Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Ana Braunstein Grinman

Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais

Rio de Janeiro
2019

Ana Braunstein Grinman

Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Eliete Bouskela

Coorientadora: Prof.ª Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G 867 Grinman, Ana Braunstein.

Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais / Ana Braunstein Grinman. – 2019.
77 f.

Orientadora: Prof.ª Dra. Eliete Bouskela
Coorientadora: Prof.ª Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho

Doutorado (Tese) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Intestinos – Doenças inflamatórias – Teses. 2. Crohn, Doença de – Teses. 3. Gastroenterologia – Teses. 4. Proctocolite. 5. Monitoramento de medicamentos. 1. I. Bouskela, Eliete. II. Carvalho, Ana Teresa Pugas. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.34

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 - 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Ana Braunstein Grinman

Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 23 de janeiro de 2019.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.ª Dra. Eliete Bouskela (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof.ª Dra. Maria das Graças Coelho de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____
Prof. Dr. Carlos Antonio Rodrigues Terra Filho
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____
Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____
Prof. Dr. Antonio Jose de Vasconcellos Carneiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2019

Gostaria de dedicar esse trabalho aos meus pais, Santiago Braunstein e Sara W. Braunstein (Z”L) em agradecimento ao amor incondicional e ao apoio e confiança que sempre tiveram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a D´s.

Agradeço a minha família por acreditarem em mim, especialmente meu marido Pedro e meus filhos Rachel, Esther e David.

Agradeço aos meus irmãos Sergio e Débora pela torcida sincera.

Agradeço a minha grande mestra e amiga Ana Teresa Pugas Carvalho pelo apoio em todos os momentos importantes de minha vida - você foi essencial.

Agradeço a minha orientadora Prof.ª Eliete Bouskela e a Prof.ª Maria das Graças Coelho de Souza

Agradeço ao Prof. Heitor Siffert Pereira de Souza pela paciência e dedicação

RESUMO

GRINMAN, Ana Braunstein. **Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais.** 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O objetivo no tratamento de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais é controlar a resposta inflamatória para manter a remissão clínica e endoscópica com cicatrização da mucosa. Parece que o monitoramento do nível sérico das drogas biológicas e de seus anticorpos poderá permitir aos médicos otimizar o tratamento e manter as drogas em concentrações efetivas por mais tempo além de importante impacto no custo do tratamento desses pacientes. Nosso objetivo foi validar a importância da dosagem do nível sérico das drogas anti TNF-α e dos seus anticorpos no manejo clínico dos pacientes com DII, correlacionando com três tipos de evolução clínica: resposta clínica sustentada, perda de resposta e não resposta ao uso da droga, além de correlacionar com parâmetros clínicos, demográficos, laboratoriais e de imagem. Foi realizado um estudo transversal de 95 pacientes com DC ou RCUI em terapia de manutenção com infliximabe ou adalimumabe. Os níveis séricos mínimos dos fármacos e de anticorpos antidrogas foram determinados por testes de ELISA. No presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis das drogas e de seus anticorpos e as respostas clinicas apresentadas pelos pacientes. Em relação à dosagem sérica de infliximabe, vimos que pacientes com níveis mais altos de PCR apresentaram níveis significativamente mais baixos de infliximabe sérico (<3 µg/ml) (p=0,028). Por outro lado, foram encontradas concentrações mais altas de anticorpos anti-IFX em pacientes que não estavam em uso concomitante de imunomoduladores (p=0,022), em pacientes que tiveram maiores efeitos adversos relacionados a biológicos (p=0,001) e maiores níveis de PCR (p=0,042). Os níveis séricos da PCR também estiveram negativamente correlacionados com IFX (CC=-0,315; p=0,033), mas positivamente correlacionados com a presença de anticorpos anti IFX (CC=0,327;p=0,027). A dosagem da albumina sérica apresentou correlação positiva com os níveis séricos de infliximabe (CC=0,379; p=0,004) e de adalimumabe (CC=0,699; p=0,003). Enfim, embora os níveis séricos mínimos e a imunogenicidade do anti-TNF-α não mostraram uma correlação significativa com os desfechos da doença, os resultados reforçam o uso da terapia combinada para pacientes sob infliximabe. Além disso, confirmamos a presença de associações significativas de níveis mínimos de anti-TNF-α e imunogenicidade com o IMC, uso concomitante de imunomoduladores, taxas de efeitos colaterais e também marcadores laboratoriais, incluindo albumina sérica e PCR.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais. Doença de Crohn. Retocolite Ulcerativa. Infliximabe. Adalimumabe. Monitoramento de drogas. Imunogenicidade.

ABSTRACT

GRINMAN, Ana Braunstein. **Study of the serum level of Infliximab and Adalimumab and its antibodies in the management of the treatment of patients with inflammatory bowel diseases.** 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The aim of the treatment of patients with Inflammatory Bowel Diseases is to control the inflammatory response to maintain clinical and endoscopic remission with healing of the mucosa. It seems that monitoring serum levels of biological drugs and their antibodies may allow physicians to optimize treatment and keep drugs in effective concentrations for longer, as well as having a significant impact on the cost of treating these patients. Our aim was to validate the importance of serum levels of anti-TNF-α drugs and their antibodies in the clinical management of patients with IBD, correlating with three types of clinical evolution: sustained clinical response, loss of response and non-response to the use of drug, in addition to correlate with clinical, demographic, laboratory and imaging parameters. A cross-sectional study of 95 patients with CD or UC was performed on maintenance therapy with infliximab or adalimumab. The trough levels of drugs and anti-drug antibodies were determined by ELISA tests. In the present study there was no statistically significant difference between drug levels and their antibodies and the clinical responses presented by the patients. Regarding the serum infliximab dosage, we found that patients with higher CRP levels had significantly lower serum infliximab levels (<3 μg / ml) ($p = 0.028$). On the other hand, higher concentrations of anti-IFX antibodies were found in patients who were not on concomitant immunomodulators ($p = 0.022$), in patients who had biological-related adverse events ($p = 0.001$) and higher levels of CRP ($p = 0.042$). Serum CRP levels were also negatively correlated with IFX ($CC = -0.315$; $p = 0.033$), but positively correlated with the presence of IFX antibodies ($CC = 0.327$; $p = 0.027$). Serum albumin dosage showed a positive correlation with serum infliximab levels ($CC = 0.379$, $p = 0.004$) and adalimumab ($CC = 0.699$, $p = 0.003$). In conclusion, although anti-TNF-α trough levels and immunogenicity do not show a significant correlation with disease outcomes, results reinforce the use of combination therapy for patients under infliximab. Moreover, we confirmed the presence of significant associations of anti-TNF-α trough levels and immunogenicity with BMI, concomitant use of immunomodulators, rates of side effects, and also laboratory markers including serum albumin and CRP.

Keywords: Inflammatory bowel diseases. Crohn's disease. Ulcerative colitis. Infliximab. Adalimumab. Therapeutic drug monitoring. Immunogenicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Algoritmo proposto para tratamento de pacientes com DII sintomáticos 34

Figura 2 - Esquema da configuração do ensaio para análise simultânea de infliximabe e dos anticorpos anti-infliximabe 41

Figura 3 – Esquema da configuração do ensaio para análise simultânea de adalimumabe e dos anticorpos anti-adalimumabe 42

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes e resultados laboratoriais 45

Tabela 2 - Comparação entre as concentrações séricas de infliximabe e anti-infliximabe com variáveis clínicas, endoscópicas e laboratoriais selecionadas 46

Tabela 3 - Comparação entre as concentrações séricas de adalimumabe e anti-adalimumabe com variáveis clínicas, endoscópicas e laboratoriais selecionadas 48

Tabela 4 - Correlações entre níveis séricos mínimos das drogas e anticorpos antidroga com variáveis clínicas, laboratoriais e de imagem 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Adalimumabe
Anti-ADA	Anti-adalimumabe
Anti-IFX	Anti-infliximabe
BMI	*Body Mass Index*
CC	Coeficiente de correlação
CD	*Crohn´s Disease*
Cmáx	Concentração sérica máxima
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DC	Doença de Crohn
ECLIA	*Electrochemiluminescence immunoassay*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ERNM	Enteroressonância magnética
HFSE	Hospital Federal dos Servidores do Estado
INSS	Instituto Nacional do Seguro Social
HMSA	*Homogenous mobility shift assay*
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFX	Infliximabe
IMC	Índice de massa corporal
IMM	Imunossupressor
LR	*Low rate*
MEI	Manifestações extra-intestinais
N	Número de casos
PCR	Proteína C reativa
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
RGA	*Reported gene assay*
RIA	Radioimunoensaio
RM	Ressonância magnética
SC	Subcutâneo
Sem	*Standart error of mean*

TDM	Monitorização terapêutica da droga
tmTNF-α	TNF-α transmembrana
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
sTNF-α	TNF-α solúvel
U	Unidade
UC	*Ulcerative Colitis*
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	**CLÍNICA E ETIOPATOGENIA DAS DII**	13
2	**PAPEL DO TNF-α E TRATAMENTO DAS DII**	14
3	**TERAPIA BIOLÓGICA E FALHAS TERAPÊUTICAS**	19
4	**JUSTIFICATIVA DE INTERESSE CIENTÍFICO**	36
5	**OBJETIVOS**	37
5.1	**Objetivo primário**	37
5.2	**Objetivos secundários**	37
6	**PACIENTES E MÉTODOS**	38
6.1	**Pacientes**	38
6.1.1	Critérios de exclusão	39
6.2	**Coleta e processamento do sangue**	39
6.3	**Dosagem sérica de Infliximabe, Adalimumabe e de seus respectivos anticorpos por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**	39
7	**ANÁLISE ESTATÍSTICA**	43
8	**RESULTADOS**	44
8.1	**População do estudo e resultados laboratoriais**	44
8.2	**Comparação dos níveis séricos mínimos de infliximabe e adalimumabe e de anticorpos antidroga**	46
9	**DISCUSSÃO**	51
	CONCLUSÕES	57
	PESQUISADORES COLABORADORES	58
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65
	APÊNDICE B - Ficha de Acompanhamento dos Pacientes	67
	APÊNDICE C - Planilha com Dados e Resultados dos pacientes	69
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	74
	ANEXO B - Índice de Harvey-Bradshaw- Doença de Crohn	76
	ANEXO C - Classificação de Truelove & Witts para RCUI	77

INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crônicas e progressivas que afetam o trato gastrointestinal. As DII compreendem a Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) que acomete o cólon, e a Doença de Crohn (DC) que pode acometer qualquer segmento do trato gastrointestinal, da boca ao ânus (Chachu e Osterman 2016). Caracterizam-se por períodos de crise e remissão (Ananthakrishnan e Ashwin 2015, Kaplan 2015).

Elas afetam mais de 5 milhões de pessoas em todo o mundo sendo 1,4 milhões somente nos Estados Unidos da América e 3 milhões na Europa (Ananthakrishnan e Ashwin 2015, Burisch e Munkholm 2015).

A incidência das DII tem aumentado nos últimos anos. A incidência da RCUI e da DC na Europa aumentou de 6,0 por 100000 habitantes-ano na RCUI e 1,0 por 100000 habitantes-ano na DC em 1962 para 9,8 por 100000 habitantes-ano e 6,3 por 100000 habitantes-ano em 2010 respectivamente (Burisch e Munkholm 2015). Além disso, populações consideradas de "baixo risco" como Índia e Japão tem presenciado aumento de incidência (Ananthakrishnan e Ashwin 2015). Estudos mostram também aumento de incidência em pacientes ditos "em desenvolvimento" como por exemplo Brasil (Kaplan 2015). Nosso país não possui ainda uma estimativa precisa da prevalência e da incidência das DII, mas trabalhos recentes mostram que a incidência está aumentando em alguns estados (SB Fróes et al. 2018). Na maioria das populações os pacientes com RCUI são diagnosticados entre os 30 a 40 anos de vida e os pacientes com DC 5-10 anos antes, entre 20-30 anos de idade (Burisch e Munkholm 2015). Entretanto, o diagnóstico de DII pode ocorrer em qualquer idade. Alguns estudos mostram um segundo pico de incidência, apesar de menor, entre a sexta e a sétima década de vida, principalmente em pacientes com RCUI (Ananthakrishnan e Ashwin 2015, Kaplan 2015).

As DII possuem grande importância devido à alta morbidade que leva a um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes além de alto custo (Kaplan 2015).

Nos Estados Unidos o custo médico direto estimado para pacientes com DII excedeu 6 bilhões de dólares em 2004 (Kaplan 2015). Os maiores custos estão relacionados a hospitalizações, cirurgias, consultas ambulatoriais e medicações.

Enquanto o custo com cirurgias tem diminuído nos últimos anos, o custo com o uso de medicações chamadas terapia biológica tem aumentado significativamente (Danese et al. 2015). A otimização do uso dessas medicações apresenta grande importância para a diminuição desses custos além obviamente do melhor tratamento dos pacientes.

Os custos indiretos, como aqueles relacionados à perda de produtividade no trabalho excedem os custos diretos. Por exemplo, foram estimados custos indiretos no Canadá de 1,6 bilhões dólares canadenses anualmente (Kaplan 2015). Um estudo recente publicado pelo nosso grupo de DII da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) mostrou que pacientes com DII representam 0,01% do total de pacientes afastados temporária ou permanentemente do trabalho pelo Instituto Nacional do Seguro Social (INSS), o que representou US$98.098.212 com gastos por afastamento do trabalho para economia brasileira no período de 2010-2014, por exemplo (SB Fróes et al. 2018).

Finalmente, os custos relacionados à perda da qualidade de vida dos pacientes são difíceis de mensurar, mas afetam de maneira importante pacientes e seus familiares.

1 **CLÍNICA E ETIOPATOGENIA DAS DII**

A RCUI apresenta como sintomas diarreia sanguinolenta, tenesmo, cólica abdominal e dependendo da extensão da doença pode apresentar sintomas sistêmicos como febre e perda de peso (Panaccione 2013, Chachu e Osterman 2016).

A DC tipicamente apresenta-se com diarreia que pode ser sanguinolenta ou não dependendo da localização da doença. Trinta por cento de pacientes com DC podem apresentar também doença perianal que se manifesta através de fissuras anais recorrentes, úlceras anais, abscessos perineais ou fístulas perianais. A dor abdominal geralmente é mais frequente também na DC pelo acometimento do intestino delgado, sendo localizada em região periumbilical ou quadrante inferior direito. Além disso, podem estar presentes também sintomas sistêmicos. A manifestação clínica vai depender da expressão fenotípica predominante, como inflamatória, penetrante ou estenosante (Panaccione 2013, Chachu e Osterman 2016).

Em relação à extensão da RCUI, aproximadamente um terço dos pacientes apresentam proctite, um terço colite esquerda e um terço apresenta pancolite. Em relação a DC, um terço é diagnosticado com doença limitada ao íleo terminal/delgado, 40% com doença íleo-colônica, 25% com colite isolada e 5% com doença do trato gastrointestinal alto (Ananthakrishnan e Ashwin 2015).

Embora grandes progressos venham sendo realizados recentemente no estudo dessas doenças, as DII possuem etiopatogenia complexa, imunologicamente mediada, ainda não totalmente compreendida. Parecem ser causadas por uma resposta exacerbada, descontrolada do sistema imune contra a flora intestinal comensal em pacientes geneticamente susceptíveis (Ananthakrishnan e Ashwin 2015, Jiang e Li 2015, Vatn e Sandvik 2015, Souza e Fiocchi 2016). Evidências sugerem que ela resulta de um defeito de barreira da mucosa intestinal, com uma resposta imune desregulada e desproporcional à microbiota comensal intestinal, levando a um desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com fatores genéticos e ambientais envolvidos, não somente na susceptibilidade da doença, mas também na expressão do seu fenótipo clínico (Vatn e Sandvik 2015, Souza e Fiocchi 2016).

2 **PAPEL DO TNF-α E TRATAMENTO DAS DII**

Entre as citocinas envolvidas no processo de inflamação exacerbada e descontrolada da mucosa intestinal em pacientes com DII, já foi demonstrado que o TNF-α exerce papel fundamental, estando aumentado na mucosa intestinal tanto de pacientes com DC quanto de pacientes com RCUI (Souza e Fiocchi 2016). O TNF-α é produzido principalmente em monócitos e macrófagos em resposta a estímulos antigênicos bacterianos e em menor proporção por linfócitos B e T, mastócitos e fibroblastos (Guerra 2011, Souza e Fiocchi 2016).

Baseado na descoberta do papel do TNF-α na etiopatogenia da inflamação nas DII, foram desenvolvidas drogas anti-TNF-α como infliximabe, adalimumabe, golimumabe e o certolizumabe pegol (a chamada terapia biológica).

Além das drogas anti-TNF-α, há também as chamadas drogas anti-integrinas (natalizumabe e vedolizumabe) e as anti-citocinas (ustekinumabe, anti IL-12 e 23) desenvolvidas mais recentemente (Danese et al. 2015).

O objetivo do tratamento nesses pacientes é controlar a resposta inflamatória para manter a remissão clínica e endoscópica (Burger e Travis 2011, Guerra 2011, Vatn e Sandvik 2015). Atualmente, é preconizada a chamada cicatrização da mucosa e remissão profunda sustentada, pois estudos mostram que essa abordagem leva à remissão clínica e endoscópica mais prolongada e sustentada (Colombel et al. 2015, Danese et al. 2015, Williet 2016).

Em relação ao tratamento dessas doenças, a abordagem tradicional chamada *step up* envolve o uso inicialmente de drogas como mesalazina, antibióticos e dependendo da resposta e gravidade da doença passando para o uso de corticOide, imunossupressores como azatioprina, 6-mercaptopurina ou metotrexate. O uso da terapia biológica nessa abordagem é reservado para casos moderado a graves refratários a essas terapias iniciais (Sohrabpour et al. 2010, Burger e Travis 2011).

Há algum tempo vem sendo preconizado por alguns autores, em casos selecionados de pacientes jovens e com sinais de gravidade e pior prognóstico a chamada abordagem *top down* com o uso de terapia biológica precocemente, antes do uso de outras drogas, o que poderia mudar a história natural da doença, reduzindo complicações, internações e cirurgias (Burger e Travis 2011).

O infliximabe e o adalimumabe são anticorpos monoclonais contra o TNF-α mais utilizados no mundo no tratamento de DII e que já mostraram ser efetivos no tratamento de diversas patologias, entre elas a artrite reumatóide, espondilite anquilosante, psoríase, artrite psoriásica e as doenças inflamatórias intestinais, tanto na indução quanto na manutenção de remissão de doença (Yamada 2010, Steenholdt et al. 2011, Van der Maas et al. 2012).

O infliximabe foi a primeira droga biológica aprovada para tratamento da DC em 1998. É um anticorpo monoclonal quimérico (75% humano- 25% murino) IgG1 direcionado contra o TNF-α. Ele se liga com alta afinidade às formas solúveis e de membranas do TNF-α, mas não à linfotoxina alfa (TNF-beta) (Ordás et al. 2012). Ele é composto de uma fração Fc humana e fragmentos Fab derivados de camundongos. É administrado via intravenosa em doses de 5 mg/kg com infusões de indução nas semanas 0, 2 e 6, seguida de manutenção a cada 8/8 semanas.

A farmacologia desses agentes é complexa e depende não somente de sua estrutura (anticorpos monoclonais), mas também das propriedades do antígeno alvo e dos fatores relacionados ao paciente e a doença (Ordás et al. 2012).

A identificação dos fatores que influenciam a farmacodinâmica e a farmacocinética dessas drogas é essencial para otimizar o tratamento dos pacientes.

Um importante fator que afeta a farmacocinética dos anti-TNF-α é a formação de anticorpos antidroga. Todos os agentes biológicos têm potencial de imunogenicidade e podem cursar com desenvolvimento de anticorpos antidroga conforme já observado em estudos randomizados (Danese et al. 2015). Esses anticorpos neutralizam diretamente a atividade dessas drogas por se ligarem a locais específicos das drogas ou por acelerar o *clearance* da droga pelo sistema retículo endotelial através da formação de imunocomplexos (Ordás et al. 2012). Além disso, a formação desses anticorpos antidroga pode afetar também a segurança das drogas aumentando o risco de efeitos adversos como anafilaxia e outros (Colombel et al. 2015, Danese et al. 2015).

O uso concomitante de imunossupressores, como, por exemplo, a azatioprina, em combinação com agentes anti-TNF-α (chamada terapia combinada) diminui a formação de anticorpos antidroga, além de aumentar a eficácia e resposta à droga, mas isso só foi demonstrado para o infliximabe, apesar de provavelmente poder ser estendido à outras terapias anti-TNF-α (Colombel et al. 2015, Danese et al. 2015).

Outros fatores que parecem afetar a farmacocinética dos anti-TNF-α incluem o índice de massa corporal (IMC alto aumenta o clearance da droga), a concentração de albumina sérica (albumina baixa aumenta o clearance da droga), a presença concomitante de terapia imunossupressora (diminui a formação de anticorpos, aumenta a concentração da droga, diminui o *clearance*, melhora a evolução clínica), o grau de inflamação sistêmica e o tipo de doença (DC x RCUI) (Ordás et al. 2012).

Além disso, proteína C reativa basal alta indica aumento do *clearance* da droga. O sexo masculino e concentrações séricas e teciduais aumentadas de TNF-α também parecem aumentar o *clearance* da droga (Ordás et al. 2012).

Em relação às propriedades farmacocinéticas do infliximabe, infusões intravenosas únicas de 1, 3, 5, 10 ou 20 mg/kg promoveram aumentos proporcionais à dose na concentração sérica máxima (Cmáx) e na área sob a curva de concentração vs. tempo (AUC). O infliximabe é distribuído predominantemente no compartimento vascular. Não foram observadas diferenças importantes na depuração ou volume de distribuição em subgrupos de pacientes distribuídos por idade, peso ou função hepática ou renal. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros farmacocinéticos de dose única entre pacientes pediátricos e adultos com DC (Remicade®, bula).

Em doses únicas de 3, 5 e 10 mg/kg, os valores farmacocinéticos médios para a Cmáx foram de 77, 118 e 277 μg/mL, respectivamente. A mediana da meia-vida nessas doses variou de 8 a 9, 5 dias. Na maioria dos pacientes, o infliximabe foi detectado no soro durante pelo menos oito semanas após uma infusão única. Um pequeno acúmulo de infliximabe foi observado no soro após a segunda dose do esquema habitual de três doses e não houve acúmulo clinicamente relevante posteriormente. Na maioria dos pacientes com DC fistulizante, o infliximabe foi detectado no soro por 12 semanas (variação de 4 a 28 semanas) após a administração do esquema de dose de indução (Remicade®, bula).

Em contraste com o infliximabe, o adalimumabe é um anticorpo monoclonal totalmente humano. É administrado via subcutânea, num esquema de 160mg, seguido de 80 mg e 40 mg com intervalos de duas semanas (indução) e regime de manutenção de 40 mg a cada duas semanas.

Apesar de ser anticorpo totalmente humano o adalimumabe também apresenta risco de imunogenicidade e formação de anticorpos antidroga (Wang et al.

2013). A formação de anticorpos anti adalimumabe está associada com baixas concentrações séricas da droga e redução da resposta ao tratamento.

Tanto o infliximabe quanto o adalimumabe possuem como alvo o TNF-α em formas solúveis e associadas à membrana, inibindo assim o TNF-α de ativar seus receptores, induzindo a apoptose de linfócitos e diminuindo assim a inflamação (Pariente et al. 2012).

O TNF-α transmembrana (tmTNF-α), um percursor da forma solúvel do TNF-alpha (sTNF-α), é expresso em macrófagos ativados e linfócitos, e em outros tipos de células. Após ser processado pela enzima conversora de TNF-α, o sTNF-α é clivado do tmTNF-α e realiza suas atividades biológicas ao se ligar em receptores de TNF-α em tecidos distantes. Evidências sugerem que não apenas o sTNF-α, mas também o tmTNFα está envolvido na resposta inflamatória.

O tmTNF-α atua como uma molécula bipolar que transmite sinais tanto como ligante mas também como receptor (Amini Kadijani et al. 2017).

Em células produtoras de TNF-α ele se liga a receptores do TNF e transmite sinais para as células como um ligante, transmitindo sinais do exterior para o interior da célula. Quando atua como receptor de IFX, a ligação do IFX ao tmTNF-α ativa alguns mecanismos anti-inflamatórios incluindo a indução a apoptose, que é considerado um dos mais importantes. Nesse processo, é ativada a apoptose das células inflamatórias, resultando na atenuação da inflamação.

Realmente, pacientes com DII não respondem ao tratamento com Etanercept, que seria outro agente anti-TNF, mas que diferentemente do IFX, parece só inibir o sTNF-α, mas não induz essa sinalização ao tmTNF-α que levaria a apoptose e seu papel anti-inflamatório.

Assim, a concentração de tmTNF-α e o número de células com tmTNF-α pode estar relacionado a resposta ao IFX nos pacientes com DII. Uma maior densidade de tmTNF-α pode levar a uma indução mais efetiva de apoptose de células inflamatórias pelo infliximabe, e a uma melhor resposta clínica ao IFX (Amini Kadijani et al. 2017).

Assim, a densidade de tmTNF-α e o número de células portadoras de tmTNF-α pode ser um biomarcador de resposta ao IFX. A identificação de um biomarcador que possa prever a resposta ao uso de IFX poderá reduzir os riscos e o custo do uso dessa droga.

Em um estudo foi testada essa hipótese em pacientes com falha de resposta primária ao tratamento com IFX. Foi visto que a densidade de TNF-α transmembrana é diferente entre os pacientes com DII. Pacientes com densidades maiores apresentam maiores taxas de apoptose após terapia com IFX. Assim a densidade do TNF-α transmembrana seria um biomarcador que poderia predizer resposta primária ao IFX (Amini Kadijani et al. 2017).

3 **TERAPIA BIOLÓGICA E FALHAS TERAPÊUTICAS**

Apesar do seu indiscutível sucesso, a terapia anti-TNF-α tem suas deficiências incluindo reações infusionais e alta incidência de não respondedores primários e secundários, explicado adiante (Jiang e Li 2015). Nem todos os pacientes respondem a esse tipo de terapia com aproximadamente 30% dos pacientes com falha na resposta na indução (não respondedores primários) e uma parte considerável desses pacientes inicialmente respondedores perdem a resposta com o passar do tempo (em torno de 40-60%) (Pariente et al. 2012). Em pacientes inicialmente respondedores o risco anual de perda de resposta é 13% por paciente/ano (Pariente et al. 2012).

Há então dois tipos de falha no tratamento com anticorpos anti-TNF-α:

a) Não respondedores primários: sem resposta a terapia de indução com infliximabe ou adalimumabe;
b) Não respondedores secundários: responderam a terapia inicialmente, mas depois pararam de responder.

As razões para as falhas no tratamento dos pacientes com essas drogas são amplamente debatidas e estudadas (Steenholdt 2013). Entre os mecanismos propostos para essa perda incluem a presença de anticorpos antidroga (anti-infliximabe ou anti-adalimumabe) conforme anteriormente relatado, que aumentam seu *clearance* e neutralizam sua atividade, diminuindo, além disso, a concentração sérica da droga. A presença de anticorpos antidroga aumenta também o risco de reações infusionais à droga (Jiang e Li 2015).

A monitorização terapêutica da droga (TDM) envolve a dosagem do nível sérico da droga ou de seus metabólitos ativos e anticorpos antidroga e é uma estratégia promissora, já realizada em diversas partes do mundo, que pode otimizar o tratamento de pacientes com DII. É baseado na premissa de que há uma relação entre a exposição à droga e a evolução e há uma considerável variabilidade entre os indivíduos de como essa droga é metabolizada (farmacocinética) e da magnitude e duração da resposta à terapia (farmacodinâmica). Apesar disso alguns estudos questionam os riscos e benefícios de uma estratégia de tratamento baseada no

monitoramento da droga e de seus anticorpos comparado ao tratamento empírico. Além disso, o tratamento pró-ativo baseado no monitoramento da droga e anticorpos em pacientes com doença quiescente ainda é uma estratégia controversa (Vande Casteele et al. 2017).

O propósito racional do uso do monitoramento do nível sérico das drogas utilizadas e de seus anticorpos antidroga seria que essa estratégia pode ajudar objetivamente a se entender o motivo da falha terapêutica e definir os próximos passos no manejo desses pacientes. Uma ação pró ativa pode ser uma ótima oportunidade de otimizar a terapia ao máximo, antes do paciente apresentar expressão clínica, endoscópica ou laboratorial aumentando as chances do sucesso do tratamento (Vande Casteele et al. 2017).

Apesar do crescente uso do monitoramento das drogas e anticorpos na prática clínica, ainda há algumas dúvidas de quando e quantas vezes mensurar, de seus benefícios e custos.

As dúvidas se referem principalmente em dois tipos de situações clínicas principais: nos pacientes com doença inflamatória ativa e nos pacientes com doença quiescente. Até que ponto uma abordagem baseada principalmente na dosagem sérica das drogas e na presença ou não de anticorpos antidroga é mais eficiente do que a abordagem empírica no manejo dessas drogas?

Medicamentos biológicos, mais especificamente anticorpos monoclonais são drogas protéicas que podem se ligar a antígenos específicos com grande especificidade e com isso levar a bloqueio eficaz de certas funções fisiológicas ou patológicas.

Uma característica dos medicamentos biológicos seria que o sistema imune reconhece essas substâncias como não próprias, e ativa a resposta imune humoral ou celular levando à formação de anticorpos contra a droga biológica. Esses anticorpos diminuem a eficácia da droga tanto por bloquear o local de ligação antígeno-anticorpo como pela formação de complexos com a molécula levando a um aumento do *clearance* da droga (Vande Casteele et al. 2017).

A concentração da droga no local de seu receptor determina a magnitude da resposta farmacológica e a monitorização da exposição à droga nos pacientes pode ser útil para guiar decisões terapêuticas na prática clínica. Várias aferições podem ser usadas para medir a exposição da droga, mas a concentração sérica mínima

que seria a concentração da droga imediatamente antes da próxima infusão é a mais utilizada (Vande Casteele et al. 2017).

Existem diferentes formatos de ensaio para dosagem da droga e de seus anticorpos, sendo os mais utilizados *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *homogenous mobility shift assay* (HMSA) e *electrochemiluminescence immunoassay* (ECLIA),

Em geral as diferentes técnicas se mostraram relativamente comparáveis com especificidade, acurácia e reprodutibilidade aceitável entre elas. HMSA e ECLIA são mais sensíveis para se detectar anticorpos com baixa afinidade do que *ELISA* (Vande Casteele et al. 2017).

Ao se interpretar os resultados recomenda-se observar primeiramente o nível sérico da droga. Na presença de uma concentração terapêutica da droga, geralmente os anticorpos são indetectáveis. Se detectáveis são geralmente de baixas concentrações e, consequentemente, tem um efeito limitado na farmacocinética da droga.

Pacientes com falha terapêutica, apesar de concentrações séricas adequadas da droga, independentemente da presença de anticorpos, pode ser justificada pelo mecanismo principal de perpetuação da inflamação não relacionado ao TNF-α nesses pacientes e a mudança para outra classe de drogas seria uma abordagem mais racional.

Por outro lado, se a concentração da droga é subterapêutica ou indetectável, aconselha-se a avaliar a concentração de anticorpos antidroga:

a) Se eles estão detectáveis, principalmente em altos títulos, sugere-se que o *clearance* da droga está aumentado devido a um mecanismo imuno-mediado e a mudança para outra droga da mesma classe, mas com outra estrutura molecular pode ser uma boa opção;
b) Se os anticorpos não são detectáveis, então o *clearance* da droga está aumentado devido a mecanismos não imunomediados, como alta carga inflamatória (*high inflammatory burden*) resultando na rápida utilização da droga e/ou perda excessiva fecal da droga (indicado pela calprotectina alta, proteína C reativa (PCR) elevada e baixa de albumina) (Vande Casteele et al. 2017).

Um estudo de revisão recente analisou vários estudos para compreender o real valor da terapia com biológicos em pacientes com DII baseado na monitorização de drogas e de anticorpos antidroga comparando com a abordagem empírica no manejo dessas drogas. Tanto em pacientes com doença inflamatória ativa (abordagem reativa) quanto em pacientes com doença quiescente (abordagem proativa) o benefício do monitoramento das drogas e anticorpos se mostrou incerto, apesar de mostrar uma tendência ao beneficio. Obviamente eles sugerem que a maioria dos estudos são ainda de baixa qualidade com muitos vieses e com metodologias diferentes, dificultando a comparação (Doherty et al. 2018).

Outro ponto importante seria qual o nível sérico adequado das drogas para se conseguir uma resposta terapêutica satisfatória. Isso depende também de qual resposta terapêutica se espera: resposta clínica, endoscópica, cicatrização total da mucosa, manejo após tratamento cirúrgico, fechamento de fístulas, colite esquerda, pancolite… Para cada tipo de resposta provavelmente são necessários níveis diferentes da droga.

O Consenso Europeu recente recomenda dosagem sérica de agentes biológicos e de anticorpos antidroga para se avaliar a retirada ou não do uso de imunossupressores quando usados em terapia combinada com agentes anti-TNF α. Além da análise clínica, bioquímica e endoscópica e histológica para se avaliar se o paciente está em remissão de doença, seria importante a análise do nível sérico de agentes anti-TNF α e da presença ou não de anticorpos antidroga. O recomendável seria a presença de doses terapêuticas de drogas anti-TNF α e a ausência de anticorpos antidroga, além da remissão clínica, bioquímica e histológica há alguns anos, para se recomendar a retirada da terapia combinada e suspensão do imunossupressor (Doherty et al. 2018).

Já a presença de doses altas de infliximabe no momento da decisão de suspensão da terapia biológica, seria um fator de mal prognóstico com risco aumentado de recaída apos a suspensão da droga.

Outra avaliação importante seria em pacientes em que houve a suspensão do uso de terapia biológica e apresentaram recaída da doença. Nesses pacientes a retomada do uso da mesma terapia biológica tem geralmente bons resultados em grande parte dos pacientes. Após a reintrodução da droga, baixos níveis séricos da mesma e a presença de anticorpos antidroga estão associados com maior risco de

não resposta, perda de resposta e reação adversa no momento da infusão (Doherty et al. 2018).

Em paciente em uso esporádico ou irregular de infliximabe a formação de anticorpos anti-infliximabe ocorre em 37-61% dos pacientes. Já em pacientes em uso regular essa percentagem cai para 6-16%. Parece que a imunogenicidade para a formação desses anticorpos não está relacionada somente a porção quimérica da droga, já que são detectados também percentagens semelhantes de anticorpos antidroga em pacientes em uso de adalimumabe e certolizumabe pegol conforme previamente relatado (Afif 2010).

A real relevância clínica da presença de anticorpos anti-infliximabe ainda é controversa apesar da presença desses anticorpos ter sido associada com perda de resposta ao tratamento, diminuição da duração da resposta e risco de reação às infusões em alguns estudos (Afif 2010, Steenholdt et al. 2011, Jiang e Li 2015).

O uso de agentes anti-TNF-α também está associado à manifestações paradoxais envolvendo a pele e articulações em aproximadamente 10-20% dos pacientes em uso de infliximabe (Coutzac et al. 2015). Essas manifestações incluem lesões psoriformes e/ou eczemáticas, localizadas geralmente em palmas, solas, e couro cabeludo. Pacientes também podem apresentar surgimento de artralgias graves em uso de infliximabe mesmo sem apresentar manifestações reumatológicas antes do início do tratamento. A patogênese desses efeitos ainda é pouco compreendida e deve envolver a farmacocinética dessas drogas.

Em estudo foram analisadas a presença de manifestações paradoxais dermatológicas (lesões psoriformes) e reumatológicas (poliartralgia grave) após uso de infliximabe comparando com nível sérico nesses pacientes. Nos 121 pacientes incluídos nesse estudo, 7% apresentou manifestações cutâneas e 8% manifestações reumatológicas após início do uso de infliximabe. O nível sérico de infliximabe não estava aumentado em pacientes com essas manifestações. O único fator associado com presença de manifestações articulares foi a presença de FAN positivo nesses pacientes mostrando provavelmente ter um mecanismo autoimune associado (Coutzac et al. 2015).

Importante notar que a formação de anticorpos anti-infliximabe é um processo dinâmico ao invés de um processo progressivo e irreversível. Anticorpos transitórios podem existir em qualquer momento durante a terapia não correspondendo sempre a uma pior evolução clínica (Jiang e Li 2015). Somente altos níveis de anticorpos

sustentadamente irão levar a perda de resposta duradoura (Vande Casteele et al. 2013, Jiang e Li 2015, Vande Roblin 2015). Roblin (2015) mostrou em estudo que duas dosagens consecutivas positivas de anticorpos anti-infliximabe é um forte e independente fator associado à perda de resposta ao tratamento.

Recentemente, Steenholdt et al. (2012) compararam quatro técnicas comumente usadas para dosagem de nível sérico e anticorpos antidrogas anti-TNF-α. Sessenta e oito por cento das amostras positivas para a presença de anticorpos por HMSA estavam negativas no método *reported gene assay* (RGA), indicando que esses anticorpos detectados tinham pouco ou nenhum efeito em neutralizar a droga ou pode ter sido um teste falso positivo para anticorpos não funcionais (Steenholdt et al. 2012).

Em um estudo de Casteele em 28% dos pacientes com anticorpos anti-infliximabe positivos, os anticorpos desapareceram em uma média de 17 semanas (Vande Casteele et al. 2013). Esse autor recomenda medir os níveis séricos de infliximabe na semana 14, antes da terapia de manutenção e em caso de perda de resposta. Um nível sérico mínimo de infliximabe <2,2μg/ml na semana 14 previu descontinuação do tratamento com infliximabe por perda de resposta persistente ou reações de hipersensibilidade com 74% de especificidade e 82% de sensibilidade (RV 3,1; p=0,0026). Concluiu assim que a dosagem sérica de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe pode ser usado como prognóstico e como uma ferramenta preditora de resposta sendo útil em determinar o escalonamento da dose, troca de droga ou retirada de infliximabe (Vande Casteele et al. 2013).

Kobayashi et al. (2016) dosaram o nível sérico de infliximabe pelo método de *ELISA* na segunda semana do início do tratamento (terapia de indução) de pacientes com RCUI, comparando prospectivamente com a resposta a curto e longo prazo nesses pacientes. Concluiu-se que níveis séricos elevados na segunda semana do tratamento e resposta clínica nesse momento está associado com bom prognóstico e manutenção da resposta clínica e cicatrização de mucosa no futuro (até semana 30) (Kobayashi et al. 2016).

Para que haja o efeito terapêutico adequado dos agentes biológicos, é necessário um nível sérico chamado “suficiente” do anticorpo anti-TNF-α, apesar desse valor exato ainda não ser totalmente estabelecido pela falta de metodologias e *cut-offs* padronizados em todas as metodologias disponíveis para dosagem (Jiang e Li 2015, Schmitz et al. 2016).

Existem alguns kits comerciais disponíveis para dosagem sérica de infliximabe e de adalimumabe e de anticorpos anti-infliximabe e anti-adalimumabe, mas ainda não está bem estabelecido o nível sérico adequado para resposta terapêutica esperada (Schmitz et al. 2016).

Uma sugestão para janela terapêutica adequada para resposta clínica esperada foi estabelecida entre 3-7µg/ml para o infliximabe. Concentrações abaixo de 3µg/ml estão relacionadas a uma diminuição da resposta e concentrações acima de 7µg/ml não mostraram benefício adicional e pode levar a um aumento desnecessário de toxicidade (Schmitz et al. 2016). Caso sejam encontrados níveis séricos muito baixos de infliximabe (<1µg/ml) é recomendada a dosagem de anticorpos anti-infliximabe. Caso não sejam encontrados anticorpos, deve-se aumentar a dosagem da droga (reduzindo o intervalo para quatro semanas ou aumentando para 10mg/kg a cada 8 semanas); caso a presença de anticorpos seja positiva, deve-se trocar a droga (Schmitz et al. 2016). Atualmente sabe-se que para se conseguir cicatrização de mucosa são esperados níveis séricos maiores da droga, geralmente maior que 8-9 µg/ml.

Alguns autores sugerem que níveis de adalimumabe >4,9µg/ml são necessários para adquirir remissão clínica. Zittan et al. (2016) estudaram o nível sérico de 60 pacientes com DC e analisaram o nível sérico de adalimumabe necessário para cicatrização de mucosa nesses pacientes. Foi visto que níveis séricos mais altos de adalimumabe de pelo menos 8,14µg/ml são necessários para remissão endoscópica nesses pacientes (sensibilidade 91,4% e especificidade de 76%) (Zittan et al. 2016).

Ungar et al. (2016) analisaram 78 pacientes em uso de infliximabe e 67 pacientes em uso de adalimumabe comparando o nível sérico dessas drogas e a presença de cicatrização de mucosa nesses pacientes. O nível sérico foi significantemente maior em pacientes com cicatrização de mucosa comparado com pacientes em atividade de doença (infliximabe 4,3 X 1,7µg/ml, p=0,0002; adalimumabe 6,2 X 3,1 µg/ml, p=0,01). Além disso, a presença de anticorpos antidroga foi também associada a menores taxas de cicatrização de mucosa se comparado com pacientes com mesmo nível sérico da droga mas sem anticorpos (16% X 50%; p=0,003) (Ungar et al. 2016).

Ensaios de alta acurácia e precisão são indispensáveis para a correta mensuração dos níveis séricos e da presença de anticorpos antidroga.

Diversas técnicas podem ser usadas para dosagem da droga como *ELISA,* radioimunoensaio (RIA) ou HMSA (ensaio de desvio de mobilidade homogênea). Essas técnicas possuem designs diferentes, uso de anticorpos de detecção diferentes e resposta diferente a variados tipos de drogas concomitantes. Além disso, são limitadas devido a sua sensibilidade, interferência e/ou complexidade. A maior limitação do método de *ELISA* em dosar níveis de anticorpos antidroga é sua maior dificuldade de detectar a presença desses anticorpos na presença da droga na circulação devido a interferência cruzada. Assim há uma baixa sensibilidade da detecção de anticorpos anti-infliximabe na presença de infliximabe na circulação, nesse método (Wang et al. 2013, Jiang e Li 2015).

As desvantagens do método de radioimunoensaio são sua complexidade, o uso de material radioativo e o tempo prolongado de incubação exigido pelo método.

O método HMSA por cromatografia líquida superou muitas limitações dos outros métodos. As vantagens incluem alta sensibilidade, especificidade, acurácia. Com esse método é possível medir anticorpos antidroga na presença de altos níveis da droga no soro do paciente o que não é possível com método de *ELISA* (Wang et al. 2012). Apesar disso, é questionável o significado clínico da presença de anticorpos antidroga caso o nível sérico da droga esteja adequado, e alguns autores nem recomendam a pesquisa de anticorpos antidroga nessa situação.

Schmitz et al. (2016) avaliaram 3 kits comerciais disponíveis para dosagem sérica de infliximabe e de seus anticorpos: kits da Theradiag (Lisa Tracker Infliximabe), Progenika (Promonitor IFX) e apDia (Infliximab *ELISA*). Foram feitas análises do soro de 30 pacientes imediatamente antes da próxima infusão de infliximabe. A correlação entre os três kits foi boa. Concluiu que os três kits podem ser usados com boa performance (Schmitz et al. 2016).

Em outro estudo foram comparados 2 kits para dosagem sérica de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe: Promonitor e ImmunDiagnostik e sua associação com a evolução do tratamento (Guiotto 2016). Foram analisados soros de 86 pacientes em um ou mais momentos durante o tratamento. Os dois testes tiveram resultados semelhantes com boa concordância entre eles.

Entretanto, está claro que níveis indetectáveis ou baixos do agente biológico no sangue estão associados com falta ou perda secundária de eficácia, aumento dos parâmetros inflamatórios e piora clínica tanto na DC quanto na RCUI (Jiang e Li 2015).

Outra questão importante a ser estudada e estabelecida quando se monitoriza dosagem sérica de agentes biológicos seria em que momento da terapia fazer a dosagem sérica da droga e de seus anticorpos. O melhor momento não está estabelecido (Yarur et al. 2016a). A maioria dos estudos avalia o nível sérico imediatamente antes da próxima infusão de infliximabe ou aplicação de adalimumabe para que o nível sérico não atrapalhe a detecção de anticorpos antidroga, caso presente, em alguns métodos.

Outra hipótese para a falha do tratamento seria a alta taxa de componentes inflamatórios que “consumiriam” rapidamente a droga não mantendo assim o nível sérico terapêutico adequado ou o desenvolvimento de outra via alternativa de inflamação não dependente de TNF-α (Ordás et al. 2012). A presença de inflamação sistêmica aumenta o catabolismo de proteínas no sistema retículo endotelial.

No estudo ACCENT I foi feita dosagem sérica de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe pelo método de *ELISA* na semana 14 do início do tratamento de pacientes com DC moderada a grave. Pacientes que obtiveram resposta sustentada com terapia de manutenção apresentavam nível sérico na semana 14 maiores do que os pacientes que não obtiveram resposta (Cornillie et al. 2014).

Não há consenso ainda no manejo desses pacientes em que há falha no tratamento com terapia biológica TNF-α. Na otimização do tratamento desses pacientes não responsivos, podemos trocar o tratamento para outra droga biológica não anti-TNF-α, mas no caso de pacientes com DII, diferentemente dos pacientes com patologias reumatológicas, as opções terapêuticas biológicas ainda estão atualmente bastante limitadas e de difícil disponibilidade de fornecimento pelo SUS. Daí a importância de entender melhor a causa da falha terapêutica para o melhor manejo desses pacientes tanto em termos de toxicidade, eficácia e custo.

Outra opção para otimização do tratamento seria aumentar a dose naqueles pacientes cuja dosagem sérica da droga está abaixo do nível considerado terapêutico e ao contrário, diminuir a dose nos pacientes com níveis séricos altos e potencialmente tóxicos. Pode-se também diminuir o intervalo entre as infusões.

Já em relação a pacientes com níveis séricos considerados ideais da droga, mas sem resposta terapêutica pode ser aventada a hipótese da presença de anticorpos antidroga ou que o mecanismo de perpetuação de doença nesses pacientes esteja relacionado à ativação de outra citocina predominantemente diferente do TNF-α (Van der Maas et al. 2012).

Foi demonstrado que as partes imunogênicas do infliximabe seriam as frações F(ab´)2 em estudo publicado em 2011 (Ben-Horin et al. 2010). Nesse estudo foram testadas amostras séricas de 62 pacientes tratados com infliximabe e 64 pacientes controles. Anticorpos anti-infliximabe total e anti fragmentos Fc e antiF(ab')2 foram pesquisados pelos métodos de *ELISA* e Western blotting. Foram detectados anticorpos anti infliximabe total e antiF(ab')2 somente em pacientes tratados com infliximabe. Anticorpos anti-infliximabe total e antiF(ab´)2 foram encontrados em pacientes que tiveram perda de resposta ao tratamento com infliximabe, mas anticorpos antiF(ab')2 também foram encontrados em pacientes com remissão sustentada limitando assim seu significado clínico. Não foram detectados anticorpos antiFc.

Steenholdt et al. (2011) fizeram um estudo com o objetivo de determinar valores de *cut-off* clinicamente relevantes de dosagem sérica de infliximabe e anticorpo anti-infliximabe em pacientes com doença inflamatória intestinal. Foram feitas dosagens séricas de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe pelo método de radioimunoenssaio em fase fluida (Biomonitor A/S-Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark). 106 pacientes com DII (2001 a 2010) foram inicialmente classificados tendo como resposta sustentada ou perda de resposta a terapia de manutenção com infliximabe. Todos os pacientes eram tratados previamente a todas as infusões de infliximabe com hidrocortisona 100 mg intravenoso, paracetamol 1g via oral e cetirizina 10 mg via oral para minimizar o risco de reação infusional aguda e prevenir o risco de desenvolvimento de anticorpos anti-infliximabe, de acordo com recomendação de alguns estudos (Steenholdt et al. 2011).

Os níveis séricos de infliximabe foram significantemente menores e as dosagens de anticorpos anti-infliximabe foram significantemente maiores em pacientes com DC com perda de resposta (média de infliximabe 0 µg/ml e média de anticorpos anti-infliximabe 35U/ml) comparados com pacientes com resposta sustentada (média de infliximabe 2,8 µg/ml e média de anticorpos anti-infliximabe 0 U/ml; $p<0,0001$). Os valores ótimos de *cut-off* pela análise foram: infliximabe<0,5 µg/ml associado com perda de resposta (sensibilidade de 86% e especificidade de 85%) e anticorpos anti-infliximabe ≥ 10U/ml (sensibilidade 81% e especificidade 90%). A dosagem combinada levou a uma sensibilidade de 81% e especificidade de 94% (Steenholdt et al. 2011). Um padrão semelhante de resultados foi visto nos pacientes com RCUI nesse mesmo estudo.

Foi visto também que o número de pacientes que desenvolveram anticorpos anti-infliximabe foi significantemente maior naqueles que não receberam medicação imunossupressora concomitante comparado àqueles que foram tratados com azatioprina, 6-mercaptopurina ou metotrexate.

Em um estudo coreano retrospectivo observacional com 63 pacientes pediátricos com doença de Crohn, foi suspenso o uso de infliximabe após um ano de remissão clínica sem corticóide. Após um seguimento médio de 4,3 anos 60,3% tiveram recaída clínica. Níveis séricos de infliximabe ≥2.5 μg/mL e cicatrização incompleta da mucosa foram associados a recaída clínica.

Kurnool et al. (2018) avaliaram 160 pacientes com RCUI em uso de terapia biológica (infliximabe, adalimumabe, golimumabe o vedolizumabe) em relação ao IMC e resposta ao tratamento. Cada aumento de 1 kg/m2 no IMC estava associado a um aumento do risco de 4% de falência no tratamento e 8% no aumento do risco de cirurgia e hospitalização. Essa associação foi vista em tratamentos baseados em dose ajustada de acordo com o peso e também em tratamentos com dose fixa. Além do IMC, dosagem de albumina sérica baixa e curta duração da doença também estavam associados a falha no tratamento. Além disso, foi observada uma correlação negativa significativa entre o IMC e os níveis séricos de adalimumabe (p=0.03). Não houve relação entre o IMC e os níveis séricos de infliximabe (Kurnool et al. 2018).

Altos níveis séricos de infliximabe são considerados um fator de mal prognóstico para remissão sustentada após a suspensão da medicação. Durante o tratamento de manutenção com medicamentos anti-TNF α, altos títulos da medicação e baixa concentração de anticorpos antidroga geralmente estão associados a uma melhor evolução clínica e endoscópica. Entretanto, estudos sobre a parada da utilização da droga mostraram que altos níveis séricos de infliximabe no momento pré-parada estavam associados com recaída da doença. De acordo com o estudo STORI, um nível sérico de IFX≥2 mg/L estava associado com recaída após cessar a droga. (multivariate Cox model [HR = 2.5, 95% CI = 1.1–5.4, p = 0.02]).

Enquanto isso, Papamichael (2015) descreveu em um estudo que níveis séricos de infliximabe <6μg/ml estavam associados com remissão clinica sustentada após suspensão do uso da droga.

Ben-Horin et al. (2015) mostraram que níveis detectáveis da droga estavam associados a recaídas [odds ratio = 8.4, 95% CI = 2.2–32, p = 0.002]. Esses

achados indicaram que níveis séricos de infliximabe ≥2.5 μg/mL estavam associados a recaída clínica apos a suspensão da droga.

Assim, monitorização sérica da droga pode ajudar a identificar um subgrupo de pacientes em que a remissão da doença está dependente do uso de drogas anti-TNF α e não estaria então indicada a suspensão da droga.

Greener et al. (2018) analisaram as relações entre o nível sérico de infliximabe (altas doses - high rate (HR) X baixas dose - low rate (LR) e comparado com as taxas de efeitos adversos e toxicidade. Foi feita uma análise retrospectiva de 180 pacientes com pelo menos um ano de uso de infliximabe. Pacientes foram divididos de acordo com o nível sérico de infliximabe, com *cutoff* de 15 μg/mL (HR and LR). Nos resultados foram vistos um total de 53 efeitos adversos em 47 pacientes. No grupo LR houve 36 efeitos adversos em 30 pacientes e no grupo HR, 17 efeitos adversos em 17 pacientes. Pacientes com níveis altos de infliximabe não apresentaram maior prevalência de infecção comparado com pacientes com nível LR. Como conclusão, os achados indicaram que altos níveis de concentração sérica de infliximabe não estão associados com maior frequencia de efeitos adversos e infecções (Greener et al. 2018).

Geralmente, níveis indetectáveis de infliximabe estão relacionados a um maior risco de desenvolvimento de anticorpos anti-infliximabe. Nesse estudo, todos os pacientes que desenvolveram reação infusional estavam no grupo de baixos níveis séricos de infliximabe (LR). Notou-se ainda que 80% dos pacientes que tiveram reação infusional tinham anticorpos anti infliximabe detectáveis no sangue (Greener et al. 2018).

Anticorpos antidroga já foram demonstrados estarem associados com diminuição da durabilidade da terapia e pior evolução. Algumas estratégias são adotadas para se tentar diminuir a formação desses anticorpos. Uma delas seria regimes regulares de tratamento e a adição de imunossupressores ao invés de tratamento episódico. Outra estratégia seria a manutenção de altos níveis de infliximabe sérico. A diferença significativa de reações infusionais entre os dois grupos enfatiza o provável benefício de altos níveis séricos de infliximabe em prevenir imunogenicidade e assim reduzir o risco de reações infusionais devido a anticorpos antidroga. Além disso, a formação desses anticorpos também leva a uma piora na resposta clinica desses pacientes, assim todo esforço deve ser feito para evitar sua formação (Greener et al. 2018).

Um trabalho foi realizado com 76 pacientes com DII que tiveram perda de resposta clínica após um tempo variável do uso de infliximabe. Foi feita a análise da dosagem sérica mínima de infliximabe e a presença de anticorpos anti-infliximabe e foi feita a correlação com a conduta empregada cegamente a esses pacientes com falha terapêutica. Dos pacientes que tiveram aumento da dose do infliximabe, 69% responderam com melhora clínica independentemente da presença ou não de anticorpos, sendo que em alguns a presença de anticorpos caiu. O nível sérico mínimo de infliximabe também não teve correlação com a resposta ou não ao aumento da dose do infliximabe (Pariente et al. 2012). Concluiu-se então que a resposta clínica a intensificação do tratamento com infliximabe (aumento da dose ou diminuição do intervalo entre as doses) não pode ser prevista em pacientes que tiveram perda de resposta inicial, através da dosagem sérica de infliximabe ou da presença de anticorpos antidroga, de acordo com esse estudo.

Já Seow et al. (2010) analisaram 115 pacientes com RCUI moderada a grave, em que foram feitas dosagens séricas de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe e feitas correlações com taxas de remissão clínica e colectomia. Pacientes desse estudo tiveram surpreendentemente dosagens séricas de infliximabe menores e mesmo ausentes, comparado com outros estudos em pacientes com DC ou espondilite anquilosante. Uma possível explicação seria um maior *clearance* da droga em pacientes com alta taxa de inflamação. Uma dosagem sérica detectável de infliximabe nesses pacientes esteve associada à maior taxa de remissão clínica, endoscópica e baixo risco de colectomia, independente da presença ou não de anticorpos antidroga (Seow et al. 2010).

Vande Casteele et al. (2013) em trabalho com 90 pacientes com DII (64 pacientes com DC e 26 pacientes com RCUI) foram feitas análises da presença ou não de anticorpos anti-infliximabe e dosagem sérica da droga, em vários momentos durante o tratamento desses pacientes. Foi visto que a presença de anticorpos anti-infliximabe nesses pacientes pode ser transitória e nem sempre leva a uma piora clínica. Entretanto níveis elevados e persistentes de anticorpos anti-infliximabe, levam a uma perda de resposta ao tratamento. Pacientes com nível sérico mínimo baixo na 14ª semana de tratamento possuem maior risco de formação de anticorpos anti-infliximabe e maior risco de interrupção do tratamento (Vande Casteele et al. 2013).

Em outro trabalho com 155 pacientes foi feita uma análise retrospectiva da dosagem sérica de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe e sua influência no manejo clínico desses pacientes. Os pacientes foram testados um ano após o início do tratamento com infliximabe. O teste foi realizado devido à perda de resposta ou a resposta parcial. Os testes foram realizados pelo laboratório Prometheus. A dosagem sérica de infliximabe ≥ 12 µg/ml na semana 4 foi considerada terapêutica, assim como a detecção de > 1,4 µg/ml imediatamente anterior a próxima infusão da droga. Pacientes com qualquer concentração detectável de anticorpo anti-infliximabe foi considerado como positivo para a presença de anticorpos antidroga e por definição foi considerado como tendo concentração de infliximabe indetectável, já que a presença de infliximabe na amostra interfere com a dosagem do anticorpo. Concluiu-se que a dosagem sérica de infliximabe e anticorpos anti-infliximabe teve impacto nas decisões terapêuticas de 73% dos pacientes em conjunto com a análise clínica, endoscópica e radiológica desses pacientes (Steenholdt 2013).

Estudo multicêntrico retrospectivo com 56 pacientes com RCUI moderada a grave em terapia de manutenção com infliximabe, foram realizadas colonoscopias e dosagem dos níveis séricos de infliximabe e anticorpos antidroga em até três meses da realização do exame endoscópico. Cicatrização de mucosa foi definido pelo Score de Mayo ≤ 1 e cicatrização histológica pela presença de nenhuma inflamação ou inflamação focal leve. Nos resultados foram vistos que os níveis séricos de infliximabe eram significantemente maiores nos pacientes com cicatrização endoscópica ($P < 0.001$) ou histológica ($P = 0.002$), comparado com pacientes sem cicatrização. Além disso, os pacientes com níveis séricos mais baixos de infliximabe, tinham a presença de anticorpos antidroga. O nível sérico de infliximabe associado à cicatricação endoscópica de mucosa foi ≥7.5 µg/mL e ≥10.5 µg/mL para cicatrização histológica (Papamichael et al. 2018).

É possível que pacientes com RCUI necessitem de níveis séricos de infliximabe maiores do que pacientes com DC para adquirirem cicatrização de mucosa endoscópica e histológica.

Outra hipótese seria que pacientes com inflamação importante no cólon apresentariam também perda fecal de infliximabe, diminuindo seu nível sérico. Já em pacientes com cicatrização de mucosa, não teria essa perda fecal e assim o nível sérico da droga permaneceria mais alto. Permanece então ainda a dúvida se altas concentrações séricas são necessárias para se adquirir remissão profunda ou

se a remissão profunda está associada às altas concentrações séricas da droga pela diminuição do *clearance* da droga e diminuição da perda fecal.

Pacientes com DC e fístulas perianais possuem maior carga inflamatória e talvez também perda fecal de infliximabe.

Isso foi recentemente demonstrado por Yarur et al. (2017). Em uma *coorte* de 117 pacientes com DC com fístulas perianais o nível sérico ideal para se alcancar cicatrização da fístula foi de 20.2 lg/ mL.

A monitorização de drogas chamada "reativa" seria a dosagem sérica da droga em casos de doença em atividade apesar do tratamento, e mudança da estratégia de tratamento de acordo com o resultado.

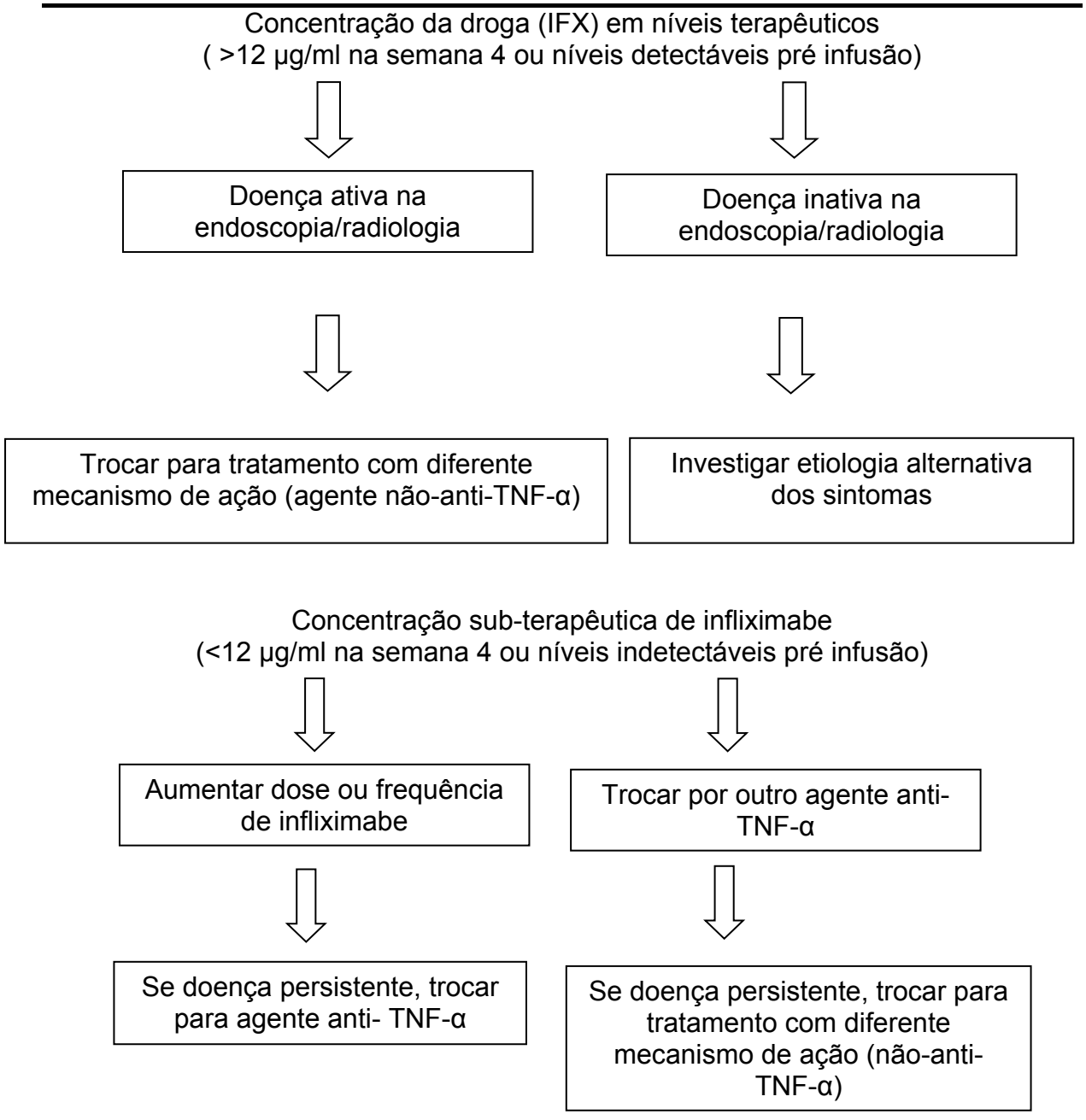
Estudos recentes demonstraram que a monitorização chamada "pro-ativa" (dosagem sérica e pesquisa de anticorpos antidroga em todos pacientes em tratamento) de infliximabe com titulação da droga até uma janela terapêutica ideal, está associado a evolução a longo prazo mais favorável e superior à monitorização reativa (Papamichael et al. 2018).

Akihiro et al. (2018) avaliaram os níveis séricos de infliximabe e a presença de anticorpos antidroga em pacientes com DC em tratamento de manutenção. Os pacientes eram classificados em perdedores de resposta ou em remissão. Além disso, foram comparados os níveis séricos de infliximabe e a presença de cicatrização de mucosa nesses pacientes. Concluíram que os níveis séricos de infliximabe foram mais úteis para diagnóstico e avaliação da perda de resposta na DC durante o tratamento de manutenção com infliximabe do que a presença dos anticorpos anti-infliximabe. Na avaliação de cicatrização de mucosa foi vista uma relação com os níveis séricos de infliximabe, e para remissão sendo necessários níveis maiores que 2.6 µg/mL (Akihiro et al. 2018).

Em algoritmo proposto por Afif (2010) para pacientes em uso de terapia biológica e sintomas clínicos (não resposta inicial ou perda de resposta) (Figura 1):

Figura 1 – Algoritmo proposto para tratamento de pacientes com DII sintomáticos

Anticorpos antidroga positivo → Trocar para outro agente anti-TNF α → Se persisitir a clínica trocar para tratamento com diferente mecanismo de ação (agente não-anti-TNF-α)



Fonte: A autora, 2019.

Foram analisadas amostras de sangue de 100 pacientes que perderam resposta ao tratamento com adalimumabe. 26% desses pacientes tinham nível sérico de adalimumabe abaixo do nível estabelecido de *cut off* e desses 68% tinha anticorpos anti-adalimumabe positivo. Esse estudo assim confirmou também a

evidência que o nível sérico das drogas e dos anticorpos antidroga são importantes na resposta do paciente a terapia (Wang et al. 2013).

Yarur et al. (2016a) demonstraram concentrações aumentadas de TNF-α na mucosa intestinal de pacientes com DC e RCUI se comparados com controles. TNF-α aumentado no tecido também foi demonstrado estar relacionado à atividade clínica e endoscópica de doença. Foi correlacionada a dosagem de infliximabe e adalimumabe na mucosa intestinal e no sangue de pacientes e a presença de atividade de doença. Foram encontrados maiores níveis de TNF-α e de anti-TNF-α em mucosa inflamada comparada a mucosa não inflamada. Importante notar que em mucosas com inflamação moderada a grave a relação anti-TNF-α /TNF-α foi baixa implicando que havia anti-TNF-α insuficiente para neutralizar o TNF-α. Em pacientes com doença ativa, altos níveis séricos de anti-TNF-α podem nem sempre expressar altos níveis teciduais. Essa discordância pode ser devido ao rápido clearance do anti-TNF-α em tecidos inflamados. Assim, de acordo com o grau de inflamação pode ser que determinado nível não seja suficiente para determinado paciente. Os autores então sugerem que enquanto um nível terapêutico tecidual não está estabelecido, a relação droga/TNF-α no tecido pode ser mais importante que o nível da droga por si só (Yarur et al. 2016b).

4 JUSTIFICATIVA DE INTERESSE CIENTÍFICO

Há uma tendência atual sugerindo que o manejo e o ajuste da terapia biológica baseado somente em sintomas clínicos são frequentemente imprecisos e pode levar à evoluções clínicas desfavoráveis. Parece que o monitoramento do nível sérico das drogas biológicas e da formação dos anticorpos antidroga na estratégia clínica poderá permitir aos médicos otimizar o tratamento e manter as drogas em concentrações efetivas por mais tempo além de importante impacto no custo do tratamento desses pacientes evitando superdoses ou uso de drogas ineficazes.

Conforme citado anteriormente, os trabalhos na literatura mostram resultados ainda controversos e muitas vezes contraditórios. O custo dessas dosagens é muito alto no mundo e principalmente no Brasil. As estratégias no Brasil de aumento de dose e/ou redução de intervalo são na maioria das vezes empíricas. Os ambulatórios de DII do HUPE da UERJ e do Hospital Federal dos Servidores do Estado atendem a mais de 300 pacientes em uso dessas medicações e a necessidade de entender melhor a sua farmacocinética é muito importante para otimizar as estratégias de tratamento desses pacientes, visando melhorar a eficácia da droga, minimizar os efeitos colaterais e reduzir os altos custos do tratamento.

5 **OBJETIVOS**

5.1 **Objetivo primário**

Validar a importância da dosagem do nível sérico das drogas biológicas anti TNF-α e dos seus anticorpos no manejo clínico dos pacientes com DII.

5.2 Objetivos secundários

a) Medir os níveis séricos de infliximabe e de adalimumabe em pacientes portadores de DII correlacionando com três tipos de evoluções: resposta clínica sustentada, perda de resposta e não resposta ao uso da droga;
b) Medir os níveis séricos de anticorpos anti-infliximabe e anti-adalimumabe em pacientes portadores de DII correlacionando com três tipos de evoluções: resposta clínica sustentada, perda de resposta e não resposta ao uso da droga;
c) Correlacionar os níveis séricos de infliximabe e de adalimumabe e seus anticorpos em pacientes portadores de DII com parâmetros clínicos, demográficos, laboratoriais e endoscópicos.

6 **PACIENTES E MÉTODOS**

TIPO DE ESTUDO: transversal com entrada prospectiva de pacientes.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa de cada instituição e aprovado (ANEXO A).

6.1 Pacientes

Foram selecionados 95 pacientes portadores de DC ou RCUI dos ambulatórios de DII da Policlínica Piquet Carneiro (PPC) da UERJ e do Hospital Federal dos Servidores do Estado (HFSE) confirmada por diagnóstico clínico, endoscópico e/ou radiológico e histológico e que estejam em uso de Infliximabe já em fase de manutenção com 5 mg/kg ou 10 mg/kg da droga a cada 8 semanas, após ter sido administrada fase de indução com 5 mg/kg de infliximabe nas semanas 0, 2 e 6 do início do tratamento ou Adalimumabe em fase de manutenção com 40 mg SC de cada 14 dias ou semanal pós terapia de indução com 160/80/40 mg de 2/2 semanas.

Todos os pacientes foram orientados e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) previamente a entrada no estudo.

Dados sociodemográficos, diagnóstico, tempo de evolução e fenótipo da doença foram anotados (APÊNDICE B). A avaliação da atividade clínica foi realizada através do score de *Harvey-Bradshaw* para a DC (ANEXO B) e do *índice de Truelove ou Mayo* para a RCUI (ANEXO C), descritos no anexo. Para avaliar a atividade laboratorial utilizamos o hemograma completo, velocidade de hemossedimentação (VHS), PCR titulada e a dosagem de calprotectina fecal. Levamos em consideração a cicatrização da mucosa evidenciada pela colonoscopia e/ou pela enterotomografia ou enterorressonância. Foi considerado:

a) Não resposta (definido por parâmetros clínicos, laboratoriais e por métodos de imagem): pacientes sem resposta à terapia com anti-TNF-α;

b) Perda de resposta (definido por parâmetros clínicos, laboratoriais e por métodos de imagem): paciente que respondeu à terapia e depois houve recidiva de atividade de doença;
c) Boa resposta ao tratamento (definido por parâmetros clínicos, laboratoriais e por métodos de imagem): paciente que respondeu à terapia com anti-TNF-α e mantêm resposta com a terapia de manutenção.

6.1.1 Critérios de exclusão

Pacientes que se recusaram a participar do estudo, pacientes HIV positivos e pacientes que não estavam usando a terapia biológica há mais de nove semanas.

6.2 **Coleta e processamento do sangue**

Foram coletadas amostras de sangue periférico (5ml) dos pacientes no dia da infusão de infliximabe, imediatamente antes da infusão da droga (nível mínimo da droga) ou no dia da aplicação do adalimumabe imediatamente antes da aplicação da droga.

O sangue colhido foi imediatamente centrifugado e o soro sobrenadante separado e guardado em *freezer* a -20^{o}C para posterior realização da dosagem sérica das drogas e de seus anticorpos pelo método de *ELISA*.

6.3 Dosagem sérica de Infliximabe, Adalimumabe e de seus respectivos anticorpos por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

As avaliações dos níveis séricos de infliximabe e dos anticorpos anti-infliximabe, bem como de adalimumabe e dos anticorpos anti-adalimumabe foram

realizadas por meio de kits de *ELISA* comercialmente disponíveis: O Infliximab Lisa-Tracker Duo (Theradiag, Marne la Vallee, França) e o Adalimumab Lisa-Tracker Duo (Theradiag, Marne la Vallee, França), respectivamente. Esses kits permitem a dosagem simultânea das drogas imunobiológicas e de seus anticorpos (Figuras 2 e 3). Ambos os kits apresentam formato sanduíche. Nesse formato, 100 µL dos padrões de concentração, do controle positivo e das amostras de soro diluídas 1:101 para dosagem de infliximabe e adalimumabe e 1:2 para as análises dos anticorpos anti-infliximabe e anti-adalimumabe são adicionados à placa do ensaio e durante uma hora de incubação, à temperatura ambiente (18ºC à 25ºC), o infliximabe e o adalimumabe se ligam às moléculas TNF-α presentes no fundo das cavidades da microplaca, enquanto os anticorpos anti-infliximabe e anti-adalimumabe se ligam ao infliximabe e adalimumabe aprisionados no fundo da microplaca. Em seguida, foi realizado um ciclo de lavagem para remoção de ligações inespecíficas e, ao final dessa etapa, 100µL anticorpos biotinilados foram adicionados à placa e durante o período de incubação (uma hora, à temperatura ambiente) se ligaram ao complexo antígeno anticorpo formado na etapa anterior. Posteriormente, foi realizado um novo ciclo de lavagem, para adição de 100µL estreptavidina-peroxidase que se ligou ao anticorpo biotinilado durante o período de incubação (30 minutos à temperatura ambiente). Ao término de mais esse período de incubação, foi realizado o último ciclo de lavagem e posterior aplicação de 100µL da solução contendo o substrato da enzima (peróxido de hidrogênio) e o cromógeno (tetrametilbenzidina, TMB) à placa. Foi então realizada uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente em que a peroxidase presente nos padrões de concentração, controle positivo e nas amostras reagiram com seu substrato e o produto da reação, por sua vez, combinou-se com cromógeno promovendo o aparecimento de uma coloração azulada cuja intensidade é diretamente proporcional a concentração da enzima conjugada e, consequentemente, do infliximabe, adalimumabe e de seus respectivos anticorpos. Ao final do ensaio a reação enzimática foi inibida com a adição 100µL de uma solução de ácido sulfúrico 0,25M. Nesse momento, a coloração se tornou amarelada e, foi então realizada a mensuração da densidade óptica de cada uma das 96 cavidades da microplaca através de um Leitor Universal de Microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA), utilizando um filtro de 450nm.

A concentração, em ng/mL, de cada molécula supracitada foi determinada fazendo a correlação do valor de densidade óptica das amostras com os valores de densidade óptica da curva-padrão que será gerada através do ajuste logístico de 4 parâmetros com auxílio de um programa de análise de dados KC Junior (Bio Tek, Winooski, VT, EUA).

Foi adotado nesse trabalho o *cut-off* ≥ 3 µg/ml para o nível sérico de infliximabe considerado terapêutico de acordo com a maioria da literatura para níveis séricos de infliximabe relacionados a boa resposta clínica ao tratamento (Steenholdt 2013, Ben Horin 2015, Jiang e Li 2015, Schmitz et al. 2016, Ungar et al. 2016, Akihiro et al. 2018, Greener et al. 2018, Kang et al. 2018, Papamichael et al. 2018). Em relação aos anticorpos anti-infliximabe consideramos níveis maiores que 0 (zero) como positivos.

Para o nível sérico de adalimumabe também foi adotado o cut-off ≥ 3 µg/ml considerado terapêutico de acordo com a literatura para níveis séricos de adalimumabe relacionados a boa resposta clínica ao tratamento. Em relação aos anticorpos anti-adalimumabe consideramos níveis maiores que 0 (zero) como positivos (Wanget al. 2013, Yarur et al. 2016b, Zittan et al. 2016).

Figura 2 - Esquema da configuração do ensaio para análise simultânea de infliximabe e dos anticorpos anti-infliximabe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35
B	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36
C	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37
D	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30
E	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39
F	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40
G	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41
H	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42

Infliximab assay

anti-Infliximab assay

Fonte: Infliximab and Adalimumabe Lisa-Tracker Duo 2017.

Figura 3 - Esquema da configuração do ensaio para análise simultânea de adalimumabe e dos anticorpos anti-adalimumabe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35	Standard 5	Sera 3	Sera 11	Sera 19	Sera 27	Sera 35
B	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36	Standard 4	Sera 4	Sera 12	Sera 20	Sera 28	Sera 36
C	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37	Standard 3	Sera 5	Sera 13	Sera 21	Sera 29	Sera 37
D	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30	Standard 2	Sera 6	Sera 14	Sera 22	Sera 30	Sera 30
E	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39	Standard 1	Sera 7	Sera 15	Sera 23	Sera 31	Sera 39
F	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40	C+	Sera 8	Sera 16	Sera 24	Sera 32	Sera 40
G	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41	Sera 1	Sera 9	Sera 17	Sera 25	Sera 33	Sera 41
H	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42	Sera 2	Sera 10	Sera 18	Sera 26	Sera 34	Sera 42

Adalimumab assay

anti-Adalimumab assay

Fonte: Infliximab and Adalimumabe Lisa-Tracker Duo 2017.

7 **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A distribuição das características individuais foi avaliada por estatística descritiva simples. As diferenças entre as distribuições das variáveis selecionadas foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher para dados categóricos. A correlação entre variáveis numéricas foi avaliada usando o coeficiente de correlação de Spearman. Todos os testes foram bicaudais e a significância estatística foi estabelecida em valores de P menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

8 **RESULTADOS**

8.1 **População do estudo e resultados laboratoriais**

Foram analisadas amostras de sangue de 95 pacientes portadores de DII dos ambulatórios de DII do HSE e da PPC da UERJ. Entre esses pacientes selecionados, 85 (89,47%) são portadores de DC e 10 (10,53%) de RCUI. 63 (66,32%) pacientes estavam em uso de infliximabe e 32 (33,68%) em uso de adalimumabe.

Entre os pacientes com DC vemos que 56 (65,9%) são respondedores, 11 (12,9%) são não respondedores primários e 18 (21,2%) são não respondedores secundários. Já entre os pacientes com RCUI 7 (70%) são respondedores e 3 (30,0%) são não respondedores secundários; não houve nesse estudo relato de pacientes com RCUI não respondedores primários.

As características demográficas, clínicas e resultados laboratoriais dos pacientes estão demonstradas na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes e resultados laboratoriais

PARÂMETROS	DC (N=85)	RCUI (N=10)
Homem	37 (43.5%)	3 (30.0%)
Branco	64 (75.3%)	7 (70.0%)
Idade (A) (Média±SEM)	42.2(±1.8)	36.3 (±3.9)
IMC (Média±SEM)	24.2 (±0.4)	25.8 (±1.6)
Duração da Doença (Meses)	148.1 (±12.1)	130.8 (±23.7)
Idade Montreal		
A1	2 (2.4%)	0 (0.0%)
A2	36 (42.4%)	8 (80.0%)
A3	47 (55.3%)	2 (20.0%)
Fenótipo Montreal		
B1	15(17.6%)	-
B2	41(48.2%)	-
B3	29(34.1%)	-
Localização Doença		
E1/L1	22 (25.9%)	1 (10.0%)
E2/L2	16 (18.8%)	2 (20.0%)
E3/L3	39 (45.9%)	7 (70.0%)
L4	8 (9.4%)	-
Doença Perianal	34 (40.0%)	-
Tabagismo	6 (7.1%)	0 (0.0%)
MEI	40 (47.1%)	3 (30.0%)
Doença Clínica Ativa	33 (38.8%)	4 (40.0%)
Albumina	4.3 (±0.07)	4.6 (±0.12)
Hemoglobina	13.14 (±0.25)	13.07 (±0.44)
PCR	2.21 (±0.50)	2.08 (±0.68)
VHS	21.06 (±2.7)	22.5 (5.4)
Calprotectina	579.13 (±208.9)	1061.75 (±838.2)
Cicatrização de Mucosa (Colonoscopia)	48.2% (n=27)	57.1% (n=4)
Escore Endoscópico (Média±SEM)	1.77 (±0.25)	1.29 (±0.61)
Cirurgias Abdominais Antes do Uso de Biológicos	44 (51.80%)	0 (0.0%)
Outra Terapia Biológica Prévia	13 (15.3%)	0 (0.0%)
Eventos Adversos do Uso de Biológicos	10 (11.8%)	2 (20.0%)
IMM Concomitante	43 (50.6%)	6 (60.0%)
Corticodependente	54 (64.3%)	10 (100.0%)
Resposta a Terapia Biológica		
Respondedor	56 (65.9%)	7 (70.0%)
Não Respondedor Primário	11 (12.9%)	0 (0.0%)
Não Respondedor Secundário	18 (21.2%)	3 (30.0%)
Nível Sérico Mínimo		
Infliximabe	2.51 (±0.38)	2.70 (±0.91)
Adalimumabe	6.32 (±0.57)	-
Anticorpos		
Anti-Infliximabe	166.03 (±92.8)	463.78 (±311.6)
Anti-Adalimumabe	8.04 (±8.04)	-

Legenda: Doença de Crohn (DC); Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI); Índice de massa corporal (IMC); Manifestações extra-intestinais (MEI); Proteína C reativa (PCR); Velocidade de Hemossedimentação (VHS); standart error of mean (SEM); Imunossupressor (IMM).

Fonte: A autora, 2019.

8.2 **Comparação dos níveis séricos mínimos de infliximabe e adalimumabe e de anticorpos antidroga**

Os resultados com níveis séricos mínimos de infliximabe e adalimumabe e anticorpos antidroga estão no Apêndice C.

Na Tabela 2 foi feita uma comparação entre os níveis séricos de infliximabe e de anticorpos anti-infliximabe e parâmetros clínicos, endoscópicos e laboratoriais.

Tabela 2 - Comparação entre as concentrações séricas de infliximabe e anti-infliximabe com variáveis clínicas, endoscópicas e laboratoriais selecionadas

Testes	***Infliximabe***			***Anti-Infliximabe***		
Pacientes Variáveis	≥3 µg/ml (n=19)	<3 µg/ml (n=44)	*Valor P*	0,00 (n=52)	>0 (n=11)	*Valor P*
DC	16 (84.2%)	37 (85.7%)	1.000	44 (84.6%)	9 (81.8%)	1.000
RCUI	3 (15.8%)	7 (14.3%)		8 (15.4%)	2 (18.2%)	
Feminino	12 (63.2%)	22 (50.0%)	0.579	28 (53.8%)	8 (72.7%)	0.326
IMC	23 (20-24.22)	24 (21-28)	0.182	23.87 (0.57)	25.61 (1.92)	0.241
Tabagismo	0 (0.0%)	2 (4.54)	1.000	2 (3.80)	1 (9.10)	0.443
Duração da doença (m)	108 (60-240)	138 (72-240)	0.435	164.8 (15.14)	156.0 (46.30)	0.365
Atividade clínica	6 (31.6%)	19 (45.2%)	0.404	21 (40.4%)	4 (36.4%)	1.000
Corticodependente	10 (52.6%)	32 (72.7%)	0.080	36 (69.2%)	7 (63.6%)	0.732
IMM	10 (52.6%)	21 (47.7%)	1.000	30 (57.7%)	2 (18.2%)	0.022
Biológico prévio	1 (5.3%)	2 (4.54%)	1.000	2 (3.8%)	1 (9.1%)	0.443
Efeitos adversos dos biológicos	2 (10.5%)	7 (15.9%)	0.707	4 (7.7%)	6 (54.5%)	0.001
Resposta a terapia						
Sustentada	14 (73.7%)	27 (61.4%)	0.557	35 (67.3%)	8 (72.7%)	0.791
Falha primária	0 (0.0%)	2 (4.54%)		2 (3.8%)	0 (0.0%)	
Falha secundária	5 (26.3%)	13 (29.5%)		15 (28.8%)	3 (27.3%)	
PCR, mg/L	0.31 (0.08- 0.75)	1.7 (0.25-3.7)	0.028	0.54 (0.13-2.1)	2.4 (1.7-14.5)	0.042
VHS, mm/h	10 (6-24)	16.5 (7-23.23)	0.847	17 (7-24)	10 (5-17)	0.383
Calprotectina, µg/g	140.9 (101.95-426.95)	54.3 (40.1-1061.75)	0.548	140.9 (59.7-442.45)	51.2 (51.2)	0.400
Hemoglobina, g/dL	12.9 (11.97-13.85)	13.4 (11.85-14.7)	0.572	12.95 (12.1-14.77)	13.4 (10.9-13.9)	0.293
Albumina, g/dL	4.55 (4.275-5.00)	4.25 (4.00-5.00)	0.139	4.4 (4-5)	4.25 (3.6-4.7)	0.147
Escore endoscópico	0 (0-3)	2 (0-3)	0.337	0 (0-3)	0 (0-2.25)	0.395
Escore ERNM	1 (0-1.5)	1 (1-2)	0.312	1 (0-2)	1 (0.25-1.75)	.000

Legenda: Doença de Crohn (DC); Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI); Índice de massa corporal (IMC); Proteína C reativa (PCR); Velocidade de Hemossedimentação (VHS); Imunossupressor (IMM); Enteroressonância magnética (ERNM).

Fonte: A autora, 2019.

Em relação à dosagem sérica de infliximabe, vimos que pacientes com níveis mais altos de PCR apresentaram níveis significativamente mais baixos de infliximabe sérico (<3 µg/ml) (p=0,028). Por outro lado, foram encontradas concentrações mais altas de anticorpos anti-IFX em pacientes que não estavam em uso concomitante de imunomoduladores (p=0,022), em pacientes que tiveram maiores efeitos adversos relacionados a biológicos (p=0,001) e maiores níveis de PCR (p=0,042).

Na Tabela 3, a seguir, foi feita uma comparação entre os níveis séricos de adalimumabe e de anticorpos anti-adalimumabe e parâmetros clínicos, endoscópicos e laboratoriais.

Tabela 3 - Comparação entre as concentrações séricas de adalimumabe e anti-adalimumabe com variáveis clínicas, endoscópicas e laboratoriais selecionadas

Testes	***Adalimumabe***			***Anti-Adalimumabe***		
Pacientes Variáveis	≥3 µg/ml	<3 µg/ml	*Valor P*	0,00	>0	*Valor P*
DC	27	5		30	2	
RCUI						
Feminino	16 (59.3%)	3 (60.0%)	1.000	19 (63.3%)	0 (0.0%)	0.157
IMC	26 (22-28)	27 (15.5-30.5)	0.960	26 (22-28)	15.5 (10-)	0.036
Tabagismo	2 (7.4%)	1 (20.0%)	0.410	3 (10.0%)	0 (0.0%)	1.000
Duração da doença (m)	84 (48-132)	180 (114-192)	0.046	96 (48-132)	192 (180-)	0.081
Atividade clínica	10 (37.0%)	2 (40.0%)	1.000	11 (36.7%)	1 (50.0%)	1.000
Corticodependente	20 (76.9%)	1 (20.0%)	0.027	20 (69.0%)	1 (50.0%)	1.000
IMM	16 (59.3%)	1 (20.0%)	0.161	16 (53.3%)	1 (50.0%)	1.000
Biológico prévio	8 (29.6%)	2 (40.0%)	0.637	9 (30.0%)	1 (50.0%)	0.534
Efeitos adversos de biológicos	1 (3.7%)	1 (20.0%)	0.292	1 (3.3%)	1 (50.0%)	0.123
Resposta a terapia						
Sustentada	17 (63.0%)	3 (60.0%)	0.651	19 (63.3%)	1 (50.0%)	0.735
Falha primária	7 (25.9%)	2 (40.0%)		8 (26.7%)	1 (50.0%)	
Falha secundária	3 (11.1%)	0 (0.0%)		3 (10.0%)	0 (0.0%)	
PCR, mg/L	1.13 (0.23-3.0)	0.08 (0.08)	0.296	0.74 (0.132-2.8)	-	
VHS, mm/h	25.5 (10.00-41.50)	38 (3-)	1.000	28.0 (10.0-40)	-	
Calprotectina, µg/g	1850	1028.3	0.400	1800 (297.8-1900)	-	
Hemoglobina, g/dL	12.8 (12.2-13.9)	13.5 (12.9-)	0.412	12.9 (12.4-13.8)	-	
Albumina, g/dL	4.3 (3.95-4.8)	4.1 (3.8-)	0.439	4.25 (3.92-4.80)	-	
Escore endoscópico	3 (0-4)	0 (0)	0.353	3 (0-4)	-	
Escore ERNM	1 (0.25-1.75)			1 (0.25-1.75)	-	

Legenda: Doença de Crohn (DC); Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI); Índice de massa corporal (IMC); Proteína C reativa (PCR); Velocidade de Hemossedimentação (VHS); Imunossupressor (IMM); Enteroressonância magnética (ERNM).

Fonte: A autora, 2019.

Na Tabela 3, vemos que pacientes com níveis séricos mais baixos de adalimumabe apresentavam maior duração da doença desde o diagnóstico (p= 0,046). Pacientes com IMC mais baixo apresentaram níveis mais altos de anticorpos anti-ADA, apesar do pequeno número de indivíduos do estudo (p=0,036).

No presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis das drogas e de seus anticorpos e as respostas clinicas apresentadas pelos pacientes.

Tabela 4 - Correlações entre níveis séricos mínimos das drogas e anticorpos antidroga com variáveis clínicas, laboratoriais e de imagem

Variáveis	Estatística	*IFX*	*Anti-IFX*	*ADA*	*Anti-ADA*
Duração da Doença	CC	-0.011	-0.118	-0.112	0.215
	P	0.935	0.356	0.543	0.246
	N	63	63	32	31
IMC	CC	-0.292*	0.176	-0.141	-0.308
	P	0.02	0.168	0.441	0.092
	N	63	63	32	31
Dosagem da medicação	CC	-0.023	0.005	0.263	-1.000**
	P	0.859	0.97	0.146	.
	N	63	63	32	31
PCR (mg/L)	CC	-0.315*	0.327*	-0.066	.
	P	0.033	0.027	0.807	.
	N	46	46	16	16
VHS (mm/h)	CC	-0.041	-0.113	-0.208	.
	P	0.786	0.455	0.458	.
	N	46	46	15	15
Calprotectina (µg/g)	CC	0.103	-0.406	0.5	.
	P	0.777	0.244	0.391	.
	N	10	10	5	5
Hemoglobina (g/dL)	CC	0.031	-0.118	-0.031	.
	P	0.817	0.382	0.895	.
	N	57	57	21	21
Albumina (g/dL)	CC	0.379**	-0.187	0.699**	.
	P	0.004	0.169	0.003	.
	N	56	56	16	16
Escore endoscópico	CC	0.052	-0.152	0.079	.
	P	0.728	0.306	0.763	.
	N	47	47	17	17
Escore RM	CC	-0.053	0.022	-0.137	.
	P	0.799	0.914	0.672	.
	N	26	26	12	12

Legenda: coeficiente de correlação (CC); número de casos (N); infliximabe (IFX); anti-infliximabe (anti-IFX); adalimumabe (ADA); anti-adalimumabe (anti-ADA): Índice de massa corporal (IMC); Proteína C reativa (PCR); Velocidade de Hemossedimentação (VHS); ressonância magnética (RM).

Fonte: A autora, 2019.

A Tabela 4 mostra uma série de correlações entre variáveis numéricas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Uma fraca correlação negativa foi encontrada entre o IMC e o nível de infliximabe sérico (CC= -0,292; p=0,02).

Os níveis séricos da PCR também estiveram negativamente correlacionados com IFX (CC=-0,315; p=0,033), mas positivamente correlacionados com a presença de anticorpos anti IFX (CC=0,327; p=0,027). Isso significa que pacientes com nível sérico adequado de infliximabe (alto), apresentam boa resposta terapêutica, com diminuição de marcadores inflamatórios como PCR.

A dosagem da albumina sérica apresentou correlação positiva com os níveis séricos de infliximabe (CC=0,379; p=0,004) e de adalimumabe (CC=0,699; p=0,003).

9 **DISCUSSÃO**

Nas últimas duas décadas, agentes biológicos, particularmente as drogas anti-TNF-α, tornaram-se o pilar do tratamento de pacientes com DII, enquanto no Brasil essa mudança ocorreu progressivamente apenas na última década. No entanto, alguns efeitos colaterais e uma taxa relevante de não-respondedores primários e secundários foram relatados, e representam uma limitação importante no tratamento desses pacientes. Para tentar resolver este problema, propusemos um estudo piloto para medir os níveis mínimos e imunogenicidade do anti-TNF-α, pela primeira vez, até onde sabemos, em uma área considerada de baixa prevalência para DII, na tentativa de investigar sua potencial associação com desfechos específicos da doença. Além disso, avaliamos se os níveis mínimos de anti-TNF-α e anticorpos antidrogas poderiam estar associados a parâmetros utilizados rotineiramente no acompanhamento de pacientes.

Resultados de vários estudos anteriores mostraram que os níveis mínimos de anti-TNF-α estão consistentemente associados à resposta clínica sustentada (Schmitz et al. 2016) e à cicatrização da mucosa (Ungar et al. 2016, Papamichael et al. 2018). Os resultados de um estudo recente parecem corroborar essa informação, pois os melhores desfechos clínicos foram associados a níveis elevados de infliximabe, até mesmo superiores a 10 µg/mL (Ungar et al. 2016).

Ungar et al. (2016) analisaram 78 pacientes em uso de infliximabe e 67 pacientes em uso de adalimumabe comparando o nível sérico dessas drogas e a presença de cicatrização de mucosa nesses pacientes. O nível sérico foi significantemente maior em pacientes com cicatrização de mucosa comparado com pacientes em atividade de doença (infliximabe 4,3 X 1,7µg/ml, p=0,0002; adalimumabe 6,2 X 3,1 µg/ml, p=0,01). Além disso, a presença de anticorpos antidroga foi também associada a menores taxas de cicatrização de mucosa se comparado com pacientes com mesmo nível sérico da droga mas sem anticorpos (16% X 50%; p=0,003) (Ungar et al. 2016).

Em outro trabalho, os níveis séricos de infliximabe foram significantemente menores e as dosagens de anticorpos anti-infliximabe foram significantemente maiores em pacientes com DC com perda de resposta (média de infliximabe 0 µg/ml e média de anticorpos anti-infliximabe 35U/ml) comparados com pacientes com

resposta sustentada (média de infliximabe 2,8 µg/ml e média de anticorpos anti-infliximabe 0 U/ml; p<0,0001). Os valores ótimos de *cut-off* pela análise foram: infliximabe<0,5 µg/ml associado com perda de resposta (sensibilidade de 86% e especificidade de 85%) e anticorpos anti-infliximabe ≥ 10U/ml (sensibilidade 81% e especificidade 90%). A dosagem combinada levou a uma sensibilidade de 81% e especificidade de 94% (Steenholdt et al. 2011). Um padrão semelhante de resultados foi visto nos pacientes com RCUI nesse mesmo estudo.

Já em um estudo de revisão recente foram analisados vários trabalhos para compreender o real valor da terapia com biológicos em pacientes com DII baseado na monitorização de drogas e de anticorpos antidroga comparando com a abordagem empírica no manejo dessas drogas. Tanto em pacientes com doença inflamatória ativa (abordagem reativa) quanto em pacientes com doença quiescente (abordagem proativa) o benefício do monitoramento das drogas e anticorpos se mostrou incerto, apesar de mostrar uma tendência ao beneficio. Obviamente eles sugerem que a maioria dos estudos é ainda de baixa qualidade com muitos vieses e com metodologias diferentes, dificultando a comparação (Doherty et al. 2018).

Assim como em um estudo anterior de Roblin et al. (2015), identificamos uma correlação entre as concentrações séricas de infliximabe e PCR, indicando que pacientes com níveis séricos mínimos mais altos, dentro da faixa terapêutica esperada, têm marcadores inflamatórios baixos concomitantes. No entanto, a calprotectina fecal, outro marcador não invasivo rotineiramente utilizado para avaliar a atividade da inflamação intestinal na DII, não apresentou associação significativa com anticorpos anti-TNF-α ou antidrogas neste estudo. É provável que o número relativamente pequeno de amostras analisadas para a calprotectina fecal neste estudo possa ter influenciado os resultados.

Na tentativa de identificar outros biomarcadores laboratoriais potencialmente úteis relacionados à resposta à terapia e/ou aos níveis mínimos de anticorpos anti-TNF-α e anticorpos antidrogas, analisamos VHS, hemoglobina e albumina. Enquanto os resultados envolvendo VHS e hemoglobina não mostraram nenhuma associação significativa com os níveis mínimos de anti-TNF-α ou anticorpos antidroga, os pacientes que tiveram concentrações séricas de albumina mais altas também apresentaram níveis séricos mais altos de infliximabe e adalimumabe. Também em acordo com nossos achados, um estudo anterior identificou uma relação entre a albumina sérica e a farmacocinética do infliximabe. Em particular, os doentes com

concentrações séricas de albumina mais elevadas mantiveram níveis séricos de infliximabe mais elevados, diminuição da depuração e meias-vidas mais longas, em comparação com doentes com albumina sérica baixa (Fasanmade et al. 2010, Kurnool et al. 2018). A albumina é a proteína mais abundante no plasma humano e tem um papel bem estabelecido no transporte e metabolismo de drogas (Yang et al. 2007). A albumina liga-se com alta afinidade a vários fármacos, enquanto os fármacos não ligados à albumina (“livres”) são mais propensos a serem excretados, porque a ligação à proteína pode diminuir a taxa de eliminação do fármaco (Yang et al. 2007). Além de seus vários papéis fisiológicos críticos, o metabolismo da albumina também pode ser afetado por distúrbios crônicos e agudos. De fato, a menor concentração de albumina sérica tem sido geralmente associada a desfechos desfavoráveis em várias condições de saúde, e tem sido usada como um marcador de processos patológicos subjacentes, incluindo desnutrição e inflamação (Vincent et al. 2003). Aqui, reforçamos a importância da concentração de albumina como um biomarcador adjuvante no acompanhamento de distúrbios inflamatórios crônicos, como a DII, e apresentamos pela primeira vez sua associação com o adalimumabe, além da já descrita relação com os níveis de infliximabe.

Em relação ao uso concomitante de imunomoduladores, foi demonstrado anteriormente que drogas como a azatioprina são capazes de reduzir a imunogenicidade, prevenindo a formação de anticorpos antifármacos durante a terapia biológica (Vermeire et al. 2007, Brandse et al. 2017). De fato, dados anteriores mostraram que a terapia combinada é mais eficaz do que a monoterapia de azatioprina ou infliximabe na obtenção de parâmetros de remissão profunda (Colombel et al. 2015). Os resultados deste estudo parecem confirmar o efeito benéfico dessa associação em relação ao infliximabe, mas não ao adalimumabe. Embora o número de pacientes em terapia combinada com adalimumabe seja menor do que aquele com infliximabe neste estudo, nossos resultados parecem corroborar os achados obtidos em uma investigação recente, que demonstrou que a eficácia clínica de uma combinação de adalimumabe e azatioprina não diferiu a partir da monoterapia de adalimumabe, a longo prazo (Matsumoto et al. 2016). É importante ressaltar que, além dos efeitos potenciais sobre a eficácia clínica e o desenvolvimento de anticorpos antidrogas, no presente estudo, também detectamos mais efeitos colaterais entre os pacientes que apresentaram anticorpos contra o infliximabe. Este achado parece reforçar a noção de o efeito benéfico da azatioprina

concomitante durante a terapia biológica pode não ser diretamente sinérgico, mas pode, na verdade, aumentar indiretamente os níveis séricos de infliximabe e/ou prevenir a formação de anticorpos antifármacos.

Em termos de características individuais, é interessante notar que pacientes com maior IMC apresentaram menores concentrações de infliximabe sérico, em concordância com outros estudos prévios na literatura (Harper et al. 2013, Kurnool et al. 2018). De fato, estudos farmacocinéticos prévios que analisaram agentes anti-TNF-α demonstraram que o maior peso corporal está consistentemente associado ao aumento da depuração de fármaco e a níveis séricos mínimos (Dotan et al. 2014, Sharma et al. 2015). Em um estudo no qual a influência do IMC em resposta à terapia biológica foi avaliada em pacientes com RCUI, os pesquisadores identificaram um risco maior de cirurgia e hospitalização para cada aumento de kg/mm2 no IMC. Tal associação foi observada em tratamentos baseados na dose de acordo com o peso e também em tratamentos de dose fixa. Além disso, em contraste com nossos resultados, uma correlação negativa significativa foi observada entre o IMC e os níveis séricos de adalimumabe, mas não com o infliximabe (Kurnool et al. 2018). No entanto, em outro estudo abordando o IMC e terapia biológica, pacientes obesos com DC ou RCUI (IMC> 30) em terapia com infliximabe tiveram um maior risco de surtos e perda de resposta ao tratamento em comparação com pacientes não obesos (Harper et al. 2013).

Biologicamente isso pode ser talvez explicado pelo estado proinflamatório que caracteriza o aumento da adiposidade. Adipócitos de obesos expressam grandes quantidades de TNF-α comparado com não obesos (Harper et al. 2013).

Nossos achados em relação ao IMC parecem ter importantes implicações clínicas, especialmente porque a prevalência da obesidade está aumentando rapidamente nos países em desenvolvimento (Ng et al. 2014), e as taxas parecem aumentar paralelamente na DII (Pringle et al. 2015, Singh et al. 2017). Nesse sentido, os médicos que cuidam de pacientes com sobrepeso e obesos com DII devem estar preparados para considerar o tratamento mais agressivo e o uso concomitante de imunomoduladores, além do acompanhamento rigoroso de pacientes em terapia biológica, e provavelmente visando diretamente a obesidade sob uma abordagem multidisciplinar.

Reconhecemos algumas limitações em nossa análise, principalmente devido ao desenho do estudo, refletindo a natureza exploratória da investigação. Embora

este trabalho constitua um estudo piloto, destaca aspectos importantes envolvendo uma análise comparativa dos níveis mínimos de anti-TNF-α e vacina relacionada à terapia, entre pacientes de uma área de baixa prevalência de DII. Entre os indivíduos consecutivamente inscritos neste estudo, a maioria consistiu em pacientes que tiveram uma resposta primária sustentada. Curiosamente, aqui apresentamos maiores taxas de resposta (remissão clínica) (65,9% CD e 70% UC) do que a maioria dos relatos na literatura (média geral de 40%) (Gisbert e Panes 2009). Uma possível explicação para isso pode se basear no fato de que este estudo é uma simples análise transversal. Considerando que uma única amostra por paciente pode não ser suficientemente consistente para prever o resultado. Por exemplo, pacientes com baixos níveis atuais podem não ter manifestado perda de resposta ainda. Por outro lado, pacientes cujas amostras já revelam a presença de anticorpos antifármacos ainda podem ter uma resposta satisfatória ao agente biológico em questão. Além disso, alguns aspectos técnicos também precisam ser abordados. Por exemplo, enquanto altos níveis sustentados de anticorpos antidrogas geralmente levam à perda permanente de resposta, também tem sido sugerido que os anticorpos antidrogas podem ser transitórios e nem sempre resultar em imunogenicidade permanente ou progressiva, e pior resultado clínico. Portanto, tem sido sugerido que os níveis mínimos de infliximabe devem ser medidos na semana 14 e no momento da perda de resposta e, sempre que indetectáveis ou baixos, os anticorpos anti-infliximabe devem ser determinados e acompanhados para descartar a formação sustentada de anticorpos antidrogas (Vande Casteele et al. 2013). Isso representa uma limitação deste estudo piloto, no qual apresentamos apenas uma análise transversal dos pacientes. Outra questão controversa emerge da questão se a medição de anticorpos anti-infliximabe por ELISA é confiável na presença de infliximabe sérico. Nesse contexto, tem sido proposto que amostras com infliximabe sérico mensurável provavelmente sejam consideradas inconclusivas para anticorpos antidrogas (Cornillie et al. 2014). Embora diferentes desenhos de estudos possam dificultar a interpretação e a comparação dos dados, também é provável que características específicas de nossa coorte possam ter influenciado os resultados.

Aqui, especulamos que as especificidades desta população de estudo podem envolver características demográficas, incluindo antecedentes genéticos e modificações epigenéticas, mas também possivelmente pela grande quantidade de

pacientes “naïves”, com um uso relativamente mais recente de agentes biológicos em geral. Também é interessante notar que, durante a última década, enquanto o uso de agentes anti-TNF-α se tornou progressivamente mais comum no Brasil, basicamente devido à disponibilidade no sistema público de saúde, que abrange aproximadamente toda a população, isso não foi acompanhado pela disponibilidade dos respectivos testes laboratoriais de monitoramento. Portanto, investigações adicionais que analisem aspectos epidemiológicos locais da DII, e a resposta clínica, incluindo estudos de acompanhamento para abordar a remissão a longo prazo, a ocorrência de falhas e eventos adversos, serão extremamente importantes. Além disso, em termos de custos gerais de saúde, será crucial também investigar o custo-benefício de promover o monitoramento dos níveis mínimos e da imunogenicidade através do sistema nacional de saúde. Nesse sentido, não apenas custos diretos, mas também indiretos, incluindo, por exemplo, necessidade de cirurgia, medicação adicional, internação hospitalar, incapacidade temporária e permanente por DII, seriam de suma importância para o planejamento de novas estratégias de saúde pública no país.

CONCLUSÕES

a) A dosagem isolada dos níveis séricos de infliximabe e de adalimumabe e de seus anticorpos em pacientes portadores de DII não permitiu observar correlação com a resposta clínica sustentada, perda de resposta e não resposta ao uso da droga no momento da coleta;
b) Os níveis séricos de infliximabe e de adalimumabe e de seus anticorpos em pacientes portadores de DII estão relacionados com parâmetros clínicos como IMC, albumina, uso de imunossupressor e efeitos colaterais;
c) Os resultados desse estudo contribuem para o manejo de pacientes com DII em tratamento com drogas anti TNF-α;
d) Este estudo reforçou a importância da avaliação e melhor investigação da real necessidade da dosagem do nível sérico das drogas biológicas anti TNF-α e dos seus anticorpos no manejo clínico dos pacientes com DII.

PESQUISADORES COLABORADORES

Prof.ª Ana Teresa Pugas Carvalho da Disciplina de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
Prof.ª Maria das Graças Souza do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ
Prof. Heitor Siffert Pereira de Souza do Serviço de Gastroenterologia, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

Afif W. Clinical utility of measuring Infliximab and Human Anti-Chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2010;105(5):1133-9.

Akihiro K, Toshiyuki M, Noritaka T, Yasumichi Takada, Masahiro Kishi,Yutaka Yano, et al.Trough level of infliximab is useful for assessing mucosal healing in Crohn's disease: a prospective cohort study. Intest Res 2018;16(2):223-32.

Amini Kadijani A, Asadzadeh Aghdaei H, Sorrentino D, Mirzaei A, Shahrokh S, Balaii H, et al. Transmembrane TNF-α Density, but not Soluble TNF-α Level, is Associated with Primary Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. Clin Transl Gastroenterol. 2017;8(9):e117.

Ananthakrishnan AN, Ashwin N. Epidemiology and risk factors for IBD. Nat Rev Gastroenterol. Hepatol. 2015;12(4):205-17.

Ben-Horin S, Yavzori M, Katz L, Kopylov U, Picard O, Fudim E, et al. The immunogenic part of infliximab is the F(ab´)2, but measuring antibodies to the intact infliximab molecule is more clinically useful. Gut. 2011;60(1):41-8.

Ben-Horin S, Chowers Y, Ungar B, Kopylov U, Loebstein R, Weiss B, et al. Undetectable anti-TNF drug levels in patients with long-term remission predict successful drug withdrawal. Aliment Pharmacol Ther. 2015;42(3):356–64.

Brandse JF, Mould D, Smeekees O, Ashruf Y, Kuin S, Strik A, et al. A real-life population pharmacokinetic study reveals factors associated with clearance and immunogenicity of infliximab in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2017;23(4):650-60.

Burger D, Travis S. Conventional Medical Management of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology. 2011;140(6):1827-37.

Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015;50(8):942-51.

Chachu KA, Osterman MT. How to Diagnose and Treat IBD Mimics in the Refractory IBD. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(5):1262-74.

Colombel JF, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rutgeerts P, Tang KL, et al. Randomised clinDeep remission in biologic and immunomodulator naıve patients with Crohn's disease – a SONIC post hoc analysis. Aliment Pharmacol Ther. 2015;41(8):734-46.

Cornillie F, Hanauer SB, Diamond RH, Wang J, Tang KL, Xu Z, et al. Postinduction serum infliximab trough level and decrease of C-reactive protein level are associated with durable sustained response to infliximab: a retrospective analysis of the ACCENT I trial. Gut. 2014; 63(11):1721-7.

Coutzac C, Chapuis J, Poullenot F, Chabrun E, Capdepont M, Blanco P, et al. Association between infliximab trough levels and the ocurrence of paradoxical manifestations in patientes with inflammatory bowel disease: a case-control study. J Crohns Colitis. 2015;9(11):1-6.

Danese S, Vuitton L, Peyrin-Buroulet L. Biologic agents for IBD: practical insights. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12(9):537-45.

Doherty G, Katsanos KH, Burisch J, Allez M, Papamichael K, Stallmach A, et al. European Crohn's and Colitis Organisation Topical Review on Treatment Withdrawal ['Exit Strategies'] in Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis. 2018;12(1):17-31.

Dotan I, Ron Y, Yanai H, Becker S, Fishman S, Yahav L, et al. Patients factors that increase infliximab clearance and shorten half-life in inflammatory bowel disease: a population pharmacokinetic study. Inflamm Bowel Dis. 2014;20(12):2247-59.

Fasanmade AA, Adedokun OJ, Olson A, Strauss R, Davis HM. Serum albumin concentration: a predictive factor of infliximab pharmacokinects and clinical response in patients with ulcerative colitis.Int J Clin Pharmacol Ther. 2010;48(5):297-308.

Gisbert JP, Panes J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn´s disease: a review. Am J Gastroenterol. 2009;104(3):760-7.

Greener T, Kabakchiev B, Steinhart AH, Silverberg MS. Higher Infliximab Levels Are Not Associated With an Increase in Adverse Events in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2018; 24(8):1808-14.

Guerra I. Utility of measuring serum concentrations of anti-TNF agents and anti-drug antibodies in inflammatory bowel disease. Curr Drug Metab. 2011;12(6):594-8.

Guiotto C. Clinical relevance and inter-test reliability of anti-infliximab antibodies and infliximab trough levels in patients with inflammatory bowek disease. Dig Liver Dis. 2016;48(2):138-43.

Harper JW, Sinanan MN, Zisman TL. Increased Body Mass Index is associated with earlier time to loss of response to infliximabe in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm bowel Dis 2013;19(10):2118-24.

Infliximab and Adalimumabe Lisa-Tracker Duo. Theradiag, Marne la Vallee, França. 2017. Bula.

Jiang W, Li X. Molecular analysis of inflammatory bowel disease: clinically useful tools for diagnosis, response prediction, and monitoring of targeted therapy. Mol Diagn Ther. 2015;19(3):141-58.

Kang B, Choi SY, Choi Yo, Kim MJ, Kim K, Lee JH, et al. Subtherapeutic Infliximab Trough Levels and Complete Mucosal Healing Are Associated With Sustained Clinical Remission After Infliximab Cessation in Paediatric-onset Crohn's Disease Patients Treated With Combined Immunosuppressive Therapy. J Crohns Colitis. 2018:12(6):644–52.

Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12(12):720-7.

Kobayashi T, Suzuki Y, Motoya S, Hirai F, Ogata H, Ito H, et al. First trough level of infliximab at week 2 predicts future outcomes of induction therapy in ulcerative colitis-results from a multicenter prospective randomized controlled trial and its post hoc analysis. J Gastroenterol. 2016; 51(3):241-51.

Kurnool S, Nguyen NH, Proudfoot J, Dulai PS, Boland BS, Vande Casteele N, et al. High body mass index is associated with increased risk of treatment failure and surgery in biologic-treated patients with ulcerative colitis. Aliment Pharm Ther. 2018;47(11):1472-9.

Matsumoto T, Motoya S, Watanabe K, Hisamatsu T, Nakase H, Yoshimura N, et al. Adalimumab monotherapy and a combination with azathioprine for Crohn´s disease: a prospective, randomized trial. J Crohns Colitis. 2016 Nov;10(11):1259-66.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden od Disease Study 2013. Lancet. 2014;384(9945):766-81.

Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012; 10(10):1079-87.

Panaccione R. Benefits of Anti TNF monitoring of drugs levels and antibody levels in clinical practice: introduction. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;9(12):3-5.

Papamichael K. Long-term outcome of patients with Crohn's disease who discontinued infliximab therapy upon clinical remission. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015;13(6):1103-10.

Papamichael K, Rakowsky S, Rivera C, Cheifetz AS, Osterman MT. Infliximab trough concentrations during maintenance therapy are associated with endoscopic and histologic healing in ulcerative colitis. Aliment Pharmacol Ther. 2018;47(4):478-84.

Pariente B, Pineton de Chambrun G, Krzysiek R, Desroches M, Louis G, De Cassan C, et al. Trough levels and Antibodies to Infliximab may not predict response to intensification of infliximab therapy in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(7):1199-206.

Pringle PL, Stewart KO, Peloquin JM, Sturgeon HC, Nguyen D, Sauk J, et al. Body mass index, genetic susceptibility and risk of complications among individuals with Crohn´s disease. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(10):2304-10.

Remicade®:infliximabe. Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. Farm. Resp.: Marcos R. Pereira– CRF/SP nº 12.304. Bula de remédio.

Roblin X, Mrotte H, Leclere M, Del Tedesco E, Phelip JM, Peyrin-Biroulet L, et al. Combination of C-reactive protein, infliximab trough levels and stable but not transient antibodies to infliximab are associated with loss of response to infliximab in inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2015;9(7):525-3.

SB Fróes R, Carvalho AT, Carneiro AJ, de Barros Moreira AMH, Moreira JPL, Luiz RR, et al.The socio-economic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. Eur J Health Econ. 2018 Apr;19(3):463-70.

Schmitz E, van de Kerkhof D, Hamann D, van Dongen JL, Kuijper PH, Brunsveld L, et al. Therapeutic drug monitoring of infliximab: performance evaluation of three commercial ELISA kits. Clin Chem Lab Med. 2016 Jul;54(7):1211-9.

Seow CH, Newman A, Irwin SP, Steinhart AH, Silverberg MS, Greenberg GR. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis.Gut. 2010;59(1):49-54.

Sharma S, Eckert D, Hyams JS, Mensing S, Thakkar RB, Robinson AM, et al. Pharmacokinetics and exposure-efficacy relationship of adalimumab in pediatric patients with moderate to severe Crohn´s disease: results from a randomized, multicenter, phase-3 study. Inflamm Bowel Dis. 2015 Apr;21(4):783-92.

Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(2):110-21.

Sohrabpour A, Malekzadeh R, Keshavarzian A. Current Therapeutic Approaches in Inflammatory Bowel Disease. Curr Pharm Design. 2010;16(33):3668-83.

Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016;13(1):13-27.

Steenholdt C. Use of infliximab and anti-inflIiximab antibody measurements to evaluate and optimize efficacy and safety of infliximab maintenance therapy in Crohn´s disease. Dan Med J. 2013;60(4):1-24.

Steenholdt C, Al-khalaf M, Brynskov J, Bendtzen K, Thomsen OØ, Ainsworth MA. Clinical implications of variations in anti-infliximab antibody levels in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(12):2209-17.

Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OØ, Ainsworth MA. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn´s disease. Scand J Gastroenterol 2011;46(3):310-8.

Ungar B, Levy I, Yavne Y, Yavzori M, Picard O, Fudim E, et al. Optimizing anti-TNF-alfa therapy: serum levels of infliximab and adalimumab are associated with mucosal healing in patients with inflammatory bowel diseases. Clin Gastroenterol Hepatol. 2016;14(4):550-7.

Vande Casteele N, Gils A, Singh S, Ohrmund L, Hauenstein S, Rutgeerts P, et al. Antibody response to Infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. Am J Gastroenterol. 2013;108(6):962-71.

Vande Casteele N, Herfarth H, Katz J, Falck-Ytter Y, Singh S. American Gastroenterological Association Institute Technical Review on the Role of Therapeutic Drug Monitoring in the Management of Inflammatory Bowel Diseases.. Gastroenterology. 2017;153(3):835–57.

Van der Maas A, Van den Bemt BJ, Wolbink G, Van den Hoogen FH, Van Riel PL, Den Broeder AA. Low infliximab serum trough levels and anti-infliximab antibodies are prevalent in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab in daily clinical practice: results of an observational cohort study. BMC Musculoskeletal Dis. 2012;13:184.

Vatn MH, Sandvik AK. Inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015; 50(6):748-62.

Vermeire S, Noman M, Van Assche G, Baert F, D'Haens G, Rutgeerts P. Effectiveness of concomitante immunossupressive therapy in supressing the formation of antibodies to infliximabe in Crohn´s disease. Gut. 2007;56(9):1226-31.

Vincent JL, Dubois MJ, Navickis RJ, Wilkes MM. Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials. Ann Surg. 2003 Mar;237(3):319-34.

Wang SL, Hauenstein S, Ohrmund L, Shringarpure R, Salbato J, Reddy R, et al. Monitoring of adalimumab and antibodies-to-adalimumab levels in patient serum by the homogeneous mobility shift assay. J Pharm Biomed Anal. 2013;78-79:39-44.

Wang SL, Ohrmund L, Hauenstein S, Salbato J, Reddy R, Monk P, et al. Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. J Immunol Methods. 2012;382(1-2):177-88.

Williet N. Pharmacokinetics of Infliximab and Reduction of Treatment for Inflammatory Bowel Diseases. Dig Dis Sci. 2016;61(4):990–5.

Yamada A. Monitoring functional serum antitumor necrosis factor antibody level in Crohn´s disease patients who maintained and those who lost response to anti-TNF. Inflamm Bowel Dis. 2010;16(11):1898-904.

Yang F, Bianc C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Hunag M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. J Struct Biol. 2007;157(2):348-55.

Yarur AJ, Jain A, Hauenstein SI, Quintero MA, Barkin JS, Deshpande AR, et al. Higher adalimumab levels are associated with histologic and endoscopic remission in patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. Inflamm Bowel Dis. 2016a; 22(2):409-15.

Yarur AJ, Jain A, Sussman DA, Barkin JS, Quintero MA, Princen F, et al. The association of tissue anti-TNF drug levels with serological and endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease: the ATLAS study. Gut. 2016b; 65(2):249-55.

Yarur AJ, Kanagala V, Stein DJ, Czul F, Quintero MA, Agrawal D, et al. Higher infliximab trough levels are associated with perianal fistula healing in patients with Crohn’s disease. Aliment Pharmacol Ther. 2017;45(7):933–40.

Zittan E, Kabakchiev B, Milgronm R, Nguyen GC, Croitoru K, Steinhart AH, et al. Higher adalimumab drug levels are associated with mucosal healing in patients with Crohn's disease. J Crohn's Colitis. 2016 May;10(5):510-15.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título de projeto: "Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais"

Pesquisadora: Dra. Ana Braunstein Grinman CRM 5269789-3

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Bouskela

Você estará participando de um trabalho com o objetivo de avaliar os níveis no sangue de um medicamento (infliximabe ou adalimumabe) que você faz uso para o tratamento da Doença de Crohn ou Retocolite Ulcerativa. Esse trabalho avaliará também a presença ou não de anticorpos contra essas drogas.

Sabemos que os pacientes que fazem uso desses medicamentos apresentam variações quanto à quantidade da substância no sangue e a formação de anticorpos contra esses medicamentos e isso pode interferir na resposta ao tratamento. É indicado assim na literatura mundial avaliar a dosagem no sangue dos pacientes dessas drogas e a presença ou não dos anticorpos para ajudar na otimização do tratamento desses pacientes.

Para participar desse projeto seu médico colherá apenas alguns tubos de sangue para que sejam feitas essas avaliações e poder ajudar no manejo do seu tratamento.

Você terá o direito de esclarecer e obter resposta sobre quaisquer dúvidas a respeito dos exames necessários, os benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa e ao seu tratamento. Os resultados dos exames serão compartilhados com você e com seu médico. Fica ainda garantido o caráter confidencial das informações à respeito da sua doença.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações coletadas aqui, bem como os resultados dos exames serão mantidos sob estrito sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro ter pleno conhecimento do que se segue:

- dos objetivos da pesquisa;
- dos procedimentos necessários para sua realização;
- dos desconfortos ou risos esperados;
- dos benefícios que possam ser obtidos;
- que receberei respostas ou esclarecimentos a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados coma a pesquisa e com meu tratamento individual;
- que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade.

Data:

_____

Assinatura do paciente ou responsável

_____

Dra. Ana Braunstein Grinman

CRM 5269789-3

APÊNDICE B - Ficha de Acompanhamento dos Pacientes

Ficha de acompanhamento dos pacientes

Nome:

Prontuário:

Endereço:

Telefone:

Data de nascimento:

Sexo:

Etnia:

Peso:

Altura:

IMC:

Diagnóstico:

Fenótipo predominante:

Extensão da doença:

Doença perianal:

Duração da doença:

Índice de atividade (Harvey-Bradshaw):

Albumina sérica:

Hemograma completo:

PCRt

VHS

Dosagem da calprotectina fecal:

Cirurgia prévia:

Manifestações extraintestinais:

Efeitos colaterais biológicos?

Tabagista:

PPD (data):

Isoniazida (data inicio e fim)

Rx de tórax (data):

Tratamento anti-TNF prévio:

Medicação imunossupressora concomitante:

Dependente de corticóide?:

Hidrocortisona pré-infusão:

Data primeira dose de infliximabe/adalimumabe:

Intervalo médio entre as doses:

Dose de infliximabe ou adalimumabe:

Respondedor?:

Perda de resposta: Após quanto tempo de uso:

Clínica no momento da coleta:

Última colonoscopia:

Última entero TC ou enteroRN:

APÊNDICE C – Planilha com Dados e Resultados dos pacientes

Quadro – Dados e Resultados dos pacientes (continua)

Número	Diagnóstico	Idade Montreal A	Montreal B (somente CD)	Montreal L / UC 1,2, ou 3	biológico atual	Infliximab ug/ml	Anti-infliximab (ng/ml)	Adalimumabe (ug/ml)	Anti-adalimumabe (ng/ml)
1	DC	3	3	1	infliximabe	6,73	0,00		
2	DC	3	2	3	infliximabe	1,20	0,00		
3	DC	2	3	3	infliximabe	3,38	0,00		
4	RCUI	2		3	infliximabe	2,41	0,00		
5	DC	2	1	3	infliximabe	4,86	0,00		
6	DC	1	2	4	infliximabe	0,00	44,51		
7	DC	3	2	1	infliximabe	8,61	0,00		
8	DC	3	3	2	infliximabe	0,00	0,00		
9	DC	2	2	1	adalimumabe			7,76	0,00
10	DC	3	3	3	infliximabe	2,80	0,00		
11	DC	2	3	4	infliximabe	0,68	71,44		
12	DC	3	2	1	adalimumabe			4,37	0,00
13	DC	2	1	2	infliximabe	2,23	0,00		
14	RCUI	2		3	infliximabe	4,36	0,00		
15	DC	3	1	2	adalimumabe			11,52	0,00
16	DC	3	3	3	infliximabe	12,90	0,00		
17	DC	3	3	4	infliximabe	0,34	0,00		
18	RCUI	2		1	infliximabe	8,49	0,00		
19	RCUI	3		3	infliximabe	0,60	0,00		
20	DC	3	3	3	infliximabe	4,50	0,00		

Quadro – Dados e Resultados dos pacientes (continuação)

Número	Diagnóstico	Idade Montreal A	Montreal B (somente CD)	Montreal L / UC 1,2, ou 3	biológico atual	Infliximab ug/ml	Anti-infliximab (ng/ml)	Adalimumabe (ug/ml)	Anti-adalimumabe (ng/ml)
21	DC	2	3	2	infliximabe	2,71	0,00		
22	RCUI	2		3	infliximabe	0,00	2058,85		
23	RCUI	2		2	infliximabe	2,86	0,00		
24	DC	2	1	3	infliximabe	2,06	0,00		
25	DC	3	2	3	infliximabe	3,09	0,00		
26	DC	2	3	2	infliximabe	1,68	0,00		
27	DC	3	3	3	infliximabe	0,00	0,00		
28	DC	2	2	4	infliximabe	2,36	0,00		
29	DC	3	2	3	infliximabe	3,90	0,00		
30	DC	3	2	2	infliximabe	1,10	0,00		
31	DC	1	1	3	adalimumabe			0,97	249,26
32	DC	2	2	1	infliximabe	2,80	0,00		
33	DC	3	2	4	infliximabe	0,99	0,00		
34	DC	3	1	3	infliximabe	0,87	0,00		
35	DC	3	3	1	adalimumabe			6,88	0,00
36	DC	2	3	3	adalimumabe			8,82	0,00
37	DC	2	1	2	infliximabe	2,11	0,00		
38	DC	3	2	1	infliximabe	1,16	0,00		
39	DC	2	2	3	infliximabe	8,47	0,00		
40	DC	2	2	3	infliximabe	1,95	0,00		
41	DC	3	1	2	infliximabe	4,61	0,00		
42	DC	3	2	1	infliximabe	2,66	0,00		

Quadro – Dados e Resultados dos pacientes (continuação)

Número	Diagnóstico	Idade Montreal A	Montreal B (somente CD)	Montreal L / UC 1,2, ou 3	biológico atual	Infliximab ug/ml	Anti-infliximab (ng/ml)	Adalimumabe (ug/ml)	Anti-adalimumabe (ng/ml)
44	DC	3	3	2	infliximabe	0,00	13,81		
45	DC	3	2	1	infliximabe	0,00	2014,30		
46	RCUI	2		3	infliximabe	0,00	2579,00		
47	DC	2	2	3	infliximabe	1,50	0,00		
48	DC	3	2	2	infliximabe	0,00	2401,56		
49	DC	2	3	3	infliximabe	4,89	0,00		
50	DC	3	3	2	infliximabe	0,00	0,00		
51	DC	3	2	3	adalimumabe			6,12	0,00
52	DC	2	3	3	infliximabe	0,00	117,81		
53	DC	3	2	3	infliximabe	1,07	0,00		
54	DC	2	2	1	infliximabe	0,00	132,46		
55	DC	2	2	3	adalimumabe			3,17	0,00
56	DC	3	3	2	adalimumabe			4,62	0,00
57	DC	2	2	4	adalimumabe			8,06	0,00
58	DC	3	2	3	infliximabe	6,99	0,00		
59	DC	3	2	3	infliximabe	2,40	0,00		
60	RCUI	3		3	infliximabe	0,51	0,00		
61	DC	2	2	3	infliximabe	0,00	3916,58		
62	DC	2	2	1	adalimumabe			9,26	0,00
63	RCUI	2		2	infliximabe	6,40	0,00		
64	DC	2	3	2	infliximabe	0,00	0,00		
65	DC	2	1	2	infliximabe	3,94	0,00		
66	DC	3	1	2	infliximabe	2,28	0,00		

Quadro – Dados e Resultados dos pacientes (continuação)

Número	Diagnóstico	Idade Montreal A	Montreal B (somente CD)	Montreal L / UC 1,2, ou 3	biológico atual	Infliximab ug/ml	Anti-infliximab (ng/ml)	Adalimumabe (ug/ml)	Anti-adalimumabe (ng/ml)
67	DC	3	3	3	infliximabe	6,62	0,00		
68	DC	2	2	3	adalimumabe			11,08	0,00
69	DC	3	1	3	adalimumabe			2,78	0,00
70	DC	3	2	3	adalimumabe			1,84	0,00
71	DC	3	3	3	adalimumabe			0,00	0,00
72	DC	3	2	1	adalimumabe			8,31	0,00
73	DC	3	3	1	infliximabe	0,67	0,00		
74	DC	3	1	3	adalimumabe			3,67	0,00
75	DC	2	2	1	infliximabe	0,00	0,00		
76	DC	3	2	3	infliximabe	0,00	87,47		
77	DC	3	3	3	infliximabe	0,58	0,00		
78	DC	2	2	3	infliximabe	0,00	0,00		
79	DC	3	2	3	infliximabe	3,66	0,00		
80	DC	2	3	3	infliximabe	7,99	0,00		
81	DC	3	2	4	adalimumabe			0,00	>320
82	DC	3	1	1	adalimumabe			6,74	0,00
83	DC	3	1	1	adalimumabe			4,36	0,00
84	DC	3	3	3	adalimumabe			6,15	0,00
85	DC	2	3	1	adalimumabe			6,22	0,00
86	DC	2	2	1	adalimumabe			12,55	0,00
87	DC	2	2	3	adalimumabe			6,67	0,00

Quadro – Dados e Resultados dos pacientes (conclusão)

Número	Diagnóstico	Idade Montreal A	Montreal B (somente CD)	Montreal L / UC 1,2, ou 3	biológico atual	Infliximab ug/ml	Anti-infliximab (ng/ml)	Adalimumabe (ug/ml)	Anti-adalimumabe (ng/ml)
88	DC	3	3	1	adalimumabe			7,61	0,00
89	DC	2	2	2	adalimumabe			9,16	0,00
90	DC	2	2	1	adalimumabe			5,22	0,00
91	DC	3	2	4	adalimumabe			11,03	0,00
92	DC	2	2	3	adalimumabe			9,42	0,00
93	DC	2	1	1	adalimumabe			4,67	0,00
94	DC	3	3	1	adalimumabe			7,88	0,00
95	DC	2	3	3	adalimumabe			5,45	0,00

Fonte: A autora, 2019.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA
Título da Pesquisa: Estudo do nível sérico de Infliximabe e de Adalimumabe e de seus anticorpos no manejo do tratamento de pacientes com doenças inflamatórias intestinais
Pesquisador: Ana Braunstein Grinman
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 30711014.6.0000.5259
Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ
Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER
Número do Parecer: 721.260

Data da Relatoria: 09/07/2014

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 677.691

Objetivo da Pesquisa:
Continuação do Parecer: 677.691
Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Continuação do Parecer: 677.691
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Continuação do Parecer: 677.691
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Continuação do Parecer: 677.691
Recomendações:
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Foram atendidas as solicitações do Parecer Consubstanciado anterior. Projeto aprovado.
Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 17 de Julho de 2014

Assinado por:
MARIO FRITSCH TOROS NEVES
(Coordenador)

ANEXO B - Índice de Harvey Bradshaw- Doença de Crohn

Variável	Descrição	Escore
1	Bem-estar geral	0 = muito bem 1 = levemente comprometido 2 = ruim 3 = muito ruim 4 = péssimo
2	Dor abdominal	0 = nenhuma 1 = leve 2 = moderada 3 = acentuada
3	Número de evacuações líquidas por dia	1 por cada evacuação
4	Massa abdominal	0 = ausente 1 = duvidosa 2 = definida 3= definida e dolorosa
5	**Complicações**	1 por item: • Artralgia • Uveíte • Eritema nodoso • Úlceras aftosas • Pioderma gangrenoso • Fissura anal • Nova fístula • Abscesso

Total: soma dos escores das variáveis de 1 a 5

Remissão: ≤ 4 pontos

Doença grave: ≥ 8 pontos

ANEXO C - Classificação de Truelove & Witts para RCUI

	Leve	Moderada	Severa
Nº evacuações	**≤ 4**	**5**	**≥ 6**
Sangramento vivo	**±**	**+**	**++**
Temperatura C^0	**Normal**	**Valores intermediários**	**> 37,5^{0}C á noite ou ≥ 37,8^{0}C 2 – 4 dias**
Pulso	**Normal**	**Intermediário**	**> 90 bpm**
Hemoglobina (g/dL)	**> 10**	**Intermediário**	**≤ 10,5**
VHS (mm)	**≤ 30**	**Intermediário**	**> 30**

Fonte: Truelove, 1955.