

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

ALINE DA PAZ FERNANDES

**CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROPROTEÍNA
CONVERTASE SUBTILISINA KEXINA TIPO 9 (PCSK9) COM
PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM MULHERES JOVENS E NA PÓS-MENOPAUSA**

Belo Horizonte - MG

2018

ALINE DA PAZ FERNANDES

**CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROPROTEÍNA
CONVERTASE SUBTILISINA KEXINA TIPO 9 (PCSK9) COM
PARÂMETROS DO PERFIL LIPÍDICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM MULHERES JOVENS E NA PÓS-MENOPAUSA**

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

Área de concentração: Bioquímica.

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

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

Profa. Dra. Cláudia Natália
Ferreira - UFMG

Belo Horizonte - MG

2018

“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”
(Walt Disney)

Dedico este trabalho:
À Deus por me acompanhar em todos os meus dias.
Aos meus pais por acreditarem e confiarem em mim.
Às Profas. Iêda, Cláudia e Maria das Graças pelo aprendizado.

Agradecimentos

Queria registrar minha sincera gratidão à minha orientadora, Dra. Iêda de Fátima Oliveira e Silva, por ter aceitado me orientar e por me acompanhar nessa etapa de minha vida.

A minha coorientadora Dra. Ana Paula Lucas Mota por todo o carinho e atenção prestados a mim.

A minha coorientadora Dra. Cláudia Natália Ferreira por me acompanhar em cada etapa sendo sempre tão solícita. Seu exemplo foi essencial de diversas formas para eu persistir mesmo diante de minhas dificuldades. Sou muito grata por tudo.

A Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, meu eterno agradecimento, pelo exemplo de generosidade e dedicação a todos os alunos.

A Profa. Dra. Karina Braga Gomes, pelos ensinamentos e por inspirar as pessoas ao seu redor com seu exemplo de dedicação.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas colegas de laboratório e amigas, Alessandra, Suelen, Carol e Lorraine, por me acolherem e por me proporcionarem momentos de alegria e superação. Com certeza, vou leva-las em meu coração.

A Ritinha, que desde o início, me ajudou de diversas maneiras. Meu agradecimento mais do que especial pelos ensinamentos e pela amizade.

A minha amiga Lílian, por ter dividido comigo tantos momentos. Sua presença e amizade foram imprescindíveis nessa caminhada.

Aos meus velhos amigos, que mesmo de longe, nunca deixaram de torcer por mim durante esses dois anos.

Ao Ramon pela torcida e incentivo. Obrigada por todas as vezes que você me ouviu e me aconselhou.

A minha prima Fernanda por ter me acolhido por um tempo em Belo Horizonte. Sua ajuda foi essencial para eu chegar ao término de meu trabalho.

Ao meu irmão Lucas pela amizade e confiança. Sou grata por você entender minha ausência em alguns momentos.

Aos meus pais, Silvania e Fernando, as pessoas mais importantes da minha vida, que desde o início, estiveram ao meu lado e me incentivaram a buscar

conhecimento e a conquistar valores. Que eu possa um dia, ao menos, retribuir um pouco da dedicação e amor que vocês sempre tiveram por mim.

A Deus, minha sincera gratidão, por jamais me deixar só.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura da PCSK9..	22
Figura 2: Representação da linha do tempo do histórico da PCSK9	24
Figura 3: Degradação do LDLr mediada pela PCSK9.....	25
Figura 4: Níveis plasmáticos de PCSK9 e marcadores de estresse oxidativo.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das mulheres jovens de acordo com o tipo de COC	35
Tabela 2. Distribuição das mulheres pós-menopausadas de acordo com o tipo de tratamento hormonal	35
Tabela 3 Tempo do uso de hormônio em anos nas mulheres investigadas.	36
Tabela 4. Características demográficas e bioquímicas e níveis de PCSK9 nas mulheres investigadas.....	42
Tabela 5. Correlação entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e os parâmetros de perfil lipídico e de estresse oxidativo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase

APO B100 - Apolipoproteína B100

AST - Aspartato aminotransferase

AVE - Acidente vascular encefálico

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CO - Contraceptivo oral

COC - Contraceptivos orais combinados

CT - Colesterol total

DCV - Doenças cardiovasculares

EE – Etinilestradiol

EGF-A - Fator de crescimento epidérmico do domínio A

FDA - *Food and Drug Administration*

GGT - γ -glutamilttransferase

GPx - Glutathiona peroxidase

HDLc - Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade

HF - Hipercolesterolemia familiar

IAM - Infarto agudo do miocárdio

IMC - Índice de massa corpórea

IT - Intervalo interquartilico

LDLc - Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade

LDLox - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

LDLr - Receptor de LDL

LH - Hormônio Luteinizante

Lp(a) - Lipoproteína a

MDA - Malondialdéido

MHT – *Postmenopausal hormone therapy*

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

não-COC – Mulheres que não fazem uso de COC

não-THM – Mulheres que não fazem terapia hormonal na pós-menopausa

NARC-1 - Convertase reguladora da apoptose neuronal 1

ON- Óxido nítrico

PCRus - Proteína C reativa ultrasensível

PCSK9 - Pró-proteína convertase subtilisina kexina tipo 9

RE - Retículo endoplasmático

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SOD - Superóxido dismutase

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

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEV - Tromboembolismo venoso

TG – Triglicerídeos

THM – Terapia hormonal na menopausa

TRH - Terapia de reposição hormonal

TUH - Tempo de uso de hormônio

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Fundamento teórico	19
2.1 Tratamento hormonal	19
2.1.1 Uso de contraceptivos orais	19
2.1.2 Terapia hormonal na menopausa	20
2.2 Proroteína convertase subtilisina kexina tipo 9	21
2.2.1 Histórico da PCSK9	23
2.2.2 Mecanismo de ação da PCSK9	24
2.3 Estresse oxidativo	26
2.3.1 Dislipidemias e aterosclerose associados ao estresse oxidativo	27
2.4 Uso de hormônios e parâmetros lipídicos e de estresse oxidativo	28
3. Justificativa e relevância do tema.....	31
4. Objetivos	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. Material e métodos	34
5.1 Ética	34
5.2 Casuística	34
5.3 Amostras biológicas	36
5.4 Delineamento experimental	37
5.5 Métodos	37
5.5.1 Dosagem de PCSK9	37
5.5.2 Marcadores de estresse oxidativo	38
5.5.3 Determinações bioquímicas do perfil lipídico	39
5.5.4 Glicemia de jejum	39
5.5.5 PCR ultrasensível	40

5.6 Análises estatísticas.....	40
6. Resultados	41
7. Discussão.....	44
8. Considerações finais	53
9. Conclusões.....	53
10. Referências	54
11. Elementos pós-textuais	65
11.1 Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	65
11.2 Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
11.3 Apêndice B - Ficha clínica da participante	68
11.4 Certificado de apresentação.....	70

RESUMO

O uso de hormônios, tanto em contraceptivos orais combinados (COC) quanto na terapia hormonal na menopausa (THM), e a idade possuem atuação direta no metabolismo lipídico e podem desencadear alterações cardiovasculares. A proproteína convertase subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9) é um novo componente do metabolismo lipídico associado ao desenvolvimento de dislipidemias, aterosclerose e eventos cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi investigar a correlação entre o uso de COC, THM, parâmetros do perfil lipídico, PCSK9 e marcadores de estresse oxidativo, em mulheres jovens e na pós-menopausa. O estudo incluiu 79 mulheres, distribuídas em quatro grupos: jovens em uso de COC (COC, n=20) ou não (não-COC, n=20), e mulheres na pós-menopausa que realizavam THM (THM, n=17) ou não (não-THM, n=22). Método colorimétrico-enzimático foi usado para dosar os parâmetros do perfil lipídico e ELISA para quantificar os níveis plasmáticos de PCSK9. MTT e TBARS foram determinados para avaliar o estresse oxidativo. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa MINITAB versão 17.0. Diferenças significativas foram observadas em relação ao colesterol total (CT) e triglicérides (TG) quando comparados os grupos não-COC e COC, e não-COC e não-THM; e a lipoproteína de baixa densidade colesterol (LDLc) quando se comparou não-COC e não-THM, e não-THM e THM. O grupo de jovens que usava hormônio apresentou níveis plasmáticos mais elevados de PCSK9 do que o grupo de jovens que não usava ($p < 0,05$). Quanto à avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, foi verificada diferença nos grupos COC e não-COC, com níveis mais elevados de TBARS no grupo COC. Além disso, níveis plasmáticos de PCSK9 correlacionaram-se positivamente com o parâmetro do perfil lipídico CT, sugerindo que o aumento de PCSK9 exerce algum efeito na dislipidemia. A PCSK9 também teve correlação com a variável MTT, no grupo COC. Considerando os dados dos parâmetros do perfil lipídico, PCSK9 e marcadores do estresse oxidativo, foi verificado que estes se apresentaram mais elevados em mulheres jovens que usam COC; ao passo que no grupo de mulheres pós-menopausadas em THM verificou-se melhores resultados para o perfil lipídico, em comparação com aquelas que não fazem THM. Nossos resultados sugerem que o uso de hormônios, dependendo da idade, pode interferir no metabolismo lipídico por mecanismos diferentes.

Palavras-chave: PCSK9, perfil lipídico, estresse oxidativo, mulheres jovens e pós-menopausa.

ABSTRACT

The hormone use, combined oral contraceptives (COC) and postmenopausal hormone therapy (MHT), as well as aging have a direct effect on lipid metabolism and may trigger cardiovascular changes. Pro-protein convertase subtilisin kexina type 9 (PCSK9) is a new component of lipid metabolism associated with the development of dyslipidemia, atherosclerosis and cardiovascular events. The aim of this study was to investigate the correlation use between COC and MHT in the lipid profile parameters towards PCSK9 and oxidative stress markers in young and postmenopausal women. The study included 79 women distributed into four groups: young women using COC (COC, n=20) or not (no-COC, n=20), and postmenopausal women performing MHT (THM, n=17) or not (no-THM, n =22). Lipid profile parameters were determined by colorimetric-enzymatic methodologies. PCSK9 plasma levels were quantified by ELISA. MTT and TBARS levels were used to evaluate oxidative stress. Statistical analyzes were performed by MINITAB program version 17.0. Significant differences were observed in relation to total cholesterol (TC) and tryglicerides (TG) when comparing no-COC and COC, and no-COC and no-THM groups; in relation to high-density lipoprotein cholesterol (LDLc) when comparing no-COC and no-THM, and no-THM and THM groups. The young people group who used hormone had higher PCSK9 plasma levels than young group who did not use ($p < 0.05$). The highest TBARS level was verified in COC group in relation no-COC groups. PCSK9 plasma levels correlated positively with lipid profile parameter TC, suggesting that PCSK9 increase may have some effect on dyslipidemia. PCSK9 also correlated with MTT variable in COC group. By considering the data of lipid profile parameters, PCSK9 and oxidative stress markers, these were found to be are higher in young women who use COC; whereas in the group of postmenopausal women in THM, better results were found for the lipid profile compared to those who did not take. Our results suggest that the hormone use, age-related, may interfere with lipid metabolism by different mechanisms.

Keywords: PCSK9, lipid profile, oxidative stress, young women; postmenopausal.

1 INTRODUÇÃO

Desde quando foram introduzidos no início da década de 1960, os contraceptivos orais combinados (COC) têm sido amplamente utilizados por milhões de mulheres em todo o mundo com a finalidade principal de prevenir a gravidez. Entre os métodos hormonais disponíveis, os COC são os mais utilizados no mundo inteiro, representando a primeira escolha contraceptiva nos países desenvolvidos e a terceira nos países em desenvolvimento (FENTON *et al*, 2007; FERREIRA *et al*, 2017; KOWALSKA *et al*, 2017). Formulações de COC tiveram suas concentrações de estrógeno e progesterona reduzidas ao longo dos anos numa tentativa de amenizar os efeitos cardiovasculares e aterotrombóticos associados à terapia hormonal (SITRUK-WARE & NATH, 2013). Nas últimas décadas, a terapia hormonal na menopausa (THM) também se tornou uma opção efetiva para mulheres na pós-menopausa que sofrem dos sintomas típicos da menopausa, incluindo suores noturnos, distúrbios de humor e sono, distúrbios urogenitais, perda óssea e alterações no metabolismo lipídico (LUOTO, 2009; BABER *et al*, 2016; KI *et al*, 2016).

Embora raras, as complicações cardiovasculares representam os riscos mais temidos entre as usuárias de COC. Destacam-se, entre estas, o tromboembolismo venoso (TEV), o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular encefálico (AVE). De acordo com o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas, a incidência de TEV aumenta de 1 a 5 ocorrências por 10.000 mulheres por ano em não usuárias de COC para 3 a 9 ocorrências por 10.000 mulheres por ano em usuárias de COC (HASEGAWA *et al*, 2017).

Estrógenos e progesteronas apresentam atuação direta no metabolismo de lipídios. Algumas pesquisas reportaram que a THM está associada com uma melhora no perfil lipídico em mulheres na pós-menopausa, enquanto outros não encontraram efeitos benéficos (MOSCA, 2000; HECKBERT *et al*, 2001; KI *et al*, 2016). Em relação ao uso de COC por mulheres em idade reprodutiva, alterações no perfil lipídico também foram destacadas por diversos estudos. Um estudo conduzido com 1391 mulheres mostrou que o uso, por longo prazo, de contraceptivo oral (CO) contendo progesterona resultou em maiores níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), e de colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade (LDLc), além de menores concentrações séricas de colesterol presente na

lipoproteína de alta densidade (HDLc), o que pode ser associado com maior risco de doenças cardiovasculares no futuro (KOWALSKA *et al*, 2017). O estudo de Giribela e colaboradores (2015) reportou que o uso por 06 meses de COC contendo estradiol e drospirenona provocou um aumento significativo nos níveis de CT e TG, mas não houve alterações consideráveis nos níveis de LDLc e HDLc ao comparar com o grupo de não usuárias de COC.

A proproteína convertase subtilisina kexina tipo 9 (PCSK9), descrita pela primeira vez em 2003, é um novo elemento do metabolismo lipídico, que vem sendo extensivamente estudado nos últimos anos e está correlacionado com o desenvolvimento de dislipidemias, aterosclerose e eventos cardiovasculares. Sua atuação central concentra-se na degradação dos receptores de LDL (LDLr), isto é, a PCSK9 impede a reciclagem dos LDLr de volta à superfície celular, contribuindo, dessa forma, para a elevação dos níveis de LDLc na corrente sanguínea (URBAN *et al*, 2013; AWAN *et. al*, 2014; GHOSH *et al*, 2015).

Além disso, foi demonstrado que o uso de hormônio pode aumentar o estresse oxidativo (CHEN & KOTANI, 2012). O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio bioquímico entre uma super-produção de espécies reativas, tanto de oxigênio como de nitrogênio, que não consegue ser combatida por sistemas antioxidantes, culminando com a oxidação das biomoléculas (CAUCI *et al*, 2016; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al*, 2016). Essas espécies reativas são deletérias para o corpo humano, pois podem capturar elétrons de várias moléculas e originar formas oxidadas, de modo que o estresse oxidativo grave pode desencadear a apoptose e necrose celular (HALLIWELL, 2012). Outro fator que pode contribuir para potencializar o estresse oxidativo no organismo feminino é a chegada da menopausa e suas alterações metabólicas. A queda progressiva de estrógeno que ocorre na pós-menopausa se correlaciona diretamente com o aumento de espécies reativas que ocorre nesse período da vida das mulheres (DOSHI & AGARWAL, 2013; RAO *et al*, 2013; ZUÑIGA *et al*, 2017). Neste sentido, o uso do hormônio contraceptivo e a menopausa podem se tornar fatores de risco para desencadear o estresse oxidativo (SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ *et al*, 2016; ZUÑIGA *et al*, 2017).

Dessa maneira, sabendo-se que o uso de COC e a THM tem atuação significativa no metabolismo lipídico e nos parâmetros de estresse oxidativo de

mulheres em idade reprodutiva e pós-menopausadas, respectivamente, e que a PCSK9 é uma proteína associada à regulação dos níveis plasmáticos de LDLc. O objetivo do presente estudo foi investigar a correlação da PCSK9 com o perfil lipídico e com os marcadores de estresse oxidativo, considerando a atuação do fator idade e uso de hormônios.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Tratamento hormonal

2.1.1 Uso de Contraceptivos Orais

Em todo o mundo, aproximadamente, 60% das mulheres em idade reprodutiva utilizam algum método contraceptivo. No Brasil, essa prevalência situa-se próxima a 70%, sendo os CO um dos métodos mais utilizados pelas mulheres (ALKEMA *et al*, 2013). Os COC impedem a ovulação, principalmente pela supressão do hormônio luteinizante (LH). Se usados de maneira correta, a taxa de falha, ou seja, a ocorrência de gravidez indesejada é inferior a uma por 100 mulheres por ano (TRUSSELL, 2011; ROACH *et al*, 2015).

Os COC apresentam o estrógeno e a progesterona sintéticos em sua formulação. Estes, por sua vez, são responsáveis por inibir a produção natural destes hormônios pelos ovários (FRYE, 2006; RIBEIRO *et al*, 2017). Podem ser encontrados em diversas formulações (concentrações de hormônios) e diferentes vias de administração (oral, intramuscular, implantes subdérmicos, transdérmica, vaginal e associado a sistema intrauterino) agindo com a finalidade de bloquear a ovulação e alterar as condições do útero e das trompas de falópio, dificultando assim a fecundação (WHO; 2008). Atualmente, pode-se classificar os COC em gerações de acordo com a dose de estrógeno e o tipo de progesterona utilizada. Os COC de primeira geração são os que apresentavam doses mais elevadas de estrógeno e as gerações seguintes apresentam-se com doses cada vez mais reduzidas de estrógenos e diferentes progestagênios, como o levonorgestrel, o acetato de ciproterona e a drospirenona. (PETITTI, 2003; RIBEIRO *et al*, 2017).

Apesar de muito difundido, o uso de CO é extensivamente associado a um risco aumentado de TEV, que é atribuível tanto à dose quanto ao tipo de progesterona utilizada na formulação (SUGIURA *et al*, 2015; MARTINELLI *et al*, 2016). Além disso, obesidade e a idade também são apontadas como fatores de risco para a ocorrência de eventos aterotrombóticos (SUGIURA *et al*, 2015). O risco de eventos cardiovasculares, como o IAM e AVE, associado ao uso de CO também tem sido relatado e, embora as complicações arteriais sejam menos frequentes do que as complicações venosas entre mulheres jovens, as consequências a curto e

longo prazo dos eventos arteriais são, na maioria das vezes, mais graves (LIDEGAARD *et al*, 2012; ROACH *et al*, 2015).

2.1.2 Terapia hormonal na menopausa

A chegada da menopausa é marcada pela última menstruação da mulher e está associada ao funcionamento reduzido dos ovários devido, principalmente, à queda dos níveis estrogênicos (HARLOW *et al*, 2012). De acordo com a *North American Menopause Society* (NAMS), (2013) a menopausa pode ser dividida nas seguintes etapas:

- Perimenopausa: é o período de tempo anterior à menopausa natural, com início de alterações metabólicas como reflexos de alterações nos níveis de hormônios ovarianos, como o estrógeno;

- Menopausa natural: é a menopausa que ocorre naturalmente, sem nenhum tratamento médico ou intervenção cirúrgica. Geralmente, ocorre próximo aos 51 anos de idade e é confirmada após 12 meses sem menstruação;

- Pós-menopausa: é o período de tempo posterior à menopausa e é definida como a ausência permanente de menstruação em decorrência da perda da função folicular ovariana.

A terapia hormonal na menopausa é comumente indicada para o tratamento de sintomas da menopausa, como fogachos, atrofia vaginal, osteoporose e distúrbios do sono (LUOTO, 2009) e tem sido associada à reversão de algumas dessas alterações. Por outro lado, alguns ensaios clínicos relataram efeitos adversos associados à terapia hormonal, tais como risco aumentado para câncer de mama, AVE, TEV e aumento da prevalência de eventos cardiovasculares (GAIRARD *et al*, 2009; AL-SAFI & SANTORO, 2014).

Os efeitos desses eventos cardiovasculares são muito controversos e, por isso, são bastante discutidos (KHALIL, 2013). Durante a transição da menopausa para o período de pós-menopausa, a maioria das mulheres apresentam alterações metabólicas, com elevação do depósito de gordura central (LIMA *et al*, 2012), modificações em direção a um perfil mais aterogênico, tais como aumento de TG, LDLc e redução dos níveis de HDLc (EL KHOUDARY *et al*, 2012; JEENDUANG *et*

al, 2014) e aumento da pressão arterial (LIMA *et al*, 2012; SIFA *et al*, 2014). Tais alterações relacionam-se com o fator idade, mas também com a queda nos níveis estrogênicos decorrentes da pós-menopausa (EL KHOUDARY *et al*, 2012) e provavelmente estão relacionadas com a elevação do risco cardiovascular que ocorre neste período (PU *et al*, 2017).

As preparações hormonais incluem dois componentes principais, o estrógeno e a progesterona. No que diz respeito às formulações, o 17 β -estradiol, estrógenos equinos conjugados e progesteronas naturais e sintéticas são comumente prescritos na prática clínica. O 17 β -estradiol é o estrógeno natural derivado de humanos, enquanto o estrógeno equino conjugado é uma formulação proveniente de um extrato preparado a partir da urina de éguas prenhes (PU *et al*, 2017).

2.2 Proproteína Convertase Subtilisina Kexina Tipo 9

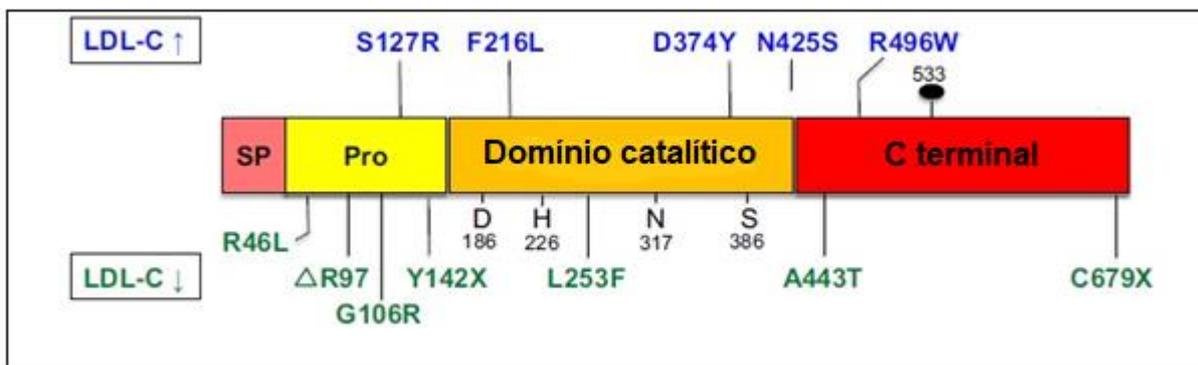
A PCSK9 foi descoberta em 2003 por Seidah e colaboradores, pesquisadores da área de Neurologia, e inicialmente foi denominada de convertase reguladora da apoptose neuronal 1 (NARC-1). Pertencente à família da proproteína convertase e sendo o nono membro a ser descoberto, foi nomeada de PCSK9. (SEIDAH *et al*. 2003; URBAN *et al.*, 2013; GUO; ZHANG & LI, 2014; CUI *et al*, 2015).

A síntese de PCSK9 ocorre em vários sítios, com alta expressão no fígado, rins, intestino e sistema nervoso central (CUI *et. al*, 2010; URBAN *et al.*, 2013). Tal proteína é transcrita e modulada, principalmente, pelo fator de transcrição SREBP-2 (*sterol regulatory element-binding protein 2*) (RIDKER *et al*, 2016) e inicialmente apresenta-se como um zimogênio solúvel de 74 kDa (pré-pró PCSK9), que sofre clivagem autocatalítica intramolecular, no retículo endoplasmático (RE), com liberação de um pró-domínio N terminal de 14 kDa e uma enzima de 60 kDa. Após o processamento autocatalítico, o pró-domínio se liga não-covalentemente ao domínio catalítico da PCSK9 para bloquear a atividade enzimática da mesma. Dessa forma, até o momento de ser secretada no meio extracelular, a PCSK9 permanece em um estado inativo, uma vez que o pró-domínio permanece ligado à proteína de 60 kDa. A clivagem autocatalítica é fundamental para a ativação e liberação da enzima do RE (URBAN *et al*, 2013; LEREN, 2014).

A PCSK9 é uma serina protease codificada por um gene localizado no cromossomo 1p32.3, englobando 12 exons (CORRAL, 2014; LAMBERT *et al*, 2012). Com apresentação em sua estrutura de 692 aminoácidos, subdivididos em peptídeo de sinal (resíduos de 1 a 30), um pró-domínio (resíduos de 31 a 152) e um domínio catalítico (resíduos de 153 a 454), seguidos por uma porção C-terminal (resíduos de 455 a 692) (ABIFADEL *et al*, 2003; LAMBERT *et al*, 2012; ABIFADEL *et al*, 2014; GUO *et al*, 2014). A Figura 1 ilustra a representação estrutural da proteína. A mesma circula em 03 formas principais: na forma de proteína madura, monomérica, que circula ligada ao LDLc; na forma multimérica, auto-associada, com provável atividade aumentada e com o fragmento inativo de furina (PAGE & WATTS, 2016).

Essa protease se liga ao fator de crescimento epidérmico A (EGF-A) do domínio de LDLr na superfície hepática, no qual LDLr e PCSK9 são internalizados pelo hepatócito para que sigam em direção a um caminho de degradação lisossomal. Dessa forma, o nível plasmático de PCSK9 está envolvido na regulação do LDLr e, conseqüentemente, na captação limitada de LDLc e na maior disponibilidade sérica de LDLc (AWAN *et al*, 2014; CORRAL, 2014; GHOSH *et al*, 2015).

Figura 1 – Representação da estrutura da PCSK9.



A proteína contém um peptídeo sinal (SP) (rosa), um pró-domínio (amarelo), um domínio catalítico (laranja) e uma porção C terminal (vermelho). No RE, o SP é removido e segue-se à clivagem autocatalítica da PCSK9 na porção do seu pró-domínio, necessária à sua maturação. O pró-domínio é clivado e reassocia-se com a PCSK9, cobrindo a tríade catalítica: aspartato (D186), histidina (H226), e serina (S386). Isto torna PCSK9 cataliticamente inerte. A estrutura oval preta 533 retrata o único sítio N-glicosilado. Mutações associadas com níveis plasmáticos elevados de LDLc estão representadas na parte superior (azul), enquanto mutações que levam a reduções nos níveis de LDLc encontram-se na parte inferior (verde) **Fonte: Schulz *et al*. (2015).**

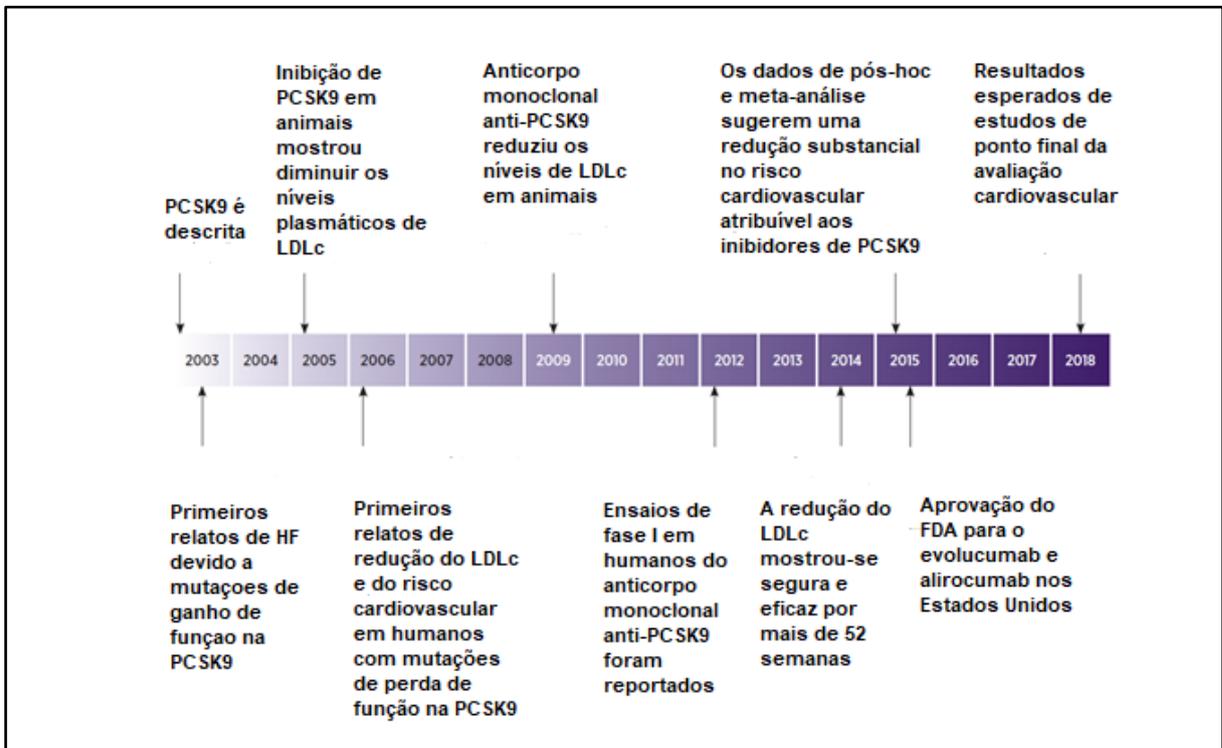
2.2.1 Histórico da PCSK9

Em 2003, Abifadel e colaboradores identificaram mutações no gene que codifica a PCSK9 em famílias francesas com uma forma autossômica dominante de hipercolesterolemia familiar (HF) e sem atividade anormal do receptor LDL ou no gene da apolipoproteína B 100 (APO B-100). Tais mutações se mostraram serem mutações de ganho de função e estavam correlacionadas com elevados níveis plasmáticos de LDLc e com a ocorrência de doença cardiovascular aterosclerótica prematura. Essa descoberta ficou conhecida como o “terceiro defeito” e, por isso, HF causada por mutações na PCSK9 é comumente referida como HF3. (LAMBERT, 2012; URBAN, 2013; ABIFADEL, 2014). Posteriormente, foram relatadas outras alterações genéticas de ganho de função, e também de perda de função, além de polimorfismos da PCSK9 relacionados a reduzidos níveis plasmáticos de LDLc e a reduzidos índices de doença cardiovascular aterosclerótica. Na Figura 1, algumas mutações de ganho e de perda de função associadas a PCSK9 são relatados. Dessa maneira, os pesquisadores começaram a estabelecer uma possível relação entre a atuação da PCSK9 no metabolismo dos parâmetros do perfil lipídico (SEIDAH *et al.*, 2003; ABIFADEL *et al.*, 2003; GUO; ZHANG & LI, 2014; PAGE & WATTS, 2016).

Em 2005, evidências experimentais revelaram que em animais, ao inibir a PCSK9, observava-se uma redução dos níveis plasmáticos de LDLc (RASHID *et al* 2005; PAGE & WATTS, 2016). Já em 2006, surgiram os primeiros estudos revelando que indivíduos que possuem mutação *nonsense* de perda de função no gene da PCSK9 apresentavam níveis plasmáticos significativamente inferiores de LDLc e risco cardiovascular diminuído (LAMBERT, 2012; COHEN *et al*, 2006). Dessa forma, várias abordagens farmacológicas de inibição de PCSK9 foram sendo investigadas e em 2009, anticorpos monoclonais anti-PCSK9 demonstraram diminuir a concentração plasmática de LDLc em animais (ABIFADEL *et al*, 2010; LAMBERT *et al*, 2012). A partir disso, vários anticorpos anti-PCSK9 foram desenvolvidos e estudados em modelos celulares e animais e estudos clínicos vem sendo realizados por empresas farmacêuticas (ABIFADEL *et al*, 2014). Em 2015, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou dois anticorpos monoclonais, o “evolcumab” e o “alirocumab” nos Estados Unidos para os pacientes que não controlam os níveis plasmáticos de LDLc com os tratamentos tradicionais com estatinas. Na Figura 2

encontra-se esquematizado um panorama geral do histórico da PCSK9 até o momento atual (PAGE & WATTS, 2016).

Figura 2 – Representação da linha do tempo do histórico da PCSK9.



Adaptado: Page & Watts, 2016.

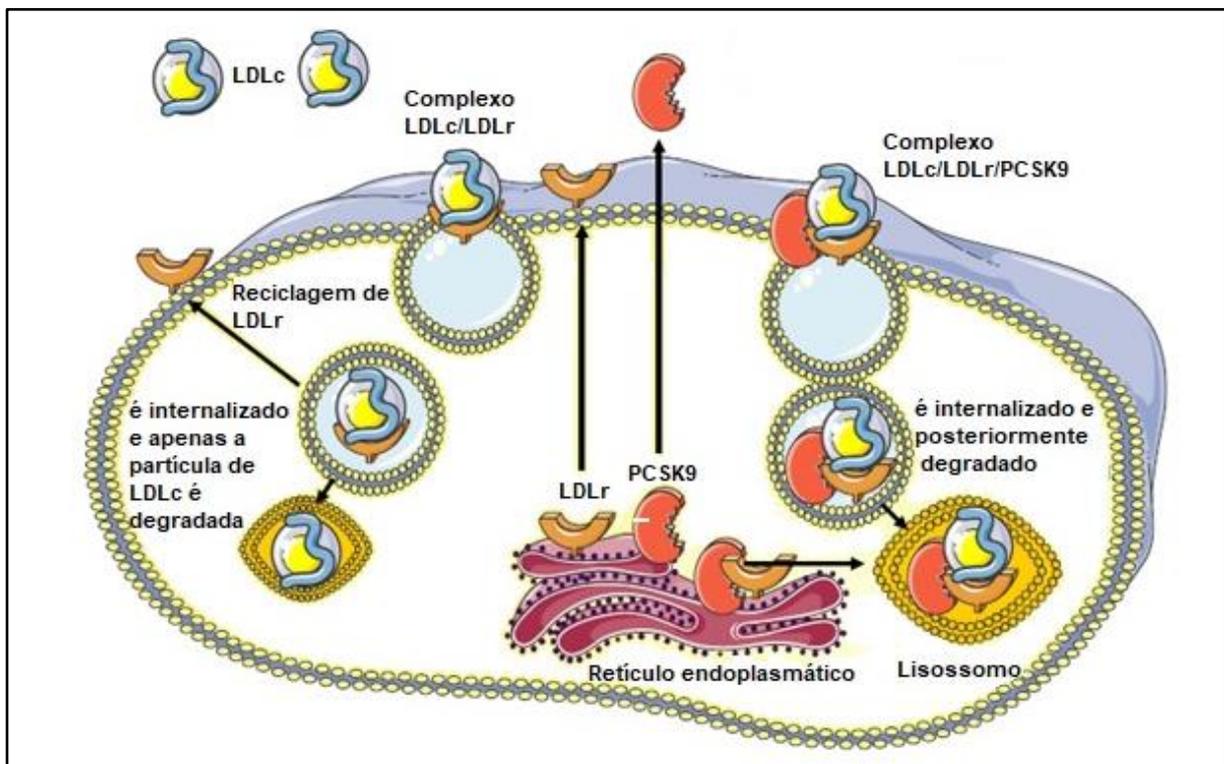
2.2.2 Mecanismo de ação da PCSK9

As pesquisas apontam que a PCSK9 desempenha um papel importante na regulação dos níveis plasmáticos de LDLc por meio da sua capacidade de mediar a degradação intracelular do LDLr. Após ser secretado pelo complexo de Golgi, o domínio catalítico da PCSK9 se liga ao LDLr na superfície celular, especificamente no fator de crescimento epidérmico de repetição do domínio A (EGF-A), de um modo dependente de cálcio. Após tal ligação, o complexo LDLc/LDLr/PCSK9 é internalizado por vesículas revestidas por clatrina e dirigidos aos endossomas e, posteriormente, aos lisossomos, onde ocorre a degradação dos LDLr. O pH ácido dos endossomas aumenta a afinidade de ligação entre PCSK9 e o LDLr. Tal fato faz com que PCSK9 permaneça ligada ao LDLr e impede o mesmo de adquirir uma conformação fechada, tornando-o mais suscetível à enzima de degradação. Por outro lado, LDLr sem PCSK9 ligada é mais propenso a reciclagem e ao retorno à superfície celular. Portanto, a ligação entre a PCSK9 e LDLr interrompe a reciclagem

do receptor, conduzindo à sua degradação, um fato que implica na diminuição de LDLr disponíveis, em níveis mais elevados de LDLc e em maior risco cardiovascular. (URBAN *et al*, 2013; LEREN *et al*, 2014; SCHULZ *et al*, 2015; PAGE & WATTS, 2016). Na Figura 3, tal processo de degradação de LDLr mediada por PCSK9 pode ser melhor visualizado.

Todavia, o mecanismo exato pelo qual o complexo LDLc/LDLr/PCSK9 é conduzido aos lisossomos ainda precisa ser completamente elucidado. Estudos de LDLr em camundongos *knockout* demonstraram que o LDLr parece ser a principal via para a remoção de PCSK9 da circulação (TAVORI *et al.*, 2013). No entanto, a regulação de LDLr e PCSK9 parece ser extremamente complexa, uma vez que domínios distintos de LDLr são capazes de se ligar nas partículas de LDLc e PCSK9, além de parte da PCSK9 circulante ser carregada nas partículas de LDLc (KOSENKO *et al.*, 2013). Segundo Lagace (2014) e Tavori *et al.* (2015), aproximadamente 40% da PCSK9 circulante se liga às partículas de LDLc por meio da interação específica com a apoB-100.

Figura 3 – Degradação do LDLr mediada pela PCSK9



Fonte: Schulz *et al*, 2015.

2.3 Estresse oxidativo

Diversas condições fisiológicas podem desencadear a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de espécies reativas de nitrogênio. Tipos celulares, tais como, células do endotélio, plaquetas, monócitos e neutrófilos podem ser responsáveis por tal geração. As ROS podem ser subdivididas em dois grupos: ROS radicalares (radicais livres), como a hidroxila, peroxila, alcoxila e superóxido; e as ROS não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio, oxigênio e ácido hipocloroso. Já óxido nítrico (ON), nitritos, nitratos, óxido nitroso e peroxinitritos são exemplos de espécies reativas do nitrogênio (VIOLI & PIGNATELLI, 2012; STEPHENS *et al*, 2009; SMALL *et al*, 2012)

O aparecimento de um estado de estresse oxidativo é alcançado com o desequilíbrio entre as concentrações de ROS e espécies reativas do nitrogênio e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo. Em outras palavras, os mecanismos antioxidantes são superados pela geração exacerbada de espécies reativas (GILBERT *et al*, 2008; GUPTA *et al*, 2009). Dessa maneira, sabe-se que as ROS apresentam dupla função. Podendo atuar tanto na manutenção de funções fisiológicas próprias do organismo quanto no dano celular por meio de sua produção excessiva. Diante do comprometimento celular, do DNA, lipídios e de proteínas circulantes, o organismo lança mão de diversificados sistemas antioxidantes para impedir a produção de ROS e também adaptar o organismo à condição de estresse oxidativo (DOTAN *et al*, 2004; VASCONCELOS *et al*, 2007).

Um dos efeitos prejudiciais decorrentes do excesso de ROS no organismo é a peroxidação lipídica de membranas celulares e de organelas. ROS provocam alterações químicas nos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios de membrana, uma vez que estes são especialmente susceptíveis a reações radicalares. Essas reações desfazem a integridade estrutural e funcional da célula, comprometendo sua viabilidade.

ROS podem ser detectadas medindo-se a concentração de subprodutos resultantes do ataque destas espécies às moléculas de proteínas, DNA e lipídios, como dienos conjugados, hidroperóxidos e aldeídos. Portanto, os subprodutos das reações entre ROS e compostos endógenos podem ser usados como biomarcadores de estresse oxidativo (MASSY *et al*, 2009; NAFAR *et al*, 2011).

Dentre os biomarcadores mais utilizados para avaliar o grau de estresse oxidativo está o malondialdeído (MDA), um dialdeído derivado do radical alcoxila

formado durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A determinação de MDA pode ser realizada por meio do teste de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). No ensaio, tem-se uma reação de condensação entre MDA e ácido tiobarbitúrico (TBA), formando-se produtos que podem ser determinados por absorção no comprimento de onda visível (532 nm) ou por fluorescência (515 nm e 533 nm). Apesar de o MDA ser bastante reativo ao TBA, este teste também identifica outros aldeídos, bilirrubina, aminoácidos e carboidratos que podem gerar cromógenos interferentes. Portanto, não se trata de uma técnica com elevada especificidade, uma vez que demais substâncias presentes em materiais biológicos também reagem com o TBA (VASCONCELOS *et al*, 2007; SPANEVELLO *et al*, 2010).

Outra maneira útil de avaliar o estresse oxidativo é por meio da determinação da capacidade antioxidante em amostras biológicas. Uma metodologia proposta consiste no ensaio do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]). No teste, o MTT, um sal tipo tetrazolium que sofre redução ao reagir com fatores antioxidantes do plasma, adquire como produtos finais os cristais de formazana, que serão detectados pela absorção de luz no espectrofotômetro ou leitor de placa de ELISA, no comprimento de onda de 570nm. Fatores antioxidantes presentes no plasma como urato, α -tocoferol, ascorbato, albumina e o grupo sulfidril das proteínas são capazes de reduzir o MTT e formar os produtos finais colorimétricos (MEDINA *et al*, 2007).

2.3.1 Dislipidemias e aterosclerose associadas ao estresse oxidativo

As doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Entre os fatores de risco modificáveis, a dislipidemia constitui um dos principais fatores contribuintes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

As dislipidemias se correlacionam com concentrações alteradas de CT, TG, LDLc e HDLc (CARRERAS & POLK, 2017; SCHULZ & SCHLUTER, 2017) e tais parâmetros são frequentemente usados para avaliar o risco de aterosclerose. Nos últimos anos, ficou evidente que a lipoproteína (a) [Lp(a)], supostamente, também desempenha um papel importante na gênese da aterosclerose e de eventos trombóticos, uma vez que essa lipoproteína apresenta semelhança estrutural com o

LDLc por meio da apolipoproteína B (apo-B) e homologia estrutural com o plasminogênio, um importante componente do sistema fibrinolítico. Dessa forma, é de se esperar que níveis elevados de Lp(a) possam estar relacionados a dislipidemias e também possa favorecer eventos trombóticos por reduzir a fibrinólise (MANSSON *et al*, 2014; BUUREN *et al*, 2017).

Diversos fatores de risco cardiovasculares estão associados ao estresse oxidativo, incluindo hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes mellitus. A oxidação dos fosfolipídios insaturados da membrana celular é capaz de modular diversas vias de sinalização. Dessa maneira, o estresse oxidativo pode ser responsável por diversos eventos, dentre eles: oxidação lipídica, inativação de ON, modificações oxidativas de DNA e proteínas, aumento da proliferação e apoptose de células vasculares, aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, como o receptor para lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), moléculas de adesão, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias. Portanto, a produção exacerbada de ROS traz como um dos principais efeitos a oxidação de LDLc, evento importante na gênese e evolução da aterosclerose (STEPHENS *et al*, 2009; KATO *et al*, 2009).

2.4 Uso de hormônios, parâmetros lipídicos e de estresse oxidativo

A influência do uso de hormônios sobre os parâmetros lipídicos é bastante debatida no meio científico e já foram demonstradas alterações no perfil lipídico entre vários grupos populacionais com diferentes padrões de dislipidemia (ASARE *et al*, 2014). Essas alterações podem ocorrer através da via genômica, no sentido de que modificações nos receptores de estrógeno afetam a elevação da apolipoproteína A-1 hepática. Portanto, pesquisas sugerem que os esteroides contraceptivos exercem seus efeitos metabólicos e os mesmos estão relacionados à síntese e/ou renovação de lipídios e lipoproteínas, incluindo CT, TG, HDLc e LDLc (PETTO *et al*, 2014).

Estrógenos e progesteronas têm variados efeitos sobre o metabolismo lipídico. Tais efeitos dependem dos componentes hormonais, da dosagem e da atividade da progesterona. Estrógeno e progesterona possuem efeitos contrários em relação aos lipídios séricos. Enquanto o estrógeno pode aumentar a produção de TG e HDLc e reduzir os níveis de LDLc, (HOGAN *et al*, 2010), as progesteronas com

atividade androgênica podem deslocar o metabolismo lipídico e lipoproteico de maneira potencialmente desfavorável. Para amenizar o impacto no metabolismo lipídico, foi desenvolvida a drospirenona, um derivado da 17α -espirolactona com propriedades anti-androgênicas (KOWALSKA *et al*, 2017).

Outro ponto a se considerar é que para a análise do efeito hormonal nos parâmetros do perfil lipídico, deve-se considerar, ainda, o fator idade. Com o passar dos anos, naturalmente, os níveis de HDLc tendem a reduzir, enquanto o de CT, TG e LDLc podem se elevar (STEVENSON *et al*, 1993; KI *et al*, 2016). Um estudo que acompanhou a transição de mulheres para a pós-menopausa revelou aumentos consideráveis no CT e TG séricos com o decorrer dos anos (KI *et al*, 2016).

Um novo componente do metabolismo de lipídios que merece especial atenção é a PCSK9. A mesma está correlacionada com a dislipidemia, aterosclerose e eventos cardiovasculares (LAMBERT *et al*, 2012). PCSK9 é uma proteína importante no metabolismo lipídico porque possui um papel central na degradação dos LDLr, interferindo diretamente nos níveis plasmáticos da LDLc (URBAN *et al*, 2013; FERDINAND & NASSER, 2015). Dessa maneira, embora a dosagem de PCSK9 ainda não seja solicitada na rotina da prática clínica, seu impacto deve ser considerado, já que a mesma está intimamente relacionada a eventos ateroscleróticos por comprometer o perfil lipídico, podendo ainda ser influenciada pela idade (CUI *et al*, 2010; GHOSH *et al*, 2015) e pelo uso de hormônios.

Dessa maneira, a despeito de seu efeito desejado no órgão reprodutivo feminino, é de suma importância considerar os efeitos metabólicos que o uso desses hormônios pode acarretar, principalmente em relação ao metabolismo lipídico, uma vez que níveis favoráveis de HDLc reduzem o risco de aterosclerose e tem um efeito cardiovascular protetor, enquanto o LDLc é considerado um dos principais contribuintes para a doença cardíaca (SITRUK-WARE, 2000; KOWALSKA *et al*, 2017).

Estudos anteriores também demonstraram que o uso de CO pode aumentar o estresse oxidativo (CHEN & KOTANI, 2012). Existem muitas hipóteses para esse aumento (FINCO *et al*, 2012) e uma delas é a necessidade de metabolizar a carga hormonal proveniente dos CO com o auxílio das enzimas hepáticas, principalmente aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase e (ALT) (HANNAFORD

et al, 1997) e γ -glutamyltransferase (GGT) (PREYER *et al*, 2016). Pesquisas realizadas demonstraram um aumento de GGT no sangue dessas mulheres o qual foi positivamente correlacionado com o uso de CO (FINCO *et al*, 2012). Além disso, deve-se considerar que mulheres na pós-menopausa têm maiores taxas de comorbidades e, por isso, são particularmente mais vulneráveis aos efeitos adversos que a terapia hormonal pode acarretar.

De acordo com outro estudo, as concentrações de ALT e AST aumentaram no soro de mulheres que usavam CO (OZER *et al*, 2008). Além disso, GGT também aparece como um forte preditor de risco de doenças. GGT induz o estresse oxidativo na parede da artéria na presença de ferro livre e também é provável que seja um indicador do suprimento reduzido de glutathiona, especialmente no fígado, o que acarreta em uma série de problemas relacionados ao estresse oxidativo aumentado (KOENIG & SENEFF, 2015). Portanto, o uso de hormônios esteroides mostrou produzir efeitos consideráveis no fígado, embora esses efeitos sejam mais fisiológicos do que patológicos e, muitas vezes, retornam ao normal após a interrupção do tratamento (EPSTEIN, 2003; KOWALSKA *et al*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A doença aterosclerótica constitui uma causa importante de morbidade e mortalidade em todo o mundo; estando intimamente relacionada a eventos cardiovasculares (WOUTERS *et al*, 2005). Fatores de risco como dislipidemias, associados à idade e ao uso de hormônios contraceptivos ou para tratamento hormonal na pós-menopausa podem contribuir na evolução de um quadro patológico. Além de alterações no perfil lipídico convencional, níveis elevados de Lp(a) devem ser considerados na investigação da gênese de eventos ateroscleróticos, uma vez que, a mesma é uma lipoproteína de grande impacto, não só por comprometer o metabolismo lipídico mas também por interferir diretamente na hemostasia.

Recentemente, a identificação e caracterização da PCSK9 introduziram novas abordagens ao metabolismo lipídico, já que essa proteína é capaz de inibir a reciclagem do LDLr de volta à superfície celular, reduzindo a quantidade de receptores e aumentando os níveis plasmáticos de LDLc circulante. Diante deste cenário, justifica-se investigar a correlação entre as concentrações plasmáticas de PCSK9 com os parâmetros do perfil lipídico, associadas a fatores de risco como o uso de hormônios e a idade. Ademais, apesar de até o presente momento não haver valores de referência para os níveis de PCSK9, as concentrações plasmáticas da mesma poderiam, futuramente, ser utilizadas como marcadores subclínicos de alterações ateroscleróticas.

Os marcadores de estresse oxidativo analisados são úteis no presente estudo e sinalizam alterações em nível de endotélio vascular e também estão intimamente relacionados à eventos ateroscleróticos, uma vez que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima das artérias de médio e grande calibre (GREENOW *et al.*, 2005). Dessa forma, a investigação da atuação do uso de hormônios e da idade sobre tais marcadores também é um dos propósitos do atual estudo.

Portanto, os dados avaliados fornecem um melhor entendimento sobre o impacto do uso de hormônios nos parâmetros de perfil lipídico que, num futuro próximo, poderão direcionar medidas preventivas, além de auxiliar na tomada de

decisão na prescrição de hormônios contraceptivos para as mulheres em idade reprodutiva e na THM para as mulheres na pós-menopausa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a correlação entre o uso de COC e de THM e parâmetros do perfil lipídico, PCSK9 e marcadores de estresse oxidativo, em mulheres jovens e na pós-menopausa.

4.2 Objetivos específicos

- a) determinar os valores plasmáticos de PCSK9 no grupo de mulheres estudadas, com e sem o uso de hormônio;
- b) avaliar o perfil lipídico nos grupos de mulheres estudadas por meio da dosagem de CT, TG, LDLc e HDLc e Lp(a);
- c) investigar a correlação entre a PCSK9 e parâmetros do perfil lipídico em mulheres jovens, em uso ou não de contraceptivo oral e em mulheres pós-menopausadas, em uso ou não de terapia hormonal na menopausa;
- e) investigar a correlação entre a PCSK9 e marcadores de estresse oxidativo em mulheres jovens e na pós-menopausa, em uso ou não de hormônios.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) (Projeto CAAE - 42589815.0 - 0000.5149) (**Anexo A**). As participantes selecionadas tiveram o esclarecimento sobre a pesquisa e as que estavam de acordo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**), bem como responderam a um questionário com perguntas de interesse Clínico e da pesquisa (Ficha Clínica) (**Apêndice B**). Incluíam-se nos grupos jovens universitárias, professoras e funcionárias da UFMG, de acordo com as especificidades de cada grupo.

5.2 Casuística

O estudo foi composto pelos seguintes grupos de estudo:

- Mulheres jovens na faixa etária de 18 a 30 anos em uso de contraceptivo oral (COC) (n=20);
- Mulheres jovens na faixa etária de 18 a 30 anos não em uso de contraceptivo oral (não-COC) (n=20);
- Mulheres na pós-menopausa na faixa etária de 50 a 60 anos que fazem terapia de reposição hormonal (THM) (n=17);
- Mulheres na pós-menopausa na faixa etária de 50 a 60 anos que não fazem terapia de reposição hormonal (não-THM) (n=22).

Os critérios de inclusão para a participação no presente estudo foram:

- Sexo: feminino;
- Faixa etária: 18 a 30 anos (jovens) ou de 50 a 60 anos (pós-menopausadas);
- Uso de hormônios: sim ou não para cada grupo de estudo (jovens-COC e pós-menopausadas-THM).

Não foram incluídas na pesquisa as participantes que apresentavam alguma das características ou manifestações clínicas a seguir: doenças hepáticas, hematológicas, inflamatórias agudas, autoimunes, malignas, insuficiência renal crônica, síndrome nefrótica, diabetes mellitus, obesidade ($IMC > 30 \text{ Kg/m}^2$), gravidez, doenças tireoidianas, tabagismo, consumo excessivo de álcool, mulheres que

estivessem no período de pós-menopausa há mais de 10 anos, uso de antiagregante plaquetário, estatinas, anticoagulante, uso de corticoides, anabolizantes, isotretinoína, ciclosporina, antirretrovirais e anti-inflamatórios não esteroidais. As participantes que assinalaram algum dos critérios de não-inclusão ao responder o questionário não foram submetidas à coleta do sangue.

Distribuição das mulheres jovens de acordo com o tipo COC, **Tabela 1**, e a das mulheres pós-menopausadas segundo o tipo de tratamento hormonal, **Tabela 2**. Vale destacar que o hormônio utilizado pelas mulheres deste estudo foi administrado pela via oral.

Tabela 1. Distribuição das mulheres jovens de acordo com o tipo de COC.

COC	EE 0,020 mg	EE 0,030 mg	EE 0,035 mg
Ciproterona 2mg			n=5
Clormadinona 2mg		n=2	
Desogestrel 015mg	n=2		
Drospirenona 3mg	n=2	n=1	
Gestodeno 0,075mg	n=3		
Levonorgestrel 0,1mg	n=4		
Levonorgestrel 0,15mg		n=1	

Abreviações: EE: etinilestradiol; n: número de jovens que faziam uso de cada combinação de COC.

Tabela 2. Distribuição de mulheres pós-menopausadas de acordo com o tipo de tratamento hormonal.

Hormônios	Estradiol 1mg	Estradiol 2mg
Noretisterona 0,5 mg	n=6	
Drospirenona 2 mg	n=2	
Gestodeno 0,025 mg	n=1	
Ciproterona 1mg		n=1
Progesterona	n= 1	
Noretisterona 1 mg		n=1

Abreviações: * Duas participantes do grupo THM faziam uso apenas de estradiol 1mg; ** Duas participantes do grupo THM faziam uso de estrógenos conjugados 0,625 mg; ***Uma participante do grupo THM fazia uso apenas de estradiol 1,5 mg **** Uma participante do grupo THM fazia uso de progesterona a cada 3 meses; n: número de pós-menopausadas que faziam uso de cada combinação hormonal.

Em relação aos grupos de mulheres que faziam uso de hormônio, a mediana do tempo de uso de hormônio (TUH) no grupo COC foi de 6,2 anos e intervalo interquartil (Q1-Q3) de 3,2 a 8,7 anos. No grupo THM foi de 4,0 (2,5-7,0) anos. A

mediana do tempo de pós-menopausa no grupo não-THM foi de 6,5 (4,5 a 9,0) anos, enquanto no grupo THM foi de 4,0 (3,5 a 9,0) anos ($p = 0,428$). Esses dados estão explicitados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Tempo de uso de hormônio em anos nas mulheres investigadas.

Grupos	TUH (Q ₁ – Q ₃)	TUH (Q ₁ – Q ₃)
COC	6,2 anos (3,2-8,7)	
THM		4,0 anos (2,5-7,0)

Abreviações: * COC: Contraceptivo oral combinado; THM: Terapia hormonal na menopausa; TUH: tempo de uso de hormônio; Q₁ – Q₃: intervalo interquartilico.

5.3 Amostras biológicas

As amostras biológicas foram obtidas de cada participante que preencheu os critérios de inclusão e assinou o termo de consentimento. Foram coletados 15,0 mL de sangue venoso de cada participante (5,0 mL no tubo sem anticoagulante, 5,0 mL em citrato de sódio 3,2% e 5,0 mL em EDTA), após jejum de 12 horas, em tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson).

A ordem da coleta estava de acordo com a recomendação do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) a fim de eliminar possíveis interferências. A primeira coleta foi realizada no tubo sem anticoagulante, seguida da coleta no tubo contendo citrato de sódio e finalizada com o tubo contendo EDTA.

As amostras de sangue obtidas sem anticoagulante foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 15 minutos para separação do soro, distribuídas em alíquotas sendo utilizada uma alíquota para determinação direta de CT, TG, HDLc e glicose de acordo com a bula de cada kit e as demais alíquotas estocadas à -80°C para posterior determinação da Lp(a) e PCRus (Proteína C reativa ultrasensível).

As amostras de sangue obtidas em citrato de sódio foram centrifugadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Setor de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, a fim de se obter o plasma pobre em plaquetas. Os tubos de coleta foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 minutos, os dois terços superiores do sobrenadante transferidos para um novo tubo de ensaio e uma outra centrifugação foi realizada a 3.500 rpm por mais 15 minutos. Apenas os dois terços superiores do sobrenadante foram

utilizados nas análises, distribuídos em alíquotas e estocados à -80°C, para determinação de parâmetros relacionados ao sistema de coagulação ou fibrinolítico em projetos paralelos.

Os tubos de coleta com o anticoagulante EDTA tiveram uma alíquota de sangue total reservada antes da separação do plasma por centrifugação. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 1.500 rpm durante 15 minutos para a obtenção do plasma em EDTA. O sangue total e as alíquotas do plasma também foram estocados à -80°C e, o plasma em EDTA foi reservado para as determinações de PCSK9 e dos marcadores de estresse oxidativo. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e processadas de acordo com a indicação de cada fabricante.

5.4 Delineamento experimental

Os parâmetros analisados neste estudo foram:

- Níveis plasmáticos de PCSK9;
- Marcadores de estresse oxidativo – MTT e TBARS;
- CT, TG, LDL colesterol, HDL colesterol e Lp(a) para avaliação do perfil lipídico;
- Glicemia de jejum para avaliação do perfil glicêmico;
- PCR ultrasensível para avaliar o perfil inflamatório.

5.5 Métodos

5.5.1 Dosagem de 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 ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

5.5.2 Marcadores de estresse oxidativo

Para determinação da capacidade antioxidante do plasma (EDTA), foi realizado o ensaio com o 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil brometo de tetrazolina reduzido (MTT) (MEDINA *et al*, 2007; VASCONCELOS *et al*, 2007). Uma mistura contendo 100 μL de plasma, 50 μL de *phosphate buffered saline* (PBS) e 12,5 μL de solução MTT foi incubada a 37°C durante 60 minutos, protegida da luz. Posteriormente, foram adicionados 750 μL de uma solução de isopropanol ácida (0,04 M; HCl) e submetidos à agitação no vórtex durante 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e a absorbância do sobrenadante medida em um espectrofotômetro a $\lambda = 570 \text{ nm}$.

Além disso, foi realizado o teste com substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), a fim de avaliar a peroxidação lipídica do plasma (EDTA) nas amostras das participantes do estudo. A peroxidação lipídica leva a produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser usados para avaliar o estado oxidativo de materiais biológicos (DOTAN *et al*, 2004). O malondialdeído (MDA) é um desses produtos secundários e é formado durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A quantificação de TBARS foi realizada de acordo com Duarte *et al* (2015) modificado: 100 μL de plasma foram adicionados a 100 μL de solução gelada de TBA 1% (TBA 1%, NaOH 0,05 mol/L e 0,1 mmol/L de hidroxitolueno butilado - BHT- 10 mM) e 100 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado. Em seguida, a solução foi incubada em banho-seco durante 25 minutos a 98°C e congelada durante 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados

375 µL de butanol aos tubos, que foram misturados durante 10 segundos e centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm. As impurezas no sobrenadante foram lidas por espectrofotometria em $\lambda = 600$ nm e seus valores foram descontados a partir da absorbância obtida a $\lambda = 532$ nm (DUARTE *et al*, 2015). A concentração de TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 (mmol/L x cm) (HERMES-LIMA *et al*, 1995).

A leitura da dosagem de PCSK9 e dos parâmetros do estresse oxidativo citados anteriormente foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas Spectra Max-340 e VersaMax microplate reader (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.

5.5.3 Determinações bioquímicas do perfil lipídico

O CT, TG e HDLc foram determinados em amostras séricas utilizando os kits de diagnóstico COLESTEROL Liquiform - LABTEST®, TRIGLYCERIDES Liquiform - LABTEST® e HDL LE-LABTEST®, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Segundo o fabricante do kit diagnóstico, é desejável que o valor do CT esteja abaixo de 200 mg/dL; do TG abaixo de 150 mg/dL e do HDLc superior a 60 mg/dL. O LCLc foi calculado usando a equação ($LDLc = CT - HDLc - TG/5$) sendo válida somente quando $TG < 400$ mg/dL (FRIEDEWALD *et al*, 1972). A determinação de Lp(a) foi realizada utilizando reagentes turbidimétricos de INVITRO® LIPOPROTEIN (a). De acordo com o fabricante do kit diagnóstico, é desejável que o valor da Lp(a) esteja abaixo de 30 mg/dL.

5.5.4 Glicemia de jejum

A glicemia de jejum foi determinada no soro utilizando o conjunto diagnóstico GLICOSE Liquiform - LABTEST® cujo princípio analítico é o método enzimático colorimétrico. O ensaio foi realizado utilizando-se o analisador bioquímico semi-automático da marca THERMO PLATE®, modelo TP Analyzer Plus. Segundo o

fabricante do kit diagnóstico, os valores de referência para a glicose situam-se entre 60 e 99 mg/dL.

5.5.5 PCR ultrasensível

A determinação quantitativa da PCRus foi determinada em amostras séricas através do uso do conjunto diagnóstico hsCRP - VITROS®, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado-química seca. O ensaio foi realizado utilizando-se o aparelho ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS-Johnson&Johnson Company, em sistema completamente automatizado. Segundo o fabricante do kit diagnóstico, o valor de referência da PCRus situa-se abaixo de 3 mg/L.

5.6 Análises estatísticas

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 interquartilico (IT). O teste *U* de Mann-Whitney foi utilizado para comparar medianas entre dois grupos em variáveis não paramétricas, corrigindo-se o nível de significância pelo método de Bonferroni. 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

As características clínicas, bioquímicas e os níveis de PCSK9 dos grupos de estudo são demonstradas na **Tabela 4**. Nenhuma diferença foi observada em relação à idade ao comparar os dois grupos de mulheres jovens. A mesma também não foi observada ao se comparar os dois grupos de mulheres na pós-menopausa. Maiores valores de IMC, PCRus e glicose foram observados para o grupo não-THM ao comparar com o grupo não-COC ($p < 0,05$).

Alguns parâmetros bioquímicos do perfil lipídico e a PCSK9 plasmática das mulheres investigadas são exibidos na **Tabela 4**. O grupo COC apresentou níveis plasmáticos mais elevados de PCSK9 do que o grupo não-COC ($p < 0,05$), **Figura 4**. Os grupos COC e não-THM apresentaram maiores concentrações de CT e TG do que o grupo não-COC, de forma significativa ($p < 0,05$). No grupo não-THM, o CT foi mais elevado quando comparado com o grupo THM ($p < 0,05$). Além disso, observou-se uma diferença significativa em relação ao LDLc quando comparou-se o grupo não-THM com o THM e não-THM com o grupo não-COC ($p < 0,05$). Não houve diferença para LDLc quando comparado o grupo COC e não-COC. Nenhuma diferença estatística foi encontrada para os níveis de HDLc e Lp (a) entre todos os grupos estudados.

Quanto à avaliação da capacidade antioxidante do plasma em EDTA, por meio da quantificação dos níveis de MTT, nenhuma diferença significativa foi observada quando comparados todos os grupos. De forma similar, os níveis de TBARS não se diferenciaram quando comparados os grupos não-THM e THM e os grupos não-COC e não-THM. No entanto, o grupo COC apresentou níveis de TBARS mais elevados do que o grupo não-COC ($p < 0,05$) **Figura 4**.

Ao analisar todas as mulheres estudadas, não foi observada correlação entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e IMC ($r = 0,194$; $p = 0,08$) assim como para os parâmetros LDLc, Lp(a) e MTT. No entanto, foi encontrada correlação positiva entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e a variável CT ($r = 0,250$; $p = 0,026$) **Tabela 5**.

No grupo COC, os níveis plasmáticos de PCSK9 foram positivamente correlacionados com MTT ($r = 0,529$; $p = 0,016$) **Tabela 5**.

No grupo não-THM, os níveis plasmáticos de PCSK9 foram positivamente correlacionados com CT ($r = 0,424$; $p = 0,049$) **Tabela 5**. No entanto, não foram observadas correlações entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e as variáveis LDLc e Lp(a) ($r = 0,402$; $p = 0,064$ e $r = 0,398$; $p = 0,066$, respectivamente).

Finalmente, nenhuma outra correlação significativa foi observada entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e outros parâmetros investigados ao considerar os demais grupos.

Tabela 4. Características demográficas e bioquímicas e níveis de PCSK9 nas mulheres investigadas.

Variáveis	não-COC (n=20)	COC (n=20)	não-THM (n=22)	THM (n=17)	p ^a	p ^b	p ^c
Idade (anos)	24 (7)	25 (7)	58 (7)	55 (3)	0,849	0,282	-
IMC (Kg/m ²)	21,9 (5,3)	21,8 (4,1)	24,6 (6,3)	25,2 (4,8)	0,588	0,955	0,007*
CT (mg/dL)	156,0 (38,5)	173,0 (30,8)	207,0 (56,3)	177,0 (46,0)	0,010*	0,012*	0,001*
LDLc (mg/dL)	84,0 (44,4)	84,8 (25,8)	134,0 (31,5)	95,8 (40,9)	0,457	0,005*	0,001*
HDLc (mg/dL)	67,0 (22,0)	72,5 (19,6)	47,6 (23,6)	51,6 (28,2)	0,156	0,411	0,051
TG (mg/dL)	71,5 (18,8)	94,5 (43,0)	111,5 (82)	118 (44,5)	0,001*	0,878	0,001*
Lp(a) (mg/dL)	22,0 (42,6)	19,1 (33,7)	21,4 (47,9)	12,7 (48,5)	0,989	0,246	0,632
PCSK9 (ng/mL)	175,9 (59,8)	209,5 (46,2)	197,8 (65,9)	195,6 (71,5)	0,017*	0,766	0,178
Glicose (mg/dL)	73,5 (11,0)	75,0 (8,8)	89,0 (11,0)	84,0 (11,0)	0,636	0,288	0,001*
PCRus (mg/L)	2,5 (4,0)	6,5 (5,8)	7,0 (6,0)	7,0 (8,0)	0,001*	0,739	0,001*

Abreviações: IMC: Índice de Massa Corporal; CT: Colesterol Total; LDLc: Colesterol presente na lipoproteína de baixa densidade; HDLc: Colesterol presente na lipoproteína de alta densidade; TG: Triglicerídeos; Lp(a): Lipoproteína (a); PCSK9: Proteína convertase subtilisina kexina tipo 9; PCRus: Proteína C Reativa ultrasensível; não-COC: Jovens não em uso de contraceptivo oral; COC: Jovens em uso de contraceptivo oral; não-THM: Menopausadas não em uso de terapia de reposição hormonal; THM: Menopausadas em uso de terapia de reposição hormonal; n= Número amostral.

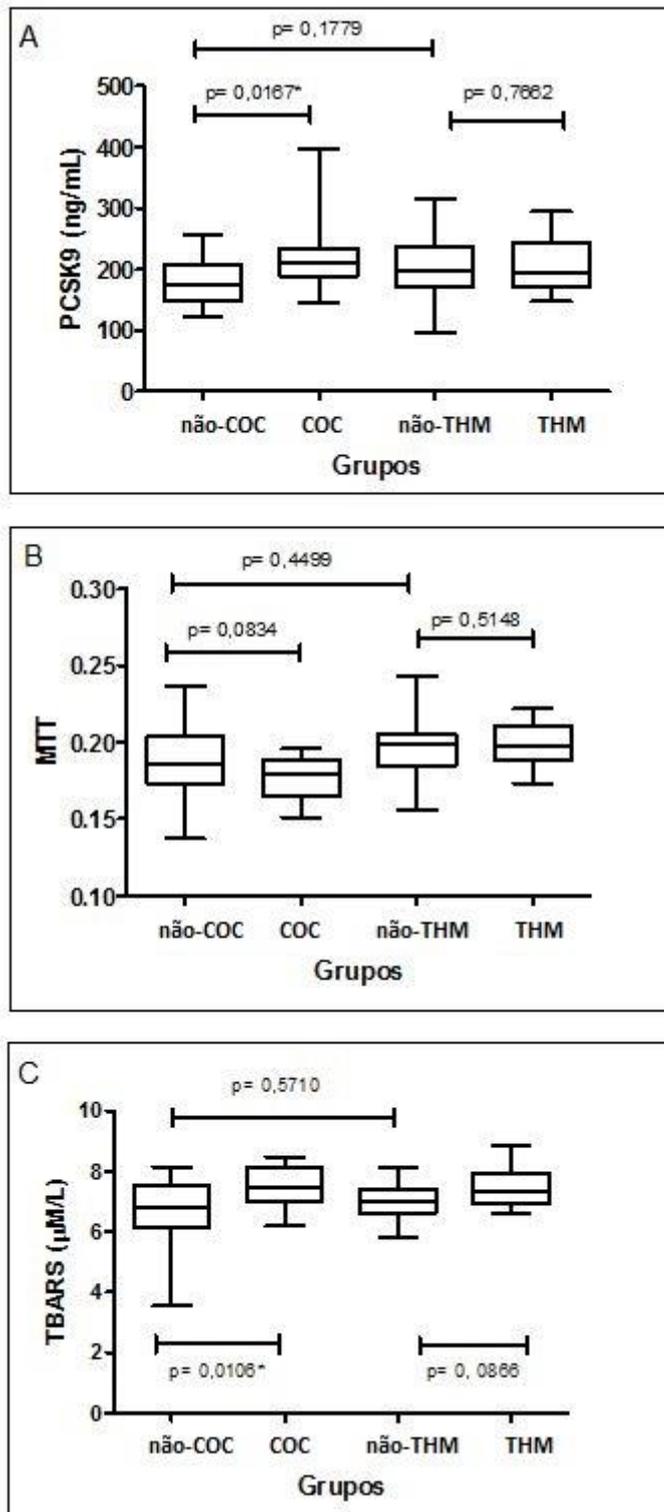
Teste *U* de Mann-whitney; Dados apresentados como mediana (intervalo interquartilico). * Valor de $p < 0,05$ denotou significância estatística. p^a: não-COC versus COC; p^b: não-THM versus THM; p^c: não-COC versus não-THM.

Tabela 5. Correlação entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e os parâmetros analisados.

Variáveis	PCSK9				
	Todas (n=79)	não-COC (n=20)	COC (n=20)	não-THM (n=22)	THM (n=17)
CT	0,250*	0,307	0,105	0,424*	0,012
LDLc	0,181	0,264	0,057	0,402	0,086
Lp(a)	0,141	0,053	0,096	0,398	0,034
IMC	0,194	0,167	0,083	0,287	0,240
MTT	0,043	-0,165	0,529*	0,160	-0,078

Coefficiente de correlação e * $p < 0,05$ entre os parâmetros analisados.

Figura 4 – Níveis plasmáticos de PCSK9 e marcadores de estresse oxidativo.
Painel A) PCSK9; painel B) MTT; painel C) TBARS.



7. DISCUSSÃO

No presente estudo, pôde ser observado valores mais elevados de IMC, PCRus e glicose no grupo não-THM, quando comparado com o grupo não-COC. Como esperado, o fator idade contribuiu de forma consistente para esses resultados. Além disso, vale enfatizar que o pareamento das idades entre os grupos não-COC e COC e não-THM e THM foi necessário para que os resultados não fossem comprometidos por uma discrepância muito elevada entre as idades das participantes dos grupos já citados.

Outra questão importante a ser considerada é a influência do TUH. A mediana do TUH foi de 4,0 anos no grupo THM e de 6,2 anos no grupo COC. No estudo de Ki e colaboradores (2016), os valores mais reduzidos nas variáveis lipídicas CT, TG e LDLc foram reportados quando a duração da THM foi superior a 5 anos. No presente estudo, os níveis de HDLc não foram afetados pela terapia hormonal, enquanto outros estudos observaram um aumento significativo nos níveis de HDLc (BAYRAK *et al*, 2006; KIKA *et al*, 2009). Os resultados do estudo de Ki e colaboradores corroboram com os do presente estudo, uma vez que foram observadas reduções com significância estatística nos níveis de CT e LDLc com 4 anos de THM. Em contrapartida, no que se refere ao TUH em mulheres jovens, um estudo realizado com 1391 mulheres entre 21-28 anos, revelou que o uso de COC a longo prazo está intimamente ligado a aumentos séricos de CT, TG e LDLc e reduções nos níveis de HDLc, o que pode ser associado a um maior risco de doenças cardiovasculares no futuro (DILSHAD *et al*, 2016). Além do tempo de uso de hormônio, o tempo de pós-menopausa também pode ter interferido nos nossos resultados, principalmente em relação ao perfil lipídico. No nosso estudo, a mediana do tempo de pós-menopausa para as participantes do grupo não-THM foi de 6,5 anos, enquanto para o grupo THM foi de 4,0 anos. Hall e colaboradores (2000) acompanharam 143 mulheres pós-menopausadas por 5 anos com medidas anuais de parâmetros do perfil lipídico. Foi relatado que a progressão da pós-menopausa é acompanhada por aumentos no CT e TG séricos e diminuição no nível de HDLc.

No presente estudo, também foram observados níveis séricos de CT e LDLc menores nas mulheres pós-menopausadas que faziam THM em relação às mulheres pós-menopausadas que não faziam terapia hormonal. Porém, não houve diferença

estatística nos níveis séricos de HDLc ao comparar os grupos não-THM e THM. Sendo assim, sugere-se que o uso de hormônio nessas mulheres possa ser responsável, pelo menos em parte, por níveis séricos de CT e LDLc reduzidos em relação ao grupo de mulheres que não usam hormônio (não-THM), atuando, portanto, como um fator protetor. No trabalho de Sanchez e colaboradores (2016), alterações no perfil lipídico de mulheres pós-menopausadas que faziam terapia hormonal também foram vistas, principalmente nos níveis de TG e HDLc. A melhora em marcadores do perfil lipídico é benéfica, uma vez que pode reduzir o risco de eventos cardiovasculares (SANCHEZ *et al*, 2016). A depuração de lipoproteínas LDLc aumenta e os níveis plasmáticos de LDLc são reduzidos em mulheres na pós-menopausa que fazem uso de THM, uma vez que as pesquisas apontam que o estrógeno tem efeitos benéficos relacionados à ativação da enzima óxido nítrico sintase, com conseqüente relaxamento do músculo liso vascular, podendo modular os lipídios do soro e fatores antioxidantes (GUO *et al*, 2015).

Outros estudos, porém, encontraram valores aumentados de HDLc em mulheres que faziam THM (NERBRAND *et al*, 2004; BAYRAK *et al*, 2006; KIKI *et al*, 2009). De acordo com tais estudos, pode-se inferir que a THM é responsável por elevar o nível de HDLc, porém, a magnitude desse aumento parece estar relacionada ao tipo e dosagem de estrógeno, bem como à via de administração. Além disso, a progesterona pode exercer um efeito negativo em relação às concentrações de HDLc (BAYRAK *et al*, 2006; KI *et al*, 2016). Pesquisadores também analisaram os efeitos da THM sobre as variáveis lipídicas em mulheres pós-menopausadas de acordo com o tipo de terapia hormonal. O aumento dos níveis de HDLc foi mais pronunciado no grupo de mulheres que fazia uso apenas de estrógeno, isto é, no grupo de mulheres que não faziam a terapia combinada de estrógeno-progesterona. Portanto, esses resultados também podem ser atribuídos aos efeitos androgênicos da progesterona (MAKI & HENDERSON, 2012).

Ao comparar o grupo de mulheres jovens que não usavam COC (não-COC) com o grupo de mulheres pós-menopausadas que não faziam uso de THM (não-THM), diferenças estatísticas foram observadas em relação aos parâmetros CT, TG e LDLc. Essa diferença pode, em grande parte, ser atribuída ao avanço da idade e seus desafios que, naturalmente, podem elevar os parâmetros do perfil lipídico. Todavia, não foram vistas diferenças estatísticas em relação aos valores de HDLc

ao comparar esses dois grupos. Resultados similares foram encontrados por Anagnostis e colaboradores (2015). Esses pesquisadores trabalharam com 518 mulheres na pós-menopausa e 515 mulheres em idade reprodutiva; ambos os grupos não faziam uso de hormônio e de nenhum tipo de medicamento que interferisse no metabolismo lipídico. Observou-se uma elevação nas concentrações dos marcadores do perfil lipídico CT, TG e LDLc, exceto no HDLc, no grupo de mulheres pós-menopausadas em relação às mulheres em idade reprodutiva.

Em relação aos grupos de mulheres em idade reprodutiva (não-COC e COC), foram reportadas maiores concentrações de CT e TG no grupo de jovens que faziam uso de COC em relação ao grupo que não fazia uso, porém não houve diferença estatística nos níveis séricos de LDLc e HDLc ao comparar os dois grupos. Resultados semelhantes foram reportados no estudo de Giribela e colaboradores (2015), em que foram encontrados aumentos significativos de CT e TG no grupo de usuárias de COC, mas não foram observadas mudanças significativas nos níveis de HDLc e LDLc quando comparado com o grupo controle. É sugerido que o uso de COC estimule a lipogênese, o que pode resultar em elevados níveis de CT e TG. Esse aumento é considerado um marcador para doenças cardiometabólicas e sugeriu-se que, a longo prazo, o uso de COC possa aumentar o risco de síndrome metabólica aguda (JOSSE *et al*, 2012).

Todavia, outros estudos relataram alterações significativas com níveis séricos diminuídos de LDLc em usuárias de COC (GASPARD *et al*, 2004; TANEEPANICHSKUL & PHUPONG, 2007; KOWALSKA *et al*, 2017). Alguns resultados sugerem que o estrógeno presente nas formulações possa ser um dos responsáveis pelo aumento da remoção de LDLc e aumento das concentrações séricas de HDLc e uma das razões para tal remoção é o aumento da sua oxidação observada por meio do aumento da concentração de MDA, um marcador de peroxidação lipídica (KOWALSKA *et al*, 2017). Por outro lado, Cauci e colaboradores (2016) mostraram em um estudo o aumento de LDLc no sangue de usuárias de COC em comparação com as não usuárias por meio do aumento de LDLox. Dessa forma, nossos resultados e os dos demais estudos enfatizam que estrógenos e progesteronas apresentam múltiplos efeitos sobre o metabolismo lipídico. Tais efeitos dependem de algumas variáveis, tais como, a dosagem, os componentes hormonais e a atividade anti-androgênica da progesterona. Além disso, hormônios

exógenos, tanto sob a forma de contraceptivos hormonais em mulheres em idade reprodutiva quanto como THM em mulheres na pós-menopausa modulam o ambiente hormonal e, subsequentemente, o risco cardiovascular gênero-específico (HARVEY *et al*, 2015).

Apesar de não ter encontrado nenhuma correlação entre PCSK9 e Lp(a) no nosso estudo, muitos pesquisadores investigam a atuação da PCSK9 em relação à Lp(a). Fan e colaboradores (2010) reportaram que a ausência de LDLr provocou a elevação de Lp(a) em coelhos transgênicos WHHL, sugerindo que o LDLr possa participar do catabolismo de Lp(a). Outro dado de suporte para tal associação são estudos com células HepG2, uma vez reportado que Lp(a) associada às células foi reduzida quando co-incubada com LDLc e PCSK9, sugerindo que Lp(a) compete com LDLc pela ligação ao LDLr. Portanto, pode-se inferir que quando a expressão de LDLr é aumentada, particularmente numa situação de baixa circulação de LDLc, Lp(a) sofre uma redução (RAAL *et al*, 2016). Tavori e colaboradores (2016) também encontraram PCSK9 plasmático associado às partículas de Lp(a) em humanos com níveis elevados de Lp(a) e em camundongos portadores de Lp(a) humano.

Diferentemente de outras lipoproteínas, a influência da dieta e exercícios físicos em relação aos níveis de Lp(a) é mínimo e parece não haver efeitos relacionados ao gênero. No entanto, provavelmente devido ao efeito estrogênico, os níveis de Lp(a) são menores em mulheres pré-menopausadas quando comparado às mulheres na pós-menopausa (STEIN & RAAL, 2016) e a THM contendo o estrógeno em mulheres na pós-menopausa tem sido associada à uma diminuição de até 25% nos níveis de Lp(a), possivelmente, devido à influência do estrógeno no gene promotor da Lp(a) (HOOVER-PLOW & HAUNG, 2013).

Em relação às dosagens de PCSK9, foram relatados níveis plasmáticos de PCSK9 mais elevados no grupo COC ao comparar com o grupo não-COC. É entendido que a PCSK9 promove a degradação de LDLr e, portanto, contribui para o aumento dos níveis de LDLc e conseqüentemente de CT. No entanto, os resultados de LDLc para os grupos não-COC e COC não foram estatisticamente diferentes, enquanto os de CT demonstraram diferença estatística, com maiores concentrações no grupo COC. Os resultados de LDLc podem ter ficado comprometidos, uma vez que o *n* amostral trabalhado foi pequeno. O estudo Arjuman e colaboradores (2011)

demonstrou um aumento da expressão de LDLr com o uso de COC. Além do mais, a inibição de PCSK9 com um anticorpo monoclonal específico foi associado à redução nos níveis de triglicérides (MC KENNEY *et al*, 2012) e o tratamento de células epiteliais intestinais humanas com PCSK9 recombinante aumenta a captação de colesterol, sugerindo a participação de PCSK9 na absorção lipídica (LEVY, *et al*, 2013). Estes resultados de efeitos de PCSK9 em biomarcadores lipídicos sugerem que a PCSK9 é essencial no metabolismo lipídico, por mecanismos que vão além da regulação do nível de LDLc (LI & LI, 2015).

Dessa maneira, pode-se supor que no caso das mulheres jovens que usam COC, o mecanismo de expressão da PCSK9 “compensou” o mecanismo de expressão de LDLr, isto é, a degradação dos LDLr pela PCSK9 foi mais pronunciada do que o aumento de expressão de LDLr. Tal hipótese pode ser suportada pelo fato de os valores de LDLc, aqui representados pelos valores de CT, serem estatisticamente superiores no grupo COC em relação ao grupo não-COC.

Ao se comparar os níveis plasmáticos de PCSK9 entre as mulheres jovens e pós-menopausadas que não usavam hormônio (não-COC e não-THM), não foram encontradas diferenças significativas. Em contrapartida, Ghosh *et al*, (2015) relataram níveis plasmáticos de PCSK9 22% mais elevados no grupo de mulheres pós-menopausadas em relação ao grupo de mulheres em idade reprodutiva. Guo e colaboradores (2015) também relataram uma correlação positiva entre os níveis de PCSK9 e a idade ao comparar mulheres na pós-menopausa com mulheres na pré-menopausa. Também não foi identificadas diferenças significativas em nossos resultados para os níveis de PCSK9 ao comparar os grupos de mulheres na pós-menopausa (não-THM e THM) em relação ao uso de hormônio. Guo (2015) também investigou se os níveis de PCSK9 estariam correlacionados com os níveis de estrógeno, porém não foi vista nenhuma correlação em 727 mulheres investigadas. Também foi mostrado em estudos com cultura de células que o 17- β estradiol em concentrações fisiológicas, não alterou de forma significativa a expressão de PCSK9 em hepatócitos humanos (GUO *et al*, 2015).

Apesar de nossos resultados não apresentarem correlação entre PCSK9 e IMC, a influência desta última variável nos níveis plasmáticos de PCSK9 também é ponto passível de discussão. No estudo de Filippatos e colaboradores (2017) e Tóth

e colaboradores (2017), as concentrações de PCSK9 foram significativamente elevadas em indivíduos com sobrepeso e obesidade ao comparar com o grupo de peso normal. Já é sabido que a progressão da aterosclerose depende do metabolismo lipídico, principalmente das moléculas de LDLc. Dessa forma, como a PCSK9 está intimamente relacionada ao catabolismo de LDLc, pode-se sugerir que níveis circulantes de PCSK9 seja um mediador de alterações cardiometabólicas induzidas pela obesidade e que a adiposidade pode atuar como um fator contribuinte que afeta os níveis circulantes de PCSK9. Além disso, dados de estudos anteriores também relataram uma associação positiva entre níveis séricos de PCSK9 e idade, gênero, IMC e glicemia de jejum (CUI *et al*, 2010; DUBUC *et al*, 2010).

Foi investigado também em nosso estudo o estresse oxidativo em mulheres jovens e pós-menopausadas de acordo com o uso de COC ou THM. Não foi observada diferença significativa em relação à concentração de TBARS e a avaliação da capacidade antioxidante do plasma, por meio do ensaio do MTT, tanto ao comparar os grupos de mulheres pós-menopausadas (não-THM e THM) quanto ao comparar os grupos não-COC e não-THM. Sánchez-Rodríguez e colaboradores (2012), utilizando o ensaio com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), obtiveram níveis significativamente maiores de lipoperóxidos, um dos marcadores de dano oxidativo, e da razão das enzimas superóxido dismutase/ glutathiona peroxidase (SOD/GPx) no grupo de mulheres na pós-menopausa, ao comparar com mulheres em idade reprodutiva. A atividade da enzima antioxidante GPx também foi menor no grupo de mulheres na pós-menopausa. Portanto, os achados desse trabalho sugerem que a pós-menopausa é um fator de risco que potencialia o estresse oxidativo e que a queda estrogênica poderia ser um dos responsáveis pelo aumento de eventos pró-oxidantes verificada nesse período. Já em um estudo posterior (SANCHÉZ-RODRIGUEZ *et al*, 2016), foi avaliado o efeito da THM sob o estresse oxidativo, em mulheres na pós-menopausa saudáveis e com síndrome metabólica. Foram mensurados lipoperóxidos plasmáticos, enzimas antioxidantes (SOD/GPx) e ácido úrico, como marcadores de estresse oxidativo e nos dois grupos avaliados observou-se melhora para esses marcadores após iniciar a THM, com um melhor equilíbrio entre fatores pró e antioxidantes, inferindo que o estrógeno possa exercer um efeito antioxidante mediado pela neutralização do excesso de espécies reativas

de oxigênio por meio de diferentes mecanismos (SUBBIAH *et al.* 1993; KUMAR *et al.*, 2010).

Já nos grupos de mulheres jovens, observamos níveis mais elevados de TBARS no grupo COC em relação ao grupo não-COC. Esse ensaio é uma medida indireta da peroxidação lipídica; portanto, tal resultado é um indicativo de que mulheres jovens que fazem uso de COC podem apresentar grau mais elevado de peroxidação lipídica do que mulheres jovens que não fazem uso de hormônio. E que o uso do hormônio pode ser um dos responsáveis por tal elevação. Esse resultado deve ser considerado, uma vez que o estresse oxidativo mais pronunciado pode ser prejudicial e, até mesmo, elevar o risco cardiovascular. No entanto, nossos dados não permitem inferir a causalidade, isto é, o presente estudo não pode avaliar se o uso de COC aumentou diretamente a produção de ROS que levou a formação de peróxidos e consumiu as defesas antioxidantes, e/ou se o uso de COC reduziu diretamente as defesas antioxidantes, tornando-a insuficiente para neutralizar os radicais livres. Portanto, pesquisas adicionais são necessárias para ampliar nossos resultados.

No estudo de Cauci e colaboradores (2016), o uso de COC elevou, consideravelmente, marcadores de estresse oxidativo, ao comparar atletas usuárias com o grupo de atletas não-usuárias de COC. Nesse estudo, ROS na forma de hidroperóxidos, mostraram-se quase duas vezes maiores em usuárias de COC em relação ao grupo controle. Os mecanismos que ocasionam o aumento de hidroperóxidos por meio do uso de COCs apontam que o catabolismo de hormônios exógenos, envolvendo atividade do citocromo P450 (CYP450) provoca o aumento da produção de ROS e a depleção da glutathiona reduzida, essencial na manutenção do estado de oxiredução do sistema biológico. É importante salientar que mais estudos são necessários para avaliar se o aumento dos marcadores de estresse oxidativo observado com o uso de COC está relacionado ao estrógeno e/ou à progesterona.

Para analisar tais condições, um estudo *in vitro* revelou que o tratamento de células com estradiol resultou em aumento da peroxidação lipídica (YEDJOU *et al.*, 2015) e Gómez-Zubeldia e colaboradores (2001) também relataram uma significativa relação entre a concentração plasmática de estradiol e concentrações plasmáticas

de MDA em ratas fêmeas *Wistar*. Todavia, não foi encontrada nenhuma relação entre os níveis plasmáticos de estradiol e atividades da superóxido dismutase e catalase, duas importantes enzimas antioxidantes. Em outro estudo também foi encontrado aumento de peróxidos lipídicos e da LDLox em 32 mulheres usuárias de COC quando comparadas com 30 mulheres que não faziam uso de COC (DE GROOTE *et al*, 2009). Pincemail e colaboradores (2007), em um estudo com mulheres belgas de 40 a 48 anos, encontraram um aumento significativo de peróxidos lipídicos em 209 usuárias de COC em comparação com 119 não usuárias de hormônio contraceptivo.

A análise univariada foi utilizada para analisar todas as mulheres do estudo; as concentrações plasmáticas de PCSK9 foram positivamente correlacionadas com a variável CT, embora a correlação encontrada tenha sido de baixa magnitude. Não foram encontradas correlações entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e as variáveis LDLc e Lp(a) no grupo de mulheres pós-menopausadas que não faziam a THM (não-THM). Ainda no grupo não-THM, observou-se uma moderada correlação entre os níveis de PCSK9 e a variável CT. O estudo de Cui e colaboradores (2010), realizado com 2719 indivíduos chineses indicou uma correlação positiva entre os níveis séricos de PCSK9 e CT, LDLc e TG. Nesse estudo, os coeficientes de correlação entre PCSK9 e as variáveis lipídicas CT, LDLc e TG foram maiores do que as correlações com outros parâmetros metabólicos analisados, tais como IMC, idade, glicemia de jejum e pressão sanguínea sistólica e diastólica. Ademais, todas essas correlações foram maiores nas mulheres do que nos homens e não houve correlação significativa observada entre PCSK9 e os níveis séricos de HDLc, demonstrando que a PCSK9 parece desempenhar um papel mínimo no metabolismo do HDLc (CUI *et al*, 2010). Já em um estudo de *coorte* realizado com mulheres saudáveis foi encontrado pouca evidência de que os níveis plasmáticos de PCSK9 são influenciados por parâmetros como idade, HDLc, e Lp(a). Por outro lado, os níveis de PCSK9 foram modestamente correlacionados com níveis circulantes de LDLc e TG e a relação CT/HDLc foi fortemente associada a um risco vascular futuro (RIDKER *et al*, 2016).

Nossas análises não relataram correlação positiva entre PCSK9 e IMC, ao considerar todas as mulheres investigadas. No entanto, no estudo de Tóth e colaboradores (2017), que trabalhou com 120 indivíduos saudáveis e livres de

doenças cardiovasculares, os níveis plasmáticos de PCSK9 mostraram-se significativamente aumentados no grupo de obesos em comparação com o grupo com sobrepeso e com o grupo de peso normal. Nesse estudo, os níveis de PCSK9 foram positivamente correlacionados com os valores de IMC.

É do nosso conhecimento que o excesso de tecido adiposo por si só, especialmente o visceral, é um fator de risco independente para transtornos cardiometabólicos. Embora nossos resultados não tenham apresentado correlação entre PCSK9 e IMC, a relação entre essas duas variáveis deve ser considerada, uma vez que a PCSK9 apresenta um papel-chave na regulação do metabolismo de lipídios e o mesmo atua diretamente na progressão de mudanças ateroscleróticas e vasculares. Por outro lado, tem sido sugerido a partir de dados recentes, o papel da PCSK9 sem considerar os efeitos lipídicos, como sua atuação na inflamação e glicemia, e que a PCSK9 pode estar relacionada com aterosclerose por meio de mecanismos independentes da degradação de LDLr (LI *et al*, 2014; TÓTH *et al*, 2017). Dessa forma, nível circulante de PCSK9 poderia ser marcador de alterações subclínicas, bem como um fator mediador dessas mudanças (BASTIEN *et al*, 2014; LI *et al*, 2014; TÓTH *et al*, 2017).

Nossos resultados também revelaram uma moderada correlação positiva no grupo COC entre os níveis plasmáticos de PCSK9 e MTT, um indicador da capacidade antioxidante do plasma. Foi demonstrado que a oxidação da LDLc elevou a expressão de PCSK9 em células não-hepáticas (SCHLUTER *et al*, 2017), indicando a existência de uma relação entre a PCSK9 e o processo oxidativo da LDLc. Nesse sentido, sugere-se que o aumento observado na capacidade antioxidante do plasma possa estar relacionado a um mecanismo do organismo como tentativa de contrabalancear o aumento da peroxidação lipídica. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar tal hipótese.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma das limitações do presente estudo pode ter sido o número amostral, juntamente com o tempo de uso de hormônio. Como cada grupo continha um n pequeno, não foi possível a estratificação dos grupos de acordo com os componentes hormonais utilizados. Além disso, a falta de padronização dos componentes hormonais utilizados nas formulações pode ter influenciado nos resultados obtidos.

9. CONCLUSÕES

Mulheres jovens em uso de hormônio apresentaram níveis aumentados dos parâmetros do perfil lipídico e estresse oxidativo, ao passo que nas menopausadas níveis séricos reduzidos do perfil lipídico.

Nossos resultados sugerem que o uso de hormônios, dependendo da idade, pode interferir no metabolismo lipídico por mecanismos diferentes.

10. 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.

ABIFADEL, M.; Jihane Pakradouni, Matthieu Collin, Marie-Elisabeth Samson-Bouma, Mathilde Varret, Jean-Pierre Rabès & Catherine Boileau. Strategies for proprotein convertase subtilisin kexin 9 modulation: a perspective on recent patents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20, n. 11, p. 1547-1571, 2010.

ABIFADEL M.; Sandy Elbitar & Petra El Khoury & Youmna Ghaleb & Mélody Chémaly & Marie-Line Moussalli & Jean-Pierre Rabès & Mathilde Varret & Catherine Boileau. Living the PCSK9 Adventure: from the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia Towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs. **Current Atherosclerosis Reports**, Paris, v. 16, n. 439, p.1-23, 2014.

ALKEMA, L.; KANTOROVA; V., MENOZZI, C.; BIDDLECOM, A. National, regional, and global rates and trends in contraceptive prevalence and unmet need for family planning between 1990 and 2015: a systematic and comprehensive analysis. **The Lancet**, v. 381, p.1642-1652, 2013.

AL-SAFI, Z. A.; SANTORO, N. Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 905-915, 2014.

ANAGNOSTIS, P.; STEVENSON, J. C.; CROOK, D.; JOHNSTON, D. G.; GODSLAND, I. F. Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions. **Maturitas**, v. 81, p. 62-68, 2015.

ARJUMAN, A.; PANDEY, H.; CHANDRA, N. C. Effect of a combination oral contraceptive (desogestrel+ethinyl estradiol) on the expression of low-density lipoprotein receptor and its transcription factor (SREBP2) in placental trophoblast cells. **Contraception**, v. 84, n. 2, p. 160-168, 2011.

ASARE, G. A.; SANTA, S.; NGALA, R. A.; ASIEDU, B.; AFRIYIE, D.; AMOAH, A. G. Effect of hormonal contraceptives on lipid profile and the risk indices for cardiovascular disease in a Ghanaian community. **International Journal of Women's Health**, v. 6, p. 597-603, 2014.

AWAN, Z.; DUBUC, G.; FARAJ, M.; DUFOUR, R.; SEIDAH, N. G.; DAVIGNON, J.; LHORET, R. R.; BAASS, A. The effect of insulin on circulating PCSK9 in postmenopausal obese women. **Clinical Biochemistry**, Montreal, QC, Canada, v. 47, p. 1033-1039, 2014.

BAASS, A.; DUBUC, G.; TREMBLAY, M.; DELVIN, E. E.; O'LOUGHLIN, J.; LEVY, E.; DAVIGNON, J.; LAMBERT, M. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 1637-1645, 2009.

BABER, R. J; PANAY, N.; FENTON, A. 2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy. **Climacteric**, v. 19, p.109-150, 2016.

- BASTIEN, M.; POIRIER, P.; LEMIEUX, I.; DESPRÉS, J. P. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. **Progress in Cardiovascular Diseases**. v. 56, n. 4, p. 369-381, 2014.
- BAYRAK, A.; ALDEMIR, D. A.; BAYRAK, T.; CORAKCI, A.; DURSUN, P. The effect of hormone replacement therapy on the levels of sérum lipids, apolipoprotein AI, apolipoprotein B and lipoprotein (a) in Turkish postmenopausal women. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 274, p. 289-296, 2006.
- BUUREN, F.; HORSTKOTTE, D.; KNABBE, C.; HINSE, D.; MELLWIG, K. P. Incidence of elevated lipoprotein (a) levels in a large cohort of patients with cardiovascular disease. **Clinical Research in Cardiology**, v.12, p. 55–59, 2017.
- CARRERAS, E. T.; POLK, D. M. Dyslipidemia: Current Therapies and Guidelines For Treatment. **US Cardiology Review**, Boston, v. 11, n. 1, p. 10-15, 2017.
- CAUCI, S.; BULIGAN, C.; MARANGONE, M.; FRANCESCATO, M. P. Oxidative stress in female athletes using combined oral contraceptives. **Sports Medicine-Open**, Italy, v. 2 n. 40, p. 1-9, 2016.
- CHEN, J. T; KOTANI, K. Oral contraceptive therapy increases oxidative stress in premenopausal women. **International Journal of Preventive Medicine**. v. 3, p. 893-896, 2012.
- COHEN, J. C. E.; BOERWINKLE, T. H.; MOSLEY, J. R; HOBBS, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 1264-1272, 2006.
- CUI, Q.; JU, X, YANG, T.; ZHANG, M.; TANG, W.; CHEN, Q.; HU, Y.; HAAS, J. V.; TROUTT, J. S.; PICKHARD, R. T.; DARLING, R.; KONRAD, R. J. ZHOU, H.; CAO, G. Serum PCSK9 is associated with multiple metabolic factors in a large Han Chinese population. **Atherosclerosis**, Nanjing, China, v. 213, p. 632-636, 2010.
- CUI, C. J.; LI, S.; LI, J-J. PCSK9 and its modulation. **Clinica Chimica Acta**, v. 440 p. 79-86, Beijing, China, 2015.
- DE GROOTE, D.; PERRIER D'HAUTERIVE, S.; PINTIAUX, A.; BALTEAU, B.; GERDAY, C.; CLAESEN, J.; Effects of oral contraception with ethinylestradiol and drospirenone on oxidative stress in women 18–35 years old. **Contraception**. v. 80, n. 2, p. 187-193, 2009.
- DILSHAD, H.; ISMAIL, R.; NAVEED, S.; USMANGHANI, K.; ALAM, M. T.; SARWAR, G. Effect of hormonal contraceptives on serum lipids: a prospective study. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 1379-1382, 2016.
- DOSHI, S. B.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress in menopause. **Journal of Mid-life Health**, v. 4, n. 3, p. 140-146, 2013.
- DOTAN Y.; LICHTENBERG D.; PINCHUK I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 200-27, 2004.
- DUARTE, R. C. F.; CAMPOS, F. M. F.; FILHO, O. A. M.; ALVES, M. T.; FERNANDES, A. P.; BORGES, K. B. G. DUSSE, L. M. S.; FARIA, M. C.;

GONÇALVES, G. S.; BOSCO, A. A.; SANDRIM, V. C.; CARVALHO, M. G. Effect of acetylsalicylic acid on platelet activation and oxidative profile in a set of Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 26, p. 123-130, 2015.

EL KHOUDARY, S. R.; WILDMAN, R. P.; MATTHEWS, K.; THURSTON, R. C.; BROMBERGER, J. T.; SUTTON-TRRELL, K. Endogenous sex hormones impact the progression of subclinical atherosclerosis in women during the menopausal transition. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 1, p. 180-186, 2012.

EPSTEIN, R. J. Hormonal contraception and cervical cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 1915, 2003.

FAN, J.; CHALLAH, M.; SHIMOYAMADA, H.; SHIOMI, M.; MARCOVINA, S.; WATANABE, T. Defects of the LDL receptor in WHHL transgenic rabbits lead to a marked accumulation of plasma lipoprotein[a]. **Journal of Lipid Research**, v. 41, n. 6, p. 1004–1012, 2010.

FENTON, C.; WELLINGTON, K.; MOEN, M. D.; ROBINSON, D. M. Drospirenone/ethinylestradiol 3mg/20microg (24/4 day regimen): a review of its use in contraception, premenstrual dysphoric disorder and moderate acne vulgaris. **Drugs**, v. 67, p. 1749-1765, 2007.

FERDINAND, K.C., NASSER, S.A. PCSK9 inhibition: discovery, current evidence, and potential effects on LDL-C and Lp[a]. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 29, p. 295-308, 2015.

FERREIRA, J. R. D.; ALELUIA, M. M.; FIGUEREDO, C. V. B.; VIEIRA, L. C. L.; SANTIAGO, R. P.; GUARDA, C. C.; BARBOSA, C. G.; OLIVEIRA, R. R.; ADORNO, E. V.; GONÇALVES, M. S. Evaluation of Cardiometabolic Parameters among Obese Women Using Oral Contraceptives. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 256, p. 1-8, 2017.

FILIPPATOS, T. D.; LIBEROPOULOS, E.; GEORGOULA, M.; TELLIS, C. C.; TSELEPIS, A. D.; ELISAF, M. Effects of increased body weight and short-term weight loss on serum PCSK9 levels – a prospective pilot study. **Archives of Medical Science - Atherosclerotic Diseases**, v. 2, p. 46-51, 2017.

FINCO, A.; BELCARO, G.; CESARONE, M. R. Evaluation of oxidative stress after treatment with low estrogen contraceptive either alone or associated with specific antioxidant therapy. **Contraception**, v. 85, p. 503-508, 2012.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-552, 1972.

GAIRARD, B.; GULDENFELS, C.; HAEHNEL, P., MATHELIN, C. Breast density: a major parameter to follow during hormone replacement therapy. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 37, n. 7, p. 657-660, 2009.

GASPARD, U.; ENDRIKAT, J.; DESAGER, J. P.; BUICU, C.; GERLINGER, C.; HEITHECKER, R. A randomized study on the influence of oral contraceptives containing ethinylestradiol combined with drospirenone or desogestrel on lipid and

lipoprotein metabolism over a period of 13 cycles. **Contraception**. v. 69, p. 271-278, 2004.

GHOSH, M.; GÄLMAN, C.; RUDLING, M., ANGELIN, B. Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol. **Journal of Lipid Research**, Stockholm, Sweden, v. 56, n. 2, p. 463-469, 2015.

GILBERT, J. S.; RYAN, M. J.; LAMARCA, B. B.; SEDEEK, M.; MURPHY, S. R.; GRANGER, J. P. Pathophysiology of Hypertension during Preeclampsia: Linking Placental Ischemia with Endothelial Dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Mississippi, v. 294, n. 2, p. 541-550, 2008.

GIRIBELA, C. R. G.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; NISENBAUM, M. G.; DE MORAES, T. L.; GIRIBELA, A. H. G.; BARACAT, E. C.; DE MELO, N. R. Effects of a combined oral contraceptive containing 20 mcg of ethinylestradiol and 3 mg of drospirenone on the blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone system, insulin resistance, and androgenic profile of healthy young women. **Gynecological Endocrinology** v. 31, n. 11, p. 912-915, 2015.

GÓMEZ-ZUBELDIA, M. A.; ARBUÈS, J. J.; HINCHADO, G.; NOGALES, A. G.; MILLÀN, J. C. Influence of estrogen replacement therapy on plasma lipid peroxidation. **Menopause**. v. 8, n. 4, p. 274-280, 2001.

GREGORIOU, O.; CHRISTODOULAKOS, G.; SIRISTATIDIS, C.; CONIDARIS, S.; KOUSKOUNI, E.; CREATSAS, G. Continuous combined replacement therapy in postmenopausal women: effect on plasma lipoproteins, bone mass and the endometrium. **Hormones**, Atenas-Grécia, v. 1, n. 4, p. 239-244, 2002.

GREENOW, K.; PEARCE, N. J.; RAMJI, D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, p. 329-342, 2005.

GUO, Y. L.; ZHANG, W.; LI, J. J. PCSK9 and lipid lowering drugs. **Clinica Chimica Acta**, v. 437, p. 66-71, 2014.

GUO, W.; FU, J.; CHEN, X.; GAO, B.; FU, Z.; FAN, H.; CUI, Q.; ZHU, X.; ZHAO, Y. YANG, T.; FANE, D.; ZHOU, H. The Effects of Estrogen on Serum Level and Hepatocyte Expression of PCSK9. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 64, p. 554-560, 2015.

GUPTA, S.; AZIZ, N.; SEKHON, L.; AGARWAL, R.; MANSOUR, G.; LI, J.; AGARWAL, A. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 64, n.11, p. 750-759, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70 n. 5, p. 257-265, 2012.

HANNAFORD, P. C.; KAY, C. R.; VESSEY, M. P.; PAINTER, R.; MANT, J. Combined oral contraceptives and liver disease. **Contraception**. v. 55, p. 145-151, 1997.

HARLOW, S. D.; GASS, M.; HALL, J. E.; LOBO, R.; MAKI, P.; REBAR, R. W.; SHERMAN, S.; SLUSS, P. M.; VILLIERS, T. G. Executive summary of the Stages of

Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Menopause**, v. 19, n. 4, p. 387-395, 2012.

HARVEY, R. E.; COFFMAN, K. E.; MILLER, V. M. Women-specific factors to consider in risk, diagnosis and treatment of cardiovascular disease. **Womens Health (Lond Engl)**. v. 11, n. 2, p. 239-257, 2015.

HASEGAWA, S.; MATSUI, T.; HANE, Y.; ABE, J.; HATAHIRA, H.; MOTOOKA, Y.; SASAOKA, S.; FUKUDA, A.; NAGANUMA, M.; HIRADE, K.; TAKAHASHI, Y.; KINOSADA, Y.; NAKAMURA, M. Thromboembolic adverse event study of combined estrogen-progestin preparations using Japanese Adverse Drug Event Report database. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1-20, 2017.

HECKBERT, S. R.; KAPLAN, R. C.; WEISS, N. S.; PSATY, B. M.; LIN, D.; FURBERG, C. D.; STARR, J. R.; ANDERSON, G. D.; LACROIX, A. Z. Risk of recurrent coronary events in relation to use and recent initiation of postmenopausal hormone therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, p. 1709-1713, 2001.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 271-280, 1995.

HOGAN, M. C.; FOREMAN, K. J.; NAGHAVI, M.; AHN, S. Y.; WANG, M.; MAKELA, S. M.; LOPEZ, A. D.; LOZANO, R.; MURRAY, C. J. L. Maternal mortality for 181 countries, 1980–2008: a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 5. **The Lancet**. v. 375, n. 9726, p. 1609-1623, 2010.

HOOVER-PLOW, J.; HAUNG, M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. **Metabolism**. n. 62, p. 479-491, 2013.

JEENDUANG, N.; TRONGSAKUL, R.; INHONGSA, P.; CHAIDACH, P. The prevalence of metabolic syndrome in premenopausal and postmenopausal women in Southern Thailand. **Gynecological Endocrinology**, v. 30, n. 8, p. 573-576, 2014.

JOSSE, A. R.; GARCIA-BAILO, B.; FISCHER, K.; EL-SOHEMY, A. Novel effects of hormonal contraceptive use on the plasma proteome. **PLoS One**, v. 7, n. 9, 2012.

KATO, R.; MORI, C.; KITAZATO, K.; OBAMA, T.; MORI, M.; TAKAHASHI, K.; AIUCHI, T.; TAKANO, T.; ITABE, H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, p. 35-39, 2009.

KHALIL, R. A. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. **Biochemical Pharmacology**; v. 86, p. 1627-1642, 2013.

KI, E. Y.; HUR, S. Y.; PARK, J. S.; HAN, K. D.; PARK, Y. G. Differences in the lipid profile and hormone replacement therapy use in Korean postmenopausal women: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2010-2012. **Gynecologic Endocrinology and Reproductive Medicine**, v. 294, p. 165-173, 2016.

KIKA G.; IZUMI, S.; MORI, A.; MURANO, T.; SUZUKI, T.; CAI, L. Y. Beneficial aspects of oral estradiol as hormone replacement therapy: consideration on bone

and lipid metabolism. **The Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v. 34, p. 92-98, 2009.

KOENIG, G.; SENEFF, S. Gamma-glutamyltransferase: a predictive biomarker of cellular antioxidant inadequacy and disease risk. **Disease Markers**. v. 2015, n. 818570, p. 1-18, 2015.

KOSENKO, T.; GOLDBER, M., LEBLOND, G., WENG, W., LAGACE, T. A. Low density protein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in human plasma and inhibits PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 288, p. 8279-8288, 2013.

KOWALSKA, K.; ŚCISKALSKA, M.; BIZOŃ, A.; ŚLIWIŃSKA-MOSSOŃ, M.; MILNEROWICZ, H. Influence of oral contraceptives on lipid profile and paraoxonase and commonly hepatic enzymes activities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. p. 1-7, 2017.

KUMAR, S.; LATA, K.; MUKHOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, T. K. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: A perspective. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, p. 1127-1135, 2010.

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

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

LEREN, T. P. Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. **Atherosclerosis**. v. 237, n. 1, p. 76-81, 2014.

LEVY, E.; BEN, D. O. A; SPAHIS, S.; SANE, A. T.; GAROFALO, C.; GRENIER, E.; EMONNOT, L.; YARA, S.; COUTURE, P.; BEAULIEU, J. F.; MENARD, D.; Seidah, N. G.; ELCHEBLY, M. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. **Atherosclerosis**, v. 227, p. 297-306, 2013.

LI, S.; GUO, Y. L.; XU, R. X.; ZHANG, Y., ZHU, C. G.; SUN, J.; QING, P.; WU, N. Q.; JIANG, L. X.; LI, J. J. Association of plasma PCSK9 levels with white blood cell count and its subsets in patients with stable coronary artery disease. **Atherosclerosis**. v. 234, n. 2, p. 441- 445, 2014.

LI, S.; LI, J. J. PCSK9: A key factor modulating atherosclerosis. **Journal Atherosclerosis Thrombosis**, v. 22, n. 3, p. 221-230, 2015

LIDEGAARD, Ø; LØKKEGAARD, E.; JENSEN, A.; SKOVLUND C. W.; KEIDING, N. Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception, **New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 2257-2266, 2012.

LIMA, R.; WOFFORD, M.; RECKELHOFF, J. F. Hypertension in Postmenopausal Women. **Current Hypertension Reports**, v. 14, n. 3 p. 254-260, 2012.

LUOTO, R. Hot flushes and quality of life during menopause. **BMC Womens Health**, v. 9, n. 13, 2009.

MAKI, P.M.; HENDERSON, V. W. Hormone therapy, dementia, and cognition: the Women's Health Initiative 10 years on. **Climacteric**, v. 15, p. 256-262, 2012.

MANSSON, M.; KALIES, I.; BERGSTRÖM, G.; SCHMIDT, C.; LEGNEHED, A.; HULTÉN, L. M.; AMROT-FORS, L.; GUSTAFSSON, D.; KNECHT, W. Lp(a) is not associated with diabetes but affects fibrinolysis and clot structure ex vivo. **Scientific reports**. v. 4, n. 5318, p. 1-7, 2014.

MARANHÃO, R. C.; CARVALHO, P. O.; STRUNZ, C. C.; PILEGGI, F. Lipoproteína (a): Estrutura, Metabolismo, Fisiopatologia e Implicações Clínicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 103, n. 1, p. 76-84, 2014.

MARTINELLI, I.; MAIANO, A; ABBATTISTA, M.; BUCCIARELLI, P.; PASSAMONTI, S. M.; ARTONI, A.; GIANNIELLO, F.; PEYVANDI, F. Duration of oral contraceptive use and the risk of venous thromboembolism. A case-control study. **Thrombosis Research**, v. 141, p. 153-157, 2016.

MASSY, A. Z.; STENVINKEL, P.; DRUEKE, T. B. The role oxidative stress in chronic kidney disease. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 4, p. 405-408, 2009.

MC KENNEY, 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 of the American College of Cardiology**, v. 59 p. 2344-2353, 2012.

MEDINA, L. O.; VELOSO, C. A; ISONI, C. A.; CALSOLARI, M. R.; CHAVES, M. M. Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, p. 193-197, 2007.

MOSCA, L. The role of hormone replacement therapy in the prevention of postmenopausal heart disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, p. 2263-2272, 2000.

NAFAR, M.; SAHRAEI, Z.; SALAMZADEH, J.; SAMAVAT, S.; VAZIRI, N. D. Oxidative Stress in Kidney Transplantation – Causes, Consequences and Potential Treatment. **Iranian Journal of Kidney Disease**, v. 5, p. 357-372, 2011.

NERBRAND, C.; LIDFELDT, J.; NYBERG, P.; SCHERSTEN, B.; SAMSIOE, G. Serum lipids and lipoproteins in relation to endogenous and exogenous female sex steroids and age. The Women's Health in the Lund Area (WHILA) study. **Maturitas**, v. 48, p. 161-169, 2004.

NORDESTGAARD, B. G. CHAPMAN, M. J.; RAY, K.; BORÉN, J.; ANDREOTTI, F.; WATTS, G. F.; GINSBERG, H.; AMARENCO, P.; CATAPANO, A.; DESCAMPS, O. S.; FISHER, E.; KOVANEN, P. T.; KUIVENHOVEN, J. A.; LESNIK, P.; MASANA, L.; REINER, Z.; TASKINEN, M. R.; TOKGÖZOGLU, L.; TYBJÆRG-HANSEN, A. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. **European Heart Journal**, v. 31, p. 2844-2853, 2010.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 20, p. 194-205, 2008.

PAGE, M. M.; WATTS, G. F. PCSK9 inhibitors – mechanisms of action. **Australian Prescriber**, Austrália, v. 39, n. 5, p. 164-167, 2016.

PETTO J.; VASQUES, L.M. R.; PINHEIRO, R. L.; GIESTA, B. A.; DOS SANTOS, A. C. N.; NETO, M. G.; LADEIA, A. M. T. Comparison of postprandial lipemia between women who are on oral contraceptive methods and those who are not. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 103, n. 3, p. 245-250, 2014.

PINCEMAIL, J.; VANBELLE, S.; GASPARD, U.; COLLETTE, G.; HALENG, J.; CHERAMY-BIEN, J. P. Effect of different contraceptive methods on the oxidative stress status in women aged 40–48 years from the ELAN study in the province of Liege, Belgium. **Human Reproduction**. v. 22, n. 8, p. 2335-2343, 2007.

PREYER, O.; JOHANSEN, D.; HOLLY, J.; STOCKS, T.; POMPELLA, A.; NAGEL G.; CONCIN, H.; ULMER, H.; CONCIN, N. γ -glutamyltransferase and breast cancer risk beyond alcohol consumption and other life style factors a pooled cohort analysis. **PLoS ONE**. v. 11, n. 2, p. 1-11, 2016.

PU, D.; TAN, R.; YU, Q.; WU, J. Metabolic syndrome in menopause and associated factors: a meta-analysis. **Climacteric**, v. 20, n. 6, p. 583-591, 2017.

RAAL, F. J., GIUGLIANO, R. P., SABATINE, M. S.; KOREN, M. J.; LANGSLET, G.; BAYS, H.; BLOM, D.; ERIKSSON, M.; DENT, R.; SCOTT, M.; WASSERMAN, S. M. Reduction in lipoprotein(a) with PCSK9 monoclonal antibody evolocumab (AMG 145): a pooled analysis of more than 1,300 patients in 4 phase II trials. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 13, p. 1278-1288, 2014.

RAAL, F. J., GIUGLIANO, R. P., SABATINE, M. S.; KOREN, M. J.; BLOM, D.; SEIDAH, N. G.; HONARPOUR, N.; LIRA, A.; XUE, A.; CHIRUVOLU, P.; JACKSON, S.; DI, M.; PEACH, M.; SOMARATNE, R.; WASSERMAN, S. M.; SCOTT, R.; STEIN, E. A. PCSK9 inhibition-mediated reduction in Lp(a) with evolocumab: an analysis of 10 clinical trials and the LDL receptor's role. **Journal of Lipid Research**, v. 57, p. 1086-1096, 2016.

RAO, P. M.; KELLY, D. M.; JONES, T. H. Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 8, p. 479-493, 2013.

RIBEIRO, C. C. M.; SHIMO, A. K. K.; LOPES, M. H. B. M.; LAMAS, J. L. T. Effects of different hormonal contraceptives in women's blood pressure values. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 71, n. 3, p. 1453-1459, 2017.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; BRADWIN, G.; ROSE, L. Plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels and the risk of first cardiovascular events. **European Heart Journal**, v. 37, p. 554-560, 2016.

ROACH, R. E; HELMERHORST, F. M; LIJFERING, W. M.; STIJNEN, T.; ALGRA, A.; DEKKERS, O. M. Combined oral contraceptives: the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2015.

ROMAGNUOLO, R.; SCIPIONE, C. A.; BOFFA, M. B.; MARCOVINA, S. M.; SEIDAH, N. G.; KOSCHINSKY, M. L. Lipoprotein(a) Catabolism Is Regulated by Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 through the Low Density Lipoprotein

Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, Ontario, Canada, v. 290, n. 18, p. 11649-11662, 2015.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; ZACARÍAS-FLORES, M.; ARRONTE-ROSALES, A.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. Menopause as a risk factor for oxidative stress. **Menopause**, Mexico, v. 19, p. 361-367, 2012.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; ZACARÍAS-FLORES, M.; CASTREJÓN-DELGADO, L.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A. K.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. Effects of Hormone Therapy on Oxidative Stress in Postmenopausal Women with Metabolic Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, Mexico, v. 17, n. 1388, p. 1-15, 2016.

SCHLUTER, K. D.; WOLF, A.; WEBER, M.; SCHRECKENBERG, R.; SCHULZ, R. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way, **Basic Research in Cardiology**, v. 112, n. 63, p. 1-11, 2017.

SCHULZ, R.; SCHLUTER, K-D.; LAUFS, U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). **Basic Research in Cardiology**, Giessen, Alemanha, v. 110, n. 4, p. 1-19, 2015.

SCHULZ, R.; SCHLUTER, K-D. PCSK9 targets important for lipid metabolism. **Clinical Research in Cardiology Supplements**, Giessen, Alemanha, 2017.

SEIDAH, N. G. BENJANNET, S.; WICKHAM, L.; MARCINKIEWICZ, J.; JASMIN, S. B.; STIFANI, S.; BASAK, A.; PRAT, A.; CHRETIEN, M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Canadá, v. 100, n. 3, p. 928-933, 2003.

SIFA, M. J. M.; LEPIRA, F. B.; LONGO, A. L.; SUMAILI, E. K.; MAKULO, J. R.; MBELAMBELA, E. P.; TONZIN, R.; NGATU, N. R.; SUGANUMA, N. Prevalence and predictors of metabolic syndrome among Congolese pre- and postmenopausal women. **Climacteric**, v. 17, n. 4, p. 442-448, 2014

SITRUK-WARE, R. Progestins and cardiovascular risk markers. **Steroids**, v. 65, p. 651-658, 2000.

SITRUK-WARE, R.; NATH, A. Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 27, p. 13-24, 2013.

SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, Austrália, v. 17, p. 311-321, 2012.

SPANEVELLO, R. M.; MAZZANTI, C. M.; BAGATINI, M.; CORREA, M.; SCMATZ, R.; STEFANELLO, N. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 1, p. 24-30, 2010.

STEIN, E. A.; RAAL, F. Future Directions to Establish Lipoprotein(a) as a Treatment for Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, New York, v. 30, p. 101-108, 2016.

STEPHENS, J. W.; KHANOLKAR, M. P.; BAIN, S. C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 202, p. 321-329, 2009.

STEVENSON, J. C.; CROOK, D.; GODSLAND, I. F. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. **Atherosclerosis**, v. 98, p. 83-90, 1993.

SUBBIAH, M. T.; KESSEL, B.; AGRAWAL, M.; RAJAN, R.; ABPLANALP, W.; RYMASZEWSKI, Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. **Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, p. 1095-1097, 1993.

SUGIURA, K.; KOBAYASHI, T.; OJIMA, T. Risks of thromboembolism associated with hormonal contraceptives related to body mass index and aging in Japanese women. **Thrombosis Research**, 2015.

SUN L. P.; SEEMANN, J.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN M. S. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, n. 16, p. 6519-6526, 2007.

TANEEPANICHSKUL S.; PHUPONG, V. Influence of a new oral contraceptive with drospirenone on lipid metabolism. **Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol**. v. 23, p. 347-350, 2007.

TAVORI, H.; FAN, D.; BLAKEMORE, J. L.; YANCEY, P. G.; DING, L.; LINTON, M, F.; FAZIO, S. Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation. **Circulation**, v. 127, p. 2403-2413, 2013.

TAVORI, H.; RASHID, S.; FAZIO, S. On the function and homeostasis of PCSK9: reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. **Atherosclerosis**, v. 238, p. 264-270, 2015.

TAVORI, H.; CHRISTIAN, D.; MINNIER, J.; PLUBELL, D.; SHAPIRO, M.D.; YEANG, C.; GIUNZIONI, I.; CROYAL, M.; DUELL, P. B.; LAMBERT, G.; TSIMIKAS, S.; FAZIO, S. PCSK9 association with lipoprotein(a). **Circulation Research**, v. 119, p. 29-35, 2016.

TÓTH, S.; FEDACKO, J.; PEKÁROVA, T.; HERTELYOVÁ, Z.; KATZ, M.; MUGHEES, A.; KUZMA, J.; STEFANIC, P. KOPOLOVETS, I.; PELLA, D. Elevated Circulating PCSK9 Concentrations Predict Subclinical Atherosclerotic Changes in Low Risk Obese and Non-Obese Patients. **Cardiology and Therapy** v. 6, p. 281-289, 2017.

TRUSSELL, J. Contraceptive failure in the United States. **Contraception** v. 83, n. 5, p. 397-404, 2011.

URBAN, D.; PÖSS, 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. Alemanha, v. 62, n. 16, p. 1401-1408, 2013.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIOLI, F.; PIGNATELLI, P. Platelet oxidative stress and thrombosis. **Thrombosis research**, v. 129, p. 378-381, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Reproductive Health and Research and John Hopkins Bloomberg School of Public Health. Family planning: a global handbook for providers. Baltimore; Geneva: CCP; WHO; 2008.

WOUTERS, K.; SHIRI-SVERDLOV, R.; VAN GORP, P. J.; VAN BILSEN, M.; HOFKER, M. H. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and Ildr mice. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, n. 5, p. 470-479, 2005

YANG, S. H.; LI, S.; ZHANG, Y.; XU, R. X.; ZHU, C. G.; GUO, Y. L.; WU, N. Q.; QING, P.; GAO, Y.; CUI, C. J.; DONG, Q.; SUN, J.; LI, J. J. Analysis of the association between plasma PCSK9 and Lp(a) in Han Chinese. **Journal of Endocrinological Investigation**, Beijing, China, 2016.

YEDJOU, C.; CAMERON, J.; MBEMI, A.; TCHOUNWOU, P. Beta-estradiol induces cytotoxic effects to human T-lymphoma (Jurkat) cells through oxidative stress. **Journal of the Mississippi Academy of Sciences**. v. 60, n. 1, p. 279-283, 2015.

ZUÑIGA, O. A. R.; TENOA, C. C.; HAROA, C.; NAVARROA, G. M. Q.; MARTOS, F. C.; MARTINEZ, P. P.; RIOS, A. G.; GARAULETD, M.; SEMPERE, M. T.; MIRANDA, J. L.; JIMENEZ, F. P.; CAMARGO, A. Differential menopause- versus aging-induced changes in oxidative stress and circadian rhythm gene markers. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 164, p. 41-48, 2017.

11. Elementos pós-textuais

11.1 ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



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

Projeto: CAAE – 42589815.0.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de abril de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação dos níveis de lipoproteína (a) e sua correlação com o sistema fibrinolítico em mulheres jovens e na pós-menopausa**" 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. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

11.2 APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

Email: _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROJETO: “AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOPROTEÍNA (a) E SUA CORRELAÇÃO COM O SISTEMA FIBRINOLÍTICO EM MULHERES JOVENS E PÓS-MENOPAUSA.”

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. Caso haja o entendimento da natureza da pesquisa e os riscos de sua participação é imprescindível o seu consentimento livre e esclarecido por escrito. Sua decisão em participar é totalmente voluntária. O presente estudo tem como objetivo determinar e analisar parâmetros bioquímicos e hemostáticos do sangue. 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 laboratório de hematologia ou de bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG. Nesta amostra de sangue serão analisados marcadores que possam influenciar no desenvolvimento das doenças cardiocirculatórias. 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 a punção venosa, a paciente irá responder 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, deve-se comunicar prontamente a equipe do laboratório de hematologia ou de bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG. A classificação do risco da pesquisa é mínima.

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 a sua amostra de sangue e não acesse mais informações sobre o seu registro.

Para informações adicionais:

O termo será assinado em duas vias e uma das vias ficará em posse do voluntário.

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)3499-6897.

Coordenadora do Projeto, Professora de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Danielle Basques Serenini - telefone (31)86065363.

Aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

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

III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

11.3. APÊNDICE B – Ficha clínica da participante

PROJETO DE PESQUISA “**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOPROTEÍNA (a) E SUA CORRELAÇÃO COM O SISTEMA FIBRINOLÍTICO EM MULHERES JOVENS E PÓS-MENOPAUSA**”.

I – IDENTIFICAÇÃO:

1. Nome: _____
2. Data de nascimento: ____/____/____ (estudo aplicado a mulheres adultas)
3. Endereço: _____
4. Telefone: _____ 5. CEP: _____
Email _____
5. Data da entrevista pelo pesquisador: ____/____/____
6. Código de identificação nas amostras _____
() Jovem ou () Menopausada
() + / Utiliza hormônio ou () - / Não utiliza hormônio
____ 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 de mulheres de 18 a 30 anos:
Utiliza contraceptivo oral? (). Sim () Não.
Se a resposta for afirmativa, qual medicamento usa? _____
A quanto tempo utiliza contraceptivo oral? _____
3. Se participante do grupo de mulheres de 50 a 60 anos:
A quanto tempo esta no período pós-menopausa? _____
Faz terapia de reposição hormonal? () Sim () Não.
Se a resposta for afirmativa, qual medicamento usa? _____
A 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)
() Doença inflamatória aguda
() Doenças tireoidianas
5. Apresenta alguma doença diferente das citadas? Qual? _____
6. É fumante? () Sim () Não

7. É etilista crônico? () Sim () Não
8. Peso_____ Altura_____
9. Utiliza algum dos medicamentos citados abaixo? Qual (is)?
- () Antiagregante plaquetário
- () Anticoagulante
10. Utiliza outro medicamento de forma contínua? () Sim () Não
- Qual (is)? _____
11. Pratica exercícios físicos, pelo menos 3vezes por semana por 30 minutos? () Sim () Não
- Não
- Qual? _____

11.4 Certificado de apresentação



51^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial

3^o Congresso Brasileiro de Informática Laboratorial

A Medicina Laboratorial na assistência à saúde
26 a 29 de setembro de 2017
Palácio das Convenções do Anhembi Parque
São Paulo • SP

certificado de participação

ALINE DA PAZ FERNANDES

participou

na qualidade de autor responsável do tema livre "**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE PCSK9 E DO PERFIL LIPÍDICO EM MULHERES MENOPAUSADAS EM USO OU NÃO DE TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL**", tendo como co-autores "SERENINI, D. B., FERREIRA, C. N., MOTA, A. P. L., SILVA, I. F. O.".


Gustavo Campana
Presidente do 51^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


Carlos Eduardo Ferreira
Coordenador de Curso/Congresso do 51^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial


César Alex de Oliveira Galoro
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial - Setembro 2016/2017

Realização:  **SBPC · ML**
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial

 **AMB**
Associação Médica Brasileira

Scanned by CamScanner