UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA APARECIDA LORENCINI

Estudo clínico fase I/II de segurança e eficácia de um
Medicamento Inovador para Tratamento de Litíase
Renal

Ribeirão Preto
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA APARECIDA LORENCINI

Estudo clínico fase I/II de segurança e eficácia de um
Medicamento Inovador para Tratamento de Litíase
Renal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lorencini, Daniela Aparecida

Estudo clínico fase I/II de segurança e eficácia de um Medicamento Inovador para Tratamento de Litíase Renal.

72 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Coelho, Eduardo Barbosa

1. Ensaio clínico. 2. Segurança. 3. Eficácia. 4. Nefrolitíase. 5. Cálculos renais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Aparecida Lorencini

Estudo clínico fase I/II de segurança e eficácia de um Medicamento Inovador
para Tratamento de Litíase Renal. Ribeirão Preto, 2018.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a).

Instituição:

Assinatura: _____

A longa caminhada acadêmica se assemelha a aventura de Jenner e Natércia depois que olharam para aquela fotografia, no livro **8 Minutos Dentro De Uma Fotografia**, um dia você está na sala conhecendo seu orientador e num outro correndo com coletas de dados, lendo milhares de artigos, se perdendo com ABNT, Vancouver... e você faz amigos, muitos amigos. Mas quando chega a proximidade da data de entrega os dias passam a ter apenas 5 horas. Quando você sai dessa história percebe que é outra pessoa, o conhecimento te faz transcender, o que antes era uma casa agora é um país inteiro. Em tempos de absoluta depuração só se salva aquele que duvida sempre, que busca conhecimento. Só o conhecimento vence a morte! Que a ciência me torne uma pessoa mais humana capaz de ver as coisas com amplitude a ponto de saber que me colocar do outro e de ver os problemas como um artista enxerga a vida mesmo na morte, como um artista que sabe que a vida é desprovida de tempo. Que a ciência seja a arte que vence a morte!

Agradecimentos

Ao CNPq e FAEPA pelo apoio financeiro para a execução do projeto (Processo 470747/2014-5).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

A empresa Apis-Flora, na figura da Prof. Dr Andresa Aparecida Berretta e ao Pesquisador da FCFRP-USP, Prof. Dr. Jairo Kennup Bastos. Sem o desenvolvimento farmacêutico inovador e sem a dedicação aos estudos preliminares realizados por ambos não seria possível atingir esta fase de desenvolvimento clínico.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho, por todo conhecimento compartilhado e pela paciência ao fazê-lo.

À minha família por todo o apoio e compreensão!

A Tatiane por ser tão companheira e me ajudar a ver a luz nos dias tenebrosos “my person”.

Aos meus amigos que de alguma forma sempre se fizeram presentes e me divertiram e consolaram na medida.

Ao amor da minha vida, chegou no final, mas me inspirou e contribuiu com sua paciência e carinho!

Eu acredito na intuição e na inspiração. A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, enquanto a imaginação abraça o mundo inteiro, estimulando o progresso, dando à luz à evolução.

Albert Einstein

RESUMO

LORENCINI, Daniela Aparecida. **Estudo clínico fase I/II de segurança e eficácia de um Medicamento Inovador para Tratamento de Litíase Renal**. 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A nefrolitíase é uma doença comum e recorrente com prevalência mundial variando de 5 a 20%, com pico de incidência entre a 3ª e 4ª década de vida e com maior prevalência em homens (3:1), frequentemente associado a atendimento de urgência. O tratamento da litíase ocorre em duas fases. Inicialmente, no episódio agudo de dor pela passagem do cálculo pelas vias urinárias, cujo objetivo terapêutico é o alívio da dor e a expulsão do cálculo. Para aqueles doentes com cálculos de repetição, o objetivo terapêutico será o de reduzir a formação de novos cálculos. Para ambos os objetivos, o arsenal terapêutico disponível é limitado. Estudos pré-clínicos com o Extrato Padronizado de *C. langsdorffii* – EPC-AF® (Apis-Flora, Ribeirão Preto, Brasil), um composto vegetal extraído da bioflora nacional, mostraram perfil de segurança e eficácia deste composto como potencial medicamento para o tratamento da litíase renal. Desta forma, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o perfil de segurança em humanos e eficácia preliminar do EPC-AF®. Foi realizado um estudo clínico fase I/IIa, randomizado, duplo-cego, comparado com placebo, de dose única de forma ascendente. As doses utilizadas foram de 175 mg, 350 mg, 700 mg, 1,4 g e 2,8 g administradas por via oral em dose única após jejum de 12h. Foram estudados grupos de 6 voluntários sadios por dose. Em cada grupo, 4 voluntários receberam de forma randomizada e cega o EPC-AF® e 2 voluntários placebo. O escalonamento para doses mais altas foi feito após a comprovação de que não houve eventos adversos com a dose previamente usada. No total, 30 voluntários sadios foram estudados na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP. Foram coletados dados clínicos e laboratoriais para segurança, com destaque para toxicidade renal, onde foram estudados variação das concentrações urinárias de NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase), KIM-1 (Kidney injury molecule-1) e alfa-1-microglobulina, além da dosagem sérica de cistatina C, um marcador da taxa de filtração glomerular. Os dados de eficácia preliminar foram

centrados na análise do perfil bioquímico urinário (pH, cálcio, citrato, oxalato, ácido úrico, magnésio e fosforo) em amostras de urina de 24h, coletadas antes e imediatamente após o uso de EPC-AF® ou placebo. Os resultados obtidos mostraram que o EPC-AF® é seguro nas doses de 175 a 2,8 g por via oral. Não foi observada variações significativas das concentrações de 24h dos principais componentes facilitadores ou inibidores da formação de cálculos urinários.

Palavras chave: Ensaio clínico fase I, Segurança, Eficácia, Nefrolitíase, Cálculos renais, Fabaceae.

ABSTRACT

LORENCINI, D. A. **A Phase I/II clinical trial for evaluating safety and efficacy of an innovative medicine to nephrolithiasis treatment.** 2019. 89f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Nephrolithiasis is a common and recurrent disease with a worldwide prevalence varying from 5 to 20%, with a incidence peak between the 3rd and 4th decade of life and with a higher prevalence in men than women (3: 1), often associated with urgent care. The treatment of lithiasis occurs in two phases. Firstly, in the acute episode of pain by the passage of the calculus through the urinary tract, whose therapeutic objective is to relieve pain and expel the stone. For those patients with recurrent stones the therapeutic goal will be reducing the formation of new stones. For both objectives, the available therapeutic arsenal is limited. Preclinical studies with C. langsdorffii standard extract (EPC-AF®, Apis-Flora, Ribeirão Preto, Brazil), an herbal compound extracted from a Brazilian native plant, showed a safety and efficacy profile of this compound as a potential drug for the treatment of renal lithiasis. Thus, the objective of this study was to evaluate the safety profile and the preliminary efficacy of EPC-AF® in healthy volunteers. A phase I/IIa clinical trial, randomized, double-blinded, placebo-controlled single-ascending dose was conducted. The doses used were 175 mg, 350 mg, 700 mg, 1.4 g and 2.8 g administered orally in a single dose after 12 h fasting. Groups of 6 healthy volunteers per dose were studied. In each group, 4 volunteers randomly and blindly received EPC-AF® and 2 volunteers received placebo. The escalation to higher doses was done after the confirmation that there were no adverse events with the dose previously used. In total, 30 healthy volunteers were studied on the General Clinical Research Centre of local teaching Hospital. Clinical and laboratory data were collected for safety, with emphasis on renal toxicity, where urinary concentrations of NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase), KIM-1 (Kidney injury molecule-1) and alpha-1-microglobulin were measured, in addition to serum cystatin C, a marker of the glomerular filtration rate. Preliminary efficacy data were centered on urinary biochemical profile analysis (pH, calcium, citrate, oxalate, uric acid, magnesium and phosphorus) in 24-hour urine

samples collected before and immediately after use of EPC-AF® or placebo. The results showed that EPC-AF® is safe in doses of 175 to 2.8 g orally. No significant variations in 24-h concentrations of the major components facilitating or inhibiting the formation of urinary stones were observed.

Key words: Phase I Clinical trial, Safety, Efficacy, Nephrolithiasis, Kidney stones, fabaceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1 – Fluxo do protocolo.....	37
Figura 2 - Triagem.....	39
Figura 3 - Fluxograma de recrutamento, seleção e análise do estudo clínico, de acordo com CONSORT.....	47
Figura 4 - Valores de hemoglobina	48
Figura 5 - Valores de Hematócrito.....	49
Figura 6 - Valores de Plaquetas	50
Figura 7 - Valores de tempo de Protrombina.....	52
Figura 8 - Valores de TTPA (INR)	52
Figura 9 - Comportamento dos marcadores de Hepatotoxicidade	55
Figura 10 - Variação dos valores de bilirrubinas	56
Figura 11 - Valores de TFG.....	58
Figura 12 - Box-Plot de Tukey.....	59
Figura 13 - Comportamento da pressão arterial sistólica (PAS).....	62
Figura 14 - Valores Eletrocardiográficos	63
Figura 15 - Comportamento dos valores séricos de testosterona	64
Figura 16 - Comportamento dos valores séricos de androstenidiona	66
Figura 17 - Comportamento dos valores séricos de FSH (A) e LH (B).....	67
Figura 18- Comportamento dos valores séricos de glicemia.....	68
Figura 19 - Comportamento dos valores séricos de colesterol.....	69
Figura 20 - Comportamento dos valores séricos de ácido úrico.....	70
Figura 21 - Relação entre a dose e as razões (24/basal).....	73
Figura 22 - Razão (24h/basal) das concentrações.....	74

TABELAS:

Tabela 1 - Resumo dos principais estudos realizados com citrato de potássio na prevenção de novos episódios de litíase.....	24
Tabela 2 - Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo	45
Tabela 3 - Comportamento dos valores de hemoglobina (g/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	48
Tabela 4 - Comportamento dos valores de hematócrito (%) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	49
Tabela 5 - Comportamento dos valores de plaquetas (cel x 10 ⁶) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).....	50
Tabela 6 - Comportamento dos valores de TP (INR, razão normalizada internacional) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	51
Tabela 7 - Comportamento dos valores de TTPA (INR, razão normalizada internacional) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	51
Tabela 8 - Comportamento dos valores de TGO, TGP, Gama-GT, Fosfatase alcalina e Bilirrubinas antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	54
Tabela 9 - Valores observados da TFG, estimada a partir da creatinina sérica (CKD-EPI 2009). Foram reportados os valores com média e IC95% para os períodos basal, 24h e 30d após o uso de EPC-AF® ou placebo.....	58
Tabela 10 - Comportamento dos marcadores tubulares NAG, NGAL, alfa-1-microglobulina e KIM-1 urinários antes e após a administração de placebo ou EPC-AF® . Valores expressos como relação entre as dosagens 24h/basal e descritos como mediana e intervalo interquartil 25 - 75%.	59
Tabela 11 - Comportamento dos valores clínicos de Frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® . Valores em média (IC95%).	61
Tabela 12 - Valores eletrocardiográficos para FC, intervalo PR, QT e QRC de acordo com grupo experimental. Valores em média (IC95%).	61
Tabela 13 - Comportamento dos valores séricos de testosterona (ng/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%)..	64

Tabela 14 - Comportamento dos valores séricos de androstenediona (ng/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	65
Tabela 15 - Comportamento dos valores séricos de FSH (U/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).....	66
Tabela 16 - Comportamento dos valores séricos de LH (U/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	67
Tabela 17 - Comportamento dos valores séricos de glicemia (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).....	68
Tabela 18 - Comportamento dos valores séricos de colesterol total (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	69
Tabela 19 - Comportamento dos valores séricos de ácido úrico (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).	70
Tabela 20 - Razão (24h/basal) das concentrações urinárias de cálcio, ácido úrico, citrato, oxalato, sódio, magnésio e fostato e do pH urinário de acordo com o grupo experimental (placebo ou EPC-AF®). Valores em mediana e intervalo interquartil 25 a 75%.	72

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C. Langsdorffi	<i>Copaífera langsdorffi</i>
CE	Comunicado Especial
ECG	Eletrocardiograma
EPC-AF®	Extrato Padronizado de Copaífera
FC	Frequência Cardíaca
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante'
Gama GT	Gama Glutamil Transferase
HCFMRP-USP	Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KIM-1	Kidney Injury Molecule 1
LH	Hormônio Luteinizante
NAG	N-Acetyl Beta D glucosaminidase
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
REBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
RPM	Rotações por Minuto
SAD	Single Ascending Dose
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 FISIOPATOLOGIA LITÍASE RENAL	20
2. HIPÓTESE.....	29
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E ASPECTOS BIOÉTICOS.....	34
4.2. MEDICAMENTO	35
4.3. PROTOCOLO DE PESQUISA	35
4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	39
4.4.1. SANGUE PERIFÉRICO	39
4.4.2. URINA ROTINA.....	39
4.4.3. URINA DE 24 HORAS	40
4.5. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	40
4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE NEFROTOXICIDADE DO EPC-AF®.....	40
4.7. AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DO EPC-AF®	41
4.8. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA	42
4.9. AVALIAÇÃO CARDÍACA	42
4.10. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	42
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	44
5.1. CASUÍSTICA.....	45
5.2. ANÁLISE DE SEGURANÇA.....	47
5.2.1. SISTEMA LINFO-HEMATOPOIÉTICO.....	47
5.2.1.1. HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO E PLAQUETAS.....	47
5.2.1.2. TP/TTPA.....	51
5.2.2. FUNÇÃO HEPÁTICA.....	53
5.2.3. SISTEMA URINÁRIO	57
5.2.3.1. CLEARANCE DE CREATININA, CISTATINA C E MARCADORES DE LESÃO TUBULAR	57
5.2.4. SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	60

5.2.5. SISTEMA REPRODUTIVO	64
5.2.5.1. TESTOSTERONA	64
5.2.1.2. ANDROSTENEDIONA.....	65
5.2.1.3. FSH/LH.....	66
5.2.6. SISTEMA ENDÓCRINO-METABÓLICO	68
5.2.6.1. GLICEMIA	68
5.2.6.2. COLESTEROL TOTAL	69
5.2.6.3. ÁCIDO ÚRICO	70
5.3. ANÁLISE DE EFICÁCIA.....	71
6. DISCUSSÕES	75
6.1 DISCUSSÃO DE SEGURANÇA	76
6.2 DISCUSSÃO EFICÁCIA.....	79
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

O cálculo renal é uma afecção frequente na prática clínica com prevalência variável na população adulta oscilando entre 5 e 20%, com alto índice de recorrência de até 50%, em cinco anos (CHAMBÔ, 2004).

O pico da incidência da litíase renal ocorre entre os 30 e 40 anos e há maior ocorrência entre os indivíduos do sexo masculino, sendo estimada a proporção de 3:1 com relação as mulheres (CHAMBÔ, 2004; SCHOR; HEILBERG, 2004). Em 1990, o estudo multicêntrico brasileiro (MULTILIT) reuniu dados epidemiológicos sobre litíase renal observados em vários centros universidades nacionais e observou incidência média em torno de 10% (COSTA, 2006). Nos Estados Unidos a incidência é de 20% (CHAMBÔ, 2004) e na Espanha de 15% (GARCIA, 2002), mostrando a alta prevalência desta doença. A litíase é ocasionada nos rins pela formação de cálculos que podem ter diferentes composições químicas, sendo aqueles de oxalato de cálcio, isolado ou associado ao fosfato de cálcio, os responsáveis por 80% dos casos clínicos (BASHIR, GILANI, 2009; ATMANI *et al.*, 2003). Sua formação é associada a diversos fatores como alimentação, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas (LIU *et al.*, 2009), infecção crônica, defeitos anatômicos e desordens metabólicas e hereditária (AJAYI *et al.*, 2007; KRIEGER *et al.*, 1996). A dor decorrente da eliminação de um cálculo renal surge subitamente e torna-se rapidamente insuportável, podendo causar náusea e vômito (THOMAS e HALL, 2005), ocasionando falta ao trabalho e demanda a serviços de urgência.

1.1 FISIOPATOLOGIA LITÍASE RENAL

O processo de formação do cálculo renal é complexo e depende em parte da composição química da urina e provavelmente de fatores relacionados ao transporte de minerais ao longo do nefro. A composição mineral da urina é influenciada por fatores genéticos que interferem com o transporte de íons ao longo dos túbulos, da dieta e da flora intestinal (BARROS; VERONESE, 2017). A formação de cristais na urina depende da concentração de alguns minerais e compostos orgânicos sendo os principais a concentração de cálcio, fosfato, oxalato, amônio, ácido úrico e da concentração de hidrogênio iônico (pH). Algumas substâncias têm papel fundamental em dificultar a cristalização, entre elas o magnésio e o citrato urinário. A concentração

de um sal maior que o produto de solubilidade, saturada, faz com que a solução se torne instável e comece o processo de cristalização. A formação da menor unidade de um cristal é considerada como primeiro passo na formação de um cálculo, sendo este processo denominado de nucleação. Após esta fase ocorre a agregação onde há a junção de novas partículas de cristais ao núcleo pré-formado, o que promove o crescimento do cálculo que futuramente pode migrar e ficar retido no sistema coletor ou na pelve renal. A formação dos cristais pode ocorrer dentro dos túbulos renais, em especial os segmentos mais distais do nefro (final do túbulo distal e dos ductos coletores) ou pode ocorrer no interstício renal, próxima a papila renal na formação das denominadas placas de Randall. O primeiro processo é observado na formação de cristais secundários a drogas (sulfas, indinavir) e o segundo parece ser o mecanismo principal para a formação de cálculos de cálcio (ORTIZ; AMBROGUINI, 2010).

As placas de Randall são constituídas de apatita (fosfato de cálcio) e são localizadas nas adjacências das alças finas de Henle, abaixo do epitélio das papilas renais (BHUSKUTE, YAP e WAH, 2009 e ASSELMAN *et al.*, 2003). As placas de Randall, em algum momento, podem erodir, lesar e atravessar o epitélio papilar, formando nichos que reúnem cristais da urina supersaturada que banha as papilas renais. (ASSELMAN *et al.*, 2003 e BIHL; MEYERS, 2001). Nesses sítios, agregam-se sais de oxalato de cálcio, ácido úrico, fosfato de cálcio, entre outros, iniciando a formação e o crescimento de cálculos. (BARROS; VERONESE, 2017).

Apesar de inexistir um tratamento que desintegre os cálculos, a terapêutica hoje empregada para esta doença foca no alívio da dor e na facilitação da expulsão do cálculo do trato urinário. Assim, o protocolo clínico terapêutico normalmente se inicia com a administração de medicamentos analgésicos, seguidos de antagonistas de canal de cálcio ou bloqueadores de receptores alfa-adrenérgicos para relaxamento da musculatura lisa, facilitando a passagem do cálculo. Adicionalmente, medicamentos diuréticos e hidratação são recomendados. Como não há medicamento capaz de dissolver o cálculo renal, caso esse não seja expelido em alguns dias, será necessário quebrá-lo através de ondas de choque extracorpóreo, também chamado de litotripsia, ou removê-lo através de procedimento endoscópico ou cirúrgico (AJAYI *et al.*, 2007). Estes procedimentos representam mais de 2 bilhões de dólares por ano, um custo extremamente significativo para a Saúde, além de promover desconforto e potencial dano ao paciente (BASHIR e GILANI, 2009).

Para os pacientes que tem alta taxa de recidiva, ou seja, aqueles que apresentam episódios de formação de novos cálculos com intervalo menor que um ano, preconiza-se o tratamento profilático que consiste no aumento contínuo da oferta hídrica, geralmente acima de 2 litros ao dia, dieta pobre em sódio e oxalato, associado ao uso de medicamentos que podem reduzir a taxa de excreção de cálcio, ácido úrico ou elevar a taxa de citrato urinário. Em alguns centros, é realizado estudo metabólico e mineral da urina e análise da composição dos cálculos para auxiliar na terapia de prevenção. A maioria dos cálculos tem em sua composição cálcio, como previamente comentado. A análise mais completa sobre o perfil urinário é a realização da prova da taxa de supersaturação urinária. Este exame é complexo, envolve geralmente o uso de mais de 14 análises urinárias, tem custo elevado e não está disponível no SUS (PROCHASKA *et al*, 2017). Ainda, a análise do perfil de supersaturação envolve o uso de um software específico (EQUIL2). A análise da composição dos cálculos fornece pouca informação de relevância clínica. Desta forma, na prática clínica, a escolha de um tratamento farmacológico profilático recai em poucas opções terapêuticas sendo as três drogas mais usadas os diuréticos tiazídeos, cujo efeito é reduzir a calciúria, no uso do alopurinol nos pacientes com excreção elevada de ácido úrico urinário e no uso de citrato de potássio, um agente que alcaliniza a urina e eleva a citratúria, o que dificulta a formação de cristais de cálcio na urina.

Existem duas revisões sistemáticas acompanhadas de metanálise que evidenciam a eficácia da terapia para facilitar a expulsão de cálculos. SINGH *et al* (2007) realizaram uma análise de 16 estudos randomizados com antagonistas alfa-adrenérgicos e de 9 estudos com uso de antagonistas do cálcio e mostraram haver, quando comparados com terapia padrão, uma maior chance de expulsão dos cálculos com risco relativo (IC95%) de 1,59 (1,44 a 1,75) e 1,50 (1,34 a 1,68), respectivamente. Mais recentemente, SEITZ *et al* (2009), confirmaram estes dados e estenderam a observação para a redução do período de duração da cólica ureteral, do uso de analgésicos e da necessidade de internação. O principal evento adverso, como esperado, foi uma hipotensão transitória. Entretanto, em um ensaio pragmático realizado em centros de referência da Inglaterra, não se mostrou que esta abordagem traz qualquer benefício (PICKARD *et al*, 2015).

Para a terapia de profilaxia com citrato de potássio os estudos são bem mais raros e não há nenhuma revisão sistemática publicada. A busca de ensaios clínicos

no banco de dados Pubmed de 1970 a 2013 com o uso dos algoritmos ("clinical trial"[Publication Type] OR "clinical trials as topic"[MeSH Terms] OR "clinical trial"[All Fields]) AND (("potassium citrate"[MeSH Terms] OR ("potassium"[All Fields] AND "citrate"[All Fields]) OR "potassium citrate"[All Fields]) AND ("kidney calculi"[MeSH Terms] OR ("kidney"[All Fields] AND "calculi"[All Fields]) OR "kidney calculi"[All Fields] OR ("kidney"[All Fields] AND "stones"[All Fields]) OR "kidney stones"[All Fields])) realizada por nós para o desenho do presente projeto resultou em apenas 44 registros. Destes, somente 7 são estudos clínicos relacionados ao tratamento da litíase renal comparando-se o citrato de potássio (em média 60mEq dia) com placebo ou diuréticos tiazídicos. Destaca-se o uso pioneiro, em apenas 5 pacientes, do citrato de potássio em 1983 (SAKHAEE *et al*, 1983), mostrando seu efeito em reduzir a formação de cristais de oxalato de cálcio, de fosfato de cálcio (bruxita) e elevando o pH urinário, o que dificulta a formação de cristais de ácido úrico. Desde então, mais 6 ensaios clínicos de pequeno tamanho, muitos abertos, apontaram para a eficácia do uso do citrato de potássio (em média 60mEq/d) na redução de formação de novos episódios de litíase, na redução do tamanho dos cálculos e no aumento da probabilidade de expulsão de cálculos já formados (vide tabela 1). Entretanto, há menção, em alguns ensaios, da baixa adesão ao tratamento de longo prazo pela irritação gástrica e pela má palatabilidade do citrato de potássio, o que impacta a efetividade do tratamento em situação real de uso.

Tabela 1 - Resumo dos principais estudos realizados com citrato de potássio na prevenção de novos episódios de litíase.

Autor	Desenho do estudo (n)	População de estudo	Intervenção	Comparador	Desfecho
Sakhaee <i>et al</i> , (1983)	Estudo aberto, não aleatorizado, cruzado, "tipo prova de conceito	Litíase recorrente (ácido úrico)	Citrato de potássio (60 mEq/d)	Citrato de sódio	Redução da [Ca] _u (154±47 mg/d para 99±23 mg/d vs 139±24 mg/d, citrato de potássio vs sódio respectivamente. Ambos tratamentos elevaram a citraturia
Pak <i>et al</i> . (1985)	Estudo observacional prospectivo (89) com duração de seguimento entre 1.3 e 4 anos	Hipocitraturia ou hiperuricosúria com ou sem cálculo	Citrato de potássio (60 mEq/d)	Tratamento Conservador (dieta e aumento da ingestão hídrica)	Remissão da ocorrência de novos episódios de litíase em 80% dos pacientes
Preminger <i>et al</i> , (1985)	Estudo observacional retrospectivo (54)	Litíase recorrente (<1 cálculo/paciente/ano)	Citrato de potássio (60 mEq/d)	Tratamento Conservador (dieta e aumento da ingestão hídrica)	Remissão da ocorrência de novos episódios de litíase em >90% dos pacientes
Barcelo <i>et al</i> (1993)	Estudo aleatorizado, aberto, controlado por placebo (57) com duração de 3 anos	Litíase recorrente e hipocitraturia	Citrato de potássio (30 a 60 mEq/d)	Placebo	Remissão em 72% no grupo citrato, redução da formação de cálculos de 1.2±0,6 para 0,1±0,2 cálculos/paciente/ano.
Ettinger <i>et al</i> , (1997)	Estudo aleatorizado, duplo-cego, controlado por placebo (64) com duração de 3 anos	Litíase por oxalato de cálcio	Citrato de potássio-magnésio (63 mEq/d)	Placebo	Redução de risco de ocorrência de novos episódios de cálculo em 85%. RR (IC95%) 0,16 (0,05 a 0,46)
Fernandez-Rodrigues <i>et al</i> (2006)	Estudo aberto, controlado por placebo com 3 braços paralelos com duração de 3 anos (150)	Litíase recorrente	Hidroclorotizida (50 mg/d), hidroclorotiazida + citrato de potássio (20 Meq/d)	Placebo	Redução da ocorrência de novos episódios de litíase ou de necessidade de litotripsia. Não houve diferença entre os grupos ativos.
Lojanapiwat <i>et al</i> . (2011)	Estudo, não randomizado, aberto, comparativo com placebo (76) com 12 meses de duração	Pós intervenção (nefrolitotomia percutânea ou litotripsia extracorpórea)	Sem tratamento	Citrato de potássio (81 mEq/d)	Redução da formação de novos cálculos (>90% do grupo ativo com remissão).
Singh <i>et al</i> (2012)	Estudo randomizado, aberto, comparativo entre dois tratamentos ativos (44) por 6 meses	Litíase recorrente	Celosia argental (Sitivaraka), 10mg/Kg em 3 tomadas	Citrato de potássio (0,25mL/Kg em 3 tomadas)	Houve equivalência entre os dois tratamentos com nos parâmetros bioquímicos urinários e na redução do tamanho dos cálculos.

Ante o exposto, constata-se que não há atualmente disponível no mercado um medicamento que desintegre cálculos renais. As poucas opções clínicas de tratamento disponíveis têm uma efetividade baixa para eliminação dos cálculos e acabam resultando em tratamentos dispendiosos e, muitas vezes invasivos, como a litotripsia com ondas de choque extracorpóreas, remoção endoscópica, nefrolitotomia percutânea ou cirurgia de extração.

O medicamento objeto deste projeto deriva de um extrato das partes aéreas da planta *Copaífera langsdorffii*, planta nativa brasileira. Apesar de o uso do óleo-resina da *C. Langsdorffii* ser bem documentado, inexistiam estudos para as partes aéreas da planta (SOUSA, 2011). Diante disso, todos os estudos para as partes aéreas foram realizados pelo nosso grupo, envolvendo estudos de fitoquímica, atividade biológica, segurança e tecnologia. Ainda, todos os testes de eficácia pré-clínica e de segurança foram realizados com o extrato padronizado produzido pela empresa Apis-Flora de Ribeirão Preto, parceira neste projeto. A elaboração do Extrato Padronizado de *Copaífera* (EPC-AF®) seguiu todos os preceitos de boas práticas de manufatura e as diretrizes da ANVISA no tocante a produção de fitoterápicos. Destarte, demonstrou-se que o produto obtido da parte aérea da planta possuía potencial interessante para a desintegração de cálculos de oxalato de cálcio.

Os resultados obtidos nos experimentos “in vitro” indicaram que EPC-AF® inibiu a formação de cristais e desagregou cristais de oxalato de cálcio já formados.

Estes resultados sugerem que a EPC-AF® poderia prevenir a formação de cálculos e pode dissolver os agregados de oxalato de cálcio (OLIVEIRA, R. B. *et al.* 2013). Em camundongos Swiss foi realizada a avaliação do efeito do extrato de EPC-AF® sobre a atividade locomotora para determinação das doses que causam alterações comportamentais resultantes de ação central ou junção neuromuscular, que podem causar resultados falso-positivos para analgesia. Ainda, realizou-se avaliação da atividade antinociceptiva, através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que é o modelo padrão para triagem de compostos com potencial ação analgésica, avaliação da atividade antiespasmódica por interferência na motilidade intestinal, que revelou ação relaxante em musculatura lisa. Os resultados de eficácia da administração pela via oral da EPC-AF®, nas doses estudadas (30, 100, 300 e 1000mg/kg), demonstraram que o produto não produziu resposta antinociceptiva. No entanto e mais interessante, os resultados indicaram que

o extrato, produziu atividade antiespasmódica nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Os compostos quercetrina e afzelina não exibiram atividade antiespasmódica (Dados não publicados – Estudos realizados pela equipe do Prof. Dr. João Ernesto Carvalho, CPQBA, UNICAMP).

Em um segundo modelo de eficácia, foi feita a introdução de pastilha de oxalato de cálcio na bexiga de ratos Wistar (BRANCALION *et al.* 2012). Os animais foram tratados por via oral com 20 mg/kg de EPC-AF® por 18 dias, sendo que o tratamento teve início após 30 dias de implementação da pastilha de oxalato. A análise urinária do pH, e das concentrações de magnésio, fosfato, cálcio, ácido úrico, oxalato e citrato foram realizadas visando determinar se o extrato poderia funcionar como um agente de prevenção da formação de cálculos. Os animais tratados com EPC-AF® tiveram níveis de magnésio aumentados e diminuição dos níveis de ácido úrico na excreção urinária. Ainda, os animais tratados exibiram redução no número médio de cálculos e redução da massa dos mesmos, sendo que estes cálculos se apresentaram mais frágeis e quebradiços do que os obtidos no grupo controle. A pressão necessária para desintegrar os cálculos dos animais do grupo controle foi, em média, cerca de duas vezes maior do que a necessária para desintegrar aqueles retirados de animais tratados com a EPC-AF® ($6,9 \pm 3,5$ vs. $3,0 \pm 1,5$) (BRANCALION *et al.* 2012).

Um terceiro modelo de avaliação de eficácia foi realizado, por meio da utilização de etilenoglicol em ratos. Neste modelo, há a indução de uma hiperoxalúria, que promove a formação e agregação de cálculos de oxalato de cálcio no compartimento túbulo-intersticial renal (OLIVEIRA *et al.* 2013). Neste experimento, dois cenários foram testados. No primeiro, houve o uso de diferentes doses de extrato de EPC-AF® desde o início da indução da formação de cálculos. Já no segundo cenário, diferentes doses de EPC-AF® foram utilizadas após a formação dos cálculos, cerca de 15 dias após o início do tratamento com etilenoglicol. Os parâmetros bioquímicos urinários foram quantificados, assim como o depósito de oxalato de cálcio e a análise da expressão de osteopontina em histologia do parênquima renal. Os resultados mostraram que o extrato de EPC-AF® foi capaz de evitar a formação de cálculos, quando utilizados desde a fase inicial do insulto. No grupo de tratamento, houve uma redução na formação de depósitos de oxalato de cálcio ($50,3 \pm 31,3$ vs $179,5 \pm 46,0$, na dose de 160mg/kg) e na formação de osteopontina. Ainda, após a administração do extrato de EPC-AF®, houve redução na oxalúria e elevação da citratúria,

parâmetros bioquímicos que indicam que o tratamento exerceu uma modificação no padrão de excreção urinária para um perfil menos litogênico.

O EPC-AF® é rico em um composto denominado de ácido galoilquinico (AGQ). (CARVALHO *et al* 2016) mostraram em estudo farmacocinético que este composto tem alta afinidade pelo tecido renal. Recentemente, (EL-SALAM *et al* 2018) mostraram que o AGQ inibe a adesão de cristais de oxalato de cálcio em células de túbulo coletor de cão (MDCK-1). Esta inibição foi modulada pela ação farmacológica dose dependente do AGQ sobre a expressão de anexina A1, uma proteína envolvida na ligação e tráfego intracelular dos cristais de oxalato de cálcio com a célula urotelial. Finalmente, no mesmo trabalho, o efeito deste composto foi também observado na redução do crescimento dos cristais em túbulos de drosófila, um modelo “in vivo”.

Em resumo, os testes de eficácia mostraram que o extrato padronizado de EPC-AF® apresenta atividade antiespasmódica. O efeito anti-litíase foi observado tanto na modificação da composição mineral (redução da dureza e tamanho dos cálculos), quanto na modificação bioquímica urinária para um perfil de menor probabilidade de formação de cristais (elevação da citratúria, elevação do pH urinário e redução da oxalúria). Ainda, a análise histoquímica mostrou haver uma menor deposição de osteopontina, ou seja, do componente biológico da matriz formadora dos cálculos e finalmente houve a potencial inibição da migração de cristais formados no interstício para dentro da célula urotelial, sugerindo um potencial efeito na migração de cristais via placas de Randall.

O segundo conjunto de experimentos pré-clínicos foi realizado com o objetivo de se estabelecer a segurança do composto em desenvolvimento. Em camundongos Swiss a EPC-AF® testada nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, não apresentou alterações comportamentais e/ou fisiológicas durante 15 dias de observação. Os compostos isolados da droga vegetal, quercetrina e afzelina, nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg também foram avaliados e, igualmente, não exibiram qualquer alteração. (dados não publicados). Em seguida, foram feitos experimentos de toxicidade aguda (15 dias) e subcrônica (90 dias) utilizando-se as partes aéreas de EPC-AF®, por via oral, utilizando as espécies: ratos Wistar (machos e fêmeas) e coelhos New Zeland (machos e fêmeas). Para a estimativa da dose letal média (DL50), o protocolo foi realizado de acordo com os guidelines da OECD (TG 408). Determinou-se a NOAEL para ratos em 300mg/Kg e para coelhos de 50mg/Kg.

Adicionalmente, estudos de avaliação do potencial mutagênico e/ou antimutagênico foram realizados através de ensaio de micronúcleo em sangue periférico de animais, bem como através de cultura de células V79. Os resultados comprovaram ausência de citotoxicidade do extrato de EPC-AF®, nas dosagens de 10, 20, 40 e 80 mg/kg e 30, 60 e 120 µl/ml, respectivamente. Além disso, foi observado efeito antimutagênico quando os animais foram tratados simultaneamente com diferentes doses do extrato de EPC-AF® e doxorrubicina (15 mg/kg).

Durante o desenvolvimento de um medicamento ou produto utilizado para o tratamento de pacientes há um momento em que deve haver a transição dos estudos realizados em animais ou em preparações *in vitro*, para o uso em humanos. Estes protocolos, denominados de fase I, são fundamentais para o desenvolvimento de novos medicamentos e visam obter informações de segurança e toxicidade do produto. Tradicionalmente, estes ensaios não oferecem benefício terapêutico para os sujeitos da pesquisa, usualmente voluntários saudáveis. Entretanto, a descoberta precoce de toxicidade pode impedir a exposição a um grande contingente de pacientes, o que justifica a sua realização. Desta forma, após a análise de todos os dados de segurança e eficácia obtidos até o momento nas diversas espécies envolvidas, realizou-se a conversão da dose obtida nas espécies para humanos considerando as orientações do FDA, onde empregou-se os fatores referentes à área de superfície corporal de 12,3, 6,2 e 3,1, para se obter a dose recomendada para os estudos clínicos. Adicionalmente, utilizou-se o fator de segurança, também sugerido pelo FDA, sendo NOAEL/10 para roedores e NOAEL/6 para não roedores, para definição de uma dosagem considerada segura.

Em resumo, litíase renal é uma doença prevalente de alta taxa de morbidade e custo para os serviços de saúde. O tratamento desta doença oferece poucas opções terapêuticas, todas com baixa efetividade em prevenir a formação de novos episódios de cálculos. O EPC-AF® é um composto promissor, com eficácia, potencial mecanismo de ação e segurança testados em fases pré-clínicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de realizar os primeiros ensaios clínicos em humanos para dar continuidade ao desenvolvimento deste novo medicamento.

2. HIPÓTESE

A principal hipótese deste trabalho é a de que o EPC-AF® é seguro em humanos. Para testar esta hipótese será realizado um ensaio clínico de fase I com doses-escalonadas, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.

3. OBJETIVOS

Desfecho Primário: Avaliar a segurança do medicamento fitoterápico inovador contendo extrato padronizado de *C. langsdorffii* (EPC-AF®) em voluntários saudáveis.

Desfecho Secundário: Estudar se o EPC-AF® é capaz de modificar a excreção urinária de substâncias relevantes para a formação de cálculos renais.

Objetivos específicos:

- ❖ Avaliação da ausência de potencial de toxicidade cardiovascular;
- ❖ Avaliação da ausência de potencial de toxicidade renal e hepático;
- ❖ Avaliação da ausência de potencial de toxicidade sobre linhagem hematopoiética;
- ❖ Avaliação da ausência de potencial de toxicidade reprodutiva;
- ❖ Avaliação do perfil de eventos adversos.
- ❖ Avaliar as propriedades farmacodinâmicas do EPC-AF® sobre a excreção de compostos relevantes para a formação de cálculos renais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E ASPECTOS BIOÉTICOS

Foram recrutados voluntários saudáveis sem ligação com o grupo de pesquisadores e residentes na cidade de Ribeirão Preto – SP. Os critérios de inclusão correspondem a homens entre 18 e 55 anos de idade, sem distinção de raça, não fumantes e não usuários de drogas ilícitas ou medicamentos. A avaliação de saúde foi realizada por meio de história e exame clínico, seguidos de eletrocardiograma de 12 derivações (ECG), avaliação bioquímica de função hepática (TGO, TGP, bilirrubinas, fosfatase alcalina e gama-GT), avaliação da função renal (creatinina sérica, relação proteína/creatinina urinária, marcadores de lesão tubular, e sumário de urina), avaliação da função reprodutiva (testosterona, LH, FSH e androstenediona), hemograma completo, lipidograma, glicemia de jejum e hemoglobina glicada, sorologia para hepatite B e C e HIV. Foram excluídas mulheres, idosos (idade>60 anos), portador de qualquer doença clinicamente detectável pela avaliação médica, alterações eletrocardiográficas (exceto distúrbios inespecíficos da repolarização ventricular ou bradi/taquicardia sinusal) ou alterações dos exames bioquímicos de função hepática, hematológica, renal, reprodutiva ou metabólica. Também foram excluídos voluntários que haviam participado de qualquer outro ensaio clínico com término inferior ao período de um ano, aqueles que apresentaram antecedentes de hipersensibilidade à medicamentos ou aqueles que estavam recebendo medicamentos uma semana antes do estudo ou durante a sua realização.

Os voluntários foram informados do estudo com detalhes e forneceram, por escrito, o consentimento livre e esclarecido. O protocolo clínico somente foi realizado mediante aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, processo HCRP 17647/2014. O voluntário teve a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida que poderia surgir, em qualquer etapa do estudo e também teve a liberdade de retirar seu consentimento e sair do estudo no momento em que desejasse. O investigador preencheu um formulário de registro de eventos adversos relacionando os procedimentos adotados para o controle ou tratamento dos mesmos.

O estudo foi conduzido em um único centro na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da

Universidade de São Paulo. O estudo foi registrado na plataforma brasileira de ensaios clínicos (REBEC) sob número RBR-6cf4xh.

4.2. MEDICAMENTO

Os comprimidos revestidos de EPC-AF® foram formulados considerando a dosagem de 350 mg de massa seca da droga vegetal por comprimido. O EPC-AF® foi obtido através das condições de secagem previamente definidas e otimizadas (COSTA-MACHADO, 2011). Os lotes dos comprimidos foram produzidos atendendo aos preceitos de Boas Práticas de Fabricação normatizados pela ANVISA, nas dependências da empresa farmacêutica Apis Flora Indl. Coml. Ltda., após a obtenção do Comunicado Especial (CE) que foi emitido pela ANVISA.

4.3. PROTOCOLO DE PESQUISA

Foi realizado um ensaio clínico de fase I/IIa de grupos paralelos, controlados por placebo (2:1), duplo-cego, randomizado e de dose única ascendente (SAD - single ascending dose). A justificativa do placebo era a de avaliar a ocorrência real de eventos adversos. O desenho escolhido é clássico para estudos de fase I e preconiza a menor exposição ao risco possível para voluntários sadios (BUOEN *et al.*, 2005). A dose inicial foi calculada de acordo com a Diretriz do FDA (2005) e caso não houvesse eventos adversos, seria elevada progressivamente até a dose máxima estimada a partir de estudos pré-clínicos de eficácia realizados em roedores e não roedores, acima descritos.

A escolha da dose inicial e das doses de escalonamento para início do estudo levou em consideração as dosagens encontradas em animais, seguidas pela correção através da área corporal e também a aplicação de um fator de segurança (NOAEL/10 para roedores e NOAEL/6 para não roedores, FDA). Desta forma a dose inicial foi de 175mg ao dia e a dose máxima foi de 2,8g ao dia.

Foi testado apenas a via oral. O intervalo de modificação da dose foi de 2 dias entre cada período. A escolha do intervalo foi empírica, baseada em dados de

farmacodinâmica do produto (excreção de citrato, cálcio e modificação pH urinário). Em estudos de acidificação urinária, uma carga ácida de amônio é excretada por rins normais em 2 a 4 horas, retornando ao pH basal em menos de 24 h (SAKHAEE *et al.*, 2002). Desta forma, o intervalo de dois dias foi bastante conservador para a transição da dose entre uma fase e outra.

Nenhum evento adverso sério foi observado durante o protocolo e desta forma as doses foram escalonadas até a dosagem máxima. A classificação de um evento como clinicamente relevante dependeu da avaliação clínica de risco elaborada pela equipe médica e/ou de achados laboratoriais que indicassem toxicidade. Alterações do ECG basal, alterações dos exames laboratoriais acima de 2 vezes o valor considerado dentro da faixa de normalidade ou sintomas ou sinais clínicos que indicassem risco de dano ao voluntário foram considerados para classificar um evento adverso como clinicamente relevante. A figura 1 esquematiza o protocolo clínico proposto. Após um mês da alta da enfermaria da UPC, os voluntários foram agendados (visita VF) para comparecerem a UPC para avaliação clínica e laboratorial semelhante à realizada na visita de triagem (Triagem).

Figura 1 – Fluxo do protocolo

Os voluntários foram examinados em consulta de triagem (Triagem) para assinatura do TCLE e exames clínico e laboratorial triagem (conforme descrito). Dentro do intervalo entre uma semana a um mês após esta consulta inicial, os voluntários que preencherem os critérios de inclusão e não apresentarem critérios de exclusão foram convidados a comparecer na UPC (Internação D1) em estado de jejum de 12 horas, às 8 horas da manhã para internação e iniciaram coleta de urina de 24 horas para quantificação bioquímica da concentração de fósforo, magnésio, urato, cálcio, citrato e oxalato e medida do pH urinário, além de ECG de 12 derivações, permanecendo internados com dieta exclusiva da unidade de internação. No dia seguinte, após jejum de 12 horas os voluntários foram orientados a esvaziar a bexiga vesical e receberam, por via oral, a dose de EPC-AF® ou Placebo de acordo com a etapa do escalonamento na qual estavam selecionados. Após a ingestão do EPC-AF® ou Placebo, novamente foi retomada a coleta de urina de 24 horas até o dia seguinte, onde foram coletados exames bioquímicos semelhantes aos coletados na triagem do voluntário, exceto para as sorologias, e foi repetido o ECG. Durante toda a internação os voluntários foram mantidos em monitoração de sinais vitais. O protocolo foi de dose ascendente, ou seja, o primeiro grupo de 6 voluntários recebeu aleatoriamente EPC-AF® na dose de 175mg ou placebo (2 placebos para cada 4 ativos). A cada decisão de ascensão da dose, uma nova coorte de 6 voluntários iniciou o mesmo protocolo, com doses crescentes (350 mg, 700mg, 1,4g e 2,8g). Desta forma, um total de 30 voluntários finalizou o protocolo. Após a alta dos voluntários, foi agendada consulta de retorno em 30 dias para avaliação clínica e laboratorial no ambulatório da UPC.

Figura 2 - Triagem

4.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.4.1. SANGUE PERIFÉRICO

Após a coleta do sangue periférico, conforme descrito acima, (em no máximo após 30 minutos) o material foi encaminhado ao laboratório de patologia clínica do HCFMRP-USP. O sangue total foi centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm para a obtenção do soro.

4.4.2. URINA ROTINA

Foi coletada a primeira urina da manhã ou com intervalo mínimo de 04 horas após a última micção, os participantes foram orientados a desprezar o primeiro jato de urina no vaso sanitário e, sem interromper a micção, coletar o segundo jato de urina (jato médio) no pote largo sem tampa, imediatamente eram adicionados 2 mL de vaselina líquida 100% (Rioquímica). Após a amostra era encaminhada ao laboratório da UPC, para medir o pH, em seguida foi separada uma alíquota de 5 mL para dosagem de citrato, e o volume final restante foi encaminhado ao laboratório de

Fluidos Orgânicos do HCFMRP-USP, para as dosagens de Fósforo, Urato, Cálcio e Creatinina.

4.4.3. URINA DE 24 HORAS

Os participantes, foram orientados a utilizarem frascos apropriados para coletar a urina durante as 48 horas de internação, os frascos eram previamente preparados com 10 mL de Ácido Hidroclorídrico 6N (13-1686 - Sigma-Aldrich). Após as 24 horas a urina era encaminhada ao laboratório da UPC, transferida dos frascos para uma proveta para medição do volume e após para um balão volumétrico, após a homogeneização retirava-se uma amostra de 50 mL para as análises.

4.5. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Para a avaliação da função hepática foram feitas dosagens em sangue periférico, no soro, conforme previamente descrito de TGO (transaminase glutâmico oxaloacética), TGP (transaminase glutâmico pirúvica), gama -GT (gama-glutamil transferase), fosfatase alcalina e dosagens de bilirrubinas direta e indireta de acordo com a rotina do setor (laboratório de patologia clínica do HCFMRP-USP - CT 600i, Weiner Lab., Rosário, Argentina). As amostras analisadas foram coletadas no período basal e no dia seguinte ao uso da dose escalonada de EPC-AF®, além da triagem e visita de segurança.

4.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE NEFROTOXICIDADE DO EPC-AF®

A análise de nefrotoxicidade envolveu a dosagem de biomarcadores por ELISA, no laboratório de Multidisciplinar de Nutrição e Metabolismo FMRP-USP – (BioTek-Winooski-USA), de lesão tubular precoce (NGAL, NAG, KIM-1, alfa1-microglobulina), nas amostras de urina rotina obtidas como descrito acima.

NGAL – Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocain, pela técnica de Elisa – sanduíche imuno-enzimático, pelo kit da USBiological – 227841.

NAG – N-Acetyl Beta D glucosaminidase – pela técnica de Elisa - quantitativa de imunoensaio enzimático competitivo, pelo kit da USBiological – 197423.

KIM-1 – Kidney Injury Molecule 1 - pela técnica de Elisa – sanduíche imuno-enzimático, pelo kit da USBiological – 227774.

Alpha-1-Microglobulin - pela técnica de Elisa – sanduíche imuno-enzimático, pelo kit da Elabscience – E-EL-H0315.

Cistatina C – Amostra soro obtida como o descrito acima, coletada no dia 1 de internação, basal, e no dia 2, pós medicação, analisadas no laboratório de Imunologia pelo nefelômetro da Siemens (BN II System, Erlangen, Alemanha).

4.7. AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA DO EPC-AF®

As amostras de urina foram coletadas em frasco selado com óleo mineral, (vaselina líquida) para evitar a perda de CO₂ e alterar o pH urinário. O pH foi medido por eletrodo íon-seletivo no laboratório de nefrologia do HCFMRP-USP, (Qualxtron 8010) e as amostras alíquotadas e armazenadas em freezer - 80°C (Panasonic, Wood Dale, USA) até a realização das dosagens bioquímicas, que foram realizadas no laboratório de patologia clínica do HCFMRP-USP. Foi avaliada a concentração de fósforo, urato, cálcio (soro), de acordo com a de acordo com a rotina do setor (laboratório de patologia clínica do HCFMRP-USP - CT 600i, (Weiner Lab., Rosário, Argentina).

Foi avaliada a concentração de fósforo, urato, cálcio (urina), de acordo com a de acordo com a rotina do setor do laboratório de Fluidos Orgânicos do HCFMRP-USP, - CB350i (Weiner Lab., Rosário, Argentina).

O magnésio no sangue, soro, e na urina, obtidos como previamente descritos foram analisados no laboratório de Pediatria HCFMRP-USP – pelo método de absorção atômica por chama Spectra A-55B (Varian, Victoria, Austrália).

A quantificação do citrato urinária foi realizada em urina de 24h por meio de kit da (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) – (MAK057). A concentração de citrato foi determinada por um ensaio de enzima acoplada, que resultou num produto

colorimétrico (570nm) proporcional ao citrato presente realizada leitura no laboratório de Multidisciplinar de Nutrição e Metabolismo FMRP-USP – (BioTek- Winooski-USA)

O oxalato em urina 24 horas conservada em ácido clorídrico foi aliquotada armazenado no ultrafreezer (-80) até o dia da dosagem que foi realizada pelo laboratório particular Padrão em conjunto com o laboratório Hermes e Pardini por método enzimático Alinity (Abbott, Illinois, U.S.A).

4.8. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO REPRODUTIVA

Os exames de LH e FSH dosados no sangue (soro), pelo laboratório de Endocrinologia do HCFMRP-USP - IMMULITE 2000® analyzer (Siemens, Los Angeles, U.S.A), a testosterona e a androstenediona dosadas no sangue (soro), pelo laboratório de Endocrinologia do HCFMRP-USP - Tri-Carb 2910 TR, (Perkin-Elmer, Waltham, U.S.A).

4.9. AVALIAÇÃO CARDÍACA

O potencial de toxicidade cardíaca foi analisado pela medida do intervalo QT e QTc em eletrocardiograma de 12 derivações (Phillips, Eindhoven, Holanda). O cálculo do intervalo QTc foi feito na derivação D2, utilizando a correção proposta por Bazett ($QTc = QT / \sqrt{RR0,50}$) (SHAH, 2002).

4.10. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Os índices hematimétricos foram quantificados no laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP, o hemograma pelo equipamento – ABX Pentra 120 (Horiba, Montpellier, France), o TP e TTPA foram preparados segundo a rotina do setor e analisados por Sta Max R (Stago, Parsippany, U.S.A).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram reportados como média ou mediana e desvio padrão ou intervalo de confiança 95%. Os dados de toxicidade renal foram reportados com razão do valores 24h/basal. Os dados de eficácia foram reportados como delta de variação (concentração urinaria após a intervenção – basal). A comparação das características dos voluntários alocados para placebo ou EPC-AF® foi feita por teste t de Student. A comparação entre os valores dos exames bioquímicos de segurança e eficácia e entre os valores de medida do intervalo QTc foram feitos por ANOVA não paramétrica para medidas repetidas, com teste de Dunn a posteriori ou teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn para dados independentes. Foram consideradas diferenças significativas aquelas com P valor < 0,05. O software graphpad prism 7.0 foi utilizado para a análise (Graphpad Software Inc, San Diego USA).

5. RESULTADOS

5.1. CASUÍSTICA.

O estudo recrutou 52 participantes saudáveis, dos quais 30 foram randomizados e participaram do estudo. As características clínicas dos participantes recrutados estão detalhadas na tabela 2. A figura 3 detalha o fluxograma da alocação dos pacientes nos braços placebo e EPC-AF® em doses escalonadas. Não houve diferenças clínicas relevantes entre os parâmetros clínicos e demográficos dos participantes incluídos no estudo. Um dos voluntários faltou na visita após 30 dias de exposição ao EPC-AF®. Em contato telefônico negou eventos adversos, mas não quis retornar a UPC para coleta de exames. Assim, 19 voluntários participaram da análise para a comparação de segurança entre os valores iniciais da triagem e ao final de 30 d de exposição ao medicamento em investigação. Para as avaliações de eficácia e toxicidade aguda por dose escalonada, 20 voluntários foram estudados para o EPC-AF® e 10 para o placebo.

Tabela 2 - Características clínicas e demográficas dos participantes do estudo

	Placebo	EPC-AF®	P valor
Idade (Anos)	34 ± 7	31 ± 5	0,18
Cor de Pele (%)			
Negro ou Miscigenado	40	25	
Branco	60	75	0,43
Altura (m)	1,8 ± 0,05	1,8 ± 0,07	0,93
Peso (kg)	86 ± 17	88 ± 14	0,84
IMC (kg/m²)	27 ± 4,7	28 ± 3,1	0,82
PA Sistólica (mmHg)	126 ± 8	128 ± 8	0,63
PA Diastólica (mmHg)	79 ± 4	80 ± 7	0,88
Intervalo QT (ms)	396 ± 15	404 ± 24	0,32

Intervalo QTC (ms)	414 ± 18	409 ± 20	0,50
Hemoglobina (g/dL)	15 ± 0,8	15 ± 1	0,76
Hematócrito (%)	45 ± 2,4	44 ± 2,9	0,43
Uréia (mg/dL)	29 ± 6,3	30 ± 8,9	0,61
Creatinina Sérica (mg/dL)	0,99 ± 0,12	1,0 ± 0,11	0,37
Sódio (mmol/L)	139 ± 2	138 ± 2	0,20
Potássio (mmol/L)	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,3	0,51
Glicemia (mg/dL)	85 ± 4	83 ± 10	0,44
Bilirrubina total (mg/dL)	0,87 ± 0,44	0,66 ± 0,22	0,19
TGO (u/L)	25 ± 8	28 ± 11	0,28
TGP (u/L)	32 ± 16	37 ± 19	0,49
Gama GT (u/L)	28 ± 12	39 ± 21	0,09
Fosfatase Alcalina (u/L)	171 ± 24	186 ± 54	0,29
Ácido úrico (mg/dL)	5,8 ± 2,0	5,9 ± 1,5	0,91
Hemoglobina Glicada (%)	5,4 ± 0,4	5,2 ± 0,5	0,47
Colesterol total LDL HDL (mg/dL)	172 ± 41	200 ± 39	0,10
Triglicérides (mg/dL)	89 ± 53	122 ± 47	0,11

Estudo EPC - Diagrama de Fluxo

Figura 3 - Fluxograma de recrutamento, seleção e análise do estudo clínico, de acordo com CONSORT.

5.2. ANÁLISE DE SEGURANÇA

5.2.1. SISTEMA LINFO-HEMATOPOIÉTICO

5.2.1.1. HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO E PLAQUETAS

As tabelas 3 e 4 e as figuras 4 e 5 mostram o comportamento dos valores hematimétricos antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo. As tabelas 3 a 4 mostram os valores observados de média e IC95% entre os períodos basal e 30

dias após a exposição ao EPC-AF® ou ao placebo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos para a concentração de hemoglobina e para o hematócrito. Houve, entretanto, uma diferença estatisticamente significativa para os valores de plaquetas entre os grupos. Esta diferença foi observada entre os valores de plaquetas do grupo basal EPC-AF® com os grupos basal placebo ($P=0,02$) e Placebo 30 d ($P=0,01$). Tal diferença foi motivada pela maior média dos valores de plaquetas no grupo basal EPC-AF® e não por ter havido plaquetopenia. Ainda, os valores observados estão dentro da normalidade laboratorial.

Tabela 3 - Comportamento dos valores de hemoglobina (g/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
15,2 (14,6 - 15,7)	15,2 (14,7 - 15,8)	0,81	15,0 (14,5 - 15,5)	14,7 (14,5 - 15,0)	0,22	0,38

Figura 4 - Valores de hemoglobina

Figura 4 - Valores de hemoglobina de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

Tabela 4 - Comportamento dos valores de hematócrito (%) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
44,7 (43,0 - 46,4)	43,7 (43,4 - 45,0)	0,99	43,6 (42,3 - 44,9)	43,4 (42,4 - 44,4)	0,70	0,42

Figura 5 - Valores de Hematócrito

Figura 5 - Valores de hematócrito (%) de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

Tabela 5 - Comportamento dos valores de plaquetas (cel x 10⁶) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
218,4 (191,7 - 245,1)	213,0 (177,1 - 248,9)	0,45	272,0 (247,4 - 296,6)	254,0 (231,5 - 277,6)	0,007*	0,04*

Figura 6 - Valores de Plaquetas

Figura 6 - Valores de plaquetas (cel x 10⁶) de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

5.2.1.2. TP/TTPA

As tabelas 6 e 7 e as figuras 7 e 8 mostram o comportamento dos valores de TP e de TTPA antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, expressos como média e IC95%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos.

Tabela 6 - Comportamento dos valores de TP (INR, razão normalizada internacional) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
1,0 (0,98 - 1,0)	1,0 (0,96 - 1,0)	0,45	1,0 (0,98 - 1,1)	1,0 (0,97 - 1,0)	0,25	0,55

Tabela 7 - Comportamento dos valores de TTPA (INR, razão normalizada internacional) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
1,1 (1,0 - 1,1)	1,1 (1,0 - 1,1)	0,42	1,1 (1,0 - 1,1)	1,0 (1,0 - 1,1)	0,18	0,65

Figura 7 - Valores de tempo de Protrombina

Figura 7 - Valores de tempo de protrombina (TP, INR) de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%.

Figura 8 - Valores de TTPA (INR)

Figura 8 - Valores de TTPA (INR) de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%.

5.2.2. FUNÇÃO HEPÁTICA

A tabela 8 e as figuras 9 e 10 mostram o comportamento das enzimas hepáticas (TGO, Gama-GT e Fosfatase alcalina) e das bilirrubinas antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo. A tabela 7 mostra os valores observados de média e IC95% entre os períodos basal, 24h após o uso do medicamento experimental ou placebo e 30 dias após a exposição ao EPC-AF® ou ao placebo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os períodos para os parâmetros estudados do ponto de vista de toxicidade. Houve uma redução estatisticamente significativa, porém de pequena magnitude e sem significado clínico nas enzimas TGO e fosfatase alcalina no grupo que recebeu EPC-AF®.

Tabela 8 - Comportamento dos valores de TGO, TGP, Gama-GT, Fosfatase alcalina e Bilirrubinas antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

	Placebo				EPC-AF®			
	Basal	24h	30d	P	Basal	24h	30d	P
TGO (U/L)	24,5 (19,2 - 29,8)	20,7 (17,2 - 24,3)	28,0 (16,7 - 39,2)	0,32	28,2 (22,0 - 30,0)	20,3* (18,3 - 22,3)	23,5 (20,2 - 26,8)	* 0,007
Gama-GT (U/L)	28,3 (19,5 - 37,1)	20,7 (17,2 - 24,3)	28,0 (16,7 - 39,3)	0,31	38,9 (29,0 - 48,9)	38,5 (27,9 - 49,1)	32,5 (24,7 - 40,3)	0,23
FA (U/L)	170,9 (153,9 - 187,9)	-	162,0 (146,9 - 177,1)	0,15	186,4 (161,1 - 211,6)	-	174,8* (152,0 - 197,6)	* 0,03
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,86 (0,55 - 1,18)	0,72 (0,58 - 0,86)	0,84 (0,60 - 1,30)	0,28	0,66 (0,56 - 0,77)	0,64 (0,54 - 0,74)	0,61 (0,52 - 0,71)	0,21
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,18 (0,13 - 0,29)	0,15 (0,11 - 0,22)	0,18 (0,12 - 0,23)	0,15	0,15 (0,13 - 0,16)	0,14 (0,12 - 0,16)	0,14 (0,12 - 0,17)	0,49
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,68 (0,42 - 0,95)	0,56 (0,45 - 0,68)	0,66 (0,46 - 0,87)	0,31	0,52 (0,43 - 0,60)	0,50 (0,42 - 0,59)	0,46 (0,38 - 0,54)	0,48

Figura 9 - Comportamento dos marcadores de Hepatotoxicidade

Figura 9 - Comportamento dos marcadores de hepatotoxicidade TGO, Gama-GT e fosfatase alcalina de acordo com o grupo experimental (barras brancas placebo e barras cinzas EPC-AF®), de acordo com a fase do protocolo: basal, 24h e 30 d após o uso do medicamento experimental ou placebo. Box-Plot de Tukey. * $P < 0,05$ para valores de TGO e fosfatase alcalina 24h e 30d, respectivamente, comparados ao período basal.

Figura 10 - Variação dos valores de bilirrubinas

Figura 10 -Variação dos valores de bilirrubinas total, direta e indireta de acordo com o grupo experimental (barras brancas placebo, barras cinzas EPC-AF®), entre os períodos basal, 24h e 30 dias após o uso de medicamento experimental ou placebo. Box-Plot de Tukey.

5.2.3. SISTEMA URINÁRIO

5.2.3.1. CLEARANCE DE CREATININA, CISTATINA C E MARCADORES DE LESÃO TUBULAR

A tabela 9 e a figura 11 mostram o comportamento da taxa de filtração glomerular (TFG) estimada pela creatinina sérica de acordo com a equação CKD-EPI 2009 e pela cistatina C. A tabela 10 e a figura 12 mostram os valores dos marcadores de lesão tubular aguda NAG, NGAL, alfa-1-microglobulina e KIM-1. Os resultados foram expressos como valores observados de média e IC95% entre os períodos basal, 24h após o uso do medicamento experimental ou placebo e 30 dias após a exposição ao EPC-AF® ou ao placebo. Foi observada uma pequena redução, clinicamente e estatisticamente significativa, da TFGe no grupo EPC-AF®. Houve em média uma redução de cerca de 6ml/min no grupo EPC-AF®, porém de cerca de 16 ml/min no placebo. Não foi observada relação com a dose empregada e 8 voluntários dos 20 que receberam o EPC-AF® mostraram discreta redução da TFGe. Por outro lado, 4 dos 10 voluntários que receberam placebo também tiveram uma discreta redução da TFG estimada pela creatinina. Embora só tenha sido observada diferenças estatisticamente significativas no grupo EPC-AF®, a magnitude da redução do clearance de creatinina e a proporção de indivíduos que experimentaram tal redução foi semelhante entre os dois grupos, sendo ainda maior no placebo. Este dado pode estar relacionado ao jejum hídrico que foi feito na Unidade de Pesquisa Clínica anterior ao uso do medicamento experimental ou placebo e pode representar uma resposta fisiológica a depleção de volume e não lesão renal. Corrobora com esta hipótese o fato de que não observamos elevação significativa dos marcadores de lesão tubular aguda e que, 30 dias após o uso, todos os voluntários apresentaram TFG dentro da normalidade e semelhante ao valor basal.

Tabela 9 - Valores observados da TFG, estimada a partir da creatinina sérica (CKD-EPI 2009). Foram reportados os valores com média e IC95% para os períodos basal, 24h e 30d após o uso de EPC-AF® ou placebo.

	Placebo			P Valor	EPC-AF®			P Valor
	Basal	24h	30d		Basal	24h	30d	
TFGe (ml/min/1,73m ²)	110,5 (90,6 - 110,4)	94,5 (84,3 - 104,7)	98,0 (88,9 - 107,2)	0,08	95,3 (90,4 - 100,3)	*89,2 (80,1 - 98,4)	97,5 (91,7 - 103,2)	*0,01
CistatinaC (mg/L)	0,79 (0,67 - 0,89)		0,79 (0,72 - 0,86)	0,89	0,88 (0,82 - 0,93)		0,87 (0,79 - 0,95)	0,64

Figura 11 - Valores de TFG

Figura 11 - Valores de TFG estimada a partir da creatinina sérica (CKD-EPI 2009) e de cistatina C. Box- Plot de Tukey. Caixas brancas representam o grupo placebo e caixas cinzas o grupo EPC-AF® . * P <0,05 para TFG grupo EPC-AF® 24h v.s. basal.

Tabela 10 - Comportamento dos marcadores tubulares NAG, NGAL, alfa-1-microglobulina e KIM-1 urinários antes e após a administração de placebo ou EPC-AF® . Valores expressos como relação entre as dosagens 24h/basal e descritos como mediana e intervalo interquartil 25 - 75%.

Razão 24h/Basal	Placebo	EPC-AF®	P Valor
NGAL/Creatinina	0,8 (0,6 - 1,1)	0,9 (0,5 - 1,7)	0,54
NAG/Creatinina	1,0 (0,6 - 2,2)	1,5 (0,7 - 3,2)	0,30
Alfa1-microglobulina/creatinina	1,1 (0,9 - 1,2)	0,9 (0,7- 1,4)	0,57
KIM-1/creatinina	1,0 (0,7 - 1,9)	0,9 (0,7 - 1,2)	0,54

Figura 12 - Box-Plot de Tukey

Figura 12 - Box-Plot de Tukey comparando os valores e sua dispersão para os diversos marcadores urinários estudados. As caixas brancas correspondem aos valores de razão observados no grupo placebo (n=10) e as caixas cinzas as diferentes doses empregadas (n=4).

5.2.4. SISTEMA CARDIOVASCULAR

Foram avaliados os parâmetros clínicos pressão arterial e frequência cardíaca e os parâmetros eletrocardiográficos intervalo PR, intervalo QT e intervalo QTC. As tabelas 11 e 12 e as figuras 13 e 14 mostram o comportamento destes parâmetros antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo e mostram os valores observados de média e IC95% entre os períodos basal, 24h após o uso do medicamento experimental ou placebo e 30 dias após a exposição ao EPC-AF® ou ao placebo. Houve redução da PAS 24h no grupo placebo quando comparado os três períodos, entretanto esta diferença não se mostrou significativa após comparação múltipla com teste de Bonferroni ($P=0,08$). Nos parâmetros eletrocardiográficos observou-se redução do intervalo QTc para ambos os grupos, motivados provavelmente pela redução da frequência cardíaca durante a internação. Para o grupo EPC-AF® houve diferença entre os três períodos ($P=0,002$) entretanto, quando corrigido por Bonferroni houve apenas tendência há redução do QTc 24h após o uso de EPC-AF® ($p=0,06$). O mesmo não foi observado no grupo placebo que mesmo após a correção para análises múltiplas por Bonferroni manteve a diferença estatisticamente 24 hs após a exposição por placebo, quando comparado em relação ao período basal ($p=0,01$).

Tabela 11 - Comportamento dos valores clínicos de Frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF®. Valores em média (IC95%).

	Placebo			P	EPC-AF®.			P
	Basal	24h	30d		Basal	24h	30d	
PAS (mmHg)	125 (121 - 129)	118 (112 - 124)	127 (122 - 132)	* 0,047	126 (121 - 130)	123 (118 - 128)	128 (122- 134)	0,22
PAD (mmHg)	77 (73 - 80)	73 (68-79)	74 (71 -78)	0,20	78 (73 -82)	73 (69-77)	76 (72 -81)	0,10
FC (bpm)	69 (63-76)	65 (59-72)	68 (64-73)	0,31	71 (65-77)	65 (60 -70)	70 (64 -76)	0,07

Tabela 12 - Valores eletrocardiográficos para FC, intervalo PR, QT e QRC de acordo com grupo experimental. Valores em média (IC95%).

	Placebo			P	EPC-AF®			P
	Basal	24h	30d		Basal	24 h	30d	
PR (ms)	165 (150- 180)	170 (150 - 190)	159 (143 - 174)	0,66	150 (139 - 161)	156 (147 - 165)	149 (136 - 162)	0,24
QT (ms)	396 (386 - 407)	396 (378 - 412)	407 (394- 420)	0,37	404 (392 - 415)	395 (384 - 406)	403 (391- 415)	0,35
QTc (ms)	414 (401 - 427)	*400 (386- 415)	414 (403- 424)	* 0,01	409 (400 - 419)	400 (394- 406)	415 (408 - 422)	* 0,002

Figura 13 - Comportamento da pressão arterial sistólica (PAS)

Figura 13 - Comportamento da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD e frequência cardíaca (FC) durante as três fases do estudo. Box-Plot de Tukey. Caixas brancas representam o grupo placebo e caixas cinzas o grupo EPC-AF®.

Figura 14 - Valores Eletrocardiográficos

Figura 14 - Valores eletrocardiográficos dos intervalos PR, Qt e Qtc para os grupos placebo (caixas brancas) e EPC-AF® (caixas cinzas). Box Plot de Tukey. * $P < 0,01$ comparado ao período basal.

5.2.5. SISTEMA REPRODUTIVO

5.2.5.1. TESTOSTERONA

A tabela 13 e a figura 15 mostram o comportamento dos níveis séricos de testosterona (ng/mL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, reportando os valores observados de média e IC95%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos.

Tabela 13 - Comportamento dos valores séricos de testosterona (ng/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
393,5 (274,6 - 512,4)	413,0 (333,8 - 492,2)	0,73	420,8 (325,9 - 515,6)	464,5 (343,0 - 585,5)	0,26	0,81

Figura 15 - Comportamento dos valores séricos de testosterona

Figura 15 - Comportamento dos valores séricos de testosterona de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

5.2.1.2. ANDROSTENEDIONA

A tabela 14 e a figura 16 mostram o comportamento dos níveis séricos de androstenediona (ng/mL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, reportando os valores observados de média e IC95%. Houve uma redução significativa no grupo EPC-AF® 30d, comparado aos valores basais deste mesmo grupo. Entretanto, os valores observados aos 30 dias não foram diferentes entre os grupos placebo e EPC-AF® ($P=0,99$). Quando comparados em conjunto por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, não foi observada diferença relevante entre o grupo EPC-AF® 30d e os demais grupos comparadores ($P=0,08$). A interpretação deste fato é a presença de outliers nos grupos basais, tanto placebo (2 outliers) quanto no EPC-AF® (3 outliers). Os dados de 30 dias são mais homogêneos e permitem inferir que aparentemente não houve toxicidade reprodutiva do EPC-AF® e sim um artefato causado pelos valores muito elevados observados no período basal para este grupo. Corrobora este fato o dado de que em nenhum voluntário foram observados valores considerados abaixo do limite de normalidade estabelecido pelo laboratório de referência.

Tabela 14 - Comportamento dos valores séricos de androstenediona (ng/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	ANOVA
92,6 (37,08 - 148,1)	52,7 (38,6 - 66,8)	0,13	99,8 (61,9 - 137,8)	52,74 (43,2 - 62,3)	*0,04	0,08 (EPC-AF® 30d)

Figura 16 - Comportamento dos valores séricos de androstenidiona

Figura 16 - Comportamento dos valores séricos de androstenidiona de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

5.2.1.3. FSH/LH

As tabela 15 e 16 e a figura 17 mostram o comportamento dos níveis séricos de FSH (U/mL) e LH (U/mL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, expressando os valores observados de média e IC95%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos.

Tabela 15 - Comportamento dos valores séricos de FSH (U/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
2,6 (1,9 - 3,4)	3,2 (1,9 - 3,5)	0,25	4,2 (2,7 - 5,7)	4,3 (3,0 - 5,0)	0,76	0,28

Tabela 16 - Comportamento dos valores séricos de LH (U/mL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
3,5	3,9	0,62	3,4	3,2	0,52	0,51
(2,5 - 4,5)	(2,4 - 5,3)		(2,6 - 4,2)	(2,6 - 3,6)

Figura 17 - Comportamento dos valores séricos de FSH (A) e LH (B)

Figura 17 - Comportamento dos valores séricos de FSH (A) e LH (B) de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%

5.2.6. SISTEMA ENDÓCRINO-METABÓLICO

5.2.6.1. GLICEMIA

A tabela 17 e a figura 18 mostram o comportamento dos níveis séricos de glicemia (mg/dL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, expressando os valores observados de média e IC95%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos. O mesmo padrão foi observado com os dados de hemoglobina glicada (dados não mostrados)

Tabela 17 - Comportamento dos valores séricos de glicemia (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P	Basal	30d	P	
85,2 (82,2 - 88,2)	85,7 (79,3 - 92,1)	0,84	83,2 (78,8 - 87,7)	81,9 (78,1 - 85,7)	0,52	0,62

Figura 18- Comportamento dos valores séricos de glicemia

Figura 18 - Comportamento dos valores séricos de glicemia de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%.

5.2.6.2. COLESTEROL TOTAL

A tabela 18 e a figura 19 descrevem o comportamento dos níveis séricos de colesterol total (mg/dL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo e mostram os valores observados de média e IC95%. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos, em ambos os grupos (placebo e EPC-AF®). O mesmo não ocorreu com os dados de triglicerídeos (dados não mostrados), onde não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 18 - Comportamento dos valores séricos de colesterol total (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
172,1 (143 - 201)	160,9 (140 - 189)	0,04*	199,7 (181 - 218)	176,8 (156 - 198)	0,003*	0,06

Figura 19 - Comportamento dos valores séricos de colesterol

Figura 19 - Comportamento dos valores séricos de colesterol total de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%.

5.2.6.3. ÁCIDO ÚRICO

A tabela 19 e a figura 20 mostram o comportamento dos níveis séricos de ácido úrico (mg/dL) antes e após o uso do EPC-AF®, comparado ao placebo, descrevendo os valores observados de média e IC95%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois períodos.

Tabela 19 - Comportamento dos valores séricos de ácido úrico (mg/dL) antes e após o uso de placebo ou EPC-AF® em doses crescentes. Valores em média (IC95%).

Placebo			EPC-AF®			P Valor ANOVA
Basal	30d	P valor	Basal	30d	P valor	
5,8 (4,4 - 7,3)	5,8 (4,9 - 6,7)	0,97	5,2 (4,5 - 6,9)	5,4 (4,9 - 7,1)	0,74	0,98

Figura 20 - Comportamento dos valores séricos de ácido úrico

Figura 20 - Comportamento dos valores séricos de ácido úrico de acordo com o tratamento experimental. Símbolos claros representam os valores individuais antes e após 30 dias do uso de placebo e os escuros antes e após 30 dias do uso de doses crescentes de EPC-AF®. As linhas representam a média e o intervalo de confiança 95%.

5.3. ANÁLISE DE EFICÁCIA

A tabela 20 descreve os resultados observados para os valores médios (IC95%) das razões entre as dosagens realizadas 24h após o uso de medicamento investigacional ou placebo e os valores basais dos principais elementos bioquímicos e minerais presentes na urina e que podem participar do processo fisiopatológico para formação de cálculos urinários. A figura 21 mostra de forma gráfica o comportamentos destas razões de acordo com a dose de EPC-AF®. Não houve modificações estatisticamente significativas da maioria dos componentes estudados, exceto para o Cálcio que apresentou uma redução de sua excreção após o uso de 700 mg de EPC-AF® ($P=0,008$). Também não se observou comportamento dose-efeito para os fatores estudados, exceto para o Cálcio que mostrou uma tendência de redução da Calciúria dose- dependente com o efeito máximo observado na dose de 700mg/d. Entretanto, ao modelar os dados por regressão não linear, nenhum dos fatores estudados apresentou relação dose-efeito com valor de r acima de 0,20.

A figura 22 mostra por Box-plot de Tukey a distribuição dos valores encontrados para os diversos elementos estudados na urina. Quando agrupados e comparados ao placebo, observou-se novamente o efeito para redução da excreção de cálcio urinário com o uso de EPC-AF®. Houve também um aumento da excreção de oxalato comparado ao placebo, mas como destacado, ao se realizar a análise de variância (teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn) não se observou diferenças para a razão de excreção de oxalato urinário 24h após a administração de doses escalonadas de EPC-AF® quando comparado ao placebo.

Tabela 20 - Razão (24h/basal) das concentrações urinárias de cálcio, ácido úrico, citrato, oxalato, sódio, magnésio e fósforo e do pH urinário de acordo com o grupo experimental (placebo ou EPC-AF®). Valores em mediana e intervalo interquartil 25 a 75%.

	Placebo	EPC-AF®	P valor
Cálcio	1,1 (1,0 – 1,4)	0,9 (0,8- 1,0)	*0,0004
Ácido úrico	0,9 (0,8 – 1,3)	1,0 (0,8 – 1,1)	0,84
Oxalato	0,7 (0,5 – 1,0)	1,0 (0,8 – 1,4)	*0,02
Citrato	1,0 (0,65 – 1,8)	0,95 (0,45 – 1,4)	0,54
Fósforo	1,0 (0,8 – 1,1)	0,9 (0,8 – 1,1)	0,36
pH	1,0 (1,0 – 1,0)	1,0 (0,9 – 1,0)	0,54
Sódio	0,9 (0,8 – 1,6)	0,8 (0,6 – 1,0)	0,13
Magnésio	1,0 (1,0 -1,1)	1,0 (0,9 – 1,1)	0,94

Figura 21 - Relação entre a dose e as razões (24/basal)

Figura 21 – Relação entre a dose e as razões (24h/basal) das concentrações urinária de cálcio, ácido úrico, oxalato, citrato, fósforo e sobre o pH urinário. Box-Plot de Tukey. Caixas Brancas representam o grupo placebo e as cinzas as doses escalonadas de EPC-AF®. * P < 0.05 700mg vs. Placebo.

Figura 22 - Razão (24h/basal) das concentrações

Figura 22 - Razão (24h/basal) das concentrações urinárias de cálcio, ácido úrico, citrato, oxalato e fósforo e do pH urinário de acordo com o grupo experimental (placebo ou EPC-AF®). Box-Plot de Tukey. Caixas brancas representam o grupo placebo e as caixas cinzas o grupo EPC-AF®. * P < 0,05 com relação ao placebo.

6. *DISCUSSÕES*

6.1 DISCUSSÃO DE SEGURANÇA

O presente estudo visou averiguar a segurança e inferir a eficácia do EPC-AF®. Por se tratar de um medicamento inovador iniciamos pela fase I que tem como objetivo principal verificar a segurança. Durante esta fase, é preconizado que várias dosagens do medicamento em estudo sejam administradas a um pequeno número de voluntários (20-100), normalmente saudáveis, para avaliação da sua ação toxicológica, efeitos adversos e riscos potenciais. Nesta fase, os pesquisadores esperam determinar as dosagens mais efetivas, além do método e da frequência mais apropriados de administração em função da velocidade de liberação necessária, e se possível, estabelecer as relações dose-resposta, visando obter dados para seguir à fase III (GOMES *et al.*, 2012).

Muitos estudos falham na fase I visto e esta é considerada a etapa de maior desafio tecnológico, pois exige treinamento específico do investigador para identificar e manejar eventos adversos, além de uma infraestrutura dedicada, já que os exames necessários para acompanhamento dos voluntários são diferentes dos exames disponíveis na rede assistencial. A elaboração de protocolo clínico de fase I é complexa, em função da dificuldade de determinar a causalidade dos efeitos adversos. (GOMES *et al.*, 2012).

Os resultados averiguados em nosso estudo são extremamente satisfatórios pois não ocorreu nenhum evento adverso sério e os órgãos alvos não foram afetados. Ainda, o EPC-AF® se mostrou tolerante em todas as doses testadas, incluindo a mais elevada (2,8 g)

Para avaliação cardíaca, foram verificados os parâmetros clínicos pressão arterial e frequência cardíaca e os parâmetros eletrocardiográficos intervalo PR, intervalo QT e intervalo QTC os valores observados de média e IC95% entre os períodos basal, 24h após o uso do medicamento experimental ou placebo e 30 dias após a exposição ao EPC-AF® ou ao placebo. Nos parâmetros eletrocardiográficos observou-se redução do intervalo QTc para ambos os grupos, motivados provavelmente pela redução da frequência cardíaca durante a internação. Para o grupo EPC-AF® houve diferença entre os três períodos ($P=0,002$) entretanto, quando corrigido por Bonferroni houve apenas tendência há redução do QTc 24h após o uso de EPC-AF® ($p=0,06$). O mesmo não foi observado no grupo placebo que mesmo

após a correção para análises múltiplas por Bonferroni manteve a diferença estatisticamente 24hs após a exposição por placebo, quando comparado em relação ao período basal ($p=0,01$).

Não foram observados dados sugestivos de toxicidade no sistema reprodutivo. As concentrações de LH/FSH e testosterona não tiveram influência do EPC-AF®. A Androstenediona teve uma redução significativa no grupo EPC-AF® 30d, comparado aos valores basais deste mesmo grupo. Entretanto, os valores observados aos 30 dias não foram diferentes entre os grupos placebo e EPC-AF® ($P=0,99$). Quando comparados em conjunto por ANOVA e pós-teste de Bonferroni, não foi observada diferença relevante entre o grupo EPC-AF® 30d e os demais grupos comparadores ($P=0,08$). A interpretação deste fato é a presença de outliers nos grupos basais, tanto placebo (2 outliers) quanto no EPC-AF® (3 outliers). Os dados de 30 dias são mais homogêneos e permitem inferir que aparentemente não houve toxicidade reprodutiva do EPC-AF® e sim um artefato causado pelos valores muito elevados observados no período basal para este grupo. Corrobora este fato o dado de que em nenhum voluntário foram observados valores considerados abaixo do limite de normalidade estabelecido pelo laboratório de referência.

De forma semelhante não se observou toxicidade hepática e nos parâmetros metabólicos com o uso de EPC-AF® em comparação ao placebo.

Uma das toxicidades mais importantes e frequentes observadas em ensaios clínicos de fase I de novos medicamentos está relacionada ao sistema hematopoiético pois este apresenta uma rápida divisão celular. A plaquetopenia ou trombocitopenia é relevante sendo uma das primeiras alterações sanguíneas perceptíveis. Em nosso estudo observamos uma diferença estatisticamente significativa para os valores de plaquetas entre os grupos. Esta diferença foi observada entre os valores de plaquetas do grupo basal EPC-AF® com os grupos basal placebo ($P=0,02$) e Placebo 30 d ($P=0,01$). Tal diferença foi motivada pela maior média dos valores de plaquetas no grupo basal EPC-AF® e não por ter havido plaquetopenia. Ainda, os valores observados estão dentro da normalidade laboratorial. Avaliamos também o TP/TTPA notamos que no comportamento dos valores de TP e de TTPA não foram diferentes.

Neste estudo, dada a característica do medicamento em desenvolvimento, foi desenvolvido um painel para avaliação de nefrotoxicidade. Conforme previamente citado na introdução, componentes ativos do EPC-AF®, em especial os AGQ têm uma

alta concentração no tecido renal. A taxa de filtração glomerular foi avaliada pelo Clearance de Creatinina e pela dosagem sérica de Cistatina C. Houve em média uma redução de cerca de 6ml/min no grupo EPC-AF® e de cerca de 16 ml/min no placebo. Não foi observada relação com a dose empregada e 8 voluntários dos 20 que receberam o EPC-AF® mostraram discreta redução da TFG. Por outro lado, 4 dos 10 voluntários que receberam placebo também tiveram uma discreta redução da TFG estimada pela creatinina. Embora só tenha sido observada diferenças estatisticamente significativas no grupo EPC-AF®-AP®, a magnitude da redução do clearance de creatinina e a proporção de indivíduos que experimentaram tal redução foi semelhante entre os dois grupos, sendo ainda maior no placebo. Este dado pode estar relacionado ao jejum hídrico que foi feito na Unidade de Pesquisa Clínica anterior ao uso do medicamento experimental ou placebo e pode representar uma resposta fisiológica a depleção de volume e não lesão renal. Corroborar com esta hipótese o fato de que não observamos elevação significativa dos marcadores de lesão tubular aguda e que, 30 dias após o uso, todos os voluntários apresentaram TFG dentro da normalidade e semelhante ao valor basal.

Com relação aos marcadores de lesão tubular aguda nenhuma alteração significativa foi observada. A Alfa-1-microglobulina (α_1 M) foi utilizada pois esta proteína de baixo peso molecular é filtrada nos glomérulos, mas reabsorvida no túbulo próxima pelo complexo megalina-cubilina. Desta forma, lesões neste segmento do nefro cursam com aumento da excreção urinária deste marcador (Yu *et al.*, 1983). O NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocain) também é uma pequena proteína de peso molecular de 25-kD, livremente filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos túbulos proximais. Em condições fisiológicas, como a esperada nos voluntários estudados, a concentração de NGAL é bastante baixa. Por outro lado, em condições de lesão tubular aguda há aumento de sua expressão nos túbulos proximais, alça de Henle e túbulos coletores coletores (SCHMIDT-OTT *et al.*, 2007 e KUWABARA *et al.*, 2009). Desta forma, a NGAL complementa a avaliação dos demais marcadores estudados, reforçando a segurança renal do EPC-AF® (BOLIGNANO *et al.*, 2009). Um terceiro marcador utilizado foi a N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), uma enzima lipossomal expressa nos túbulos proximais. A NAG tem se mostrado sensível na detecção de lesão renal associada a nefrotoxicidade e complementa os dados dos demais marcadores estudados (PRICE, 1992 e EMEIGH HART, 2005). Em nosso

estudo, não observamos nenhuma alteração significativa deste marcador, mesmo em altas doses do EPC-AF®. Finalmente, estudamos também as concentrações urinárias de uma proteína transmembrana do tipo 1 denominada Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), que não é detectada em urina ou tecido renal normal, mas tem sua expressão documentada em células do túbulo proximal humano e de roedores quando os rins são submetidos a injúria renal aguda, particularmente isquêmica. Ainda, o KIM-1 é excretado na urina e tem seus valores significativamente elevados quando há LRA. Nossos dados foram variáveis para este marcador, mas parte da explicação desta variabilidade se deve as baixas concentrações observadas em nossos voluntários, considerados saudáveis (HAN *et al.*, 2008).

6.2 DISCUSSÃO EFICÁCIA

Os resultados apresentados neste trabalho não permitiram avançar no conhecimento do potencial mecanismo de eficácia do EPC-AF®. O principal objetivo deste projeto foi o de avaliar a segurança do composto, utilizado pela primeira vez em humanos com as doses e forma farmacêutica desenvolvida. Foi procurado, entretanto, observar se o uso de doses crescentes de EPC-AF® estariam associadas a mudanças dos componentes minerais e orgânicos relacionados à formação de cálculos renais. Os dados apresentados neste trabalho não são consistentes com os que foram observados inicialmente em modelos animais, ou seja, a maior excreção de magnésio urinário, a redução nas concentrações urinárias de ácido úrico e oxalato e o aumento da citratúria (GOMES *et al.*, 2012 e YU *et al.*, 1983). Nenhum dos componentes avaliados apresentou clara relação dose-efeito, o que faz supor que nas doses usadas e em tomada única não há clara modificação da composição da urina no tocante a modificações das concentrações de elementos facilitadores ou inibidores da cristalização na urina. Por outro lado, deve-se destacar que o presente experimento, por estudar um número muito limitado de voluntários por dose (apenas 4), não possui poder estatístico para detectar variações na composição urinária que sejam clinicamente significantes. Ainda, o uso de apenas uma dose pode ter sido insuficiente para modificar a composição da urina, ainda mais em voluntários saudáveis com ausência de história de episódio anterior de litíase renal. Por todos estes motivos, um

novo ensaio de fase II deve ser realizado para se avançar na comprovação da potencial modificação das concentrações de minerais na urina por este composto promissor.

Os mecanismos de ação do EPC-AF® podem se estender além da modificação da composição urinária. A formação de cálculos renais se inicia no processo de nucleação dos cristais que pode ser homogêneo ou heterogêneo e pode ocorrer dentro dos túbulos ou no interstício renal, neste caso associado a núcleos de fosfato de cálcio presentes no interstício das porções mais distais da papila renal, conhecida como placas de Randall (BOLIGNANO *et al.*, 2009 e PRICE, 1992). Em ambos os processos, a adesão destes cristais às células epiteliais, sejam elas o urotélio ou as células tubulares das porções mais distais do nefro, parece ser um passo fundamental para que haja a agregação de novos cristais e crescimento do cálculo. O processo de adesão dos cristais, particularmente dos de oxalato de cálcio, tem sido parcialmente desvendado ao longo das últimas décadas. Utilizando modelos “in vitro”, como o uso de células de túbulo distal de cão (MDCK1, Madin-Darby canine kidney type I), observou-se que a adesão de cristais de oxalato de cálcio à esta célula depende de um conjunto chave de proteínas expressas na membrana celular. Dentre estas proteínas, destacam-se as anexinas A1 e A2, a proteína de choque ao calor-90 (heat shock protein HSP-90), a α -enolase e algumas glicosaminoglicanas derivadas do ácido hialurônico (FONG-NGERN *et al.*, 2011 apud EL-SALAM *et al.*, 2018). O pré-tratamento com anticorpos contra estas proteínas de membrana reduzem acima de 50% a ligação dos cristais de oxalato de cálcio as células MDCK1. Um segundo modelo bastante interessante é baseado no uso “ex-vivo” de túbulos de Malpighi, removidos de *drosophila melanogaster*. Este modelo permite a avaliação da adesão e da agregação intratubular de cristais de oxalato de cálcio. Desta forma, substâncias promissoras no tratamento da litíase, particularmente de cristais de cálcio, podem ser testadas. Ainda, o uso destes insetos permite o ensaio “in vivo” com dietas ricas em oxalato de sódio. Esta abordagem promove a formação de cristais de oxalato de cálcio no sistema excretor dos insetos, induzindo a sua morte precoce (7). Em publicação recente, o uso de um extrato de uma planta brasileira (*Costu arabicus*) mostrou reduzir a agregação dos cristais de oxalato de cálcio as células MDCK1 (8). Entretanto, este efeito só foi observado ao se realizar o pré-tratamento dos cristais com a fração aquosa da planta. Curiosamente, outras plantas utilizadas para o tratamento popular

para as doenças renais, particularmente na África, como a *Lepidobotrys staudtti*, a *Guiera senegalensis* e a própria *Copaífera langsdorffi* possuem compostos em comum, entre eles os derivados do ácido galoilquínico (9,10,11). Recentemente, utilizando um composto sintético obtido a partir do ácido galoilquínico (3,4,5 tri-O-galoquinil metil-ester – TGAME), foi observado que houve redução da adesão dos cristais de oxalato de cálcio de forma dose-dependente às células MDCK1, efeito que foi desprovido de citotoxicidade. Este efeito foi associado a dois efeitos celulares distintos. Houve redução da formação de radicais livres de oxigênio e redução importante da expressão da Anexina A1. O tratamento com anticorpos anti-anexina A1 reproduziu os resultados de redução da ligação do oxalato de cálcio às células tubulares “in vitro”. Ainda, este mesmo composto foi capaz de inibir a agregação em túbulo de Malpighi no modelo “ex vivo” de *Drosophila melanogaster* (EL-SALAM, 2018).

Somados, os efeitos farmacodinâmicos do EPC-AF® permitem apontar para um medicamento inovador radical em sua classe. Ele teria tanto um efeito na redução da supersaturação urinária, quanto na redução da adesão de eventuais cristais formados às células epiteliais, facilitando a sua excreção e dificultando a agregação e crescimento dos cálculos. Desta forma, é fundamental que novos experimentos em humanos sejam realizados, agora com pacientes portadores de nefrolitíase, para que o real potencial terapêutico do EPC-AF® seja conhecido.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo de fase I/IIa permite concluir:

- 1) O EPC-AF® mostrou-se seguro nas doses de 125mg a 2,8 g, não apresentando nenhum efeito adverso clinicamente relevante relacionado ao uso do medicamento.
- 2) Não houve indícios de toxicidade cardíaca, endócrina, reprodutiva, hematológica e hepática dentro da faixa de doses estudada. Houve uma discreta redução da TFG, observada na mesma magnitude no grupo ativo e placebo, embora de significância estatística apenas no grupo ativo. Esta alteração foi transitória, reversível no 30d após o uso do EPC-AF®, não foi dose-dependente e não foi acompanhada de lesão tubular aguda, o que sugere que não houve lesão renal e sim uma alteração fisiológica transitória.
- 3) Houve uma redução significativa da excreção de cálcio urinário, de forma aguda, sem comprometer a excreção de fósforo e de citrato urinário. O estudo não tem poder para tecer conclusões sobre eficácia e novos estudos devem ser feitos para se detectar se este efeito é clinicamente relevante. O efeito máximo observado para a redução da calciúria parece ser com o uso de 700 mg de EPC-AF®. Estudos futuros de fase IIb/III devem ser desenhados com doses entre 125 e 700mg/d em pacientes portadores de litíase

8. REFERÊNCIAS

AJAYI, L.; JAEGER, P.; ROBERTSON, W. e UNWIN, R. Renal stone disease. **Medicine**, v. 35, p. 415-419, 2007.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. São Paulo: Grupo Gen, 2004.

ASSELMAN, M. *et al.* Calcium Oxalate Crystal Adherence to Hyaluronan-, Osteopontin-, and CD44-Expressing Injured/Regenerating Tubular Epithelial Cells in Rat Kidneys. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 12, p. 3155–3166, 2003

BARCELO, P. *et al.* Randomized double-blind study of potassium citrate in idiopathic hypocitraturic calcium nephrolithiasis. **Journal of Urology**, v. 150, n. 6, p. 1761–1764, 1993.

BARROS, E.; VERONESE, F. J. V. Litíase renal. In: FOCHESSATO FILHO, L.; BARROS, E. *Medicina Interna na Prática Clínica*. Porto Alegre: Artmed; 2013. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/5883/litiasse_renal.htm. Acesso em 30/08/2017

BASHIR, S.; GILANI, A. H. Antiurolithic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 1, p. 106–116, 2009.

BASILE, A. C.; SERTI, J. A. A.; FREITA, P. C. D. e ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **J. ethnopharmacol**, v. 22, p. 101-109, 1988.

BHUSKUTE, N. M.; YAP, W. W.; WAH, T. M. A retrospective evaluation of Randall's plaque theory of nephrolithiasis with CT attenuation values. **European Journal of Radiology**, v. 72, n. 3, p. 470–472, 2009.

BIHL, G.; MEYERS, A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. **Lancet**, v. 358, n. 9282, p. 651-6, 2001.

BOLIGNANO, D. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. **Clin. j. am. soc. nephrol.**, v. 4, n. 2, p. 337–344, 2009.

BRANCALION, A.P.S. *et al.* Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urol. res.**, v. 40, n. 5, pp. 475-481, 2012.

BUOEN, C.; BJERRUM, O. J.; THOMSEN, M. S. How first-time-in-human studies are being performed: A survey of phase I dose-escalation trials in healthy volunteers published between 1995 and 2004. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 10, p. 1123–1136, 2005.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A. e PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CASCON, V. Copaíba: *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CASCON, V. e GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v. 55, p. 773-778, 2000.

CHAMBÔ, J. L., Guia Prático de Urologia. Sociedade Brasileira de Urologia, 2004, Seção VIII, capítulo 169. **Epidemiologia, etiologia, diagnóstico e tratamento clínico da litíase urinária**. Disponível em http://sbv.org.br/publicacoes_guiia66praticodeurologia.asp. Acesso em 28 de abril de 2004.

CHRISTINA, A. J. M. *et al.* Antilithiatic effect of *Asparagus racemosus* willd on ethylene glycol-induced lithiasis in male albino Wistar rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 27, p. 633-638, 2005.

COSTA, P. S; SILVA, C. A. T.. Análise do impacto do progresso tecnológico nos custos do tratamento hospitalar: o caso do tratamento para litíase urinária no Hospital Universitário de Brasília, **Caderno EBAPE.BR**, 4, 1, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 8, p. 1231-1234, 2002.

COSTA-MACHADO, A. R. M. Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: otimização de extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos fatoriais. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção de título de mestre em Ciências, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 130p., 2011.

DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. **Scand. j. clin. lab. invest.**, v. 68, n. SUPPL. 241, p. 89–94, 2008.

DEVARAJAN, P. NGAL in Acute Kidney Injury: From Serendipity to Utility. **Am. j. kidney dis.**, v. 52, n. 3, p. 395–399, 2008.

EL-GAMAL, O. *et al.* Role of combined use of potassium citrate and tamxulosin in the management of uric acid distal ureteral calculi, **Urol. res.**, 40, 3, 219-224, 2012.

EL-SALAM, M.A. *et al.* The Synthesized Plant Metabolite 3,4,5-Tri-O-Galloylquinic Acid Methyl Ester Inhibits Calcium Oxalate Crystal Growth in a Drosophila Model, Downregulates Renal Cell Surface Annexin A1 Expression, and Decreases Crystal Adhesion to Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 4, p. 1609–1621, 2018.

EMEIGH HART, S. G. E. Assessment of renal injury in vivo. **J. pharmacol. toxicol. methods.**, v. 52, n. 1, p. 30–45, 2005.

ETTINGER, B. *et al.* Potassium-magnesium citrate is an effective prophylaxis against recurrent calcium oxalate nephrolithiasis. **J. Urol.**, v. 158, n. 6, p. 2069–2073, 1997.

FERRARI, M.; PAGNONI, U. M.; PELIZZONI, F.; LUKES, V. e FERRARI, G. Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 905-907, 1971.

FONG-NGERN, K. *et al.* Large-scale identification of calcium oxalate monohydrate crystal-binding proteins on apical membrane of distal renal tubular epithelial cells. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 10, p. 4463–4477, 2011.

GARCIA, J. E. R. Litiasis renal. Viatusalud, 14 Oct. 2002. Disponível em: <http://www.viatusalud.com/Documento.asp?id=33>>. Acesso em 26 de Outubro de 2017.

GOMES, R. D. P. *et al.* Ensaios clínicos no Brasil: competitividade internacional e desafios. **BNDES Setorial**, n. 36, p. 45–84, 2012.

GUERRA, M. P. e NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 3ed, p. 13-26, 2001.

HAASE, M. *et al.* Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. **Am. j. kidney dis.**, v. 54, n. 6, p. 1012–1024, 2009.

HAN, W. K. *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney int.**, v. 62, n. 1, p. 237–244, 2002.

HAN, W. K. *et al.* Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. **Kidney int.**, v. 73, n. 7, p. 863–869, 2008.

HÜBNER W. A.; IRBY, P.; STOLLER, M. L. Natural history and current concepts for the treatment of small ureteral calculi. **Eur Urol.** 1993;24(2):172-6.

JULIOUS, S. A., Sample sizes for clinical trials with Normal data. **Statist. Med.**, v. 23, p. 1921–1986, 2004.

KRIEGER, J. N. *et al.* Dietary and behavioral risk factors for urolithiasis: potential implications for prevention. **Am. j. kidney dis.**, v. 28, p. 195-201, 1996.

KORKES, F.; GOMES, S.A.; HEILBERG, I.P. Diagnóstico e tratamento de litíase ureteral. **J Bras Nefrol.**, v.31, n.1, p. 55-61, 2009.

KUWABARA, T. *et al.* Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. **Kidney International**, v. 75, n. 3, p. 285–294, 2009.

LAIKANGBAM, R.; DEVI. M. D. e SINGH, S. R. Anti-bacterial efficacy of elite medicinal plants on urolithiasis inducing flora. **JFAE**, v.7, p. 40-45, 2009.

LANGENHEIM, J. H.; ARRHENIUS, S. P. e NASCIMENTO, J. C. Relationship of light intensity to leaf resin composition and yield in the tropical leguminous genera *Hymenaea* and *Copaifera*. **Biochem. system. ecol.**, v. 9, p. 27-37, 1981.

LANGENHEIM, J. H.; CONVIS, C. L.; MACEDO, C. A. e STUBBEBLINE, W. H. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. **Biochem. system. ecol.**, v. 14, p. 41-49, 1986a.

LIU, C-C.; HUANG, S-P.; WU, W-J.; CHOU, Y-H.; JUO, S.; TSAI, L-Y.; HUANG, C-H. e WU, M-T. The Impact of Cigarette Smoking, Alcohol Drinking and Betel Quid Chewing on the Risk of Calcium Urolithiasis. **Annals of Epidemiology**, v. 19, p. 539-545, 2009.

LOJANAPIWAT, B. et al. Alkaline citrate reduces stone recurrence and regrowth after shockwave lithotripsy and percutaneous nephrolithotomy. **International Braz J Urol**, v. 37, n. 5, p. 611-616, 2011.

MACEDO, C. A. e LANGENHEIM, J. H. A further investigation on leaf sesquiterpenes variation in relation to herbivory in two Brazilian populations of *Copaifera langsdorffii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 207-216, 1989a.

MACEDO, C. A. e LANGENHEIM, J. H. Microlepidopteran herbivory in relation to leaf sesquiterpenes in *Copaifera langsdorffii* adult trees and their seedling progeny in a Brazilian woodland. **Biochem. system. ecol.**, v. 17, p.217-224, 1989b.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR., V. F.; GRYNBERG, N. F. e ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MOE, O.W.; PEARLE, M. S. Sakhaee K. Pharmacotherapy of urolithiasis: evidence from clinical trials. **Kidney Int.** 2011;79(4):385-92.

OHSAKI, A. et al. The isolation and the *in vivo* potent antitumor activity of cleoredane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorg. med. chem. lett.**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, R. B. DE *et al.* Effect of the *copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

ORTIZ, V.; AMBROGINI, C. Fisiopatologia e Tratamento Clínico da Litíase Urinária. NARDOZZA JÚNIOR, A.; ZERATI FILHO, M.; REIS, R. B. (Ed). **Urologia Fundamental**. São Paulo: Planmark, 2010. Cap. 12. Disponível em: <http://www.sbu-sp.org.br/admin/upload/os1688-completo-urologiafundamental-09-09-10.pdf>. Acesso em: 15 de Out. 2016.

P D R Physician's Desk Reference for Herbal Medicines. 2 ed., New Jersey: Medical Economics Company, 2000.

PAIVA, L. A. F. *et al* Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats **J. ethnopharmacol.**, v. 93, p. 51-56, 2004.

PICKARD, R. *et al.* Use of drug therapy in the management of symptomatic ureteric stones in hospitalised adults: A multicentre, placebo-controlled, randomised controlled trial and cost-effectiveness analysis of a calcium channel blocker (nifedipine) and an alpha-blocker (tam. **Health Technology Assessment**, v. 19, n. 63, p. 7–171, 2015.

PREMINGER, G. M. *et al.* Guideline for the management of ureteral calculi. **Eur Urol.**, v. 6, n. 52, 1610-31, 2007.

PRICE, R. G. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clinical Nephrology**, v. 38, n. Supl 1, p. S14–S19, 1992.

PROCHASKA, M. *et al.* Relative Supersaturation of 24-Hour Urine and Likelihood of Kidney Stones. **Journal of Urology**, v. 199, n. 5, p. 1262–1266, 2017.

RANDALL, A. the Origin and Growth of Renal Calculi. **Annals of Surgery**, v. 105, n. 6, p. 1009–1027, 1937.

SAKHAEI, K. *et al.* Contrasting effects of potassium citrate and sodium citrate therapies on urinary chemistries and crystallization of stone-forming salts. **Kidney International**, v. 24, n. 3, p. 348–352, 1983.

SCHMIDT-OTT, K. M. *et al.* Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 407–413, 2007.

SCHOR, N., HEILBERG, I.P. Cálculo renal é doença multifatorial. Disponível em: http://www.samaritano.com.br/?id_noticia:10Etid_not_conteudo=142. Acesso em 28 de abril de 2004.

SEITZ, C., LIATSIKOS, E., PORPIGLIA, F., TISELIUS, H., ZWERGEL, UL. Medical therapy to facilitate the passage of stones: what is the evidence? **European Urology**, v. 56, n. 3, p. 455-471, 2009.

SHAH, R. R. Drug-induced prolongation of the QT interval: Regulatory dilemmas and implications for approval and labelling of a new chemical entity. **Fundam. clin. pharmacol.**, v. 16, n. 2, p. 147–156, 2002.

SINGH, A., ALTER, H.J., LITTLEPAGE, A., A systematic review of medical therapy to facilitate passage of ureteralcalculi, **Annals of Emergency Medicine**, v. 50, n. 5, p. 552-563, 2007.

SOUSA, J. P. B. **Copaífera langsdorffii**: estudo fitoquímico, validação de metodologias analíticas e análise sazonal. 2011. 179f. (Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção de título de Doutor em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

THOMAS, B. e HALL, J. Urolithiasis. **Surgery**, v. 23, p. 129-133, 2005.

VAIDYA, V. S.; FERGUSON, M. A.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers of acute kidney injury: early diagnosis, pathogenesis, and recovery. **Ann. rev. pharmacol. toxicol.**, v. 48, n. 1, p. 463–493, 2008.

YU, H. *et al.* Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal. **J Clin Pathol**, v. 36, p. 253–259, 1983.