireoidianas

Exames : TGO _____ TGP _____ Creatinina _____ RFG: _____

HbA1c : _____ TSH : _____

5. Apresenta alguma doença diferente das citadas? Qual? _____
6. Já apresentou algum tipo de evento cardiovascular? () Sim () Não.
Se positivo, com que idade?
7. Tem história familiar de DAC precoce?
Grau de parentesco:
Homens com menos de 55 anos ()
Mulheres com menos de 60 anos ()
8. É fumante? () Sim () Não
9. É etilista crônico? () Sim () Não
10. Peso _____ Kg Altura _____ cm IMC _____
11. Utiliza outro medicamento de forma contínua? () Sim () Não
Qual(is)? _____

10.4- Certificado de Apresentação



CBEM 2018
33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia
7 a 11 de agosto
Belo Horizonte - MG

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

TRATAMENTO DA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR: RELAÇÃO COM OS VALORES DE COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES

foi apresentado na modalidade Pôster Impresso, por Júnea Paolucci de Paiva Silvino, no evento 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia ocorrido de 07 a 11 de agosto de 2018 no Expominas em Belo Horizonte/MG.

Belo Horizonte, 11 de agosto de 2018

Paulo Augusto Carvalho Miranda
PAULO AUGUSTO CARVALHO MIRANDA
Presidente do 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia

Alexandre Hohl
ALEXANDRE HOHL
Presidente da Comissão Científica do 33º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia

Fábio Trujillo
FÁBIO TRUJILLO
Presidente da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

Realização
SBEM Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia