

INIBIDORES DE PCSK9: IMPACTOS NO CONTROLE DO LDL E POTENCIAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS EMERGENTES

Andreia Alves Lopes de Farias;
Dinorah Barbosa Rodrigues Abdemun;
Gabriel Chehab de Carvalho Melo;
Jorge Alexandre de Araujo Peres;
Lorena Andrade Matheus;
Nayara Pravato Maziero;
Sandra Coelho Madeira Santos;
Williamkley Araújo dos Santos;
Robert Fernando Paladines Jiménez;
Murilo Mallon

Resumo A proproteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) é uma enzima hepática essencial na regulação dos níveis plasmáticos de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Ao promover a degradação dos receptores de LDL (LDL-R) nos hepatócitos, a PCSK9 reduz a depuração do LDL-C circulante. Os inibidores de PCSK9, como os anticorpos monoclonais evolocumabe e alirocumabe, bloqueiam essa interação, preservando os LDL-R e promovendo a redução acentuada do LDL-C, com benefícios clínicos comprovados na prevenção de eventos cardiovasculares. Além das dislipidemias, novas evidências sugerem que a PCSK9 está envolvida em outros processos fisiopatológicos, ampliando seu potencial terapêutico. Na oncologia, estudos indicam que a PCSK9 pode modular o microambiente tumoral, afetando a apresentação de antígenos e a resposta imune antitumoral. Sua inibição pode favorecer a eficácia de terapias imunológicas, representando uma nova estratégia adjuvante no tratamento de alguns tipos de câncer. Em doenças infecciosas, como sepse e infecções virais, a PCSK9 também tem papel relevante. Ela influencia a expressão de receptores envolvidos na depuração de lipopolissacarídeos (LPS) e outras moléculas pró-inflamatórias, podendo impactar a resposta inflamatória sistêmica e a gravidade do quadro séptico. Em infecções virais, há indícios de que a PCSK9 modula a expressão de receptores de entrada viral, como o LDL-R, que alguns vírus utilizam para invadir células hospedeiras. Tais achados abrem perspectivas para o uso de inibidores de PCSK9 além da cardiologia, especialmente em contextos inflamatórios, infecciosos e oncológicos. A via subcutânea de administração e o perfil de segurança favorável contribuem para sua aplicabilidade clínica. Embora o custo ainda represente um desafio, o contínuo avanço nas pesquisas pode consolidar o papel da PCSK9 como alvo terapêutico multifuncional.

Palavras-chave: Proproteína Convertase Subtilisina/quexina Tipo 9. Inibidores de PCSK9. Hipercolesterolemia. Neoplasias. Sepses

1. INTRODUÇÃO

A primeira conexão entre colesterol e doença cardíaca foi relatada em 1913, em São Petersburgo, por Nikolai Nikolajewitsch Anitschkow com base em sua observação seminal do desenvolvimento acelerado da aterosclerose na íntima arterial de coelhos alimentados com uma dieta rica em colesterol¹. Estudos epidemiológicos importantes – e a similaridade da aterosclerose com a patologia humana da doença cardíaca – impulsionaram uma busca de 60 anos por agentes redutores de colesterol². Em 1973, Endo et al³ examinaram 3.800 cepas fúngicas para descobrir um potente inibidor reversível da β -hidroxil β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, a mevastatina – também chamada de compactina³.

Em 1987, foi desenvolvido um composto quimicamente relacionado, a lovastatina (Mevacor), que se tornou a primeira estatina a chegar aos pacientes⁴. Isso foi seguido por uma melhoria sucessiva na potência e especificidade das estatinas: Zocor (sinvastatina), Lipitor (atorvastatina) e Crestor (rosuvastatina), que causou uma redução de 25% a 50% do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDLc)⁵.

Até 2003, a principal função relatada das estatinas era diminuir os níveis de LDLc, modulando a homeostase do colesterol no fígado. Mecanicamente, ao reduzir a síntese de colesterol, o tratamento com estatinas resulta na ativação da proteína de ligação ao elemento

regulador de esteroide SREBP-2, no retículo endoplasmático (RE), assim que seu domínio N-terminal atinge o núcleo e aumenta a síntese do receptor de LDL (LDLR), após sua associação com elementos reguladores de esteroide (SREs) no promotor de LDLR^{6,7}. Isso, por sua vez, ativa os genes biossintéticos do colesterol, levando a uma maior captação de LDLc da circulação. Esse mecanismo de feedback equilibra os níveis de colesterol celular e diminui a quantidade de LDLc circulante^{8,9}.

O nível de colesterol plasmático é influenciado não apenas por sua biossíntese de novo, mas também pela absorção do colesterol alimentar e pela remoção do colesterol do sangue. O bloqueio da absorção do colesterol alimentar pelo intestino, por meio da inibição da proteína Niemann-Pick C1-Like 1 nas células epiteliais do intestino delgado e hepatócitos, é a base do mecanismo de ação da ezetimiba, um medicamento descrito pela primeira vez por Schering-Plough¹⁰. Quando combinado com uma estatina, a ezetimiba reduz ainda mais o LDLc em 15% a 20% e melhora os resultados cardiovasculares^{11,12}.

2. FAMÍLIA DAS CONVERTASES DE PROTEÍNA

As proteínas secretoras sofrem várias modificações pós-traducionais (PTMs) antes de atingirem seus destinos intra/extracelulares, expandindo e diversificando assim suas funções¹³. A N- e O-glicosilação são modificações irreversíveis, que resultam em rearranjos estruturais que afetam muitas funções e destinos das proteínas secretoras^{14,15}. A fosforilação reversível em resíduos específicos de Ser, Thr e Tyr em proteínas secretoras é realizada por um número limitado de cinases secretoras, sendo a FAM20C a mais bem estudada para fosforilação de Ser/Thr^{16,17}. Uma das principais PTMs irreversíveis é a proteólise limitada de ligações peptídicas selecionadas, que depende da especificidade da(s) enzima(s) de processamento e da acessibilidade de ligações peptídicas cindíveis à protease de ataque^{18,19}.

O processamento inativo de proteínas precursoras, que ocorre frequentemente em resposta a um estímulo, resulta em uma resposta fisiológica rápida, incluindo, mas não se limitando a coagulação sanguínea, fibrinólise, produção hormonal ativa, fertilização, metamorfose e digestão. Enquanto algumas PTMs ocorrem após a proteína ser secretada, o processamento precursor dentro da via secretora desempenha um papel importante na ativação de várias proteínas secretoras, como hormônios polipeptídicos, fatores de crescimento, receptores, enzimas e glicoproteínas de superfície^{19,10}.

Desde a década de 1960, percebeu-se que hormônios polipeptídicos como insulina, melanotropinas (hormônio estimulante de α e β -melanotropina [MSH]) e β -endorfina são produzidos a partir de proteínas precursoras mais longas, principalmente inativas, por meio de clivagens sucessivas em aminoácidos básicos pareados (aa)²¹⁻²⁶. Esse conceito de proteólise limitada de pró-hormônios por proteases celulares foi posteriormente estendido a muitas proteínas secretoras e até mesmo a patógenos infecciosos, e demonstrou ocorrer em resíduos básicos simples e pareados dentro do motivo: (K/R)-Xn-(K/R)↓, ou mais comumente (K/R)-Xn-(R)↓, onde Xn são resíduos espaçadores compreendendo 0, 2, 4 ou 6 aa²⁷.

Passaram-se mais de 15 anos para identificar as enzimas de processamento cognatas que reconhecem esses motivos. Elas constituem uma família de 7 serina proteases básicas específicas de aa, as PCs, relacionadas à subtilisina/kexina (SK), e seus genes receberam principalmente o nome de PCSKs^{27,28}. Essencialmente, PC1 (gene PCSK1) e PC2 (gene PCSK2)/7B2 (7B2: chaperona de PC2) são as principais convertases responsáveis pela geração de hormônios bioativos regulados, armazenados em grânulos secretores de núcleo denso, como insulina; ACTH/ α -MSH/ β -endorfina, glucagon/GLP1,2; gastrina; encefalinas; TRH, entre outros²⁹.

Os outros membros são expressos ubiquamente – Furina ligada à membrana tipo I (gene Fur) e PC7 (gene PCSK7); amplamente expressos – PC5 (gene PCSK5); e PACE4 – gene PCSK6; ou sintetizados apenas em tecidos gonadais – PC4 (gene PCSK4). Todos os PCs são ativados após 1 ou 2 clivagens autocatalíticas, que removem seu prodomínio semelhante a uma chaperona N-terminal intramolecular, começando no ER (exceto PC2) e continuando na rede trans-Golgi (Furina), grânulos secretores imaturos (PC1 e PC2), na superfície celular (PC5, PACE4 e possivelmente PC4) ou em endossomos iniciais (PC7)²⁹.

Assim, nenhum PC básico específico de aa é ativo nos compartimentos ER ou Golgi inicial, pois permanecem associados de forma não covalente com seus respectivos prodomínios inibitórios, até que atinjam seus destinos, quando então as condições celulares (pH, cálcio, etc.) são adequadas para a remoção do prodomínio por clivagem autocatalítica adicional (PC1, PC2, Furin, PC5, PACE4) ou separação física (PC4, PC7). Embora a maioria das clivagens de PC resulte na ativação de proteínas precursoras ou na geração de novas funções, algumas clivagens

levam à inativação do substrato²⁹. Por exemplo, a N-caderina é ativada pela Furin, mas inativada pelo PC5, e a PCSK9 é inativada pela Furin^{29,30}.

Também foi considerado que o processamento de proteínas precursoras pode ocorrer por clivagem em resíduos não básicos, dentro da via secretora inicial. Exemplos típicos são as proteínas de ligação ao elemento regulador de esterol 1 e 2 (SREBP-1, 2) e as glicoproteínas de superfície dos vírus da febre hemorrágica do vírus Lassa ou do vírus da febre hemorrágica do Congo da Crimeia, que são ativados no Golgi cis/medial³¹⁻³³.

Usando oligonucleotídeos degenerados, hibridizando o sítio ativo que codifica o mRNA de convertases, e amplificação por reação em cadeia da polimerase, foi identificado, em 1999, o oitavo membro da família PCSK e nomeado isoenzima 1 de subtilisina-kexina (SKI-1). Esta enzima cliva o fator neurotrófico derivado do cérebro em **R-G-L T↓SL**, onde os resíduos em destaque são importantes para a clivagem por SKI-1³⁴. Este último revelou-se ser a mesma protease (protease do sítio 1; S1P) identificada em 1998 que ativa SREBP-1, -2 e, posteriormente, o fator de estresse do ER ATF6^{35,36}. Em todos os substratos subsequentes de SKI-1/S1P (gene MBPTS1), o motivo de clivagem de consenso geral foi encontrado como sendo **R-X-Alifático-Z↓**, onde X é qualquer resíduo exceto Pro e Cys, e Z é qualquer aa (melhor Leu) exceto Val, Pro, Cys ou Glu^{34,37-49}.

3. DESCOBERTA DO PCSK9

A PCSK9 pertence à família de proteinase K de subtilases, e seu domínio catalítico exibe 25% de identidade de sequência de proteína com a de seu membro mais próximo da família, SKI-1/S1P. O mRNA humano de PCSK9 abrange 3710 pb em 12 exons que codificam uma proteína 692-aa. A hibridização in situ e as análises de linhagens de tecido/células por Northern blots revelaram que o fígado e o intestino delgado são as principais fontes de síntese de PCSK9 no camundongo adulto, rato e humano. O mapeamento de PCSK9 no braço curto do cromossomo 1p32, por sua vez, revelou que ele estava próximo ao locus 1p34.1p32, identificado em grandes famílias francesas potencialmente codificando um terceiro gene para hipercolesterolemia familiar autossômica dominante (FH3), onde os genes LDLR e apolipoproteína B (APOB) foram excluídos⁵¹. Este locus foi associado ao aumento da secreção hepática de colesterol associado à lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), que após sua secreção é convertida em LDLc⁵²⁻⁵⁴.

A análise da biossíntese de PCSK9 em células que expressam ortólogos humanos, de rato ou de camundongo revelou que, como outras PCSKs, esta enzima também sofre processamento autocatalítico de seu prodomínio N-terminal no ER no sítio **VFA Q₁₅₂↓**, onde os resíduos em negrito itálico são críticos para o processamento⁵⁵⁻⁵⁷. Porém, a PCSK9 é a única PCSK que sempre permanece não covalentemente associada ao seu prodomínio, mesmo quando secretada⁵⁸. Isso foi confirmado em uma análise 3D da PCSK9 circulante secretada pelo fígado. Assim, a PCSK9 atua como protease apenas uma vez, durante seu processamento autocatalítico no RE, sugerindo que a PCSK9 secretada regula os níveis de LDLc por um mecanismo não enzimático e racionalizando a existência de variantes de ganho de função, incomuns para uma enzima⁵⁹⁻⁶¹.

4. PCSK9 E DEGRADAÇÃO DO LDLR

As primeiras pistas sobre o mecanismo de ação da PCSK9 surgiram em dois relatórios, publicados por Maxwell & Breslow^{62,63}, que demonstraram que a superexpressão da PCSK9 reduziu drasticamente os níveis de proteína, mas não de mRNA, do LDLR ao induzir sua degradação dentro da via endossomal/lisossomal ácida^{62,64}. Os mesmos autores haviam mostrado meses antes, por análise de microarray, que a PCSK9 era regulada negativamente pelo colesterol alimentar e positivamente por SREBP-1a e SREBP-2, fornecendo evidências de que a PCSK9 é um gene regulado pelo colesterol⁶⁵. Esta conclusão foi confirmada em um estudo semelhante pela capacidade das estatinas de aumentar a transcrição da PCSK9^{66,67}. Embora os níveis de mRNA de PCSK9 e LDLR tenham sido regulados positivamente pela ausência de tratamento com colesterol e estatina, a PCSK9 induziu a degradação da proteína LDLR⁶⁸. Isso esclarece o mecanismo por trás das mutações humanas que levam à hipercolesterolemia. Assim, o PCSK9 GOF resulta na degradação exacerbada do LDLR induzida por PCSK9^{52,69}.

Um suporte definitivo adicional para a função da PCSK9 veio com dois estudos de Cohen et al^{70,71}, que sequenciaram a PCSK9 em indivíduos com níveis muito baixos de colesterol, associando assim de forma inequívoca 2 variantes prevalentes de perda de função (LOF) heterozigotas Y142X e C679X em afro-americanos com reduções de cerca de 40% no

LDLc⁷⁰ e com uma incidência 88% menor de doença arterial coronariana (DAC) durante um período de acompanhamento de 15 anos⁷¹.

Esta foi a primeira evidência de que a PCSK9 pode estar agindo estequiometricamente no LDLR, em vez de como uma protease, pois as enzimas geralmente requerem mais de 90% de atividade de perda para ter um efeito perceptível em sua função⁷². A inativação de PCSK9 em camundongos confirmou que a perda da expressão de PCSK9 estava associada a níveis de LDLR quase três vezes maiores no fígado e a uma redução drástica do LDLc plasmático⁷³. A viabilidade desses camundongos knockout (KO), além da descoberta dos primeiros indivíduos desprovidos de PCSK9 funcional, estabeleceu essa proteína como um alvo terapêutico atraente para a redução do LDLc^{74,75}.

5. Mecanismo molecular do PCSK9

Conforme mencionado, a PCSK9 é um membro da subfamília da protease K subtilis, que codifica a proteína pré-proteína invertase *Bacillus subtilis*, liberada na circulação periférica após a maturação autocatalítica no retículo endoplasmático. Ela se liga a diferentes receptores ou moléculas para produzir diferentes efeitos biológicos. Os mecanismos de ação da PCSK9 podem ser divididos nas seguintes categorias⁷⁶:

- ligação ao LDL-R, para degradar o LDL;
- ligação aos TLRs, para mediar a resposta inflamatória;
- ligação ao receptor CD36; para promover PA e trombose; e
- ligação ao LRP1, ApoER2 e VLDL-R para promover a concentração de lipoproteína.

5.1 PCSK9, LDL-C circulante e degradação do LDL-R

O PCSK9 tem como alvo a degradação do LDL-R, que é um alvo importante para reduzir o LDL-C na circulação sanguínea. O LDL-R é essencial para o metabolismo das partículas de LDL. O LDL-C combina-se com o LDL-R na superfície da membrana da célula hepática e entra nas células hepáticas humanas por endocitose. Uma diminuição no valor do pH intracelular separará o LDLC do LDL-R. Após a separação, o LDL-C é degradado no lisossomo, e o LDL-R retorna à superfície da membrana hepática para continuar a se ligar ao LDL-C restante.

Após o PCSK9 se ligar ao LDL-R, o complexo PCSK9-LDL-R-LDL é formado, o que faz com que o PCSK9, o LDL-C e o LDL-R entrem no lisossomo juntos para serem degradados, o LDL-R na superfície celular diminui e a degradação do LDL-C diminui de acordo. Com base nesse processo, estudos demonstraram que o aumento do LDL circulante mediado pela PCSK9 está relacionado à progressão de DCVs, como a doença arterial coronariana (DAC)^{77,78}.

Uma meta-análise que avaliou uma amostra de 28.319 pacientes encontrou uma associação positiva significativa entre a concentração circulante de PCSK9 e o risco de eventos cardiovasculares adversos importantes⁷⁹, sugerindo que a inibição da expressão de PCSK9 reduz os níveis séricos de LDL e o risco de DCV⁸⁰. Além disso, o nível de proteína PCSK9 circulante é independente de fatores de risco conhecidos, incluindo LDL, e pode ser usado para prever eventos cardiovasculares futuros⁸¹.

A imagem de histologia virtual por ultrassom intravascular mostrou uma correlação linear entre os níveis séricos de PCSK9 e a proporção e quantidade de tecido central necrótico nas coronárias, mas não com os níveis séricos de LDL-C e o uso de estatina⁸². Da mesma forma, em camundongos ApoE ^{-/-}, a superexpressão de PCSK9 aumentou o tamanho da placa no seio aórtico e na raiz aórtica sem alterar os níveis de colesterol plasmático. Isso sugere que a PCSK9 também pode influenciar a biologia vascular e a progressão da doença cardiovascular por meio de outros mecanismos⁸³.

5.2. PCSK9, TLR-4 e resposta inflamatória

TLRs são proteínas transmembrana definidas por domínios citoplasmáticos para reconhecimento de ligantes de domínios extracelulares e interações com proteínas de transdução de sinal TLR, que ativam vias NF-KB a jusante de sinais biológicos. A PCSK9 pode se ligar a TLRs, aumentar os níveis de P-IkB α , degradação de IkB α e translocação nuclear de NF-kB em macrófagos, regular o microambiente da inflamação miocárdica e influenciar o curso da DCV⁸⁴.

A PCSK9 aumenta a secreção de fatores inflamatórios, principalmente promovendo a ativação da via TLR-4/NF-KB, e o mecanismo exato pode estar relacionado à similaridade da resistina e do C-terminal do domínio rico em cisteína da proteína PCSK9. A resistina se liga ao

TLR-4 pelo C-terminal e regula positivamente sua expressão para ativar a via de sinalização TLR-4, sugerindo que PCSK9 e resistina têm efeitos semelhantes no TLR-4⁸⁴.

O fator tecidual, uma glicoproteína que desempenha papéis importantes na coagulação e inflamação, é rapidamente induzido por agentes pró-inflamatórios por mecanismos dependentes de NF-KB, que estimulam monócitos circulantes. Scalise et al⁸⁵ descobriram que PCSK9 ativou a via de sinalização TLR4/NF-KB em células TLR4-HEK293, na mesma extensão que o lipopolissacarídeo (LPS), e a colocalização de PCSK9 e TLR4 foi confirmada por agonistas específicos de TLR4 e microscopia confocal quantitativa.

Isso sugere que PCSK9 pode ativar a via de sinalização TLR4/NF-KB para induzir a expressão do fator tecidual, que foi independente do efeito pró-inflamatório do LDL-C circulante. A lesão e ativação de células endoteliais podem ser o elo central com a ocorrência e desenvolvimento de sepse. O conteúdo de micropartículas de células endoteliais pode ser aumentado após sepse e afetar a função endotelial, regulando o óxido nítrico, a oxigenase do óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras moléculas de sinalização, e promovendo inflamação e lesão microvascular⁸⁵.

Yang et al⁸⁶ descobriram que, em camundongos sépticos, os níveis de expressão de eNOS e VE-caderina foram diminuídos, e a expressão de PCSK9 foi aumentada. A ativação das vias TLR4/MyD88/NF-κB e NLRP3 foi responsável pela disfunção endotelial induzida por PCSK9. A inibição de PCSK9 pode prevenir o declínio da vasodilatação dependente do endotélio e melhorar a taxa de sobrevivência de camundongos sépticos. Esses resultados sugerem que o aumento de PCSK9 na sepse ativa as vias TLR4/MyD88/NF-κB e NLRP3 para induzir inflamação, resultando em disfunção endotelial vascular e uma taxa de sobrevivência reduzida. A PCSK9, portanto, pode se combinar com TLR4 para regular a expressão de fatores inflamatórios e afetar o processo de doenças inflamatórias⁸⁶.

5.3 PCSK9, CD36, ativação plaquetária e trombose

O CD36 existe em plaquetas, fagócitos mononucleares e adipócitos, e atua como um regulador negativo da angiogênese. Como receptores scavenger em membranas fagocíticas, o CD36 participa da internalização de células apoptóticas, patógenos bacterianos e fúngicos e LDL, reconhecendo fosfolipídios e lipoproteínas oxidados específicos, mediando respostas inflamatórias que afetam a progressão da aterosclerose⁸⁷.

Além disso, o PCSK9 também pode se ligar ao CD36 plaquetário, aumentar a PA e reduzir a captação de ácidos graxos e o acúmulo de triglicerídeos nos tecidos. Sabe-se que o PCSK9 circulante aumenta a ativação plaquetária (PA) e o PCSK9i diminui, mas o mecanismo subjacente é desconhecido. Cammisotto et al⁸⁷ conduziram um estudo multicêntrico de controle, antes e depois, em 80 heterozigotos. Pacientes com hipercolesterolemia familiar (HeFH) recebendo a dose máxima tolerada de estatina ± ezetimiba, PA, peptídeo derivado de Nox2 solúvel (SNOX2-DP) e lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL) foram medidos antes e depois de seis meses de tratamento com PCSK9i. Comparado com a linha de base, o PCSK9i diminuiu os níveis séricos de LDL-c, ox LDL, trombose, alcano (Tx) B2, sNOX2-dp e PCSK9. Esses resultados sugerem que o tratamento com PCSK9i pode reduzir sequencialmente a formação de ox-LDL em pacientes HeFH ativos de NOX2 regulados por PA.

O envolvimento da PCSK9 na PA foi demonstrado em modelos animais de camundongos PCSK9 -/-, mas ainda falta uma associação clara entre os níveis de PCSK9 e a reatividade plaquetária⁸⁸. Estudos mostraram que a proteína PCSK9 no plasma se liga ao receptor CD36 e ativa a cinase Src e a cinase 5 regulada por sinal extracelular da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e a cinase amino-terminal C-Jun, aumentando os níveis de ROS⁸⁹.

Além disso, a via de sinalização p38MAPK/fosfolipase A2 citoplasmática/cisina-1/tromboxano A2 a jusante do CD36 é ativada para promover AP e trombose in vivo⁸⁹. A formação de trombose na circulação arterial é a principal causa patológica de doenças trombóticas arteriais, como síndrome coronariana aguda e acidente vascular cerebral isquêmico. A agregação de locais de lesão vascular e trombose subsequente são as principais etapas dessas doenças trombóticas arteriais⁹⁰.

Além disso, o PA também agrava a obstrução microvascular e promove a dilatação pós-IM⁸⁹. O PCSK9 está envolvido no metabolismo dos triglicerídeos, independentemente do seu efeito nos receptores de LDL, e foi sugerido que seja mediado pelo CD36. Demers et al⁹¹ induziram a degradação do CD36 em linhagens celulares e adipócitos primários, por meio da superexpressão do PCSK9, e reduziram a captação do análogo de palmitato BODIPY FL C16 e OX-LDL em adipócitos 3T3-L1 e hepatócitos HepG2, respectivamente.

Outros estudos descobriram que o nível da proteína CD36 aumentou a expressão de pequeno RNA interferente (siRNA) combinado com PCSK9 endógeno em células do fígado e tecidos adiposos hepáticos e viscerais de camundongos PCSK9 $-/-$, sugerindo que a PCSK9 desempenha um papel importante na regulação do CD36 e do metabolismo dos triglicerídeos⁹¹.

5.4 PCSK9, receptores associados a lipídios e metabolismo

Mutações em PCSK9, um terceiro locus associado à hipercolesterolemia familiar, levam a uma maior depuração de LDL-C plasmático, devido à degradação reduzida de LDL-R hepático. Além disso, estudos mostraram que os dois membros da família mais próximos de LDL-R, VLDL-R e ApoER2, também são alvos de PCSK9 e estão envolvidos, principalmente, no desenvolvimento neuronal e no metabolismo lipídico⁹².

O LDL-R é o regulador primário dos níveis circulantes de LDL, e o VLDL-R e o ApoER2 no cérebro mediam a sinalização de Reelin, uma via essencial para o desenvolvimento normal do sistema nervoso. Poirier et al⁹² descobriram que a PCSK9 do tipo selvagem e sua mutação funcional, naturalmente adquirida, D374Y podem degradar o LDL-R, o VLDL-R e o ApoER2 após a coexpressão celular ou a reinternalização da PCSK9 humana secretada, sem exigir atividade catalítica para a degradação induzida.

A quimera PCSK9 ligada à membrana aumenta o direcionamento intracelular de endossomos/lisossomos tardios. Este estudo também demonstrou que a atividade do PCSK9 e sua afinidade de ligação para o VLDL-R e o ApoER2 eram independentes da presença do LDL-R, enquanto a expressão do mRNA do PCSK9 estava relacionada à expressão do VLDL-R no cerebelo de camundongos lactentes. Isso demonstra um efeito mais geral do PCSK9 na degradação da família LDL-R, destacando seus principais papéis na homeostase do colesterol e dos lipídios e no desenvolvimento do cérebro. O nível de expressão de PCSK9 no cérebro foi mais alto no cerebelo perinatal, mas também aumentou no tecido cerebral adulto após isquemia. A função de PCSK9 e o mecanismo de seu envolvimento na apoptose neuronal permanecem obscuros⁹².

Kysenius et al⁹³ descobriram que a PCSK9 KO reduziu a morte de neurônios granulares cerebelares deficientes em potássio, conforme demonstrado por níveis diminuídos de C-Jun nuclear fosforilado, caspase-3 ativada e concentrações de núcleo apoptótico. A redução de ApoER2 é insuficiente para reverter o efeito protetor fornecido pelo RNAi de PCSK9, sugerindo que a via de sinalização pré-apoptótica de PCSK9 é mediada por mudanças na função de ApoER2.

Estudos mostraram que PCSK9 regula a apoptose neuronal independentemente da função do receptor NMDA, mas sinergicamente com as vias de sinalização ERK e JNK. Esses resultados sugerem que a PCSK9 aumenta a apoptose neuronal regulando os níveis de ApoER2 e as vias de sinalização antiapoptóticas relacionadas. Além disso, descobriu-se que a PCSK9 no cérebro pode promover a apoptose neuronal ativando a via de sinalização Bcl-2/Bax/Caspase3⁹³.

Um estudo também verificou que o nível de PCSK9 no fluido cerebrospinal de pacientes com DAC era maior do que o de pacientes sem DAC, indicando que há uma ligação fisiopatológica entre a PCSK9 e a doença. A PCSK9 pode desempenhar um papel na DAC, ativando o acúmulo de lipídios, a apoptose e a produção de amiloide no cérebro. Essas descobertas sugerem que a PCSK9 tem um efeito mais geral na degradação celular e que a família LDL-R enfatiza seus papéis na homeostase do colesterol e dos lipídios e no desenvolvimento do cérebro⁹⁴.

Outro dado relevante mostra que a PCSK9 não carrega nenhuma atividade de protease em trans. As primeiras estruturas cristalinas relatadas da PCSK9 indicaram que o C-terminal do prodomínio autocatalítico excisado estava solidamente embutido no sulco de ligação ao substrato, provavelmente bloqueando o acesso a qualquer substrato⁹⁵. Em concordância, a coexpressão do prodomínio da PCSK9 com um mutante cataliticamente morto da PCSK9 madura, em que o sítio ativo Ser386 foi mutado para Ala (S386A), levou a uma PCSK9 reconstituída totalmente funcional e secretada, capaz de mediar a degradação do LDLR, semelhante à PCSK9 do tipo selvagem⁹⁶.

Esta conclusão foi posteriormente confirmada em outro estudo, usando uma abordagem semelhante com um mutante PCSK9 do sítio ativo His226 (H226A), que também resultou em uma via de degradação semelhante de outros membros da família VLDL-R e ApoER2. Assim, a PCSK9 atua como uma protease apenas uma vez durante seu processamento de zimogênio autocatalítico no ER⁹⁷.

6. IMPACTO CLÍNICO DOS INIBIDORES DE PCSK9

Os ensaios cardiovasculares desempenharam um papel crucial no avanço da nossa compreensão dos inibidores de PCSK9, uma nova classe de medicamentos, ao fornecer insights valiosos sobre sua eficácia e segurança. Três ensaios principais – FOURIER, SPIRE-1 e SPIRE-2, e o ensaio ODYSSEY Outcomes – forneceram evidências para o uso de inibidores de PCSK9 no tratamento de DCVs, conforme resumo abaixo.

6.1 Estudo FOURIER

O estudo FOURIER foi um estudo de desfecho cardiovascular fundamental, que teve como objetivo avaliar a eficácia e a segurança do evolocumabe, um inibidor da PCSK9. Este estudo incluiu uma coorte substancial de 27.564 pacientes que apresentaram doença aterosclerótica clinicamente evidente e tinham histórico de infarto do miocárdio (IM), acidente vascular cerebral (AVC) não hemorrágico ou doença arterial periférica (DAP) sintomática. Os participantes do estudo já estavam passando por terapia otimizada de redução de lipídios, principalmente estatinas de alta intensidade, e apresentavam níveis basais de LDL-C de 70 mg/dL ou mais, ou níveis de colesterol não HDL de 100 mg/dL ou mais⁹⁸.

Todos foram randomizados para receber injeções subcutâneas de evolocumabe (140 mg a cada 2 semanas ou 420 mg mensais) ou injeções de placebo correspondentes. O desfecho primário de eficácia foi o composto de eventos cardiovasculares maiores, abrangendo morte cardiovascular, IM, AVC, revascularização coronária ou hospitalização por angina instável. O desfecho secundário primário foi o composto de morte cardiovascular, IM ou AVC⁹⁸.

Os resultados do ensaio demonstraram que o evolocumabe reduziu os níveis de LDL-C em 59%, em 48 semanas, em comparação com o placebo, resultando em uma redução média absoluta substancial de 56 mg/dL para um nível mediano de 30 mg/dL. Importante ressaltar que o ensaio demonstrou uma redução de 15% no risco do desfecho primário e de 20% no desfecho secundário principal com o tratamento com evolocumabe. As descobertas do ensaio também indicaram que a redução em eventos cardiovasculares se tornou mais pronunciada após o ano inicial de tratamento, sugerindo um benefício clínico sustentado ao longo do tempo⁹⁸.

Porém, uma reanálise baseada em dados regulatórios revelou algumas inconsistências entre as informações no relatório do estudo clínico (CSR) e aquelas na publicação dos resultados do ensaio primário de 2017. Para 360 de 870 mortes (41,4%), a causa da morte julgada pelo comitê de eventos clínicos FOURIER diferiu daquela declarada pelo investigador clínico local. Após a readjucação, observou-se que as mortes cardíacas foram numericamente, mas não significativamente, maiores no grupo evolocumabe (113) do que no grupo placebo, enquanto as mortes vasculares não cardíacas foram semelhantes entre os grupos. O HR relatado para mortalidade cardiovascular na análise do estudo original foi de 1,05. Após a readjucação, foi encontrado um aumento relativo maior (embora ainda não significativo) na mortalidade cardiovascular no grupo de tratamento com evolocumabe⁹⁹.

6.2 Ensaios SPIRE-1 e SPIRE-2

Os ensaios SPIRE-1 e SPIRE-2 investigaram o inibidor de PCSK9 bococizumab em uma grande coorte de 27.438 pacientes com histórico de DVC ou diabetes. Os ensaios foram projetados para avaliar os efeitos do bococizumab nos níveis de LDL-C e nos resultados cardiovasculares. Porém, ambos os ensaios foram encerrados prematuramente, devido ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra o bococizumab. Esses anticorpos diminuíram a capacidade do medicamento de reduzir os níveis de LDL-C ao longo do tempo, levando a uma diminuição de seu efeito terapêutico^{100,101}.

Apesar do término precoce, o ensaio SPIRE-2 demonstrou uma redução de risco de 21% no desfecho composto primário no grupo bococizumab em comparação ao grupo placebo. O desfecho composto primário incluiu morte cardiovascular, IM não fatal ou AVC não fatal. Isso sugere que o bococizumab pode ter fornecido um benefício clínico. Isso destaca a importância do monitoramento de anticorpos neutralizantes em pacientes que recebem inibidores de PCSK9 e ressalta a necessidade de pesquisa contínua sobre estratégias para mitigar esse desafio¹⁰¹.

6.3 Resultados do teste ODYSSEY

O estudo de resultados ODYSSEY centrou-se na investigação dos efeitos do alirocumabe, outro inibidor da PCSK9, em pacientes que tiveram uma síndrome coronária aguda (SCA) recente, como IM ou angina instável, dentro de 1–12 meses antes da inscrição. O estudo inscreveu 18.924 pacientes que já estavam em terapia de estatina de alta intensidade. O tratamento com alirocumabe resultou em uma redução significativa de 57% nos níveis de LDL-

C, em comparação com o placebo. O desfecho composto primário, que incluiu morte por doença cardíaca coronária (DCC), IM, AVC isquêmico ou hospitalização por angina instável, exibiu uma redução de 15% com alirocumabe em comparação com o placebo. Além disso, uma análise exploratória sugeriu uma redução nominal de 15% na mortalidade por todas as causas com alirocumabe, embora a significância estatística não tenha sido alcançada¹⁰².

7. APLICAÇÃO CLÍNICA DOS INIBIDORES DE PCSK9

Os inibidores de PCSK9 têm eficácia significativa em hiperlipidemia, aterosclerose e outras doenças, com muitos relatórios destacando seus potenciais efeitos terapêuticos no tratamento de sepse, tumores e algumas infecções virais, entre outras doenças, conforme detalhado abaixo.

7.1 Hiperlipidemia

Os lipídios do sangue incluem colesterol, triglicerídeos (TGs) e lipídios no soro. A hiperlipidemia, por sua vez, inclui níveis elevados de colesterol total (CT), LDL-C e TG no soro. O tratamento da hiperlipidemia requer ajuste da dieta e mudanças no estilo de vida, independentemente da terapia medicamentosa. Os medicamentos usados correspondem a estatinas, inibidores da absorção de colesterol, ácido bempedoico, preparações de óleo de peixe de alta pureza e inibidores de PCSK9¹⁰³.

A inibição de PCSK9 é uma nova estratégia terapêutica para o controle da hiperlipidemia, que pode melhorar a circulação de LDL-R, aumentar a utilização de LDL-R na superfície das células do fígado e reduzir o nível de LDL-C no sangue. Um estudo de longo prazo de pacientes com hipercolesterolemia usando um anticorpo monoclonal descobriu que o evolocumabe reduziu as concentrações de LDL-C em 55 a 57% em comparação com o placebo. O estudo também comparou a monoterapia com evolocumabe com ezetimiba e encontrou uma redução de 38 a 39% no LDL-C no grupo evolocumabe, sugerindo uma redução significativa no LDL-C com um único inibidor de PCSK9¹⁰⁴.

O mecanismo pelo qual as estatinas reduzem os níveis de LDL-C é aumentar a expressão de LDL-R na superfície das células do fígado, reduzindo assim os níveis circulantes de LDL-C. No entanto, a regulação de feedback negativo das estatinas induz a expressão e secreção de PCSK9, o que enfraquece sua eficácia na redução do LDL¹⁰⁵. Portanto, a combinação de inibidores de PCSK9 pode fornecer uma maneira eficaz de reduzir o LDL-C em pacientes com resistência a medicamentos tratados apenas com estatinas. Os inibidores de PCSK9 reduziram o LDL-C circulante em pacientes com HeFH, e o efeito da ezetimiba combinada com evolocumabe foi semelhante ao do evolocumabe sozinho¹⁰⁶.

Outro estudo descobriu que a adição de evolocumabe à hiperlipidemia resultou em uma redução média de 48% no LDL-C em comparação com o placebo¹⁰⁷. Esses resultados indicam que a ezetimiba não afeta significativamente a eficácia de redução de lipídios dos inibidores de PCSK9, e uma redução adicional de lipídios pode ser alcançada com base na eficácia da ezetimiba. Além disso, o estudo controlado por placebo de 52 semanas de evolocumabe para hiperlipidemia descobriu que os pacientes no grupo evolocumabe tiveram uma redução de 58% no LDL-C na semana 12 e uma redução de 57% na semana 52, em comparação com o grupo placebo¹⁰⁷. A segurança e tolerabilidade a longo prazo do alirocumabe foram avaliadas, e a redução média no LDL-C na semana 78 foi de 58%, indicando que o efeito de redução do LDL-C dos inibidores de PCSK9 é durável e bem tolerado¹⁰⁸.

7.2 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença vascular inflamatória crônica, causada por lesão endotelial vascular, e caracterizada pelo acúmulo gradual de placa nas paredes de artérias de grande e médio porte. Medicamentos comumente usados, como antiplaquetários, anticoagulantes e vasodilatadores, são indicados para retardar o acúmulo de placa, diminuindo os lipídios sanguíneos para induzir trombólise e prevenir o bloqueio vascular, respectivamente. Vários estudos mostraram que os inibidores de PCSK9 têm certos efeitos na inibição da lesão das células endoteliais vasculares, reduzindo os lipídios sanguíneos e protegendo as células cardíacas durante a isquemia/reperfusão miocárdica (I/R)¹⁰⁹.

Como uma classe de medicamentos hipolipemiantes, os inibidores de PCSK9 podem efetivamente retardar o acúmulo de placa intravascular e até mesmo causar regressão da placa. Zeng et al¹⁰⁹ constataram que os inibidores de PCSK9 em células endoteliais da veia umbilical humana induzem piroapoptose, mediando a expressão de LDL oxidado pela via mitocondrial ubiquinona-citocromo C redutase proteína central 1/espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses

resultados sugerem que os inibidores de PCSK9 podem inibir a escortose de células endoteliais até certo ponto e retardar o desenvolvimento de aterosclerose.

Além disso, Safaeian et al¹¹⁰ mostraram que o evolocumabe teve efeitos antioxidantes e protetores celulares no dano oxidativo induzido por H₂O₂ em células endoteliais. Nicholls et al¹¹¹, por sua vez, conduziram um ensaio clínico randomizado, multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo, no qual evolocumabe ou placebo foi injetado uma vez por mês (420 mg) e mediu a porcentagem do volume da placa aterosclerótica (VPA) por ultrassom intravascular como foco primário, durante 84 semanas de tratamento.

Dados de angiograma de 968 pacientes com doença cardíaca coronária foram coletados e mostraram níveis mais baixos de LDL-C no grupo evolocumabe do que no grupo placebo. Aqueles tratados com estatinas tiveram um aumento de 0,05% no VPA enquanto tomavam o placebo e uma diminuição de 0,95% enquanto tomavam evolocumabe. Entre aqueles que não tomavam estatinas, 64,3% dos pacientes no grupo evolocumabe tiveram regressão da placa, em comparação com 47,3% no grupo placebo¹¹¹.

Toscano et al¹¹² inscreveram pacientes com HeFH e realizaram análise bioquímica e avaliação da VOP na linha de base por seis meses de estatina mais ezetimiba e seis meses de PCSK9-I. Os níveis de PCSK9 aumentaram durante o tratamento com estatina/EZE e começaram a diminuir após o tratamento. Considera-se que os níveis de PCSK9 estão relacionados aos valores de VOP da linha de base na HeFH. Esses resultados sugerem que os inibidores de PCSK9 podem desacelerar, estabilizar e até mesmo diminuir significativamente as placas e ter um efeito sinérgico com as estatinas.

A isquemia miocárdica aguda é uma das principais causas de desprendimento de placas ateroscleróticas. No processo de isquemia miocárdica aguda, o nível de PCSK9 aumenta, levando à deterioração do microambiente inflamatório miocárdico e à insuficiência cardíaca. Portanto, os inibidores de PCSK9 podem ter um efeito protetor na lesão miocárdica. Por meio de experimentos com animais, Palee et al¹¹³ descobriram que a administração do inibidor de PCSK9 antes da isquemia teve um efeito cardioprotetor e melhorou a função ventricular esquerda ao aliviar o dano mitocondrial, o que foi demonstrado pela redução do tamanho do infarto do miocárdio e da arritmia em I/R.

8. POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO PCSK9

8.1 PCSK9 e sepse

A PCSK9 reduz o colesterol circulante reduzindo a densidade de LDL-Rs nas células do fígado. Durante a infecção, esses receptores estão envolvidos na limpeza de lipídios bacterianos circulantes, como LPS. Acredita-se que esses lipídios desempenham um papel fundamental no início de respostas inflamatórias sistêmicas descontroladas durante a sepse. A limpeza de lipídios pela inibição de PCSK9 pode ser um novo método para o tratamento da sepse¹¹⁴.

Foi relatado que camundongos PCSK9 KO têm um efeito protetor no choque séptico induzido por LPS e a variante do tipo de disfunção (LOF) PCSK9 mostrou baixas frequências de choque séptico e falência de órgãos, enquanto o inverso foi observado em camundongos transgênicos superexpressando PCSK9^{115,116}. Em modelos de sepse de ligadura e perfuração cecal, foi relatado que camundongos PCSK9 -/- apresentam concentrações bacterianas mais baixas no sangue, pulmões e fluido peritoneal do que animais selvagens, sugerindo que a exclusão de PCSK9 é benéfica para a inibição ou eliminação bacteriana¹¹⁶. Como a proteção séptica de PCSK9 -/- não foi demonstrada em camundongos LDL-R KO, KO de PCSK9 ou o uso de inibidores de PCSK9 podem aumentar a eliminação de lipídios através de LDL-R^{116,117}.

A complexidade da sepse é específica da espécie, lançando dúvidas sobre o uso de modelos de sepse em roedores¹¹⁸. Na realidade, camundongos e ratos são significativamente mais resistentes à sepse do que humanos. O modelo de camundongo humanizado gerado por Laudanski et al¹¹⁹ reduziu essa limitação até certo ponto. Além disso, os inibidores de PCSK9 podem não beneficiar hospedeiros jovens com sepse. Atreya et al¹²⁰ encontraram uma associação aumentada entre mutações PCSK9 LOF e prognóstico ruim de choque séptico em crianças. A justificativa por trás dessa observação não é clara, e eles sugerem que as crianças devem ser excluídas de ensaios clínicos de sepse envolvendo inibidores de PCSK9, até que o efeito desconhecido da disfunção de PCSK9 em crianças pequenas seja esclarecido.

Vecchié et al¹²¹ identificaram, em seu estudo sobre a correlação entre PCSK9 e mortalidade por choque séptico, que pacientes com choque séptico e baixo nível de PCSK9 no primeiro dia apresentaram mortalidade maior em 28 e 90 dias, do que outros pacientes com um

alto nível de PCSK9 no primeiro dia. Na subanálise deste experimento, os pesquisadores descobriram que baixos níveis circulantes de PCSK9 um dia após o início da sepse não estavam associados a um bom prognóstico^{122,123}. Pacientes com baixa lipoproteína de alta densidade (HDL) durante a sepse têm um risco muito maior de morte por falência de órgãos, enquanto a PCSK9 não tem efeito significativo nos níveis críticos conhecidos de HDL. Portanto, o uso de inibidores de PCSK9 durante a sepse é desconhecido, e o efeito preventivo dos inibidores de PCSK9 na sepse não pode ser descartado^{124,125}.

8.2 PCSK9 no diagnóstico e tratamento de tumores

O colesterol desempenha um papel fundamental no metabolismo celular, especialmente em processos que demandam energia, como crescimento e divisão celular. As células tumorais têm maiores necessidades de colesterol. O LDL fornece colesterol para células periféricas, e sua regulação positiva em tumores está relacionada à progressão do câncer¹²⁶. Foi relatado que em diferentes coortes de pacientes, indivíduos com alta expressão de mRNA PCSK9 tumoral têm uma taxa de sobrevida global mais baixa do que indivíduos com baixa expressão de mRNA PCSK9. Portanto, a expressão PCSK9 pode ser um biomarcador valioso para o prognóstico clínico de alguns tumores malignos, incluindo câncer de fígado, estômago, rim, pâncreas e mama¹²⁷.

Foi demonstrado que em células T CD8+, o LDL-R forma um complexo com o receptor de células T (TCR), que é ativado pela ligação a peptídeos antigênicos, apresentados às células tumorais pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC). A ligação do LDL-R ao TCR promove a reciclagem da superfície celular e aumenta a atividade antitumoral das células T CD8+. Portanto, a combinação de medicamentos redutores de colesterol (PCSK9i, estatinas e ezetimiba) pode aumentar o nível de LDL-R de superfície e reduzir significativamente o LDL-C¹²⁸.

Reduzir o crescimento tumoral e/ou metástase por meio da depleção do colesterol e aumentar a atividade do TCR e do MHC-I é uma estratégia importante para o tratamento do câncer. Liu et al¹²⁹ descobriram que a tumorigenicidade das células tumorais pcSK9-KO foi reduzida em camundongos, e o mAb do receptor de morte programada 1 (PD-1) foi injetado para inibir o crescimento do tumor em conjunto com inibidores de PCSK9, sugerindo que a inibição do PCSK9 derivado do tumor pode superar a resistência aos medicamentos para a terapia PD-1.

8.3 PCSK9 e infecção viral

A PCSK9 pode estar associada a doenças infecciosas virais, incluindo o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da dengue (DENV) e o SARS-CoV-2, o agente etiológico da COVID-19. O LDL-R foi identificado como um dos receptores de ligação para a entrada do HCV nas células do fígado¹²⁴. Caron et al¹³⁰ isolaram iPSCs de um paciente com deleção de LDL-R, permitindo que induzissem a diferenciação em células do fígado. Células sem LDL-R funcional ainda podem ser infectadas com HCV, mas a produção do vírus aumenta significativamente após a reexpressão de LDL-R, sugerindo que o LDL-R não está relacionado à entrada do HCV, mas está relacionado ao metabolismo lipídico das células hospedeiras durante o empacotamento do HCV. Como os inibidores de PCSK9 podem aumentar o empacotamento e a infectividade do HCV, os pacientes infectados devem usar inibidores de PCSK9 com cautela.

Além disso, estudos descobriram que a infecção por DENV promove a síntese de colesterol pela via SREBP-2, induz a expressão de PCSK9 em hepatócitos e reduz o LDL-C circulante¹³¹. Níveis elevados de PCSK9 no plasma foram detectados em pacientes infectados com DENV, e níveis elevados de colesterol no retículo endoplasmático levam a uma resposta significativamente reduzida do interferon tipo I (IFN) antiviral nos hepatócitos do hospedeiro, altos níveis de viremia e vazamento de plasma mais grave¹³⁰.

Portanto, os inibidores de PCSK9 podem beneficiar os pacientes com DENV aumentando os níveis de genes de resposta ao interferon antiviral. A terapia combinada com estatinas e inibidores de PCSK9 tem o potencial de reduzir dois fatores que contribuem para um risco aumentado de complicações da trombose da COVID-19. Portanto, o uso de inibidores de PCSK9 no tratamento da COVID-19 pode ser outra estratégia potencial¹³⁰.

REFERÊNCIAS

1. Buja LM, Nikolai N. Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2014;23(3):183-184.
2. Frantz ID Jr, Moore RB. The sterol hypothesis in atherogenesis. *Am J Med*. 1969;46(5):684-690.
3. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010; 86(5):484-493.
4. Li JJ. *Triumph of the Heart: The Story of Statins*. Oxford: University Press.
5. Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol*. 1998;81(5):582-587.
6. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*. 2001;40(6):439-452.
7. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hastly AH, et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*. 2002;43(8):1220-1235.
8. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):431-438.
9. Davignon J. The cardioprotective effects of statins. *Curr Atheroscler Rep*. 2004;6(1):27-35.
10. Rosenblum SB, Huynh T, Afonso A, et al. Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem*. 1998;41(6):973-980.
11. Smith BA, Wright C, Davidson M. Role of ezetimibe in lipid-lowering and cardiovascular disease prevention. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(12):72.
12. Giugliano RP, Cannon CP, Blazing MA, et al.; IMPROVE-IT (Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial) Investigators. Benefit of adding ezetimibe to statin therapy on cardiovascular outcomes and safety in patients with versus without diabetes mellitus: results from IMPROVE-IT (improved reduction of outcomes: vytorin efficacy international trial). *Circulation*. 2018;137(15):1571-1582.
13. Schjoldager KT, Clausen H. Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing—deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(12):2079-2094.
14. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(12):729-749.
15. Aebersold R, Agar JN, Amster IJ, et al. How many human proteoforms are there? *Nat Chem Biol*. 2018;14(3):206-214.
16. Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, et al. A single kinase generates the majority of the secreted phosphoproteome. *Cell*. 2015;161(7):1619-1632.
17. Cui J, Xiao J, Tagliabracci VS, Wen J, Rahdar M, Dixon JE. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *Elife*. 2015;4:e06120.

18. Neurath H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci.* 1989;14(7):268-271.
19. Neurath H, Walsh KA. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(11):3825-3832.
20. Lazure C, Seidah NG, Pélaprat D, Chrétien M. Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review. *Can J Biochem Cell Biol.* 1983;61(7):501-515.
21. Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science.* 1967;157(3789):697-700.
22. Steiner DF. On the discovery of precursor processing. *Methods Mol Biol.* 2011;768:3-11.
23. Chrétien M, Li CH. Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem.* 1967;45(7):1163-1174.
24. Chrétien M, Benjannet S, Dragon N, Seidah NG, Lis M. Isolation of peptides with opiate activity from sheep and human pituitaries: relationship to beta-lipotropin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976;72(2):472-478.
25. Chrétien M. How the prohormone theory solved two important controversies in hormonal and neural Peptide biosynthesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:148.
26. Seidah NG, Lis M, Gianoulakis C, Schiller P, Chrétien M. Letter: fragment of sheep beta-lipotropin with morphine-like activity. *Lancet.* 1976;1(7967):1017.
27. Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 1999;848(1-2):45-62.
28. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(5):367-383.
29. Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, Mbikay M. The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem.* 2013;288(30):21473-21481.
30. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30561-30572.
31. Rawson RB, Cheng D, Brown MS, Goldstein JL. Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J Biol Chem.* 1998;273(43):28261-28269.
32. Lenz O, ter Meulen J, Klenk HD, Seidah NG, Garten W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12701-12705.
33. Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1. *J Virol.* 2003;77(16):8640-8649.
34. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al. Mammalian subtilisin/ kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1321-1326.
35. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, et al. Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell.* 1998;2(4):505-514.
36. Ye J, Rawson RB, Komuro R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000;6(6):1355-1364.

37. Seidah NG. Proprotein convertases SKI-1/S1P and PCSK9. In: Minamino N, Kastin A, eds. *Handbook of the Biologically Active Peptides*. Academic Press; 2012:1-8.
38. Espenshade PJ, Cheng D, Goldstein JL, Brown MS. Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*. 1999;274(32):22795-22804.
39. Pullikotil P, Vincent M, Nichol ST, Seidah NG. Development of protein-based inhibitors of the proprotein of convertase SKI-1/ S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17338-17347.
40. Pasquato A, Pullikotil P, Asselin MC, et al. The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23471-23481.
41. Seidah NG, Prat A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem*. 2002;38:79-94.
42. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(7):685-696.
43. Pasquato A, Cendron L, Kunz S. Cleavage of the glycoprotein of arenaviruses. *Activat Viruses Host Proteases* 2018:47-70.
44. Velho RV, De Pace R, Klünder S, et al. Site-1 protease and lysosomal homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(11 Pt B):2162-2168.
45. Tassew NG, Charish J, Seidah NG, Monnier PP. SKI-1 and Furin generate multiple RGMA fragments that regulate axonal growth. *Dev Cell*. 2012;22(2):391-402.
46. Nakagawa T, Suzuki-Nakagawa C, Watanabe A, et al. Site-1 protease is required for the generation of soluble (pro)renin receptor. *J Biochem*. 2017;161(4):369-379.
47. Seidah NG, Pasquato A, Andreo U. How do enveloped viruses exploit the secretory proprotein convertases to regulate infectivity and spread? *Viruses* 2021;13(7):1229.
48. Kondo Y, Fu J, Wang H, et al. Site-1 protease deficiency causes human skeletal dysplasia due to defective inter-organelle protein trafficking. *JCI Insight* 2018;3(14):e121596.
49. Ye J. Transcription factors activated through RIP (regulated intramembrane proteolysis) and RAT (regulated alternative translocation). *J Biol Chem*. 2020;295(30):10271-10280.
50. Marschner K, Kollmann K, Schweizer M, Bräulke T, Pohl S. A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science*. 2011;333(6038):87-90.
51. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):928-933.
52. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*. 2003;34(2):154-156.
53. Varret M, Rabès JP, Saint-Jore B, et al. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*. 1999;64(5):1378-1387.
54. Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, et al. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(4):1089-1093.

55. Naureckiene S, Ma L, Sreekumar K, et al. Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420(1):55-67.
56. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48865-48875.
57. Benjannet S, Hamelin J, Chrétien M, Seidah NG. Loss- and gain-of-function PCSK9 variants: cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation. *J Biol Chem*. 2012;287(40):33745-33755.
58. Saavedra YG, Zhang J, Seidah NG. PCSK9 prosegment chimera as novel inhibitors of LDLR degradation. *PLoS One*. 2013;8(8):e72113.
59. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(5):413-419.
60. Piper DE, Jackson S, Liu Q, et al. The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure*. 2007;15(5):545-552.
61. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(4):785-791.
62. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(6):2069-2074.
63. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7100-7105.
64. Park SW, Moon YA, Horton JD. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J Biol Chem*. 2004;279(48):50630-50638.
65. Maxwell KN, Soccio RE, Duncan EM, Sehayek E, Breslow JL. Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *J Lipid Res*. 2003;44(11):2109-2119.
66. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12027-12032.
67. Dubuc G, Chamberland A, Wassef H, et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(8):1454-1459.
68. Attie AD, Seidah NG. Dual regulation of the LDL receptor—some clarity and new questions. *Cell Metab*. 2005;1(5):290-292.
69. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*. 2004;114(4):349-353.
70. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005;37(2):161-165.
71. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1264-1272.

72. Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon YA, Brown MS, Horton JD. Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):13607-13612.
73. Rashid S, Curtis DE, Garuti R, et al. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(15):5374-5379.
74. Zhao Z, Tuakli-Wosornu Y, Lagace TA, et al. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):514-523.
75. Hooper AJ, Marais AD, Tanyanyiwa DM, Burnett JR. The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):445-448.
76. Yurtseven E, Ural D, Baysal K, Tokgözoğlu L. An update on the role of PCSK9 in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2020;27:909–18.
77. Brown M, Ahmed S. Emerging role of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK-9) in inflammation and diseases. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;370:170–7.
78. Gitt AK, Lautsch D, Ferrières J, Ferrari GD, Vyas A, Baxter C, et al. Cholesterol target value attainment and lipid-lowering therapy in patients with stable or acute coronary heart disease: results from the Dyslipidemia International Study II. *Atherosclerosis*. 2017;266:158–66.
79. Zhou Y, Chen W, Lu M, Wang Y. Association between circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and major adverse cardiovascular events, stroke, and all-cause mortality: systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:617249.
80. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354:1264–72.
81. Leander K, Mälarstig A, Van't Hooft F, Hyde C, Hellénius M, Troutt J, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) predicts future risk of cardiovascular events independently of established risk factors. *Circulation*. 2016;133:1230–9.
82. Cheng J, Oemrawsingh R, Garcia-Garcia H, Boersma E, van Geuns R, Serruys P, et al. PCSK9 in relation to coronary plaque inflammation: results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis*. 2016;248:117–22.
83. Tavori H, Giunzioni I, Predazzi I, Plubell D, Shivinsky A, Miles J, et al. Human PCSK9 promotes hepatic lipogenesis and atherosclerosis development via apoE- and LDLR-mediated mechanisms. *Cardiovasc Res*. 2016;110:268–78.
84. Tang Z, Peng J, Ren Z, Yang J, Li T, Wang Z, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF-κB pathway. *Atherosclerosis*. 2017;262:113–22.
85. Scalise V, Sanguinetti C, Neri T, Cianchetti S, Lai M, Carnicelli V, et al. PCSK9 induces tissue factor expression by activation of TLR4/NF-κB signaling. *Int J Mol Sci*. 2021;22:12640.
86. Yang C, Zeng Y, Hu Z, Liang H. PCSK9 promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages to aggravate H/R-induced cardiomyocyte injury via activating NF-κB signalling. *Gen Physiol Biophys*. 2020;39:123–34.
87. Cammisotto V, Baratta F, Castellani V, Bartimoccia S, Nocella C, D'Erasmo L, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 inhibitors reduce platelet activation modulating ox-LDL pathways. *Int J Mol Sci*. 2021;22:7193.

88. Kassassir H, Siewiera K, Sychowski R, Watała C. Can the antiplatelet effects of cangrelor be reliably studied in mice under in vivo and in vitro conditions using flow cytometry? *Pharmacol Rep.* 2013;65:870–83.
89. Qi Z, Hu L, Zhang J, Yang W, Liu X, Jia D, et al. PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin 9) enhances platelet activation, thrombosis, and myocardial infarct expansion by binding to platelet CD36. *Circulation.* 2021;143:45–61.
90. Gurbel P, Jeong Y, Navarese E, Tantry U. Platelet-mediated thrombosis: from bench to bedside. *Circ Res.* 2016;118:1380–91.
91. Demers A, Samami S, Lauzier B, Des Rosiers C, Ngo Sock E, Ong H, et al. PCSK9 induces CD36 degradation and affects long-chain fatty acid uptake and triglyceride metabolism in adipocytes and in mouse liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:2517–25.
92. Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, et al. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J Biol Chem.* 2008;283:2363–72.
93. Kysenius K, Muggalla P, Mätlik K, Arumäe U, Huttunen H. PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:1903–16.
94. Benn M, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A. Low LDL cholesterol, PCSK9 and HMGCR genetic variation, and risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: Mendelian randomisation study. *BMJ.* 2017;357:j1648.
95. Momtazi-Borojeni AA, Jaafari MR, Afshar M, Banach M, Sahebkar A. PCSK9 immunization using nanoliposomes: preventive efficacy against hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Arch Med Sci.* 2021;17:1365–77.
96. Li Q, Su J, Liu Y, Jin X, Zhong X, Mo L, et al. In vivo PCSK9 gene editing using an all-in-one self-cleavage AAV-CRISPR system. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2021;20:652–9.
97. Ding Q, Strong A, Patel KM, Ng SL, Gosis BS, Regan SN, et al. Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res.* 2014;115:488–92.
98. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017;376:1713–22.
99. Erviti J, Wright J, Bassett K, et al. Restoring mortality data in the Fourier cardiovascular outcomes trial of evolocumab in patients with cardiovascular disease: a reanalysis based on regulatory data. *BMJ Open.* 2022;12:e060172.
100. Ridker PM, Revkin J, Amarenco P, et al. Cardiovascular efficacy and safety of bococizumab in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2017;376:1527–39.
101. Ridker PM, Amarenco P, Brunell R, et al. Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of Vascular Events (SPIRE) Investigators. Evaluating bococizumab, a monoclonal antibody to PCSK9, on lipid levels and clinical events in broad patient groups with and without prior cardiovascular events: rationale and design of the Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of Vascular Events (SPIRE) lipid lowering and SPIRE cardiovascular outcomes trials. *Am Heart J.* 2016;178:135–44.
102. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, et al. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2018;379:2097–107.
103. Association CM. Guidelines for primary diagnosis and treatment of dyslipidemia. *Chin J Gen Pract.* 2019;018:417–21.
104. Koren MJ, Giugliano RP, Raal FJ, Sullivan D, Bolognese M, Langslet G, et al. Efficacy and safety of longer-term administration of evolocumab (AMG 145) in patients with

hypercholesterolemia: 52-week results from the Open-Label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C (OSLER) randomized trial. *Circulation*. 2014;129:234–43.

105. Cao G, Qian YW, Kowala MC, Konrad RJ. Further LDL cholesterol lowering through targeting PCSK9 for coronary artery disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2008;8:238–43.

106. Raal FJ, Stein EA, Dufour R, Turner T, Civeira F, Burgess L, et al. PCSK9 inhibition with evolocumab (AMG 145) in heterozygous familial hypercholesterolaemia (RUTHERFORD-2): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015;385:331–40.

107. Blom DJ, Hala T, Bolognese M, Lillestol MJ, Toth PD, Burgess L, et al. A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia. *N Engl J Med*. 2014;370:1809–19.

108. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Aversa M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372:1489–99.

109. Zeng J, Tao J, Xi L, Wang Z, Liu L. PCSK9 mediates the oxidative low-density lipoprotein-induced pyroptosis of vascular endothelial cells via the UQCRC1/ROS pathway. *Int J Mol Med*. 2021;47:53.

110. Safaeian L, Mirian M, Bahrizadeh S. Evolocumab, a PCSK9 inhibitor, protects human endothelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress. *Arch Physiol Biochem*. 2020;1–6.

111. Nicholls SJ, Puri R, Anderson T, Ballantyne CM, Cho L, Kastelein JJ, et al. Effect of evolocumab on progression of coronary disease in statin-treated patients: The GLAGOV randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;316:2373–84.

112. Toscano A, Cinquegrani M, Scuruchi M, Di Pino A, Piro S, Ferrara V, et al. PCSK9 plasma levels are associated with mechanical vascular impairment in familial hypercholesterolemia subjects without a history of atherosclerotic cardiovascular disease: Results of six-month add-on PCSK9 inhibitor therapy. *Biomolecules*. 2022;12:562.

113. Palee S, McSweeney CM, Maneechote C, Moisesescu DM, Jaiwongkam T, Kerdphoo S, et al. PCSK9 inhibitor improves cardiac function and reduces infarct size in rats with ischaemia/reperfusion injury: Benefits beyond lipid-lowering effects. *J Cell Mol Med*. 2019;23:7310–9.

114. Grin PM, Dwivedi DJ, Chathely KM, Trigatti BL, Prat A, Seidah NG, et al. Low-density lipoprotein (LDL)-dependent uptake of Gram-positive lipoteichoic acid and Gram-negative lipopolysaccharide occurs through LDL receptor. *Sci Rep*. 2018;8:10496.

115. Walley KR. Role of lipoproteins and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in endotoxin clearance in sepsis. *Curr Opin Crit Care*. 2016;22:464–9.

116. Dwivedi DJ, Grin PM, Khan M, Prat A, Zhou J, Fox-Robichaud AE, et al. Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis. *Shock*. 2016;46:672–80.

117. Leung AKK, Genga KR, Topchiy E, Cirstea M, Shimada T, Fjell C, et al. Reduced proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) function increases lipoteichoic acid clearance and improves outcomes in Gram-positive septic shock patients. *Sci Rep*. 2019;9:10588.

118. Shaler CR, Joshua C, Rudak PT, Arash M, Szabo PA, Tun-Abraham ME, et al. MAIT cells launch a rapid, robust and distinct hyperinflammatory response to bacterial superantigens and quickly acquire an anergic phenotype that impedes their cognate antimicrobial function: Defining a novel mechanism of superantigen-induced immunopathology. *PLoS Biol*. 2017;15:e2001930.

119. Laudanski K. Humanized mice as a tool to study sepsis—more than meets the eye. *Int J Mol Sci*. 2021;22:2403.

120. Atreya MR, Whitacre BE, Cvijanovich NZ, Bigham MT, Thomas NJ, Schwarz AJ, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 loss-of-function is detrimental to the juvenile host with septic shock. *Crit Care Med.* 2020;48:1513–20.
121. Vecchié A, Bonaventura A, Meessen J, Novelli D, Minetti S, Elia E, et al. PCSK9 is associated with mortality in patients with septic shock: Data from the ALBIOS study. *J Intern Med.* 2021;289:179–92.
122. Innocenti F, Gori AM, Giusti B, Tozzi C, Donnini C, Meo F, et al. Plasma PCSK9 levels and sepsis severity: An early assessment in the emergency department. *Clin Exp Med.* 2021;21:101–7.
123. Rannikko J, Jacome Sanz D, Ortutay Z, Seiskari T, Aittoniemi J, Huttunen R, et al. Reduced plasma PCSK9 response in patients with bacteraemia is associated with mortality. *J Intern Med.* 2019;286:553–61.
124. Molina S, Castet V, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol.* 2007;46:411–9.
125. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154–6.
126. Cruz P, Mo H, Mcconathy WJ, Nirupama S, Lacko AG. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: A review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front Pharmacol.* 2013;4:119.
127. Bhattacharya A, Chowdhury A, Chaudhury K, Shukla PC. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): A potential multifaceted player in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2021;1876:188581.
128. Yuan J, Cai T, Zheng X, Ren Y, Qi J, Lu X, et al. Potentiating CD8+ T cell antitumor activity by inhibiting PCSK9 to promote LDLR-mediated TCR recycling and signaling. *Protein Cell.* 2021;12:240–60.
129. Liu X, Bao X, Hu M, Chang H, Jiao M, Cheng J, et al. Inhibition of PCSK9 potentiates immune checkpoint therapy for cancer. *Nature.* 2020;588:693–8.
130. Caron J, Pène V, Tolosa L, Villaret M, Luce E, Fourrier A, et al. Low-density lipoprotein receptor-deficient hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells allow familial hypercholesterolemia modeling, CRISPR/Cas-mediated genetic correction, and productive hepatitis C virus infection. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:221.
131. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331–40.