ESTATINAS E HEMORREOLOGIA
PARTE 1 – EFEITOS NA COAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE

Filipe Vieira, Flávio Reis[1]

RESUMO

Os inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductase, ou estatinas, são potentes inibidores da síntese do colesterol, sendo uma das principais categorias de fármacos

hipolipemiantes. Estudos clínicos sugerem que os benefícios das estatinas podem não ser apenas devidos às suas propriedades antidislipidémicas, mas também aos seus efeitos pleiotrópicos, em grande medida resultantes da inibição da síntese de isoprenóides, com consequente influência nas vias de sinalização posteriores. Entre outras propriedades, as estatinas apresentam efeitos benéficos sobre os parâmetros hemorreológicos, podendo ser um contributo adicional para a prevenção de episódios do foro cardio e cerebrovascular. O presente artigo pretende rever os efeitos das estatinas na coagulação e fibrinólise, focando alguns dos factores mais pertinentes e os estudos mais significativos. A diminuição da formação de trombina, e da expressão de factores chave na coagulação, incluindo do factor tecidular (FT) são maioritariamente atribuídas ao efeito das estatinas na inibição da isoprenilação das proteínas sinalizadoras. Ainda não é certo até que ponto é que estas propriedades das estatinas, algumas delas resultantes de estudos *in vitro* e/ou em modelos animais, contribuem para a redução da mortalidade ou morbilidade cardio e cerebrovascular. Para além disso, ainda não está esclarecido se todas as estatinas têm o mesmo mecanismo ou propriedades anticoagulantes. Estudos clínicos futuros podem ajudar a entender o impacto das estatinas nas reacções da cascata de coagulação, e também sobre os principais marcadores da fibrinólise, e estabelecer o papel destes fármacos na prevenção e tratamento de trombose arterial em vasos ateroscleróticos e, possivelmente, na trombose venosa.

Palavras-chave: estatinas, efeitos pleiotrópicos, coagulação, fibrinólise.

[1] Morada para envio correspondência: Flávio Reis, PhD Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, IBILI, Sub-Unit 1 (Polo III), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra
3000-548 Coimbra, Portugal
Tel: +351 239480053; Fax: +351 239480065; E-mail: freis@fmed.uc.pt

INTRODUÇÃO

As estatinas são fármacos inibidores da enzima 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductase, que assim inibem a biossíntese do colesterol, sendo a sua principal aplicação terapêutica as hipercolesterolemias (Bhindi et al., 2008) e, por isso, são usadas na prevenção primária e secundária da doença arterial coronária (DAC). A sua importância clínica também advém da sua segurança relativa comparada com a de outros agentes hipolipemiantes e o seu efeito benéfico na mortalidade e morbilidade, particularmente na área de doença cardiovascular (DCV) (LaRosa et al., 1999; Zhou et al., 2010).

Uma vez que os níveis de colesterol plasmático estão fortemente relacionados com a doença coronária, assumiu-se que os efeitos benéficos da terapêutica com estatinas estavam relacionados totalmente com a redução do colesterol. Contudo, sabe-se hoje que existem efeitos independentes do colesterol ou pleiotrópicos (Zhou et al., 2009). As estatinas reduzem os eventos cardiovasculares não só em pacientes hipercolesterolemicos mas também normocolesterolémicos com DAC ou risco cardiovascular aumentado (Wang et al., 2008). Com efeito, vários ensaios têm mostrado uma redução significativa do risco de todas as manifestações clínicas do processo aterosclerótico. Para além disso, resultados a longo prazo de ensaios clínicos mostraram também diminuir significativamente a incidência e mortalidade total na DAC, bem como no enfarte do miocárdio (EM), em procedimentos de revascularização, no acidente vascular cerebral (AVC) e na doença vascular periférica. Estes efeitos benéficos das estatinas são independentes do género e são mais evidentes em pacientes de meia-idade e idosos (também os mais afectas por hipercolesterolemias), tanto em prevenção primária como secundária. Mais ainda, devido à sua fácil e cómoda administração, as estatinas mostraram uma alta taxa de *compliance* pelos pacientes (Bhindi et al., 2008). Em comparação com alguns dos outros fármacos hipocolesterolémicos, as estatinas têm um bom perfil de segurança, estando bem descritos os seus principais efeitos secundários, que incluem principalmente a rabdomiólise, miopatia, e possibilidade de toxicidade hepática e renal em determinados circunstâncias (Pasternak et al., 2002).

As estatinas produzem o seu efeito anti-colesterolémico ao inibir competitivamente a HMG-CoA reductase, inibindo assim a conversão de HMG--CoA em ácido L-mevalónico. Este mecanismo limita a taxa de biossíntese do colesterol, ao prevenir o acesso do substrato para os locais activos da enzima (Istvan et al., 2001). Em consequência deste mecanismo, ocorre diminuição da síntese hepática do colesterol, aumento da regulação dos receptores LDL e aumento da *clearance* plasmática do colesterol LDL. Para além disso, ao inibir a HMG--CoA reductase, as estatinas podem também inibir a síntese de importantes isoprenóides intermediários, como o farnesilpirofosfato (FPP) e o geranilgeranilpirofosfato (GGPP), que provêm do ácido L-mevalónico (Goldstein et al., 1990). O GGPP e o FPP servem de importantes ligações lipídicas para a modificação pós-

-translacional de proteínas intracelulares, como Ras, Rho e Rac (Van Aelst et al., 1997). Assim, para além da diminuição do colesterol também a inibição destas proteínas intracelulares dependentes de isoprenóides pode contribuir para alguns dos efeitos biológicos das estatinas (Figura 1).

O benefício das estatinas na aterosclerose estende-se para lá da sua capacidade hipolipemiante, estando descritos aspectos como a estabilização de placas ateroscleróticas e a redução da inflamação vascular, trombogenicidade e disfunção endotelial (Ito et al., 2006). Numerosos estudos têm demonstrado que os distúrbios da coagulação e fibrinólise contribuem para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose. As estatinas parecem apresentar efeitos benéficos sobre os parâmetros hemostáticos, principalmente aqueles que são factores de risco para a DCV (Krysiak et al., 2003).

ESTATINAS, MONÓXIDO DE AZOTO E PLAQUETAS

As estatinas inibem a actividade da oxidase do NADPH mediada pelo Rac1 (uma isoforma da superfamília de GTPases), e assim reduzem a produção de ROS induzido pela angiotensina II e a hipertrofia no músculo liso vascular e cardíaco (Takemoto et al., 2001; Wassmann et al., 2001). A activação do Rac1 na parede vascular tem sido associada a aterosclerose, proliferação neointimal, hipertrofia cardíaca e disfunção endotelial. O Rac1 tem múltiplos papéis em diversos processos celulares e na fisiologia cardiovascular. Assim, a inibição do Rac1 pode também contribuir para alguns efeitos pleiotrópicos das estatinas (Wang et al., 2008).

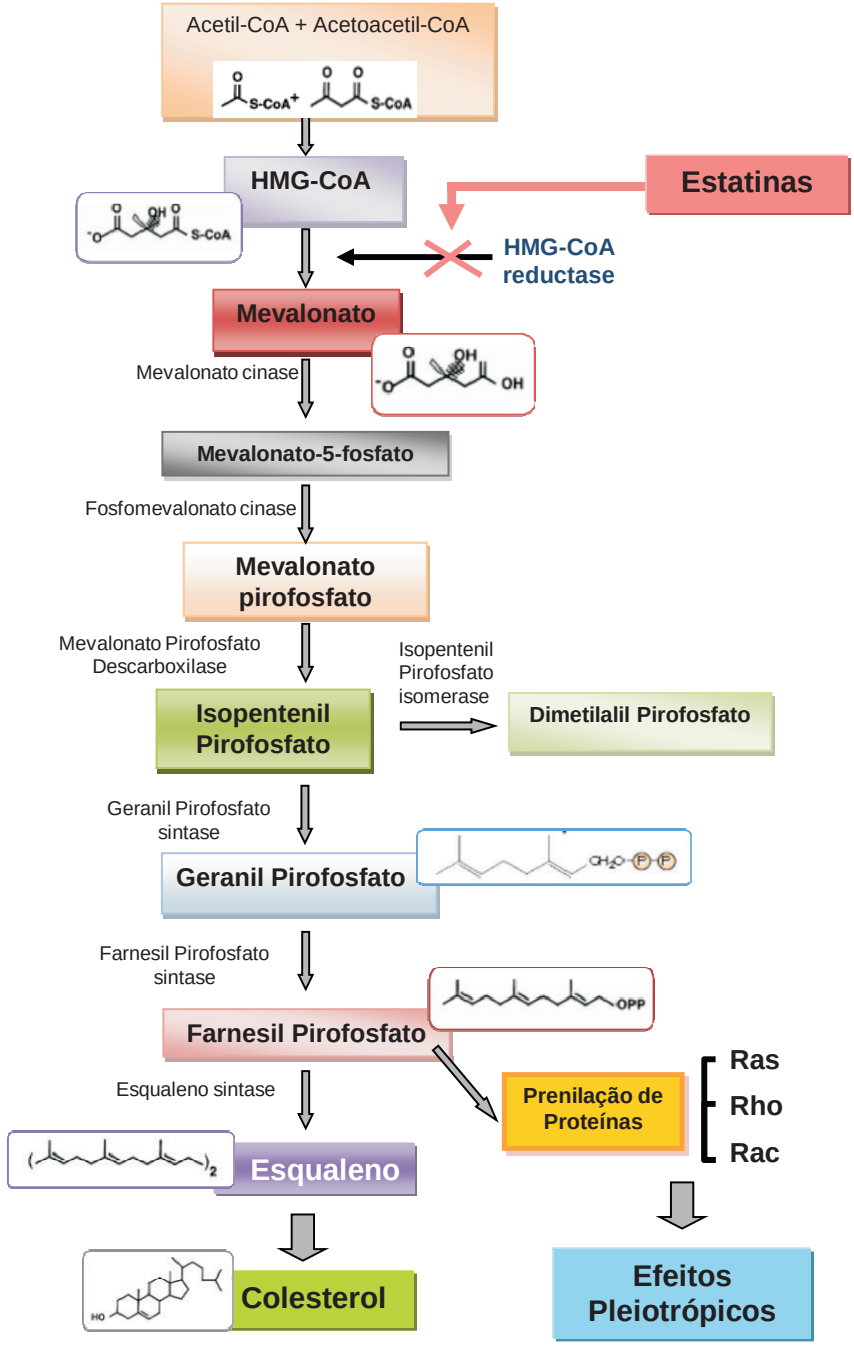

Fig. 1 – Via do mevalonato e síntese de colesterol e isoprenóides. As estatinas inibem a actividade da HMG-CoA reductase e reduzem a isoprenilação de moléculas sinalizadoras intracelulares, como Ras, Rho e Rac, propriedades que estão associados aos seus efeitos pleiotrópicos. Adaptado de Zhou et al. (2010).

O monóxido de azoto (NO) é um vasodilatador fisiológico sintetizado pelas sintetases do NO (NOS), e as suas principais funções biológicas

são: a inibição da agregação plaquetário, da adesão de leucócitos, da trombogénese, da proliferação de células musculares lisas e a supressão do stresse oxidativo (Miida et al., 2004). A função endotelial está normalmente prejudicada em pacientes com hipercolesterolemia ou aterosclerose (Egashira et al., 1993). Esta disfunção endotelial está associada a uma diminuição da síntese ou actividade do NO derivado do endotélio (Pritchard et al., 1995). As estatinas melhoram a disfunção endotelial ao aumentar a produção de NO. Em pacientes hipercolesterolemicos, o tratamento com estatinas atenua a vasoconstrição mediada por acetilcolina (um vasodilatador dependente do endotélio) e aumenta o fluxo sanguíneo plasmático (Egashira et al., 1993). Estes efeitos favoráveis foram observados no periodo das 24h de tratamento e na ausência de redução significativa do colesterol (Wassmann et al., 2003).

O mecanismo subjacente a este efeito protector das estatinas consiste no aumento da biodisponibilidade de NO, resultando no aumento da vasodilatação e facilitando o fluxo sanguíneo miocárdico regional em condições de hipóxia (Laufs et al., 1997). Para além disso, a produção de NO induzida por estatinas inibe o aumento da regulação de moléculas de adesão envolvidas em interacções de leucócitos-células endoteliais (Zhou et al., 2010). Finalmente, estatinas podem também preservar o potencial da membrana mitocondrial em resposta ao stresse oxidativo em monócitos de uma forma dependente do NO (Jones et al., 2003).

As plaquetas circulantes estão associadas à formação de trombos murais no local da rotura das placas e lesão vascular. Este mecanismo é fundamental na origem de síndromes coronários agudos (Zhou et al., 2010). A hipercolesterolemia tem sido associada com aumentos na reactividade plaquetário. As estatinas podem diminuir a reactividade plaquetário, através da redução dos níveis de colesterol plasmático (Zhou et al., 2010). No entanto, estudos recentes sugerem que alguns dos efeitos podem não ser dependentes do colesterol (Glynn et al., 2009). Um dos mecanismos propostos consiste no aumento da regulação mediada pelas estatinas da eNOS nas plaquetas, o que leva a diminuição da sua activaçao (Laufs et al., 2000). Para além disso, inibem a expressão do factor tecidular (FT) por macrófagos e, assim, reduzem o potencial trombótico da parede vascular (Aikawa et al., 2001). Foi ainda sugerido que os receptores activadores de peroxissomas proliferativos (PPARs) também podem mediar algumas das acções anti-plaquetárias das estatinas (Ali et al., 2009).

A análise de alguns estudos sugere uma relação entre o aumento do risco de AVC não hemorrágico com o aumento da concentração de colesterol. No entanto, esta relação não é tão forte como aquela entre a doença cardíaca isquémica e o colesterol (Miida et al., 2004). Apesar da correlação entre níveis elevados de colesterol e doença cerebrovascular permanecer controversa, as estatinas tornaram-se uma das terapêuticas mais importantes para a prevenção e tratamento de AVCs (Zhou et al., 2010). Muitos estudos clínicos consideraram que as estatinas reduzem o AVC em 10-30% (Miida et al.,

2004). Os efeitos benéficos das estatinas no AVC isquémico são provavelmente independente do colesterol, uma vez que estudos com outros fármacos modificadores lipídicos não tiveram sucesso na redução da incidência de AVC (Zhou et al., 2010). Este efeito é devido à redução da aterosclerose pré-cerebral e aos efeitos pleiotrópicos, como a melhoria da disfunção endotelial, estabilização da placa, inibição da agregação plaquetário e acções anti-inflamatórias (Miida et al., 2004).

EFEITOS DAS ESTATINAS NA COAGULAÇÃO

Efeitos no fibrinogénio

O fibrinogénio pode ser considerado como um factor de risco na doença cardiovascular (Krysiak et al., 2003). Níveis elevados de fibrinogénio representam um factor de risco para a DAC e trombose, e afectam significativamente a trombogenecidade plasmática (Undas et al., 2005). Vários estudos mostraram que em pacientes com níveis elevados de fibrinogénio o risco de DAC é superior aos pacientes que apresentam níveis de colesterol total aumentados. O risco de episódios coronários permanece baixo quando os níveis de fibrinogénio são baixos, mesmo que os níveis de colesterol sejam altos (Meade at al., 1986; Kannel et al., 1987). O fibrinogénio é também um factor de risco importante na mortalidade de pacientes com claudicação intermitente (Gensini et al., 1998).

Os efeitos das estatinas no fibrinogénio apresentam resultados contraditórios. Está descrito que as estatinas aumentam, diminuem ou, na maioria dos estudos, não apresentam qualquer efeito, nos níveis de fibrinogénio plasmático (Undas et al., 2005). Estas discrepâncias podem dever-se ao facto de se usarem diferentes métodos laboratoriais para medir os níveis de fibrinogénio, como métodos imunonefelométricos ou métodos imunoturbidimétricos (Krysiak et al., 2003). Estes métodos podem apresentar resultados errados quando os níveis de triglicerídeos estão aumentados (Song et al., 2001). O "*Clauss method*" parece ser o melhor para para medir os níveis de fibrinogénio no plasma; no entanto, níveis elevados de produtos de degradação do fibrinogénio (PDF) podem inibir a polimerização da fibrina, reduzindo assim os níveis de fibrinogénio no plasma quando medidos por este método (Clauss et al., 1957). Há ainda outras razões que podem explicar as discrepâncias encontradas. Os níveis de fibrinogénio plasmáticos aumentam em várias doenças agudas, como EM, infecção e trauma, hipertensão arterial (HTA), diabetes mellitus (DM) e deslipidémia, e ainda nas seguintes condições: envelhecimento, hábitos tabágicos, obesidade e contracepção oral (Heinrich et al., 1995; De Maat, 2001). Pelo contrário, os níveis de fibrinogénio diminuem em vegetarianos, após o consumo moderado de álcool, exercício físico e tratamento com derivados do ácido fíbrico, antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos, ticlopidina, pentoxifilina, defibrotide e algumas drogas anti-inflamatórias (Heinrich et al., 1995; De Maat, 2001). Os níveis de fibrinogénio também parecem depender do polimorfismo do seu gene na população (De Maat, 2001) e mos-

tram variação sazonal, o que pode também explicar as discrepâncias entre os diferentes estudos (Krysiak et al., 2003).

A acção pró-aterogénica complexa do fibrinogénio sugere que até pequenas alterações nos seus níveis podem contribuir para os benefícios cardiovasculares inicias e tardios da terapêutica com estatinas. No entanto, para que mais resultados conclusivos sejam obtidos serão necessários mais estudos com períodos padronizados de observação e dosagem, numa população representativa e com um método uniforme para medir os níveis de fibrinogénio (Krysiak et al., 2003).

Efeitos no factor tecidular

O factor tecidular (FT) é o principal iniciador fisiológico da coagulação sanguínea ao servir de co-factor ao factor VII activado (FVIIa), sem o qual é uma enzima inactiva (Morrissey, 2001). O FT é sintetizado por estimulação ou lesão de monócitos, macrófagos e células musculares lisas e endoteliais (Rosenson et al., 1998). Depois de se ligar ao FVIIa, o FT activa os factores IX e X, assim iniciando a cascata da coagulação.

Estudos com simvastatina mostraram que o efeito das estatinas no FT abrange não só macrófagos e monócitos mas também outros tipos de células, incluindo do músculo liso e do endotélio, inibindo a expressão do FT e também a sua actividade (Eto et al., 2002). Trabalhos realizados em células obtidas tanto de dadores saudáveis como de pacientes com hipercolestrolemia, nos quais foram usados vários tipos de estatinas (simvastatina, fluvastatina, cerivastatina e pravastatina), mostraram redução nos níveis e actividade do FT em culturas de monócitos e macrófagos humanos, estimulados ou não por factores inflamatórios (lipopolissacarídeos: LPS) e lipoproteínas aterogénicas (LDLs acetiladas) (Krysiak et al., 2003).

Vários estudos em animais foram efectuados para avaliar as alterações na expressão do FT em artérias, incluindo estudos em que foi administrada simvastatina e pravastatina em macacos *cynomolgus* em dieta aterogénica; cerivastatina em coelhos do tipo *Watanabe Heritable Hiperlipidemic* (WHHL), um modelo de hipercolesterolemia isolada; simvastatina em ratos com défice de apolipoproteina-E; fluvastatina em coelhos alimentados com colesterol. Estes trabalhos mostraram uma redução substancial na expressão do FT em lesões ateroscleróticas, em conjunto com a supressão da inflamação no ateroma, independentemente dos efeitos da redução lipídica das estatinas (Undas et al., 2005). O estudo com cerivastatina em coelhos do tipo WHHL mostrou que os efeitos da cerivastatina estão relacionados não só com a diminuição do número de macrófagos na placa aterosclerotica como também com a redução da expressão do FT nas células da membrana interna da aorta (Aikawa et al., 2001).

Em humanos foram encontradas evidências de que o FT está envolvido na acção *in vivo* das estatinas (Krysiak et al., 2003), comprovando efeitos idênticos aos observados nos trabalhos em animais (Undas et al., 2005). O estudo ATROCAP (*the Atorvastatin and Thrombogenicity of the Carotid Atherosclerotic Plaque*),

no qual foi administrada atorvastatina (a doses de 20 mg/dia durante 4-6 meses) a 59 pacientes com estenose carotídea bilateral, mostrou redução dos níveis de antigénio FT e da actividade em homogenados de placas aterogénicas. Os resultados apresentaram uma diminuição de 29% dos níveis de antigénio FT e diminuição de 56% da actividade do FT em placas ateroscleróticas removidas por endarterectomia em comparação com resultados obtidos em pacientes sujeitos a placebo (Cortellaro et al., 2002). Outro estudo em humanos demonstrou o efeito das estatinas na redução da actividade do FT e nos níveis de antigénio do FT. A administração de 20 mg/dia de Simvastatina durante 8 semanas em 24 pacientes com hipercolestrolemia poligénica apresentou uma redução acentuada na actividade do FT e nos níveis de antigénio do FT (em 61% e 68%, respectivamente) em monócitos estimulados (Ferro et al., 1997). Um efeito semelhante na actividade do FT foi produzido com doses baixas de simvastatina (10 mg/dia) tanto em monócitos não estimulados como estimulados por LPS de 15 pacientes que tinham sido submetidos a transplante cardíaco (Holschermann et al., 2000).

Em suma, os estudos até hoje realizados sobre o efeito das estatinas no FT apontam para uma diminuição da expressão do FT em monócitos e vários tipos de células vasculares (Undas et al., 2005).

Efeitos no factor VII

Alguns estudos clínicos mostraram que a actividade coagulante do factor VII (FVII) no plasma é um factor de risco para DAC (Krysiak et al., 2003). Em pacientes com história de EM foi encontrada alta actividade coagulante do FVII e em doentes com DAC instável e EM uma elevada razão FVII funcionante/antigénio do FVII (Gensini et al., 1998).

Os estudos que avaliaram o efeito das estatinas no FVII revelaram diferentes resultados, mas na maioria deles as estatinas apresentavam um efeito benéfico (Krysiak et al., 2003). Em pacientes hipercolesterolémicos os níveis de antigénio e a actividade coagulante do FVII diminuíram após 12 semanas de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina e após 4 a 6 semanas de tratamento com 20 mg/dia do mesmo fármaco. Estas alterações não se encontravam relacionadas com os efeitos hipolipemiantes deste fármaco (Undas et al., 2005). Em pacientes com história de EM a pravastatina reduziu os níveis de FVII. Em pacientes com hiperlipoproteinemia tipo IIa, IIb e IV a atorvastatina diminuiu os níveis de antigénio e/ou actividade coagulante do FVII. A administração de simvastatina em pacientes com hiperlipoproteinémia tipo II primária, de cerivastatina em pacientes com hiperlipidemia primária mista e de simvastatina e fluvastatina em pacientes com dislipidemia diabética reduziu a actividade coagulante do FVII (Krysiak et al., 2003). Contudo, também existem dados publicados que mostram que a simvastatina, a pravastatina e a fluvastatina não têm efeito nos níveis e/ou actividade coagulante do FVII (Undas et al., 2005). Outros estudos mostraram que a simvastatina produz uma diminuição insignificante na actividade coagulante do FVII em pa-

cientes com hiperlipoproteinemia tipo IIa e em pacientes com risco aumentado de DAC; a simvastatina diminuiu também os níveis de antigénio do FVII (Bo et al., 1991; Mitropoulos et al., 1997). Como o antigénio do FVII, a actividade coagulante do FVII e a actividade do FVIIa correlacionam-se com os níveis de triglicerídeos, ácidos gordos livres e colesterol, as discrepâncias entre os estudos pode resultar de diferentes critérios de inclusão e diferentes efeitos das estatinas no perfil lipídico (Krysiak et al., 2003). Neste contexto, mais estudos são necessários, usando ensaios específicos para quantificar os níveis de FVIIa no sangue circulante, para clarificar se as estatinas podem alterar a actividade do complexo iniciador TF-FVIIa não só pela expressão do FT mas também pela formação ou actividade do FVIIa (Undas et al., 2005).

Efeitos no inibidor da via do factor tecidular

O inibidor da via do factor tecidular (TFPI) apresenta um potencial anticoagulante marcado. Este está envolvido na regulação da coagulação induzida pelo FT (Hansen et al., 1995). O TFPI é o único inibidor fisiológico do complexo TF-FVIIa que também neutraliza a actividade catalítica do factor X activado. Oitenta % do TFPI encontra-se ligado a LDL, o que sugere que as alterações induzidas por fármacos no perfil lipídico podem afectar a actividade deste inibidor (Undas et al., 2005). Como a actividade anticoagulante do TFPI está relacionada com a fracção livre de TFPI, este facto parece ter um papel importante nos efeitos anticoagulantes das estatinas (Krysiak et al., 2003). No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados. Lovastatina, fluvastatina, simvastatina e atorvastatina mostraram diminuir a actividade do TFPI, causado pela redução nos complexos LDL-TFPI, e níveis totais de TFPI sem qualquer alteração no TFPI livre em indivíduos hiperlipidémicos (Undas et al., 2005). A inibição da HMG-CoA reductase promove a redução de antigénio do TFPI, o que estará muito provavelmente ligado à normalização dos distúrbios funcionais do endotélio, e não tanto à supressão do potencial anticoagulante do *pool* endotelial do TFPI livre (Hansen et al., 1995). A informação disponível indica que não há alterações significativas nos níveis/actividade do TFPI durante a terapêutica com estatinas (Undas et al., 2005).

Efeitos na trombina

A trombina, uma proteína do tipo serina protease, tem como principal função converter fibrinogénio em fibrina, realizando um papel fundamental no processo de coagulação. A trombina é produzida da protrombina, que é essencialmente o estado inactivo desta proteína (Krysiak et al., 2003). Para avaliar os efeitos das estatinas na trombina, a maioria dos estudos focaram os seguintes parâmetros: fragmento da protrombina (F1+2); fibrinopeptídeo A (FPA); e complexo trombina-antitrombina III (TAT) (Krysiak et al., 2003). O F1+2 é um polipeptídeo que é clivado da protrombina quando esta é convertida em trombina. O FPA resulta da

clivagem do fibrinogénio pela trombina. O F1+2 reflecte o último passo da formação da fibrina, enquanto o FPA reflecte a actividade da trombina. A trombina livre é inactivada quando se liga ao complexo TAT, sendo os níveis deste um marcador da activação da coagulação (Dahlback, 2000).

A terapêutica com estatinas resulta na diminuição da formação de trombina. Um estudo de 16 pacientes com EM prévios e níveis de colesterol elevados tratados com pravastatina (40 mg/dia), mostrou que a correcção do aumento do potencial trombogénico pode ser importante para benefícios clínicos nos primeiros meses após um episódio coronário agudo (Undas et al., 2005). De todas as estatinas, a simvastatina e a pravastatina são as melhores estudadas em termos dos efeitos na trombina. Vários estudos mostraram que a simvastatina diminuiu os níveis de F1+2, TAT e FPA no sangue venoso de pacientes com hipercolesterolemia (Krysiak et al., 2003). Foi também documentado que a simvastatina inibiu a conversão da protrombina em trombina, o que foi acompanhado por aumento do tempo de hemorragia em pacientes com DAC e níveis de colesterol alto *borderline* que se encontravam a tomar baixas doses de aspirina (75 mg/dia) (Musial et al., 2001).

São vários os estudos que incidiram sobre a análise do efeito das estatinas na trombina. Num estudo em que foi administrada pravastatina durante 3 meses em baixas doses (10 mg/dia) em pacientes com hipercolesterolemia houve uma diminuição nos níveis dos complexos TAT e FPA (Wada et al., 1993). Noutro estudo em que este fármaco foi administrado durante 8 semanas numa dose maior (40 mg/dia) foi observado um efeito semelhante nos níveis de F1+2 em pacientes com hipercolesterolemia (Cipollone et al., 2002). A administração de 15 mg/dia de pravastatina (mínimo durante 1 mês) inibiu a formação de trombina dependente de plaquetas, um parâmetro que se encontra aumentado em pacientes com hipercolesterolemia e hiperlipidemia mista. O efeito da pravastatina na formação de trombina resultou da melhoria da desregulação plaquetas--factores de coagulação porque a actividade e agregação das plaquetas não sofreu alterações nos pacientes, nem antes nem depois do tratamento (Aoki et al., 1997). Um tratamento de 16 semanas no qual foi administrado 20 mg/dia de pravastatina durante 8 semanas e 40 mg/dia de pravastatina durante as outras 8 semanas mostrou diminuição nos níveis de F1+2 e TAT, que estavam aumentados em pacientes com história de EM. O efeito favorável das estatinas na coagulação foi observado independentemente da gravidade das lesões ateroscleróticas nas artérias carotídeas (Di Garbo et al., 2000). O tratamento com cerivastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina e fluvastatina, durante 12 semanas, produziu um efeito inibitório na formação de trombina dependente de plaquetas em pacientes com hipercolesterolemia (Puccetti et al., 1999, 2001).

Alguns estudos sugerem que nem todas as estatinas produzem o mesmo efeito na formação de trombina e que este efeito pode ser diferente entre pacientes. Três meses de tratamento com atorvastatina, simvastatina ou pravastatina revelaram uma diminuição significativa nos niveis dos mar-

cadores plasmáticos da trombina no sangue venoso periférico. No entanto, as estatinas tiveram efeitos diferentes na formação de trombina. A simvastatina, administrada a 40 mg/dia durante 3 meses, inibiu a formação de trombina e a atorvastatina, administrada a 10 mg/dia, inibiu insignificantemente a formação de trombina; enquanto a pravastatina administrada a 40 mg/dia não apresentou qualquer efeito (Joukhadar et al., 2001). Deve ser referido que o papel da trombina na acção das estatinas na coagulação pode depender do sexo do paciente e tipo de estatina. Num estudo em que foi administrada simvastatina 20-40 mg/dia durante 6 meses houve inibição da formação de trombina apenas em mulheres (Dangas et al., 1999).

Foi demonstrado que o efeito das estatinas na formação de trombina resulta de dois mecanismos: da inibição da formação da trombina dependente de plaquetas e da inibição da expressão do FT. Esta afirmação baseia-se no facto de que quando o sistema de coagulação é activado *in vitro* por monócitos estimulados com LPS, o efeito da simvastatina nos níveis de F1+2 (uma diminuição proporcional à dose) correlaciona-se com o efeito inibitório do fármaco na expressão do FT (75), e também no facto de que a cerivastatina diminui os níveis de FT nos monócitos em que os níveis de FT estão aumentados na presença de plaquetas, o que indica uma interacção entre plaquetas e o FT na regulação da formação de trombina (Krysiak et al., 2003).

Num estudo em que foi administrada simvastatina 20 mg/dia durante 3 meses em pacientes com DAC avançada e níveis altos *borderline* de colesterol verificou-se que o atraso e redução da activação da protrombina eram acompanhados por alterações na actividade de outros factores de coagulação cujas funções são fisiologicamente reguladas pela trombina. Estas alterações incluem: diminuição da formação de cadeias leves e pesadas de factor V activado, diminuição da activação do factor XIII e inibição da proteólise do fibrinogeneo em fibrina (níveis reduzidos de FPA e fibrinopeptídeo B (FPB)) (Undas et al., 2001). Isto suporta o conceito de que as estatinas, por influenciarem a formação de trombina e a sua actividade, afectam a homeostasia, o que pode produzir efeitos clínicos favoráveis (Krysiak et al., 2003).

Uma vez que a trombina estimula vários processos aterogénicos, incluindo a migração/proliferação celular, tráfico de leucócitos e inflamação, é possível especular que o efeito das estatinas na trombina passa não só pela redução na formação da trombina mas pode também inibir a aterosclerose por vários mecanismos indirectos, como alterações na sinalização da trombina pela proteina G ligada a receptores activados por proteases (PARs) (Undas et al., 2005).

A activação do PAR-1 (receptor 1 da trombina activado por proteases), através de várias vias de sinalização, incluindo as proteinas isopreniladas Rho, resulta não só em alterações pós-transcripcionais mas também em alterações na transcrição de alguns genes (Minami et al., 2004). Por exemplo, o aumento da expressão do FT pela trombina, como documentado por vários investigadores, pode estar reduzido como resultado da diminuição, induzida pelas estatinas, na formação de trombina em adição

Tabela I. Efeitos das estatinas na coagulação: sumário de alguns dos principais resultados

– Diminuição da expressão do factor tecidular
– Diminuição da produção e/ou activação do factor VII
– Diminuição da produção de trombina
– Diminuição da activação do factor V
– Diminuição da clivagem do fribrinogénio
– Diminuição da activação do factor XIII
– Inexistência de alterações na síntese do fibrinogénio
– Aumento da expressão de trombomodulina
– Auemnto da inactivação do factor Va
– Diminuição da produção e/ou activação do inibidor da via do factor tecidular

Adaptado de Undas et al. (2005).

à inibição da isoprenilação de sinalizadores intermediários envolvidos na função do PAR-1 (Undas et al., 2005).

Foi proposta a hipótese de que este mecanismo relacionado com o PAR-1 tem particular importância na expressão dos efeitos anti-trombóticos da estatinas. No entanto, o efeito anti--trombóticos das estatinas através da activação do PAR-1 nas plaquetas e células vasculares, bem como nas vias de sinalização e transcrição da trombina, ainda não estão totalmente estabelecidos (Undas et al., 2005).

Alguns dos efeitos das estatinas nos principais factores de coagulação descritos na literatura estão sumariados na tabela I.

EFEITOS DAS ESTATINAS NA FIBRINÓLISE

Efeitos no tPA e PAI-1

Os marcadores mais importantes da actividade fibrinolítica são os níveis do inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1) e do activador do plasminogénio tecidular (tPA), razão pela qual têm sido usados para avaliar o efeito das estatinas na fibrinólise (Krysiak et al., 2003). Indivíduos com actividade plasmática aumentada de PAI-1 têm maior risco para doença cardiovascular, como DAC, enfarte agudo do miocárdio (EAM), reestenose pós-angioplastia coronária e doença vascular periférica (Nordt et al., 2000). O antigénio tPA está associado a risco de EM e AVC (Ridker et al., 1993,1994).

Estudos *in vitro* revelaram que a atorvastatina, a cerivastina, a fluvastatina, a lovastatina e a simvastatina, mas não a pravastatina, diminuíram a produção de PAI-1 em alguns tipos de células endoteliais e de músculo liso, em células humanas, mas também aumentaram a produção de tPA em células musculares lisas (Wiesbauer et al., 2002). Noutro estudo, a fluvastatina não alterou os níveis de PAI-1 no endotélio coronário (Mueck et al., 2001). Assim, parece pode ser excluído que as estatinas têm efeitos diferentes nas células endoteliais de diferentes vasos sanguíneos. As concentrações das estatinas usadas nestes estudos *in vitro* foram na maioria dos casos superiores às concentrações plasmáticas de pacientes tratados com estes fármacos. O efei-

to das estatinas nas PAI-1 e tPA parece ser clinicamente relevante, no entanto o mecanismo das alterações induzidas pelas estatinas na sua síntese ainda não é conhecido (Krysiak et al., 2003).

Ao interpretar estudos em humanos devemos ter em atenção vários factores. Os estudos clínicos acerca do papel das estatinas na regulação da fibrinólise não são tão esclarecedores como os estudos *in vitro*, havendo vários factores que podem influenciar os resultados dos estudos clínicos acerca do efeito das estatinas sobre os níveis e a actividade do PAI-1 e tPA. As diferenças entre os estudos ou o facto de que os marcadores periféricos circulantes da fibrinólise não serem bons marcadores da fibrinólise local podem ser responsáveis pelos resultados frustrantes ou contraditórios observados nos estudos clínicos (Krysiak et al., 2003).

Os efeitos das estatinas na fibrinólise podem ser alterados por vários factores como citocinas [como a interleucina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral α (TNF-α)], factores de crescimento [como o factor de crescimento transformador β1 (TGF-1β)] e hormonas (nomeadamente a actividade do sistema renina-angiotensina). Para além disso, os níveis de PAI-1 também estão relacionados com os níveis de triglicerideos, LDL e glicose oxidados no plasma, resistência à insulina e obesidade (Isaacsohn et al., 1994; Juhan-Vague et al., 2000; Tsikouris et al., 2002; Seljeflot et al., 2002). A morfologia da placa aterosclerótica também pode ter impacto nos resultados clínicos. Estudos *in vitro* revelaram que os efeitos da atorvastatina na síntese do PAI-1 só foram observados nos estádios iniciais da diferenciação monócitos/macrófagos (Lopez et al., 2001). Um estudo com pravastatina produziu efeitos semelhantes no PAI-1 e tPA, tanto em mulheres como em homens (Dangas et al., 1999). O género parece ter pouca importância apesar da associação bem documentada entre estrogénios e o sistema fibronólitico (Tsikouris et al., 2002).

Quanto ao tipo de estatinas, um estudo mostrou que a atorvastatina produziu um efeito mais forte no antigénio do tPA e na sua actividade do que a simvastatina (Seljeflot et al., 2002a; 2002b); no entanto, outros dados mostraram que a substituição de simvastatina por atorvastatina em pacientes com hipercolesterolemia primária não afectou os níveis plasmáticos de PAI-1, o que sugere que ambos os fármacos produzem efeitos semelhantes (Ito MK, 2001). Todavia, mais dados parecem ser necessários para avaliar de forma mais cabal esta questão.

A dose de estatinas administrada também parece influenciar os resultados obtidos. Foi documentado que eram necessários 40 mg/dia de pravastatina para produzir efeito na actividade do antigénio do tPA e PAI-1 (20 mg/dia não eram suficientes) (Krysiak et al., 2003). Também a duração do tratamento pode influenciar os efeitos clínicos das estatinas nos marcadores da fibronólise. Estudos *in vitro* mostraram que as estatinas afectavam a produção de tPA e PAI-1 dependendo do tempo (Krysiak et al., 2003). Em estudos clínicos que apresentavam tratamentos de curto período, o efeito das estatinas no tPA e PAI-1 foi pequeno. Por exemplo, a simvastatina administrada durante 8 semanas diminuia os níveis de anti-

génio do PAI-1 apenas quando era acompanhada por terapia hormonal de substituição concomitante (Sbarouni et al., 2000). A lovastatina administrada durante 8 semanas diminuiu insignificativamente os níveis de antigénio tPA e PAI-1 (Zambrana et al., 1997). A fluvastatina administrada durante 4 ou 8 semanas e a pravastatina administrada durante 6 semanas não afectaram o PAI-1 nem o tPA (Ambrosi et al., 2000; Lin et al., 2000; Newby et al., 2002). Em estudos clínicos que apresentavam tratamentos de longo período, o efeito das estatinas no PAI-1 e tPA eram normalmente mais pronunciadas. Seis meses de tratamento com pravastatina reduziu os níveis de antigénio de PAI-1 e de tPA em pacientes com ou sem DAC (Dangas et al., 1999; Dangas et al., 2000). Vinte semanas de tratamento com fluvastatina diminuiram significativamente os níveis de antigénio tPA em pacientes com DAC e leve/moderada hipercolesterolemia (Bevilacqua et al., 1997). Vinte e quatro semanas de tratamento com lovastatina diminuíram significativamente os níveis de antigénio PAI-1 em doentes com hipercolesterolemia, com ou sem risco de apresentar DAC (Isaacsohn et al., 1994). Um ano de tratamento com atorvastatina ou simvastatina aumentou a actividade do tPA e diminuiu insignificativamente a actividade do PAI-1 em pacientes com DAC (Seljeflot et al., 2002a; 2002b). Se esta hipótese for verdadeira, as estatinas devem ser administradas por um período mínimo de tempo para se observar todo o seu efeito na prevenção primária e secundária de eventos coronários agudos (Krysiak et al., 2003).

Há variações circadianas na actividade do sistema fibrinolítico, uma vez que tanto os níveis de tPA como de PAI-1 mostram um ritmo circadiano. Os antigenios do PAI-1 e tPA alcançam os seus picos mais altos de manhã e os seus valores mais baixos à tarde. Por outro lado, a actividade do tPA é maior pela tarde e menor de manhã. Esta relação deve ser considerada, mas não há estudos que permitam tirar conclusões definitivas (Krysiak et al., 2003).

Efeitos sobre outros agentes da fibrinólise

Existem outros marcadores fibrinolíticos, como o índice da actividade fibrinolítica (FAI), os D-dímeros, o plasminogénio ou a α2-antiplasmina, que são possíveis factores de risco cardiovasculares; no entanto, muito menos é conhecido sobre a influência das estatinas nestes parâmetros (Krysiak et al., 2003). Em pacientes hiperlipidémicos com DAC, o FAI aumentou 136% depois de 3 meses de tratamento com 10 mg/dia de atorvastatina (Atalar et al., 2002). Em pacientes em diálise peritoneal, o FAI aumentou 30,6% após tratamento com 10 mg/dia de simvastatina (Malyszko et al., 2001).

Estudos relacionados com os níveis de D-dímeros apresentaram resultados pouco esclarecedores. Após a administração de simvastatina (40 mg/dia) durante 8 semanas os níveis de D-dimeros diminuíram 26,3% (Lin et al., 2000) e após a administração de pravastatina (10 mg/dia) durante 3 semanas diminuíram 50% (Wada et al., 1993). No entanto, noutros estudos a administração de esta-

tinas provocou um aumento de aproximadamente 46% nos níveis de D-dímeros (Seljeflot et al., 2002). Existem ainda outros estudos nos quais as estatinas não tiveram efeito nos níveis de d-dímeros (Dangas et al., 1999; Joukhadar et al., 2001).

Estudos com lovastatina, atorvastatatina e simvastatina não afectaram os níveis de plasminogénio nem de α2-antiplasmina (Mayer et al., 1992; Zambrana et al., 1997; Bo et al., 2001).

Os fracos efeitos das estatinas nalguns estudos podem ser explicados pelo facto do sangue periférico não ser um bom material para avaliar a fibrinólise local. Mesmo efeitos fortes das estatinas na fibrinólise podem não ser observados quando o sangue periférico é avaliado. No entanto, até pequenos efeitos das estatinas na fibrinólise podem produzir um efeito benéfico para prevenir a progressão da DAC e o desenvolvimento de eventos cardiovasculares agudos (Krysiak et al., 2003), merecendo por isso mais investigação para um esclarecimento mais cabal da sua real influência.

CONCLUSÕES

As estatinas apresentam vários efeitos para além da diminuição dos níveis de colesterol. Estes efeitos incluem a melhoria da função endotelial, diminuição da inflamação vascular, inibição da proliferação de músculo liso ou imunomodulação. Há dados que sugerem que a maior parte destes efeitos são consequência da inibição da síntese de isoprenóides, que vão afectar várias vias de sinalização posteriores. Contudo, permanece por elucidar cabalmente até que extensão é que estes efeitos pleiotrópicos contribuem para os benefícios clínicos da terapêutica com estatinas.

Vários autores descobriram que as estatinas produzem um efeito favorável em alguns parâmetros da coagulação e da fibrinólise que se pensam serem factores de risco para o desenvolvimento de DCV. A diminuição da formação de trombina, de várias reacções pró-coagulantes desta e da expressão do FT são maioritariamente atribuídas ao efeito das estatinas na inibição da isoprenilação das proteínas sinalizadoras. Ainda não é certo até que ponto é que estas propriedades das estatinas encontradas *in vitro* e/ou em modelos animais contribuem para a redução da mortalidade ou morbilidade cardiovascular. Para além disso, ainda não é conhecido se todas as estatinas têm o mesmo mecanismo ou propriedades anticoagulantes. Estudos clínicos futuros podem ajudar a entender o impacto das estatinas nas reacções da cascata de coagulação e estabelecer o papel destas na prevenção e tratamento de trombose arterial em vasos ateroscleróticos e, possivelmente, na trombose venosa.

As estatinas parecem influenciar a coagulação e fibrinólise, ainda que os efeitos produzidos possam ser moderados. No entanto, dado que os distúrbios hemorreológicos têm um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações, mesmo uma normalização parcial destes distúrbios pode produzir benefícios clínicos significativos, merecendo por uma uma melhor clarificação.

REFERÊNCIAS

1. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. Circulation. 2001; 103(2):276-83.
2. Ali FY, Armstrong PC, Dhanji AR, Tucker AT, Paul-Clark MJ, Mitchell JA, Warner TD. Antiplatelet actions of statins and fibrates are mediated by PPARs. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29(5):706-11.
3. Ambrosi P, Aillaud MF, Habib G, Kreitmann B, Métras D, Luccioni R, Bouvenot G, Juhan-Vague I. Fluvastatin decreases soluble thrombomodulin in cardiac transplant recipients. Thromb Haemost. 2000; 83(1):46-8.
4. Aoki I, Aoki N, Kawano K, Shimoyama K, Maki A, Homori M, Yanagisawa A, Yamamoto M, Kawai Y, Ishikawa K. Platelet-dependent thrombin generation in patients with hyperlipidemia. J Am Coll Cardiol. 1997; 30(1):91-6.
5. Bevilacqua M, Bettica P, Milani M, Vago T, Rogolino A, Righini V, Santoli E, Norbiato G. Effect of fluvastatin on lipids and fibrinolysis in coronary artery disease. Am J Cardiol. 1997; 79(1):84-7.
6. Bhindi R, Ormerod O, Newton J, Banning AP, Testa L. Interaction between statins and clopidogrel: is there anything clinically relevant? QJM. 2008; 101(12):915-25.
7. Bo M, Bonino F, Neirotti M, Gottero M, Pernigotti L, Molaschi M, Fabris F. Hemorheologic and coagulative pattern in hypercholesterolemic subjects treated with lipid-lowering drugs. Angiology. 1991; 42(2):106-13.
8. Bo M, Nicolello MT, Fiandra U, Mercadante G, Piliego T, Fabris F. Treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia: atorvastatin vs simvastatin. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2001; 11(1):17-24.
9. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazia M, Falco A, Cuccurullo F, Davì G. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. Circulation. 2002; 106(4):399-402.
10. Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E, Rossi F, Negri A, Tremoli E, Gabrielli L, Camera M. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. Thromb Haemost. 2002; 88(1):41-7.
11. Dahlbäck B. Blood coagulation. Lancet. 2000; 355(9215):1627-32.
12. Dangas G, Badimon JJ, Smith DA, Unger AH, Levine D, Shao JH, Meraj P, Fier C, Fallon JT, Ambrose JA. Pravastatin therapy in hyperlipidemia: effects on thrombus formation and the systemic hemostatic profile. J Am Coll Cardiol. 1999; 33(5):1294-304.
13. Dangas G, Smith DA, Badimon JJ, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Cohen AM, Levine D, Fallon JT, Ambrose JA. Gender differences in blood thrombogenicity in hyperlipidemic patients and response to pravastatin. Am J Cardiol. 1999; 84(6):639-43.
14. Dangas G, Smith DA, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Fier C, Cohen AM, Fallon JT, Badimon JJ, Ambrose JA. Pravastatin: an antithrombotic effect independent of the cholesterol-lowering effect. Thromb Haemost. 2000; 83(5):688-92.
15. de Maat MP. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. Ann N Y Acad Sci. 2001;936:509-21.
16. Di Garbo V, Bono M, Di Raimondo D, De Simone R, Raneli G, Avellone G. Non lipid, dose-dependent effects of pravastatin treatment on hemostatic system and inflammatory response. Eur J Clin Pharmacol. 2000; 56(4):277-84.
17. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Takeshita A. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 1993; 91(1):29-37.
18. Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Lüscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. Circulation. 2002; 105(15):1756-9.
19. Ferro D, Basili S, Alessandri C, Mantovani B, Cordova C, Violi F. Simvastatin reduces monocyte-tissue-factor expression type IIa hypercholesterolaemia. Lancet. 1997; 350(9086): 1222.
20. Gensini GF, Comeglio M, Colella A. Classical risk factors and emerging elements in the risk profile for coronary artery disease. Eur Heart J. 1998; 19 Suppl A:A53-61.
21. Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Ridker PM. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism. N Engl J Med. 2009; 360(18):1851-61.
22. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 1990; 343(6257):425-30.
23. Hansen JB, Huseby KR, Huseby NE, Sandset PM, Hanssen TA, Nordøy A. Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipoproteinemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; 15(7):879-85.
24. Heinrich J, Assmann G. Fibrinogen and cardiovascular risk. J Cardiovasc Risk. 1995; 2(3):197-205.
25. Hölschermann H, Hilgendorff A, Kemkes-Matthes B, Schönburg M, Bauer EP, Tillmanns H, Haberbosch W. Simvastatin attenuates vascular hypercoagulability in cardiac transplant recipients. Transplantation. 2000; 69(9):1830-6.
26. Isaacsohn JL, Setaro JF, Nicholas C, Davey JA, Diotalevi LJ, Christianson DS, Liskov E, Stein EA, Black HR. Effects of lovastatin therapy on plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels. Am J Cardiol. 1994; 74(7):735-7.
27. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science. 2001; 292(5519):1160-4.
28. Ito MK, Talbert RL, Tsimikas S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction. Pharmacotherapy. 2006; 26(7 Pt 2):85S-97S.
29. Ito MK. The effects of converting from simvastatin to atorvastatin on plasminogen activator inhibitor type-1. J Clin Pharmacol. 2001; 41(7):779-82.

30. Jones SP, Teshima Y, Akao M, Marbán E. Simvastatin attenuates oxidant-induced mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. Circ Res. 2003; 93(8):697-9.
31. Joukhadar C, Klein N, Prinz M, Schrolnberger C, Vukovich T, Wolzt M, Schmetterer L, Dorner GT. Similar effects of atorvastatin, simvastatin and pravastatin on thrombogenic and inflammatory parameters in patients with hypercholesterolemia. Thromb Haemost. 2001; 85(1):47-51.
32. Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. Ann Med. 2000; 32 Suppl 1:78-84.
33. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. JAMA. 1987; 258(9):1183-6.
34. Krysiak R, Okopień B, Herman Z. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. Drugs. 2003; 63(17):1821-54.
35. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. JAMA. 1999;282(24):2340-6.
36. Laufs U, Fata VL, Liao JK. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem. 1997; 272(50):31725-9.
37. Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm M, Dirnagl U, Endres M. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. Stroke. 2000; 31(10):2442-9.
38. Lin TH, Huang CH, Voon WC, Yen HW, Lai HM, Liang HY, Lu YH, Lee KT, Lee CS, Lai WT, Sheu SH. The effect of fluvastatin on fibrinolytic factors in patients with hypercholesterolemia. Kaohsiung J Med Sci. 2000; 16(12):600-6.
39. Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Deprez-Beauclair P, Laouenan H, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin on plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis in human monocytes/macrophages. J Cardiovasc Pharmacol. 2001; 37(6):762-8.
40. Małyszko J, Małyszko JS, Hryszko T, Myśliwiec M. Effects of long-term treatment with simvastatin on some hemostatic parameters in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Am J Nephrol. 2001; 21(5):373-7.
41. Mayer J, Eller T, Brauer P, Solleder EM, Schäfer RM, Keller F, Kochsiek K. Effects of long-term treatment with lovastatin on the clotting system and blood platelets. Ann Hematol. 1992; 64(4):196-201.
42. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. Lancet. 1986; 2(8506):533-7.
43. Miida T, Hirayama S, Nakamura Y. Cholesterol-independent effects of statins and new therapeutic targets: ischemic stroke and dementia. J Atheroscler Thromb. 2004;11(5):253-64.
44. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, Aird WC. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(1):41-53.
45. Mitropoulos KA, Armitage JM, Collins R, Meade TW, Reeves BE, Wallendszus KR, Wilson SS, Lawson A, Peto R. Randomized placebo-controlled study of the effects of simvastatin on haemostatic variables, lipoproteins and free fatty acids. The Oxford Cholesterol Study Group. Eur Heart J. 1997; 18(2):235-41.
46. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. Thromb Haemost. 2001; 86(1):66-74.
47. Mueck AO, Seeger H, Deuringer FU, Wallwiener D. Effect of an estrogen/statin combination on biochemical markers of endothelial function in human coronary artery cell cultures. Menopause. 2001; 8(3):216-21.
48. Musiał J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. Thromb Haemost. 2001; 85(2):221-5.
49. Newby DE, Witherow FN, Wright RA, Bloomfield P, Ludlam CA, Boon NA, Fox KA, Webb DJ. Hypercholesterolaemia and lipid lowering treatment do not affect the acute endogenous fibrinolytic capacity in vivo. Heart. 2002; 87(1):48-53.
50. Nordt TK, Bode C. Impaired endogenous fibrinolysis in diabetes mellitus: mechanisms and therapeutic approaches. Semin Thromb Hemost. 2000; 26(5):495-501.
51. Pasternak RC, Smith SC Jr, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C; American College of Cardiology; American Heart Association; National Heart, Lung and Blood Institute. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. J Am Coll Cardiol. 2002;40(3):567-72.
52. Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. Circ Res. 1995; 77(3):510-8
53. Puccetti L, Bruni F, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Console E, Auteri A, Pasqui AL. Effect of diet and treatment with statins on platelet-dependent thrombin generation in hypercholesterolemic subjects. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2001; 11(6):378-87.
54. Puccetti L, Bruni F, Di Renzo M, Bova G, Cercignani M, Iadanza A, Auteri A, Pasqui AL. Hypercoagulable state in hypercholesterolemic subjects assessed by platelet-dependent thrombin generation: in vitro effect of cerivastatin. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 1999; 3(5):197-204.
55. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ, Manson JE, Vaughan DE. Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. Lancet. 1994; 343(8903):940-3.
56. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. Lancet. 1993; 341(8854):1165-8.
57. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. JAMA. 1998; 279(20):1643-50.

58. Sbarouni E, Melissari E, Kyriakides ZS, Kremastinos DT. Effects of simvastatin or hormone replacement therapy, or both, on fibrinogen, factor VII, and plasminogen activator inhibitor levels in postmenopausal women with proven coronary artery disease. Am J Cardiol. 2000; 86(1):80-3.
59. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. Thromb Res. 2002; 105(4):285-90.
60. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. Atherosclerosis. 2002; 162(1):179-85.
61. Song JC, White CM. Do HMG-CoA reductase inhibitors affect fibrinogen? Ann Pharmacother. 2001; 35(2):236-41.
62. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21(11):1712-9.
63. Tsikouris JP, Suarez JA, Meyerrose GE. Plasminogen activator inhibitor-1: physiologic role, regulation, and the influence of common pharmacologic agents. J Clin Pharmacol. 2002; 42(11):1187-99.
64. Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Statins and blood coagulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(2):287-94.
65. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. Genes Dev. 1997; 11(18):2295-322.
66. Wada H, Mori Y, Kaneko T, Wakita Y, Nakase T, Minamikawa K, Ohiwa M, Tamaki S, Tanigawa M, Kageyama S, et al. Elevated plasma levels of vascular endothelial cell markers in patients with hypercholesterolemia. Am J Hematol. 1993; 44(2):112-6.
67. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. Trends Mol Med. 2008;14(1):37-44.
68. Wassmann S, Faul A, Hennen B, Scheller B, Böhm M, Nickenig G. Rapid effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition on coronary endothelial function. Circ Res. 2003; 93(9):e98-103.
69. Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Konkol C, Sauer H, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. Mol Pharmacol. 2001; 59(3):646-54.
70. Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. Br J Pharmacol. 2002; 135(1):284-92.
71. Zambrana JL, Velasco F, Castro P, Concha M, Vallés F, Montilla P, Jimenéz-Perepérez JA, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F. Comparison of bezafibrate versus lovastatin for lowering plasma insulin, fibrinogen, and plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in hyperlipemic heart transplant patients. Am J Cardiol. 1997; 80(7):836-40.
72. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. – Basic research and clinical perspectives -. Circ J. 2010;74(5):818-26.
73. Zhou Q, Liao JK. Statins and cardiovascular diseases: from cholesterol lowering to pleiotropy. Curr Pharm Des. 2009;15(5):467-78.