UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LÍVIA MOREIRA GENARO

Monitoramento Terapêutico e Influência dos Polimorfismos Genéticos Associados ao Uso de Adalimumabe em Pacientes com Doença de Crohn

CAMPINAS

2024

LÍVIA MOREIRA GENARO

Monitoramento Terapêutico e Influência dos Polimorfismos Genéticos Associados ao Uso de Adalimumabe em Pacientes com Doença de Crohn

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Raquel Franco Leal

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LÍVIA MOREIRA GENARO E ORIENTADA PELA
PROFª. DRª. RAQUEL FRANCO LEAL

CAMPINAS

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8402

G285m

Genaro, Livia Moreira, 1993-
Monitoramento terapêutico e influência dos polimorfismos genéticos associados ao uso de adalimumabe em pacientes com doença de Crohn / Livia Moreira Genaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Raquel Franco Leal.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Doença de Crohn. 2. Adalimumabe. 3. Monitoramento de medicamentos. 4. Polimorfismo genético. I. Leal, Raquel Franco, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Therapeutic monitoring and influence of genetic polymorphisms associated with the use of adalimumab in patients with Crohn's disease
Palavras-chave em inglês:
Crohn's disease
Adalimumab
Therapeutic drug monitoring
Genetic polymorphism
Área de concentração: Cirurgia Translacional
Titulação: Doutora em Ciências
Banca examinadora:
Raquel Franco Leal [Orientador]
Tiago Sevá Pereira
Carlos Augusto Real Martinez
Lucas Faraco Sobrado
Marcelo Rodrigues Borba
Data de defesa: 04-11-2024
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-4640-6554
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/5246440624401978

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LÍVIA MOREIRA GENARO

ORIENTADOR: RAQUEL FRANCO LEAL

MEMBROS TITULARES:

1. PROFª. DRª. RAQUEL FRANCO LEAL

2. PROF. DR. TIAGO SEVÁ PEREIRA

3. PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

4. PROF. DR. LUCAS FARACO SOBRADO

5. PROF. DR. MARCELO RODRIGUES BORBA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 04/11/2024

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, cuja graça e orientação estiveram sempre presentes ao longo da minha jornada, iluminando o caminho e me dando forças nos momentos desafiadores.

Aos meus pais, Miriam e Lucio, que têm sido meu alicerce inabalável, minha fonte de amor e inspiração. Vocês me apoiaram incondicionalmente e foram minha motivação constante para buscar a excelência. Ao meu querido esposo, Bruno, cujo amor, apoio e compreensão foram inestimáveis durante os anos de pesquisa. Sua paciência e encorajamento me ajudaram a perseverar nos momentos mais difíceis.

Esta conquista é um reflexo do apoio, amor e fé que recebi de cada um de vocês. Que nossa jornada continue a ser enriquecida por momentos felizes e sucesso compartilhado.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata à minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Raquel Franco Leal, por ter aberto as portas de seu laborátorio para que eu pudesse realizar este trabalho. Agradeço imensamente o apoio, orientação e sabedoria ao longo deste percurso. Sua dedicação e expertise foram fundamentais para minha formação acadêmica e para este doutorado. Seus conselhos valiosos moldaram minha abordagem à pesquisa e ao conhecimento científico de maneira inestimável.

À minha família, por seu amor incondicional e apoio ao longo de toda a minha jornada acadêmica, não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão. Vocês são meu alicerce, minha motivação e meu refúgio. Obrigada por apoiarem todas as minhas decisões, entenderem minhas ausências e vibrarem comigo a cada resultado.

Às minhas queridas Lilian, Juliana, Mariana e Ida, expresso minha gratidão por serem meu apoio constante. A presença de vocês foi essencial em todos os momentos, uma fonte de inspiração e parceria em desafios acadêmicos e pessoais. Obrigada por se fazerem presentes, mesmo quando houve distância física.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Investigação em Doenças Inflamatórias Intestinais (Lab DII), quero expressar meu apreço profundo. As conversas no laboratório e as amizades que construímos são algo que levarei comigo para o futuro. Aqui deixo meu agradecimento especial à Karine Steigleder, Natalia Siqueira, Marina Moreira, Lívia Fontana e Beatriz Guerra pela amizade, bons momentos e companheirismo.

Expresso minha sincera gratidão ao Laboratório de Genética do Câncer (LAGECA), em especial aos doutores Juliana e Gustavo, pelos ensinamentos e orientações valiosas que contribuíram significativamente para o sucesso deste projeto de pesquisa. A colaboração de vocês foi fundamental para os resultados deste trabalho. Agradeço também a todos os membros do laboratório por sua generosidade, ambiente colaborativo, e por me fazerem sentir parte do LAGECA.

À Prof. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono por seus ensinamentos,

experiência e apoio que foram inestimáveis, contribuindo significativamente para o projeto. A possibilidade de acompanhá-la durantes os ambulatórios e exames de colonoscopias enriqueceu muito minha compreensão sobre o tema.

À Prof. Azucena Salas por me receber em seu laboratório em Barcelona durante o meu doutorado sanduíche. Sua generosidade, orientação e expertise foram fundamentais para o sucesso dessa experiência, que enriqueceu minha jornada acadêmica. Agradeço pela paciência, atenção e ensinamentos durante o período. Sou muito grata também a todos os membros da equipe do IBD-IDIBAPS pelo apoio e pela atmosfera de aprendizado que tornaram esta experiência inesquecível. Em especial agradeço à Victoria, Angela, Iris, Elisa, Floortje, Miriam, Marisol, Isabella, Marc e Claudio por todos os ensinamentos e momentos compartilhados.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pelo acolhimento e oportunidade, sendo minha casa desde a graduação.

À toda equipe do GASTROCENTRO/Unicamp que possibilitou a realização deste estudo. Em especial às enfermeiras Giane, Eliane e Vanessa cujo apoio foi fundamental na coleta dos materiais utilizados neste trabalho.

Ao Amarildo Stabile Júnior, secretário da Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia, FCM-Unicamp, por todas as orientações neste período.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2020/01924-5, pela bolsa da modalidade Doutorado, que possibilitou a dedicação ao programa de pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado também com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa processo nº 140462/2020-1.

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

Agradeço especialmente aos pacientes por sua contribuição inestimável e fundamental para o avanço do conhecimento médico. Valorizo muito a generosidade, altruísmo e confiança em participar da nossa pesquisa. Espero

que os resultados deste estudo possam retribuir a vivência compartilhada, melhorando a saúde e o bem-estar daqueles que confiaram em nós.

EPÍGRAFE

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico; é também uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas”

Marie Curie

RESUMO

Introdução: A doença de Crohn (DC) é uma inflamação crônica do trato gastrointestinal, cuja patofisiologia envolve interações complexas entre o sistema imunológico e o tecido intestinal, com destaque para o papel das citocinas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), na manutenção do processo inflamatório. O adalimumabe, um anticorpo monoclonal humano que neutraliza o TNF-α, contribui para a regulação da inflamação associada à DC, embora possa induzir processos imunogênicos, comprometendo a eficácia terapêutica. Assim, o monitoramento dos níveis séricos e de anticorpos anti-droga (ADA) é sugerido para otimizar a terapia. Além disso, o estudo de fatores genéticos que influenciam a resposta ao adalimumabe pode esclarecer as relações entre genética, imunologia e clínica na DC. **Objetivo:** Quantificar o nível sérico de adalimumabe, e avaliar a intercambialidade entre os testes de níveis séricos. Além, detectar a presença de ADA, avaliar a formação de complexos imunes e investigar os fenótipos genéticos associados à imunogenicidade em pacientes com DC acompanhados no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Gastrocentro e no Ambulatório de Diarreias do Hospital das Clínicas - Unicamp. **Métodos:** O estudo incluiu 70 pacientes em fase de manutenção que utilizavam o adalimumabe, tendo sidos subdivididos em atividade (DCA) e em remissão (DCR). Amostras de sangue periférico foram processadas para obtenção de soro e DNA genômico. A concentração de adalimumabe foi determinada por ensaios de imunoabsorção enzimática (Promonitor) e ensaio de fluxo lateral (Quantum Blue). A intercambiabilidade entre os ensaios foi comparada pela análise de regressão Passing-Bablok e Bland-Altman. A presença de ADA e a formação de complexos imunes foram quantificadas por ensaios de ELISA. O DNA genômico foi genotipado para *ATG16L1*, *CD96* e *CD155*. **Resultados**: As concentrações séricas de adalimumabe não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, independentemente do ensaio. Uma diferença estatística foi observada entre os ensaios, indicando disparidade nas medidas (p=0,003), com concordância moderada. ADA foram detectados em 4 dos 27 pacientes com níveis infraterapêuticos, sendo 3 no grupo com DCA e 1 no grupo DCR. A análise dos complexos imunes revelou concentrações significativamente mais elevadas

no grupo DCA (p=0,0125). A avaliação genotípica indicou associações significativas entre o genótipo *CD96* CC (selvagem) e níveis elevados de proteína C-reativa, envolvimento colônico e níveis infraterapêuticos de adalimumabe. O genótipo *ATG16L1* CC foi associado a valores mais elevados de Índice de Atividade Endoscópica da Doença de Crohn e calprotectina fecal, enquanto o genótipo variante (TT) apresentou contagens de plaquetas mais baixas. **Conclusão:** Este estudo evidenciou que a eficácia do tratamento com adalimumabe não se correlaciona diretamente com concentrações mais elevadas do fármaco nesta coorte. A variabilidade entre os ensaios analisados aponta para a importância de um método único de teste no acompanhamento do paciente, visando maior precisão no monitoramento terapêutico. Observou-se uma associação entre o genótipo selvagem para *CD96* e *ATG16L1* e respostas laboratoriais e endoscópicas desfavoráveis ao adalimumabe. Além disso, os níveis elevados de complexos imunes no grupo DCA sugerem uma correlação com a resposta inadequada ao tratamento com adalimumabe.

Palavras-chave: doença de Crohn. Adalimumabe. Monitoramento de medicamentos. Polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Introduction: Crohn's disease (CD) is a chronic inflammation of the gastrointestinal tract, whose pathophysiology involves complex interactions between the immune system and intestinal tissue, with emphasis on the role of pro-inflammatory cytokines, such as Tumor Necrosis Factor (TNF-α), in maintaining the inflammatory process. Adalimumab, a human monoclonal antibody that neutralizes TNF-α, contributes to regulating inflammation associated with CD, although it can induce immunogenic processes, compromising therapeutic efficacy. Therefore, monitoring serum levels and anti-drug antibodies (ADA) is suggested to optimize therapy. In addition, studying genetic factors that influence the response to adalimumab may clarify the relationships between genetics, immunology, and clinical features in CD. **Objective:** To quantify the serum level of adalimumab and evaluate the interchangeability between serum-level tests. In addition, this study aimed to detect the presence of ADA, evaluate the formation of immune complexes, and investigate the genetic phenotypes associated with immunogenicity in patients with CD followed at the Inflammatory Bowel Disease Outpatient Clinic of the Gastrocentro and the Diarrhea Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas - Unicamp. **Methods:** The study included 70 patients in the maintenance phase who used adalimumab, having been subdivided into active (DCA) and remission (DCR). Peripheral blood samples were processed to obtain serum and genomic DNA. The adalimumab concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent (Promonitor) and lateral flow (Quantum Blue) assays. The interchangeability between the assays was compared using the Passing-Bablok and Bland-Altman regression analysis. The presence of ADA and the formation of immune complexes were quantified by ELISA assays. Genomic DNA was genotyped for *ATG16L1*, *CD96*, and *CD155*. **Results:** Serum adalimumab concentrations did not differ significantly between groups, regardless of the assay. A statistical difference was observed between assays, indicating disparity in measurements (p=0.003), with moderate agreement. ADA was detected in 4 of 27 patients with subtherapeutic levels, 3 in the DCA group and 1 in the DCR

group. Immune complex analysis revealed significantly higher concentrations in the DCA group (p=0.0125). The genotypic evaluation indicated significant associations between the *CD96* CC (wild-type) genotype and elevated C-reactive protein levels, colonic involvement, and subtherapeutic adalimumab levels. The *ATG16L1* CC genotype was associated with higher Crohn's Disease Endoscopic Activity Index and fecal calprotectin values, while the variant genotype (TT) showed lower platelet counts. **Conclusion:** This study showed that the efficacy of adalimumab treatment does not directly correlate with higher drug concentrations in this cohort. The variability between the assays analyzed points to the importance of a single test method in patient follow-up, aiming at greater precision in therapeutic monitoring. An association was observed between the wild-type genotype for *CD96* and *ATG16L1* and unfavorable laboratory and endoscopic responses to adalimumab. Furthermore, the high levels of immune complexes in the DCA group suggest a correlation with inadequate response to adalimumab treatment.

Keywords: Crohn's disease. Adalimumab. Therapeutic drug monitoring. Genetic polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imunopatologia da doença de Crohn (DC). 25

Figura 2. Atuação do adalimumabe. 29

Figura 3. Avaliação de imunogenicidade ao adalimumabe. 34

Figura 4. Formação de complexos imunes.. 35

Figura 5. Níveis séricos de adalimumabe em pacientes com doença de Crohn (DC) em atividade e remissão...... 49

Figura 6. Número de pacientes em cada categoria de nível terapêutico. 50

Figura 7. Níveis séricos de adalimumabe em pacientes com DC em associação à imunomoduladores...... 51

Figura 8. Comparação entre o ensaio Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral).. 52

Figura 9. Regressão linear para comparação entre os ensaios Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral)...... 53

Figura 10. Comparação entre medições pelos testes Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral)...... 54

Figura 11. Detecção de ADA em pacientes com níveis infraterapêuticos de adalimumabe conforme determinação pelos ensaios Quantum-Blue e Promonitor. 55

Figura 12. Avaliação da formação de complexos imunes como processo imunogênico. 56

Figura 13. A medicina de precisão no contexto da terapia com adalimumabe para a doença de Crohn implica uma abordagem abrangente para a otimização do tratamento.. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos participantes. 47

Tabela 2. Comparação das frequências de selvagens homozigotos e heterozigotos do gene CD155 em relação a variáveis categóricas. 57

Tabela 3. Comparação das frequências dos polimorfismos do gene ATG16L1 em relação a variáveis categóricas. 60

Tabela 4. Comparação das frequências dos polimorfismos do gene CD96 em relação a variáveis categóricas. 63

Tabela 5. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos níveis de hematócrito.. 67

Tabela 6. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos níveis de Proteína C Reativa (PCR). 68

Tabela 7. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos níveis de albumina. 69

Tabela 8. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS). 70

Tabela 9. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos níveis de Velocidade de

Hemossedimentação (VHS). 71

Tabela 10. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes ATG16L1, CD96 e CD155 em relação aos níveis de calprotectina fecal. 72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação de Montreal..... 26

Quadro 2. Intervalos de detecção dos testes utilizados. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB - β-actina

ADA – Anticorpos Anti-Droga

ATG16L1 - *Autophagy-related gene 16-like 1*

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CC – Genótipo selvagem

CDEIS – *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*

cDNA - DNA complementar

DC – Doença de Crohn

DCA – Doença de Crohn em Atividade

DCR – Doença de Crohn em Remissão

DIIs – Doenças Inflamatórias Intestinais

dNTPs - Desoxiribonucleotídeos

EDTA - Anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetracético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Clássica

EPM – Erro padrão da média

ERM – Enterografia por Ressonância Magnética Nuclear

GWAS – Estudos de associação genômica ampla

IADC - Índice de Atividade da Doença de Crohn

IC – Intervalo de Confiança

IQR - *Interquartile Range* (Intervalo entre quartil)

IMM – Imunomodulador

LiCL - Cloreto de Lítio

LLOQ – *Lower Limit of Quantification*

NF-κB - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RCU – Retocolite Ulcerativa

SES-CD – *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease*

SI – Sistema Imune

SNV - *Single Nucleotide Variants*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGI – Trato Gastrointestinal

Th1 – T helper 1

TNFR-1 - Receptor do fator de necrose tumoral 1

TNFR-2 - Receptor do fator de necrose tumoral 2

TNFRSF1B – Receptor do fator de necrose tumoral 1 beta

TNFRSF6 - Receptor do fator de necrose tumoral 6

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPMT – Tiopurina S-metiltransferase

TT – Genótipo variante

6-TGN – 6-Tioguanina

ULOQ - *Upper Limit of Quantification*

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

K - Kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22

1.1. Doença de Crohn: considerações gerais e imunopatologia 22

1.2. Caracterização clínica e endoscópica 25

1.3. Anticorpos monoclonais como terapêutica 27

1.4. Monitoramento terapêutico do adalimumabe 30

1.5. Imunogenicidade associada ao adalimumabe 33

1.6. Influência da variabilidade genética 36

2. OBJETIVOS 39

2.1. Objetivo Geral 39

2.2. Objetivos Específicos 39

3. CASUÍSTICA E MÉTODO 40

3.1. Desenho do estudo e amostra da população 40

3.1.1. Critérios de inclusão 40

3.1.2. Critérios de exclusão 40

3.1.3. Caracterização da casuística e considerações éticas 41

3.1.4. Aspectos relacionados às características socioeconômicas, demográfica, avaliação clínica e laboratorial. 42

3.2. Método 43

3.2.1. Determinação da concentração sérica de adalimumabe e detecção de anticorpos anti-adalimumabe 43

3.2.2. Determinação da formação de complexos imunes 44

3.2.3. Obtenção do DNA genômico e ensaio de genotipagem 44

3.3. Análise estatística 44

4. RESULTADOS 46

4.1. Dados Clínicos e Demográficos 46

4.2. Comparação de níveis séricos de adalimumabe dentre os grupos

atividade e remissão 48

4.3. Comparação e intercambialidade entre testes 51

4.4. Detecção de anticorpos anti-adalimumabe nos pacientes com doença de Crohn 54

4.5. Mensuração da formação de complexos imunes 55

4.6. Avaliação dos genótipos de polimorfismos para *ATGL16L1*, *CD96* e *CD155* 56

5. DISCUSSÃO 73

6. CONCLUSÃO 85

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

8. APÊNDICE 97

8.1. Questionário de dados clínicos e demográficos 97

9. ANEXOS 98

9.1. Aprovação do Comitê de Ética 98

9.2. Indice de Atividade da Doença de Crohn (IADC) 99

9.3. *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS) 100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Crohn: considerações gerais e imunopatologia

O trato gastrointestinal (TGI) representa a maior superfície de contato do corpo humano com o ambiente externo, dessa forma a barreira gastrointestinal está constantemente exposta a diversos microrganismos potencialmente patogênicos. Para evitar infecções, são necessárias estratégias eficazes por parte do sistema imune (SI), como a produção de citocinas e quimiocinas que ativam e direcionam a migração de leucócitos, bem como a secreção de agentes antimicrobianos (1), de forma a proteger o local e evitar sua destruição.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são caracterizadas como uma condição idiopática resultante da inflamação crônica e excessiva do TGI, podendo resultar em diarreia, hemorragia intestinal, perda de função dos órgãos, dor abdominal, perda de peso e fadiga (2, 3). As DII são subdivididas em duas formas clínicas, a retocolite ulcerativa (RCU) e a doença de Crohn (DC). Ambas compartilham características semelhantes, como a inflamação crônica, a disfunção da resposta imunológica inflamatória, e suas sintomatologias, além de apresentarem o padrão remitente e recidivante de doença (4, 5).

Ainda não há um consenso quanto às causas das DII, entretanto acredita-se que a somatória de fatores como predisposição genética, disfunção da barreira da mucosa intestinal, resposta imunológica desbalanceada, distúrbios da microbiota, e fatores ambientais, impacta na etiopatogenia das doenças (6, 7). Os principais fatores ambientais citados como riscos para o surgimento da doença são o fumo, a poluição do ar, apendicectomia, depressão e estresse psicosocial, e dietas contendo produtos ultraprocessados (8, 9). Além disso, a contribuição de fatores genéticos também demonstrou ter um papel importante, por meio da existência de genes de risco como o *NOD2/CARD15* e o *ATGL16L1*, os quais estão envolvidos com a regulação de processos inflamatórios e com a autofagia, respectivamente (10, 11).

As taxas mais elevadas de ocorrência das DII são predominantemente encontradas em países altamente industrializados. Devido aos processos de industrialização, houve um aumento nos diagnósticos das DII nos países em processo de desenvolvimento, sendo mais evidentes esses achados no início do

século XXI (12). Essa elevação na incidência das DII em tais nações pode ser associada a múltiplos fatores, como o aumento da urbanização que influenciou modificações nos padrões de vida, bem como o crescimento nas taxas de tabagismo (13). A DC pode afetar pessoas de todas as faixas etárias e gêneros, mas é mais prevalente entre a segunda e a terceira décadas de vida. Assim, há implicações diretas na produtividade, na qualidade de vida dos pacientes e, por conseguinte, na esfera da saúde pública, trazendo ônus ao sistema de saúde (14).

A DC foi descrita pela primeira vez por Burrill B. Crohn em 1932. Em seu estudo, foi apresentada uma descrição clínica, com detalhes como possíveis complicações, a ocorrência de estenoses e fístulas, enunciando assim uma doença crônica inflamatória do TGI com características únicas, sendo sua descoberta um marco importante no entendimento das doenças gastrointestinais, e permitiu avanços significativos no diagnóstico e tratamento (15, 16).

A evolução da DC se caracteriza por períodos de remissão e recidiva, não havendo, até o momento, uma cura definitiva. Os pacientes manifestam uma ampla gama de sintomas, como diarreia, dor abdominal, perda de peso, náuseas, vômitos e, em alguns casos, febre e calafrios (17, 18), debilitando sua qualidade de vida. A condição apresenta diversos fenótipos, incluindo inflamatório, estenosante e penetrante, e ao longo do tempo, os pacientes podem transitar entre estes. A maioria dos pacientes acaba necessitando de pelo menos um procedimento cirúrgico de ressecção durante o curso da doença (19), principalmente dentre os que apresentam acometimento do intestino delgado, os que têm fístulas perianais, além de haver uma tendência de necessidade de intervenção cirúrgica em pacientes cujo diagnóstico foi realizado entre os 45 e 59 anos (20).

Diferentemente da RCU, a qual caracteriza-se por uma inflamação histologicamente limitada à superfície da mucosa e restrita ao cólon e reto, a DC apresenta inflamação que abrange todas as camadas da parede do TGI (21). Os locais mais frequentemente afetados pela DC incluem o íleo, o cólon e a região perianal. Sua capacidade de atingir todas as camadas do intestino pode resultar em úlceras segmentares, que são profundas e intercaladas com áreas de mucosa intestinal não inflamada (22, 23).

A profundidade das úlceras pode levar a complicações, como o desenvolvimento de fístulas, e consequentemente, à necessidade de intervenções cirúrgicas. Aproximadamente 40% dos pacientes experimentam sintomas perianais, incluindo plicomas, fissuras e fístulas perianais. Em casos mais graves e exacerbados, podem ocorrer complicações como sangramento intestinal, megacólon tóxico e o desenvolvimento de adenocarcinoma no cólon ou reto (22, 23).

O tecido intestinal demonstra a existência de uma interação entre a patofisiologia e o sistema imunológico, na qual as células de Paneth, as células caliciformes e as células imunes atuam para manter a integridade do órgão (24). Entretanto, na ocorrência da DC, células imunes são recrutadas ao local e iniciam a produção de citocinas e quimiocinas, as quais contribuem para a chegada de células T *helper* 1 (Th1) na mucosa. Assim, esses linfócitos sintetizam mais citocinas inflamatórias, as quais levam a mais inflamação no tecido, causando danos à mucosa e ao epitélio (25-27). Esses danos estão diretamente relacionados à disbiose, o que pode desencadear e manter um processo inflamatório contínuo e exacerbado. Além disso, por levar à modulação, prolongamento e regulação da inflamação intestinal e na lesão aos tecidos, as citocinas pró-inflamatórias têm sido objeto de estudo, visto seu papel central na doença, e representam alvos terapêuticos em potencial (28, 29).

Uma das principais citocinas pró-inflamatórias trata-se do Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), sendo predominantemente sintetizado por macrófagos, linfócitos, células dendríticas e células endoteliais (1). A atividade biológica desse fator inicia quando ele se acopla aos seus receptores TNFR-1 e TNFR-2, desencadeando a ativação subsequente da via de sinalização do NF-κB. Este, por sua vez, estimula a síntese de produtos pró-inflamatórios (30, 31), desempenhando papel crucial na patogênese da doença ao induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e IL-33 (Figura 1). Assim, essa interação contribui para a perpetuação do estado inflamatório no organismo (28, 32).

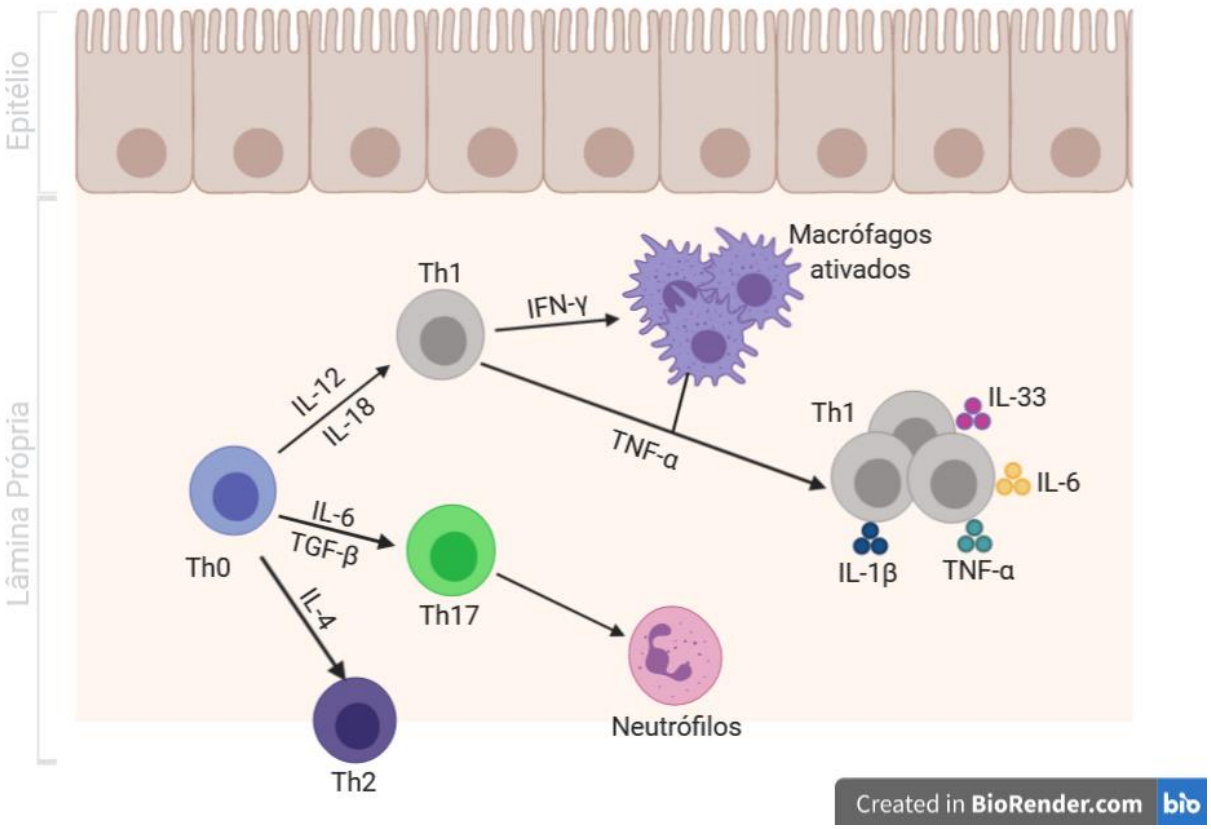

Figura 1. Imunopatologia da doença de Crohn (DC). *A progressão da doença envolve várias citocinas pró-inflamatórias, sendo o TNF-alfa uma das mais destacadas. Além de suas próprias propriedades como citocina pró-inflamatória, o TNF-alfa também estimula a expressão de outras citocinas, desempenhando assim um papel fundamental na manutenção do estado inflamatório. Figura criada com BioRender.com*

Pela sua contribuição para o ciclo exacerbado de inflamação, o TNF-α favorece ativamente o dano à mucosa intestinal na DC, esse de forma exacerbada e retroalimentada. Essa inflamação crônica resulta em úlceras, erosões e lesões na parede intestinal, características da doença, levando a complicações como fístulas, estreitamentos (estenoses) e formação de abscessos.

1.2. Caracterização clínica e endoscópica

A caracterização clínica e endoscópica da DC envolve a aplicação da Classificação de Montreal, do Índice de Atividade da DC (IADC) e a avaliação de índices endoscópicos, tais como o *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS) e o *Simplified Endoscopic Activity Score for Crohn's Disease* (SES-CD).

A Classificação de Montreal (Quadro 1) categoriza a DC com base em parâmetros como a idade do diagnóstico (A), a localização (L) e o comportamento (B), com o propósito de classificar o fenótipo da doença e orientar a seleção da estratégia terapêutica mais adequada para cada paciente (33).

Quadro 1. **Classificação de Montreal para doença de Crohn.**

Idade no Diagnóstico (A)	A1 – abaixo dos 16 anos A2 – entre 17 e 40 anos A3 – acima dos 40 anos
Localização (L)	L1 – ileal L2 – colônico L3 – ileocolônico L4 – TGI superior
Comportamento (B)	B1 – inflamatório B2 – estenosante B3 – fistulizante
Modificador p	Presença de doença perianal

O IADC avalia diversos aspectos, incluindo o hábito intestinal diário relatado pelo paciente, a média da intensidade da dor abdominal ao longo de sete dias, o bem-estar geral durante uma semana, a presença de complicações, o uso de medicamentos, a detecção de massas abdominais, as alterações no hematócrito e as variações de peso. Com base nos pontos acumulados, a classificação divide os pacientes em quatro categorias: remissão clínica (com menos de 150 pontos), atividade leve (pontuação entre 150 e 250 pontos), atividade moderada (pontuação acima de 250 até 350 pontos) e atividade grave (mais de 350 pontos) (34). Seu uso na clínica auxilia no entendimento da doença no momento atual, contribuindo para que se possa correlacionar a queixa do paciente com sinais de atividade da doença.

No que diz respeito aos índices endoscópicos, o CDEIS baseia-se na avaliação colonoscópica, através da detecção ou não de lesões, incluindo úlceras superficiais, úlceras profundas e estenoses ulceradas ou não, nos segmentos específicos do trato gastrointestinal, como o íleo terminal, o cólon ascendente, o cólon transverso, o cólon esquerdo, sigmoide e o reto (35). Seu propósito é avaliar a extensão e a intensidade da inflamação na mucosa intestinal. Por sua vez, o SES-CD é um escore mais simplificado que pode ser correlacionado com o CDEIS (36). Ambos índices são amplamente reconhecidos como padrão-ouro para determinar a presença ou ausência de atividade inflamatória na doença e auxiliar no seu manejo.

Dessa maneira, a aplicação do IADC e do CDEIS nos pacientes durante o acompanhamento médico permite um melhor entendimento global da doença. O ideal é que o paciente seja capaz de entrar em estado de remissão tanto clínico, quando endoscópico, e assim mantê-lo, visto que a cura ainda não é possível.

1.3. Anticorpos monoclonais como terapêutica

Com base nas classificações e escores dos pacientes com DC, são estabelecidas orientações terapêuticas que abrangem tanto o uso de medicamentos quanto procedimentos cirúrgicos. A abordagem medicamentosa consiste na administração de agentes destinados a reduzir os processos inflamatórios, incluindo aminossalicilatos, corticosteroides, antibióticos, imunossupressores e terapias biológicas (37).

O principal desafio no tratamento reside em alcançar tanto a remissão endoscópica quanto a clínica, mantendo essa remissão ao longo do tempo para prevenir possíveis complicações e a necessidade de cirurgias. Estudos recentes têm destacado a importância da cicatrização da mucosa intestinal como um fator associado à redução da incidência de complicações, à diminuição das taxas de recorrência e à redução no número de hospitalizações e procedimentos cirúrgicos, sendo considerada um fator prognóstico chave no tratamento da DC (38-40).

O uso de aminossalicilatos (como a mesalazina e a sulfassalazina), tiopurinas (como a azatioprina e 6-mercaptopurina), e corticosteroides (como a

prednisona, prednisolona e a budesonida) eram considerados, antigamente, a base do tratamento das DII (41). Estes continuam sendo utilizados como terapia devido às suas vantagens, como estabilidade química e facilidade de administração. No entanto, apresentam efeitos adversos, incluindo risco de infecções secundárias, carcinogênese e hepatotoxicidade, devido ao seu potencial imunossupressor (42, 43), além de não serem tão eficazes na cicatrização de mucosas. Assim fez-se necessária a introdução de outros medicamentos que pudessem contribuir de maneira mais eficaz para atingir esse objetivo (44).

Neste contexto, o uso de medicamentos biológicos, conhecidos como anticorpos monoclonais, foi incorporados como uma abordagem inovadora para tratar a DC. Esses compostos demonstram uma notável eficácia na promoção da cicatrização da mucosa (2, 45), conseguindo auxiliar na dificuldade antes encontrada com o uso dos demais medicamentos disponíveis para o tratamento de DII.

Biologicamente, os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas originadas de um único clone de linfócitos B, sendo projetados para se ligar a antígenos específicos com habilidade de direcionamento às células-alvo (46). Sendo assim, a engenharia genética permite a produção de anticorpos que consigam ser extremamente específicos quanto ao seu alvo e suas funções em larga escala. Os avanços biotecnológicos atuais têm impulsionado o desenvolvimento de anticorpos monoclonais aprimorados em termos de eficácia e acessibilidade, podendo ser gerados para as mais diversas funções (47).

Desde a sua primeira aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2002 (48), os anticorpos monoclonais têm desempenhado um papel essencial como tratamentos para uma ampla gama de condições médicas, como doenças reumatológicas, doenças autoimunes e também imuno-mediadas (49). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) informou que mais de 500 denominações de anticorpos monoclonais haviam sido designadas, sendo essas comerciais e em fase de testes clínicos de fases avançadas (50).

O emprego de anticorpos monoclonais como uma abordagem terapêutica para a DC representa uma verdadeira revolução na maneira como a doença é tratada. Um exemplo é o adalimumabe, um anticorpo monoclonal totalmente humano, composto por uma imunoglobulina G1 (IgG1), que é capaz de identificar

e se ligar de maneira específica ao TNF-α, neutralizando sua função biológica ao bloquear sua interação com os receptores p55 e p57 na superfície celular (51) (Figura 2). Adicionalmente, o adalimumabe desempenha um papel na regulação das respostas inflamatórias induzidas ou controladas por essa citocina (52). Sua composição é caracterizada por duas cadeias leves kappa (K), compreendendo 214 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 24 kDa, e duas cadeias pesadas de 49 kDa, estas com 451 aminoácidos, totalizando 148 kDa (53).

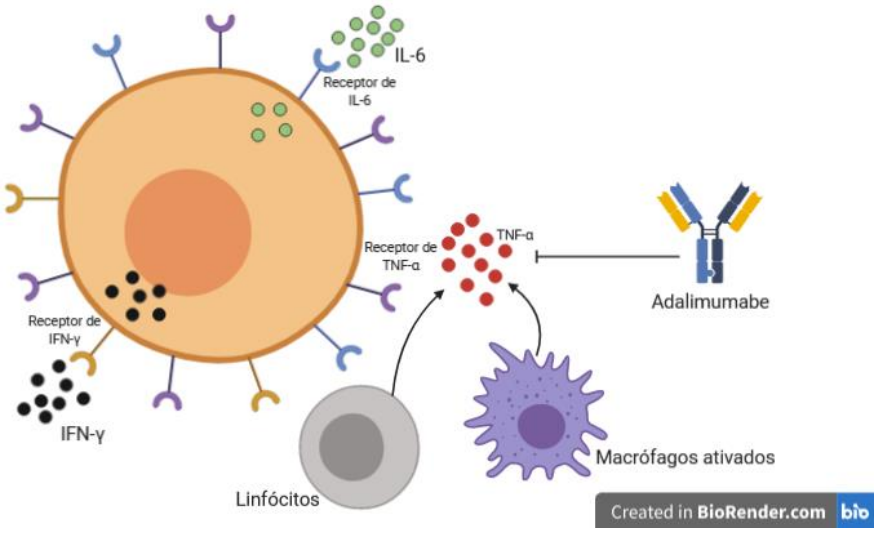

Figura 2. Atuação do adalimumabe. *A interação entre o receptor de TNF-α, linfócitos e macrófagos produtores de TNF-α desempenha um papel central na resposta imunológica e inflamatória. O adalimumabe atua bloqueando especificamente o TNF-α, inibindo sua ligação aos receptores p55 e p57 na superfície celular e, consequentemente, atenuando a resposta inflamatória. Figura criada com BioRender.com*

O adalimumabe tem se destacado por sua eficácia abrangente na DC, tanto na indução quanto na manutenção da cicatrização da mucosa em pacientes (54). Uma das características significativas que tornam este medicamento tão vantajoso é a sua capacidade de autoadministração por parte do paciente, o que elimina a necessidade de visitas frequentes a centros de saúde para realizar infusões. Além disso, sua reduzida imunogenicidade é uma característica relevante, uma vez que, sendo totalmente humanizado, minimiza o potencial de respostas imunológicas indesejadas (55).

Sendo comercializado em dose única de 40 mg, o adalimumabe deve ser

administrado por via subcutânea, inicialmente em regime de 14 em 14 dias (52), sendo capaz de manter sua estabilidade por 18 meses quando armazenado de 2ºC a 8ºC (53). A segurança e a eficácia deste medicamento foram avaliadas em estudos randomizados e controlados por placebo envolvendo mais de 1400 pacientes com DC ativa, abrangendo casos de espectro moderado a grave (IADC ≥ 220 e ≤ 450) (52). A indução da remissão clínica (IADC < 150) foi demonstrada em dois estudos distintos (51, 56), ambos revelando que uma proporção significativamente maior de pacientes tratados com 160/80 mg de adalimumabe alcançou a remissão clínica, quando comparados ao placebo. Estes estudos destacam a eficácia do medicamento no tratamento da DC, tanto como agente de indução quanto como uma opção para a manutenção da remissão, mesmo em casos mais graves.

Em relação aos efeitos colaterais do adalimumabe, por se tratar de um inibidor de TNF-α, os pacientes que fazem uso desse medicamento são mais propensos à infecções, em especial à tuberculose. Dessa forma, deve-se realizar o monitoramento dos pacientes durante o seu uso, com avaliação de história clínica e investigação de antecedentes de tuberculose para abranger casos de latência, através de testes de Mantoux e radiografia de tórax antes de iniciar seu uso. Além, este não deve ser administrado em casos de infecções ativas (52).

A avaliação de efeitos indesejáveis durante o uso do adalimumabe foi analisada em 2334 pacientes, com exposições ao medicamento durante 6 meses e 1 ano. As principais queixas relatadas pelos participantes foram hiperlipidemia, cefaleias e tonturas, ocorrência de infecções respiratórias do trato superior, sinusites, rinites, aumento da tosse, e infecções no sistema urogenital (52).

1.4. Monitoramento terapêutico do adalimumabe

O monitoramento sérico dos anticorpos monoclonais anti-TNF-α tem sido amplamente empregado e recomendado na prática clínica, visando prevenir tanto o subtratamento quanto o excesso, cenários que podem resultar em questões relacionadas à eficácia e à segurança (57). Diversos estudos evidenciaram a correlação entre os níveis da droga e melhorias tanto clínicas quanto endoscópicas, bem como cicatrização de mucosas. Essa associação também se reflete na redução das taxas de recorrência da doença, menor

necessidade de hospitalizações e cirurgias, além de taxas superiores de remissão e sua manutenção (58-60).

Importantes diretrizes de manejo para DII recomendam que seja realizado o monitoramento sérico em pacientes. A diretriz de 2017 da *American Gastroenterological Association* (AGA) recomenda o monitoramento em pacientes com doença ativa, seja identificada por meio de sintomas clínicos ou confirmada por biomarcadores objetivos. Além disso, também sugere o monitoramento em pacientes assintomáticos que demonstrem evidência de inflamação ativa em exames endoscópicos e/ou radiológicos (61). A diretriz também aponta que ajustar as doses para otimizar a medicação de forma empírica pode ser inadequado, especialmente em pacientes que apresentam algum tipo de falha mecanicista ou imunomediada. Nessas circunstâncias, é recomendável considerar a substituição da classe medicamentosa, em vez de apenas otimizar o medicamento atual (61).

Especificamente em relação ao adalimumabe, estudos recomendam que níveis a partir de 4,8 µg/ml são associados a respostas clínicas favoráveis, enquanto concentrações acima de 7,5 µg/ml demonstraram melhora histológica (62). Outro trabalho sugere que doses superiores a 13,9 µg/ml na semana 4 estiveram associadas à remissão após 24 semanas, indicando que concentrações mais elevadas podem ser necessárias para alcançar a resposta terapêutica desejada (63). A faixa terapêutica globalmente aceita para as concentrações de adalimumabe é de 5-12 µg/ml (64-66).

O monitoramento sérico pode ser realizado de forma proativa e reativa. O monitoramento proativo é conduzido preventivamente, visando identificar possíveis falhas terapêuticas antes que o paciente manifeste sintomas clínicos. Por outro lado, o monitoramento reativo é realizado em resposta a sinais clínicos ou endoscópicos de atividade da doença. Negoescu et al. compararam a efetividade entre os dois tipos de monitoramento em pacientes utilizando infliximabe por meio de um modelo de predição. Seus dados indicaram que o monitoramento proativo resultou em menos recorrências de crises em comparação com o monitoramento reativo. Além disso, o monitoramento proativo demonstrou proporcionar economia financeira (67).

A principal técnica para a quantificação de produtos biológicos é o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que é específico para antígenos e fornece dados de

forma quantitativa. Embora seja uma técnica de execução relativamente simples, requer um laboratório equipado com um leitor de absorbância e treinamento especializado para sua realização e operação. Entre as desvantagens, o ELISA é caracterizado por uma execução demorada e requer um grande número de amostras para serem realizadas simultaneamente, a fim de ser economicamente viável. Portanto, em ambientes com baixo fluxo de pacientes em um curto período de tempo, pode resultar em longos períodos de espera até que o número necessário de amostras seja alcançado para análise (68).

Como alternativa, foram desenvolvidos ensaios de fluxo lateral, também conhecidos como testes rápidos, para a mensuração de produtos biológicos. Esses testes de baixo custo, são portáteis, podendo ser utilizados em clínicas e leitos. Além disso, os resultados podem ser exibidos tanto de forma quantitativa quanto qualitativa. Entre as vantagens, esses testes podem ser realizados de forma individual, eliminando a necessidade de um grande número de amostras para serem analisadas simultaneamente. Além disso, possuem um tempo de execução curto, variando de 15 a 30 minutos (69).

Diversos ensaios comercialmente padronizados estão disponíveis para a mensuração de níveis séricos de adalimumabe, sendo extremamente úteis no manejo das DII. Em um estudo realizado por Cheli et al., os pesquisadores avaliaram a performance, a intercambialidade e a correlação entre o ensaio ELISA (Chorus Promonitor®) e o ensaio de fluxo lateral (RIDA QUICK®) para a mensuração sérica de infliximabe e adalimumabe. Os resultados indicaram uma boa concordância entre as concentrações mínimas de adalimumabe nos dois ensaios, mas uma correlação fraca para infliximabe (70). Similarmente, Gomes et al. também investigaram a intercambialidade dos ensaios de fluxo lateral (Quantum Blue®) e ELISA (Promonitor®) para a mensuração de infliximabe, encontrando diferenças significativas entre os testes e uma concordância moderada (71).

Dessa maneira, a comparação entre testes demonstra-se benéfica ao permitir a identificação das metodologias que fornecem resultados mais precisos, assegurando a mensuração real dos níveis séricos dos medicamentos. Além disso, é possível obter informações sobre a custo-efetividade, permitindo a adoção de opções mais econômicas e a determinação da viabilidade de realização dos testes em ambientes com infraestrutura limitada.

1.5. Imunogenicidade associada ao adalimumabe

Com um maior uso de terapias biológicas ao longo do tempo, observou-se que, entre um considerável número de pacientes submetidos a tratamentos com anticorpos monoclonais, alguns apresentaram respostas imunológicas indesejadas em relação às terapias (72-74). Pesquisas demonstraram que certos pacientes têm uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento dessas respostas imunológicas indesejadas, resultando na produção de anticorpos contra as terapias biológicas (75, 76).

A imunogenicidade, caracterizada pela capacidade dos compostos terapêuticos de estimular a produção de anticorpos contra seu próprio sistema foi identificada em estudos recentes como um dos principais fatores subjacentes à ineficácia terapêutica observada nos indivíduos que fazem uso de anticorpos monoclonais (77-79), e assim impactando diretamente no curso da doença.

O processo de imunogenicidade implica em uma sequência de etapas complexas (Figura 2). Inicialmente, ocorre a endocitose terapêutica, na qual as células do sistema imunológico reconhecem o medicamento e internalizam uma fração do mesmo. Subsequentemente, as células T desempenham um papel crucial, orquestrando a ativação do sistema imunológico em resposta ao adalimumabe. Essas células identificam o medicamento como um elemento estranho e coordenam a resposta imunológica, estimulando, assim, outros tipos celulares a serem ativados, incluindo as células B (1).

Uma vez ativadas, as células B iniciam a produção de anticorpos específicos, cujo alvo é o adalimumabe. A liberação de anticorpos anti-adalimumabe pode resultar em um comprometimento da eficácia do medicamento, uma vez que tais anticorpos têm a capacidade de neutralizá-lo, diminuindo, assim, sua habilidade de identificar o TNF-α livre e consequentemente de tratar as condições médicas para as quais foi prescrito.

Dessa forma, compreender os processos de endocitose terapêutica, ativação das células T, resposta das células B e liberação de anticorpos anti-adalimumabe é essencial para aprimorar esses medicamentos biológicos e evitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico, provendo uma terapia mais eficaz e que possa melhorar a qualidade de vida dos pacientes a curto e longo prazo.

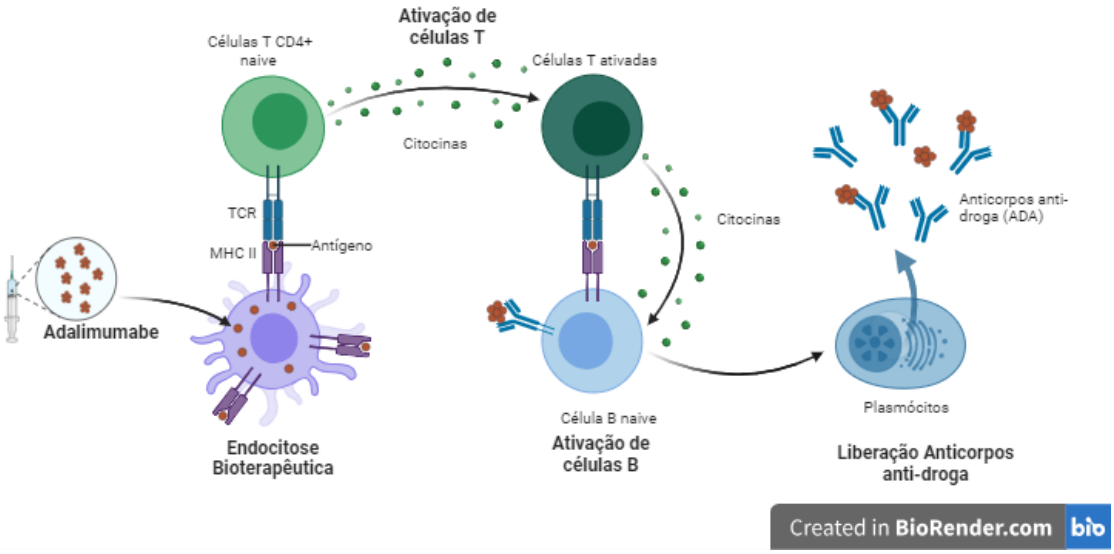

Figura 3. Avaliação de imunogenicidade ao adalimumabe. *O processo de imunogenicidade envolve a internalização do medicamento por células do sistema imunológico, seguida pela ativação das células T, que coordenam a resposta imunológica, incluindo a ativação das células B. Essas células B produzem anticorpos direcionados ao medicamento, o que pode reduzir sua eficácia ao neutralizá-lo. Figura criada com BioRender.com.*

Diversos fatores podem levar ao desenvolvimento de anticorpos anti-droga (ADA), como o perfil imunológico do paciente, a forma de administração da droga, a própria estrutura do anticorpo monoclonal, e uso de medicações concomitantes (80, 81). Assim, o aprimoramento da terapia com base na monitorização dos níveis séricos dos medicamentos biológicos e dos níveis de ADA oferece inúmeros benefícios na amenização de efeitos adversos. Essa abordagem possibilita um ajuste terapêutico ideal, abrangendo desde os efeitos mais leves, que podem ser gerenciados com anti-histamínicos e corticosteroides, que não comprometem seu uso contínuo, até os efeitos mais graves, que justificariam a descontinuação do tratamento com o adalimumabe e posterior troca para outra medicação.

Estudos estão atualmente em andamento para esclarecer a relação entre a utilização de terapias biológicas e a indução da imunogenicidade resultante do uso desses medicamentos. Fatores genéticos, a gestão do tratamento e a estratégia de dosagem estão entre os possíveis elementos correlacionados à redução da eficácia terapêutica (82).

A detecção de ADA demonstra uma correlação significativa com a

redução dos níveis séricos da medicação (72, 83). Através da estimulação da proliferação de linfócitos, ocorre a produção de ADA que podem se complexar com o anti-TNF-α, formando complexos imunes, estes também envolvidos na remoção do fármaco e consequente falha terapêutica.

Complexos imunes são gerados mediante o aumento da produção de anticorpos por linfócitos B, em resposta a antígenos específicos ou à presença excessiva destes últimos. Esses complexos, em geral, se caracterizam pela presença de múltiplos anticorpos, notadamente IgG e IgM, que se ligam ao antígeno correspondente, resultando na formação de extensas cadeias insolúveis (1).

Estes complexos, por sua vez, favorecem a depuração do fármaco através do sistema retículo-endotelial, promovendo uma acentuada diminuição nos níveis séricos da medicação e exercendo um impacto notável sobre a sua eficácia clínica (Figura 4) (82, 84-86).

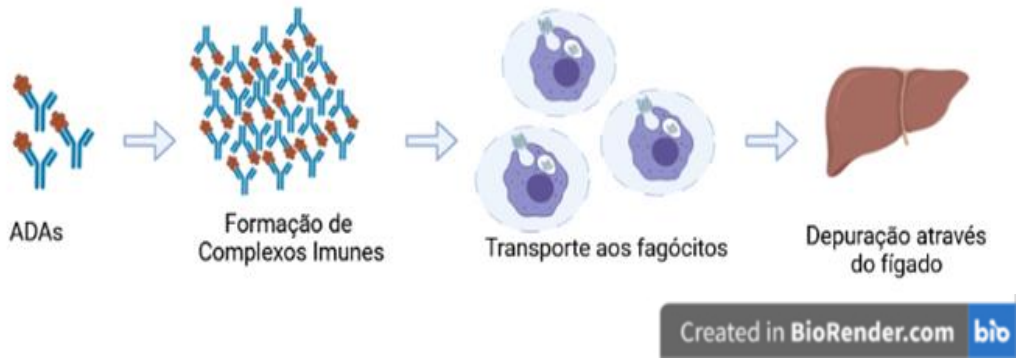

Figura 4. Formação de complexos imunes. *Os complexos imunes potencializam a depuração do anticorpo monoclonal mediante a ação do sistema retículo endotelial, resultando em uma redução substancial dos níveis plasmáticos de adalimumabe, exercendo um impacto substancial em sua eficácia. Figura criada com BioRender.com.*

Em estudo conduzido por Van Schouwenburg et al (2013), evidenciou-se que, em indivíduos acometidos por artrite reumatoide que desenvolveram anticorpos em reação à administração de adalimumabe, observou-se a presença de complexos imunes em escala reduzida algumas semanas após a aplicação do fármaco (87). Kroenke et al (2021) investigaram a resposta imunológica de uma heteroimunoglobulina com semelhança ao TNF-α em indivíduos saudáveis.

Este estudo constatou a formação de ADA nos participantes, e também identificou a presença de anticorpos direcionados ao TNFα endógeno nos soros dos indivíduos tratados com a referida heteroimunoglobulina. Tais resultados reiteram que a formação de complexos imunes entre um agente terapêutico e seu alvo pode desencadear a perda de tolerância imunológica e promover a geração de uma resposta de anticorpos direcionada ao alvo terapêutico em questão (88).

1.6. Influência da variabilidade genética

Sabendo da importância dos fatores genéticos na etiologia das DII, diversos estudos buscaram avaliar padrões genéticos associados às doenças, de modo a encontrar variantes de risco para o seu desenvolvimento. Mutações em genes foram alvo de investigações, como a avaliação de polimorfismos para o gene *NOD2* que foram associados com a ocorrência da doença (89). Assim, foram realizados diversos estudos de associação genômica ampla (GWAS), os quais comparam a frequência de alelos de uma variante entre os indivíduos acometidos por determinada doença, e aqueles saudáveis.

Investigar a influência do perfil genético do paciente e correlacioná-la às terapias disponíveis e a possíveis efeitos adversos é algo que pode trazer muito benefício para o manejo das DII. No estudo conduzido por Chouchana et al, evidenciou-se a presença de um polimorfismo genético na enzima tiopurina S-metiltransferase (TPMT) em indivíduos de ascendência caucasiana. Este polimorfismo resultou na diminuição da atividade da TPMT e em elevadas concentrações de 6-tioguanina (6-TGN), estando correlacionado com a incidência de mielotoxicidade em pacientes submetidos à terapêutica com tiopurinas (90).

Dado que a imunogenicidade representa apenas um dentre os inúmeros fatores determinantes na resposta clínica às terapias anti-TNF-α, pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de elucidar quais outros elementos contribuem para o êxito ou insucesso dessas terapias. Até o momento presente, a influência da variabilidade genética nesses processos imunogênicos, particularmente no contexto das doenças inflamatórias intestinais, permanece uma questão de considerável incerteza, e a relação entre variações genéticas e a falha

terapêutica tem sido objeto de investigação.

Pesquisadores buscaram avaliar a falha terapêutica associada ao uso de infliximabe e fatores genéticos associados ao *NOD2* em indivíduos não respondedores. O estudo demonstrou que pacientes que apresentavam homozigose para as variantes de alto risco de IL23R se beneficiavam de uma melhor resposta quando comparados aos homozigotos que apresentavam variante de baixo risco para IL23R (91). O mesmo grupo também avaliou polimorfismos de genes associados à apoptose na predição da resposta ao infliximabe em pacientes com DC luminal e com fistulizante. Os achados demonstraram uma associação significativa entre polimorfismos no gene *FasL* e a resposta ao infliximabe em ambos os grupos (91), sendo o *FasL* um ligante chave indutor de apoptose da familía do TNF-α (92).

A pesquisa conduzida por Aterido et al (2019) investigou a correlação entre polimorfismos genéticos do gene *CD96*, que codifica uma proteína que, juntamente com seu ligante *CD155*, desempenha um papel na ativação das células B, e consequente produção de anticorpos, com a resposta terapêutica ao adalimumabe. Os investigadores observaram que a variação genética na via do *CD96-CD155* pode aumentar a predisposição à produção de anticorpos antidrogas, induzindo a upregulação do *CD155* e a subsequente polarização para o fenótipo Th2, que atua como ativador de linfócitos B. Assim, estabeleceram uma associação entre o locus *CD69* e a imunogenicidade associada ao adalimumabe, influenciando, assim, a resposta clínica ao tratamento (93).

A identificação de associações entre o perfil genético do paciente e as características clínicas e respostas terapêuticas desempenham um papel crucial no desenvolvimento de abordagens personalizadas na prática médica. Um exemplo significativo reside na mutação do gene *ATG16L1* (*Autophagy-related gene 16-like 1*), que demonstrou ter uma relação direta com a DC. Este gene é responsável por regular processos de autofagia celular e o clearance bacteriano, funções cruciais desempenhadas pelas células do sistema imunológico inato (11). Em estudo conduzido por Nuij et al (2017), foi identificada uma associação de relevância estatística entre a administração de agentes anti-TNF-α e variantes de risco genético no gene *ATG16L1*. Os pacientes acometidos por DII que apresentavam polimorfismos neste gene demonstraram uma maior

probabilidade de obter benefícios significativos com o uso de adalimumabe, resultando em uma resposta terapêutica mais eficaz (94).

Dessa maneira, considerando a ocorrência de processos imunogênicos ao adalimumabe, como presença de anticorpos contra agentes anti-TNF e a formação de complexos imunes, e dado o contexto ainda não totalmente elucidado da contribuição dos fatores genéticos para o sucesso ou fracasso terapêutico acreditamos que nosso trabalho contribui para o conhecimento nesta área. Além disso, este estudo poder servir de base para a avaliação dos níveis séricos de adalimumabe, bem como para a detecção de ADA presente no sangue periférico, que pode ser realizada de forma sistemática nos diversos serviços de saúde e instituições especializadas em DII no Brasil, podendo fornecer novas elucidações que correlacionem fatores genéticos e imunológicos com o quadro clínico dos pacientes, contribuindo para o desenvolvimento de uma base científica que possa auxiliar na personalização terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a dosagem quantitativa do nível sérico de adalimumabe, bem como detecção de ADA, a formação de complexos imunes e analisar variantes genéticas relacionados à imunogenicidade em pacientes com DII acompanhados no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais “Juvenal Navarro Góes”, noo Gastrocentro/Unicamp e no Ambulatório de Diarréias do Hospital das Clínicas da Unicamp.

2.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar os níveis séricos de adalimumabe e a presença de ADA com a atividade clínica da doença e com resultados de exames objetivos (ileocolonoscopia e/ou enterorresonância) realizados na rotina desses pacientes.
- Comparar dois testes para a quantificação dos níveis séricos de adalimumabe, avaliando sua intercambialidade e performance.
- Quantificar a formação de complexos imunes no soro de pacientes e correlacioná-los com os níveis séricos de adalimumabe e a presença de ADA anteriormente detectados.
- Realizar a genotipagem dos genes *CD96*, *CD155* e *ATG16L1* nos pacientes e correlacioná-los com as demais variaveis numéricas e categóricas do estudo, incluíndo os níveis séricos de adalimumabe e a presneça de ADA.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. Desenho do estudo e amostra da população

Trata-se de um estudo prospectivo, quantitativo e transversal, no qual foram avaliados 70 pacientes com DC, de ambos os sexos, que fazem acompanhamento no Ambulatório do Gastrocentro e do Hospital das Clínicas - Unicamp, e que estão fazendo uso contínuo e regular de adalimumabe. A coleta de dados ocorreu entre os anos de 2020 e 2024.

Os pacientes selecionados estavam em acompanhamento no ambulatório de DII do Gastrocentro e no de Diarréias do Hospital das Clínicas da Unicamp, com diagnóstico confirmado de DC e que estavam em uso de adalimumabe como regime terapêutico. De aproximadamente 1 mil pacientes em acompanhamento no ambulatório de DII do Gastrocentro, 58 pacientes participaram do estudo; e de aproximadamente 350 pacientes em seguimento no Diarréias do Hospital das Clínicas, 12 foram incluídos do estudo. A partir desse grupo, selecionaram-se os pacientes na fase de manutenção da terapia biológica, que haviam realizado ileocolonoscopia ou enterografia por enteroressonância magnética em um período de até um mês antes ou após a coleta de sangue. Esta coleta foi programada para ocorrer o mais próximo possível da administração seguinte de adalimumabe.

3.1.1. Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico clínico e endoscópico de DC em tratamento regular de manutenção com adalimumabe (a partir da sexta semana de aplicação), e com a presença e regularidade às consultas médicas.

3.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com ausência de algum exame objetivo (ileocolonoscopia e/ou enterorresonância) no último um mês do dia da coleta de sangue periférico, ou que não tivessem esses exames agendados na rotina no próximo um mês depois do dia da coleta de sangue periférico.

3.1.3. Caracterização da casuística e considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp (CAAE: 92894418.4.0000.5404). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi lido na integra pelos pacientes e aqueles que aceitaram participar do estudo, tiveram colhidas suas assinaturas com local e data, sendo duas vias (uma delas ficando com o paciente). Foram seguidos os aspectos éticos e legais da pesquisa com seres humanos de acordo com a Resolução no 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e Comitê de Ética e Pesquisa.

Após terem aceitado participar do estudo, os indivíduos foram convidados a responder um questionário clínico-demográfico (Anexo 8.1), no qual foram coletados dados relativo ao sexo, idade, raça, tipo de DII, idade ao diagnóstico, tempo de duração do DII, tempo de uso de adalimumabe, dosagem inicial de adalimumabe (mg), alteração da dose ou da frequência de uso, cirurgia anterior relacionada à DC, uso de imunomoduladores concomitantes (azatioprina e metotrexato), e uso prévio de outros imunobiológicos para tratamento da DC. Foram utilizados dados provenientes de exames laboratoriais realizados rotineiramente nos pacientes, os quais estavam registrados em seus prontuários médicos. Em seguida, foi realizado o cálculo do IADC, conforme descrito no Anexo 9.2.

Os pacientes eram alocados como pertencentes ao grupo atividade ou remissão de acordo com critérios objetivos. A atividade da doença foi avaliada por colonoscopia (doença ativa definida como pontuação CDEIS ≥5 – Anexo 9.3 - ou presença de úlceras profundas em pelo menos um segmento intestinal) ou enterografia por ressonância magnética nuclear (ERM) (doença ativa definida como presença de úlceras profundas em pelo menos um segmento intestinal).

Após, foram coletadas amostras de sangue, sendo 5 ml em tubo seco para obtenção de soro para posterior dosagem dos níveis séricos e detecção de ADA, além da quantificação da formação de complexos imunes; e dois tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) de 5ml cada para a obtenção do DNA genômico, com a finalidade de realizar a genotipagem dos genes *CD96, CD155* e *ATG16L1* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.

Todas as amostras foram armazenadas em freezer a -80ºC de acordo com a regulação do biorrepositório (Anexado no Formulário da Plataforma Brasil) para posteriores análises.

Vale ressaltar que independente do resultado obtido nas amostras sanguíneas, estes não interferiram no tratamento proposto aos pacientes com DC, acompanhados nos ambulatórios do Gastrocentro/Unicamp e HC/ Unicamp.

3.1.4. Aspectos relacionados às características socioeconômicas, demográfica, avaliação clínica e laboratorial.

O questionário estruturado abordou questões sobre aspectos socioeconômicos, demográficos, dados clínicos e laboratoriais.

A primeira etapa se deu por meio de questões sobre endereço atual, local de nascimento e estado civil. A segunda etapa foi investigativa acerca dos sintomas iniciais da DC, e é seguida pela história pessoal do indivíduo, com questões sobre o tempo de tratamento com adalimumabe, as reações adversas apresentadas após a infusão, a dosagem atual da medicação (mg/aplicação), além da coleta de dados do prontuário médico (resultados dos exames objetivos, como ileocolonoscopia, enterorresonância, e exames laboratoriais como, hematócrito, proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação, número de plaquetas). A terceira etapa foi a realização do IADC pelo médico responsável.

A última fase se deu através dos resultados obtidos pela leitura dos experimentos realizados na amostra sanguínea de cada indivíduo, mensurando os níveis séricos de adalimumabe, a detecção ADA, a quantificação de complexos imunes e a análise genética dos polimorfismos dos genes *CD96, CD155* e *ATG16L1*.

3.2. Método

3.2.1. Determinação da concentração sérica de adalimumabe e detecção de anticorpos anti-adalimumabe

A amostra de sangue total, obtida da coleta dos pacientes com DC em uso de adalimumabe, foi centrifugada por 10 minutos, para separação do soro. Cerca de 3 ml de soro foram armazenados em biofreezer.

A determinação da concentração de adalimumabe foi realizada tanto por ensaio de imunoabsorção enzimática clássica (ELISA) (Promonitor® - Progenika Biophama, S. A. Espanha) quanto por ensaio de fluxo lateral (teste rápido da Bühlmann® Quantum - Blue - Bühlmann Laboratories AG Schönenbuch, Suíça), de acordo com a recomendação do fabricante. Em ambos os ensaios, valores entre 5-12µg/ml foram considerados terapêuticos, enquantos valores abaixo de 5 eram considerados infraterapêuticos, e acima de 12 supraterapêuticos.

A detecção de ADA foi realizada por ensaio de ELISA (Promonitor® - Progenika Biophama, S. A. Spain) para os pacientes que apresentavam níveis infraterapêuticos (<5µg/ml). Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão, utilizando amostra de concentração conhecida presente no próprio ensaio.

Os intervalos de detecção de cada ensaio utilizado, estão descritos no Quadro 2.

***Quadro 2*. Intervalos de detecção dos testes utilizados.**

	Teste	**Intervalo de detecção**
Nível sérico de adalimumabe	Quantum Blue® (Bühlmann): Ensaio de Fluxo Lateral	1.3-35 µg/ml
	Promonitor® (Grifols): ELISA	≥0,024 µg/mL e ≤ 12 µg/mL
Níveis de ADA	Promonitor® (Grifols): ELISA	>10 AU/ml: positivo

3.2.2. Determinação da formação de complexos imunes

A quantificação da formação de complexos circulantes foi realizada por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática clássica (Buhllmann® CIC-CIQ EIA - Bühlmann Laboratories AG Schönenbuch, Suíça) a partir do soro de pacientes com DII em uso de adalimumabe, obtidos como descrito no item 3.1.3, de acordo com a recomendação do fabricante.

3.2.3. Obtenção do DNA genômico e ensaio de genotipagem

O DNA genômico foi obtido das amostras de leucócitos do sangue periférico através da extração de DNA com cloreto de lítio (LiCl) e proteinase K. O DNA genômico extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo para verificação de sua integridade. A concentração e a pureza das amostras de DNA foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies®, Estados Unidos).

Os genótipos do polimorfismo para *ATG16L1* (rs10210302), *CD96* (rs9828223) e *CD155* (rs203710) foram avaliados por meio da PCR em tempo real utilizando o ensaio para genotipagem TaqMan®. A reação de PCR foi realizada com a utilização do DNA dos pacientes, SNP Genotyping Assay Mix 1X (contendo dois pares de sondas e dois fluorocromos detectores: FAM® e VIC® - (Life Technologies®, Estados Unidos), TaqMan®Universal PCR Master Mix 1X (contendo a Taq DNA polimerase, desoxiribonucleotídeos (dNTPs) e solução tampão com componentes otimizadores da reação (Life Technologies®, Estados Unidos), além de água estéril. As condições de amplificação consistiram na ativação inicial da Taq DNA polimerase (Life Technologies®, Estados Unidos) a 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de incubação a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Os resultados da genotipagem foram visualizados por meio do programa TaqMan® Genotyper (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

3.3. Análise estatística

A análise descritiva foi expressa como mediana ± mínimo e máximo. A normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com limiar de p > 0,1. Os níveis séricos de adalimumabe foram examinados quanto à atividade da doença, ao uso de drogas imunomoduladoras concomitantes e à presença de anticorpos anti-adalimumabe pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, enquanto as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado ($\chi 2$). Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes estatísticos. A análise estatística e os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad Prism, versão 8 (Califórnia, EUA).

O teste Wilcoxon foi empregado para avaliar as diferenças entre os resultados de ELISA e Quantum Blue dentro da faixa de medição. Métodos não paramétricos foram utilizados devido ao desvio dos dados de uma distribuição normal. A concordância entre os resultados obtidos pelo ELISA e os testes rápidos foi avaliada por meio da análise de regressão Passing-Bablok (95) e da técnica de Bland-Altman. A análise de regressão Passing-Bablok é empregada para investigar a existência de uma relação linear entre as variáveis X e Y (ELISA e teste rápido), fornecendo intervalos de confiança para a inclinação (B) e interceptação (A). Tais parâmetros são utilizados para determinar se há uma diferença significativa entre B e 1, bem como entre A e 0. Se o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para a inclinação incluir o valor 1 e o IC 95% para a interceptação abranger o valor 0, isso indica ausência de diferença proporcional e constante entre os métodos, respectivamente. A análise incluiu apenas pacientes cujos valores de adalimumabe estavam dentro da faixa de detecção de ambos os testes. O teste de linearidade CUSUM foi empregado para verificar se os resíduos estão distribuídos aleatoriamente acima e abaixo da linha de regressão, a fim de avaliar a linearidade na relação entre os métodos e a aplicabilidade da regressão (96). Para realizar essas análises estatísticas, utilizou-se o software Stata Statistical Software, versão 14 (College Station, TX, EUA).

Para a genotipagem, em relação as variáveis contínuas, utilizamos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição da normalidade. De modo a analisar as variáveis categóricas reais, utilizamos a comparação de frequências através do teste de qui-quadrado.

4. RESULTADOS

4.1. Dados Clínicos e Demográficos

A partir dos dados adquiridos nos prontuários médicos, foi possível efetuar a caracterização dos pacientes participantes no estudo, conforme demonstrado na Tabela 1. Do total de 70 pacientes incluídos em nosso estudo, 43 foram classificados como tendo DC em atividade (DCA). A maioria desses pacientes era composta por homens, e apresentava mediana de duração da doença de 12 anos. Em relação a cirurgias, 16 pacientes precisaram se submeter a intervenções cirúrgicas ao longo curso da doença. Quanto ao adalimumabe, a mediana de tempo de uso foi de 36 meses, com 17 pacientes utilizando o adalimumabe em regime de 7/7 dias, e 26 em regime 14/14 dias. Doze pacientes utilizavam medicação imunossupressora concomitantemente como terapêutica.

Ademais dentre os pacientes DCA, 5 pacientes apresentaram reações adversas ao adalimumabe, sendo que as queixas mais comuns foram relacionadas a problemas dermatológicos, como vermelhidão na pele. Observou-se também predominância da Classificação de Montreal A2L3B1, com 17 pacientes apresentando acometimento perineal e 22 relataram manifestações extra intestinais, sendo a artralgia a principal queixa relatada. A mediana do IADC foi de 178,2 neste grupo, e em termos laboratoriais, esses pacientes apresentaram uma mediana de 5,32 mg/ml de Proteína C reativa e 1000 µg/g de Calprotectina fecal.

O grupo em remissão (DCR) foi composto por 27 participantes, apresentando em sua maioria mulheres, e uma mediana de duração da doença de 13 anos. Dentre esses pacientes, 16 necessitaram passar por intervenções cirúrgicas. A mediana de uso de adalimumabe foi de 60 meses, com 5 pacientes utilizando o medicamento no regime semanal e 22 no regime a cada 14 dias. Quatorze pacientes utilizaram medicações imunossupressoras junto ao anti-TNF-α. Em relação a reações adversas ao medicamento, apenas dois pacientes apresentaram queixas, sendo uma dermatológica (vermelhidão) e outra sistêmica (indisposição geral após a aplicação). Observou-se predomínio da Classificação de Montreal A2L2B1, com 10 pacientes apresentando acometimento perineal e 16 com manifestações extra intestinais. Semelhante ao grupo DCA, a artralgia também foi a principal queixa relatada por esses

pacientes. A mediana do IADC nesse grupo foi de 113. Os resultados laboratoriais revelaram uma mediana de 2,0 mg/ml de Proteína C-Reativa e 30 µg/g de Calprotectina Fecal.

Quando comparados os grupos, os pacientes DCA apresentaram menor tempo de duração de terapia com o adalimumabe, e maiores valores de IADC, CDEIS, PCR e Calprotectina fecal quando comparados aos pacientes DCR, entretanto estes ultimos apresentam maiores níveis de albumina.

***Tabela 1*. Características clínicas e demográficas dos participantes.**

	Grupo DCA	**Grupo DCR**	**p**
Número de Pacientes	43	27	-
Sexo (M/F)	26/17	13/14	-
Idade (anos)	44 [18-77]	40 [19-79]	0,7673
Tempo de Evolução da Doença (anos)	12 [0,3-36]	13 [3-34]	0,3505
Submetidos à intervenção cirúrgica	16	16	-
IMM concomitante ao adalimumabe	12	14	0,806
Idade no Diagnóstico (A1/A2/A3)	5/27/11	2/21/4	-
Localização (L1/L2/L3)	11/10/22	7/12/8	-
Comportamento da Doença (B1/B2/B3)	19/11/13	14/8/5	-
Doença Perineal (sim/não)	17/26	10/17	-
Manifestações extraintestinais (sim/não)	21/22	16/11	-
Artralgia	19	14	-
Manifestações oftalmológicas	4	1	-
Manifestações dermatológicas	2	1	-
Tabagismo (sim/não)	2/41	0/27	-
Duração da Terapia com Adalimumabe (meses)	36 [2-168]	60 [7-216]	**0,0390**
Regime de aplicação do adalimumabe			
Semanal	17	5	**-**
A cada 14 dias	26	22	**-**

Apresentação de Reação Adversa ao Adalimumabe (sim/não)	5/38	2/25	-
Lesões dermatológicas	5	1	-
Reação sistêmica	0	1	-
Uso prévio de imunobiológico (sim/não)	18/25	4/23	**0,018**
IADC	178,2 [16,4-563]	113 [0-441,2]	**0,0024**
CDEIS #	6,9 [1,8-26]	0 [0-3]	**<0,0001**
Sinal de inflamação na Enteroressonância nuclear magnética (sim/não) φ	21/0	0/10	-
Hematócrito (%)	40,4 [20,4-53,1]	42,4 [30,5-53,9]	0,1883
Plaquetas (x10³)	291 [106-570]	267,5 [161-471]	0,1367
Velocidade de Hemossedimentação (%)	43 [5-120]	28,5 [4-46]	0,1743
Nível de Albumina (g/dL)	3,9 [2,8-4,6]	4,15 [3,6-5]	**0,0010**
Proteína C-Reativa (mg/L) ¥	5,32 [0,1-69]	2 [0-23]	**0,0121**
Calprotectina fecal (ug/g) &	1000 [192-2632]	30 [2-129]	**<0,0001**

As variáveis numéricas são descritas como mediana (min, max) e as variáveis categóricas como frequências absolutas. DCA = doença de Crohn ativa. DCR = doença de Crohn em remissão. M = masculino, F = feminino. CDAI = índice de atividade da doença de Crohn. CDEIS = índice de gravidade endoscópica da doença de Crohn. IMM = Imunossupressor. # CDEIS foi mensurado em 30 pacientes do grupo DCA e 25 pacientes do grupo DCR. φ Presença de úlceras e realce de contraste da mucosa em pelo menos um segmento intestinal. ¥ A proteína C reativa foi mensurada em 39 pacientes do grupo CDA e em 25 do grupo CDR. & A calprotectina fecal foi mensurada em 17 pacientes do grupo DCA e em 8 pacientes do grupo DCR. Valores significativos de p estão escritos em negrito.

4.2. Comparação de níveis séricos de adalimumabe dentre os grupos atividade e remissão

As concentrações séricas de adalimumabe foram mensuradas tanto pelo ensaio Quantum-Blue (Figura 5a), quanto pelo Promonitor (Figura 5b). Não foi encontrada diferença significativa em relação aos níveis de medicação em ambos grupos.

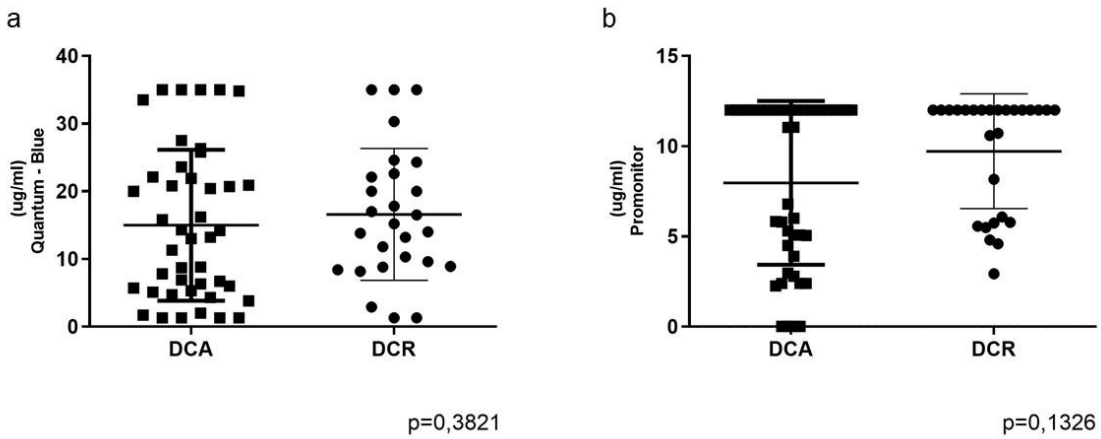

Figura 5. Níveis séricos de adalimumabe em pacientes com doença de Crohn (DC) em atividade e remissão. *Dosagem realizada por ensaio Quantum-Blue (a) e Promonitor (b). Para DCA: n=43; para DCR: n=27. *p <0.05 é considerado estatisticamente significativo versus DCA. DCA: grupo de pacientes com doença de Crohn em atividade. DCR: grupo de pacientes com doença de Crohn em remissão.*

Ao avaliar a estratificação dos pacientes DCA quanto aos níveis terapêuticos (Figura 6a), por meio do ensaio Quantum-Blue, nove apresentaram níveis infraterapêuticos (20,94%), onze apresentaram níveis ideais (25,58%), e vinte e três supraterapêuticos (53,48%). Para o ensaio Promonitor®, doze pacientes apresentaram níveis infraterapêuticos (27,90%), dez com concentrações ideais (23,25%) e vinte supraterapêuticos (48,85%). Quanto aos pacientes em remissão (Figura 6b), para o ensaio Quantum-Blue, três apresentaram níveis infraterapêuticos (11,11%), sete apresentaram níveis terapêuticos (25,92%), e dezessete supraterapêuticos (62,97%). Para o ensaio Promonitor, três apresentaram níveis infraterapêuticos (11,11%), oito terapêuticos (18,60%) e dezesseis supraterapêuticos (70,29%).

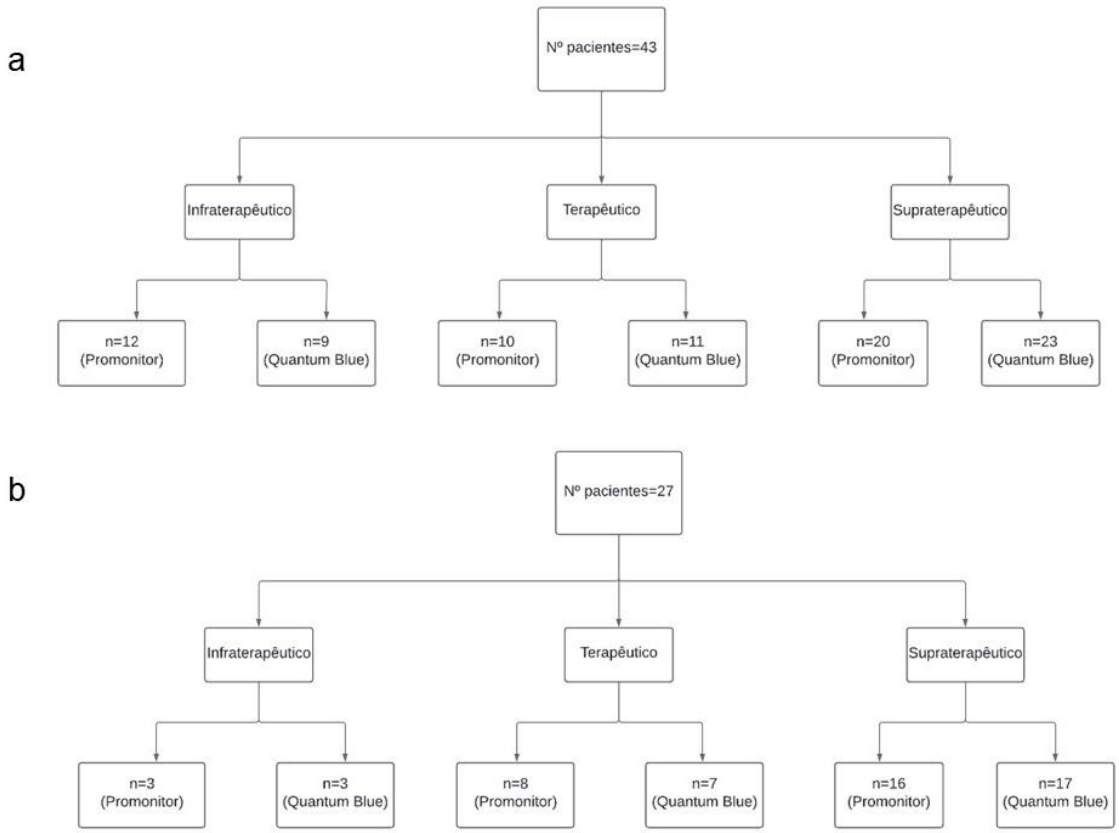

Figura 6. Número de pacientes em cada categoria de nível terapêutico. Dosagens realizadas por ensaio Quantum-Blue e Promonitor. (a) Pacientes pertencentes ao grupo atividade, estratificados de acordo com os níveis terapêuticos. (b) Pacientes pertencentes ao grupo remissão, estratificados de acordo com os níveis terapêuticos.

Em seguida, realizamos a análise da concentração sérica de adalimumabe na presença de medicação imunomoduladora concomitante ao TNF-α. Quando mensurada tanto pelo ensaio Quantum-Blue quanto pelo ensaio Promonitor, não encontramos diferenças sigificativas na influência do imunomodulador no nível sérico do adalimumabe (Figura 7). Entretanto, identificamos uma tendência em relação a um maior nível sérico de adalimumabe nos pacientes que utilizavam imunomodulador concomitante quando mensurado pelo ensaio Quantum-Blue.

a b

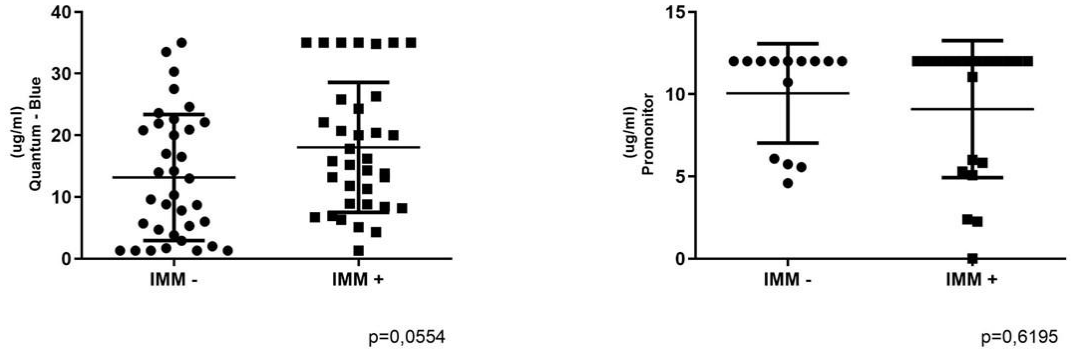

Figura 7. Níveis séricos de adalimumabe em pacientes com DC em associação à imunomoduladores. *Dosagens realizadas por ensaio Quantum-Blue (a) e Promonitor (b). Para IMM-: n=35; para IMM+: n=34. *p <0.05 é considerado estatisticamente significativo versus IMM+. IMM: Imunomodulador.*

4.3. Comparação e intercambialidade entre testes

Com o objetivo de avaliar a intercambiabilidade dos testes, foi realizada uma análise para determinar se ambos os testes operavam de maneira consistente na medição dos níveis séricos de adalimumabe. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa (p = 0,003) na mediana quando comparados os dois testes sendo 5,49 (IQR 2,97 – 6,08) para Promonitor e 8,2 (IQR 5,3 – 13,2) para Quantum Blue. Esses dados indicam uma disparidade entre suas medições (Figura 8), com uma dispersão consideravelmente maior nos resultados do Quantum Blue. Para essas análises, utilizaram-se as amostras que apresentaram níveis dentro dos limites de detecção do teste (n=23), ou seja, valores de concentração situados entre o limite inferior de quantificação (LLOQ) e o limite superior de quantificação (ULOQ) para ambos os testes.

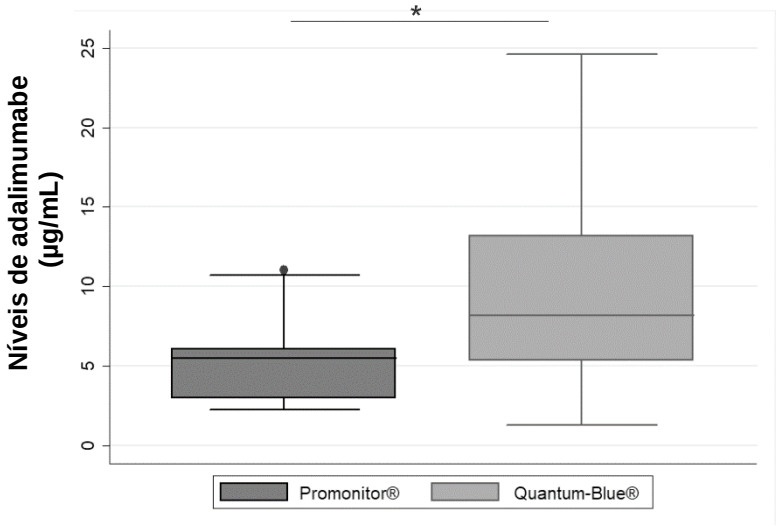

Figura 8. Comparação entre o ensaio Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral). *Os box-plots demonstram a comparação das concentrações de adalimumabe (mg/mL), sendo a mediana representada pela linha horizontal, diferença estatisticamente significativa (*p=0,003).*

A aplicação do teste CUSUM sugere que a regressão linear é uma escolha apropriada para avaliar a relação entre as variáveis (p>0,20); desta maneira, prosseguimos com o teste Passing-Bablok (Figura 9). As concentrações séricas de adalimumabe dentro do intervalo de detecção foram avaliadas em 23 pacientes para cada teste analítico. Para o teste Quantum Blue a mediana foi 8,2, enquanto para Promonitor, a mediana foi 5,50. Os resultados indicam que as medições realizadas pelo teste Quantum-Blue são cerca de 8,25% maiores do que as realizadas com o da Promonitor. Não houve diferença significativa de zero (3,526; IC 95%: 0,842 a 4,742), no intercepto da regressão Passing-Bablok, porém houve uma inclinação menor que um (0,266; IC 95%: 0,085 a 0,583), indicando uma diferença proporcional entre os testes. Além, encontramos um coeficiente de correlação de concordância de Lin foi de 0,247, sugerindo uma concordância moderada entre eles.

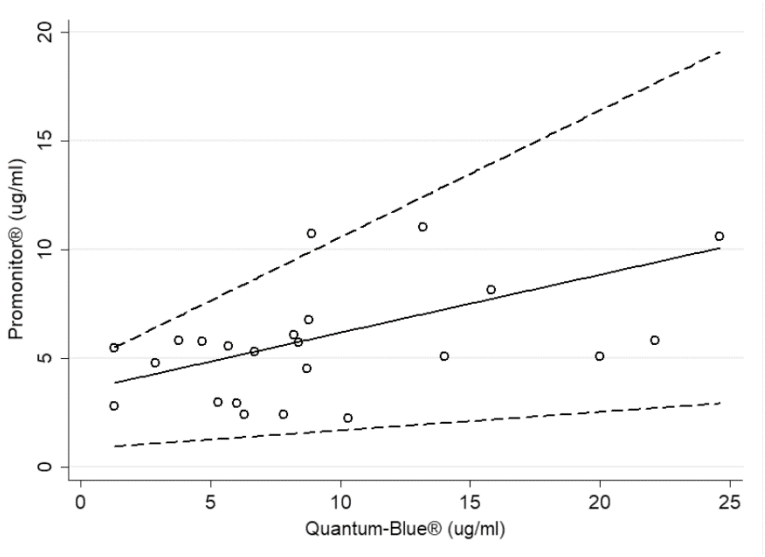

Figura 9. Regressão linear para comparação entre os ensaios Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral). *A análise de regressão linear pelo método de Passing-Bablok foi realizada para os níveis séricos de adalimumabe, revelando concordância de Lin de 0,247.*

Após, foi realizado um teste de Bland-Altman para complementar a comparação e avaliar o grau de concordância entre os dois ensaios. Essa análise evidenciou uma concordância moderada entre os dois testes (correlação de Spearman de -0,603, p=0,002) (Figura 10). Encontramos dois valores fora do intervalo de confiança, sendo ambos abaixo do valor. Há uma tendência de que o ensaio Quantum Blue demonstre maiores valores quando comparado ao ensaio Promonitor.

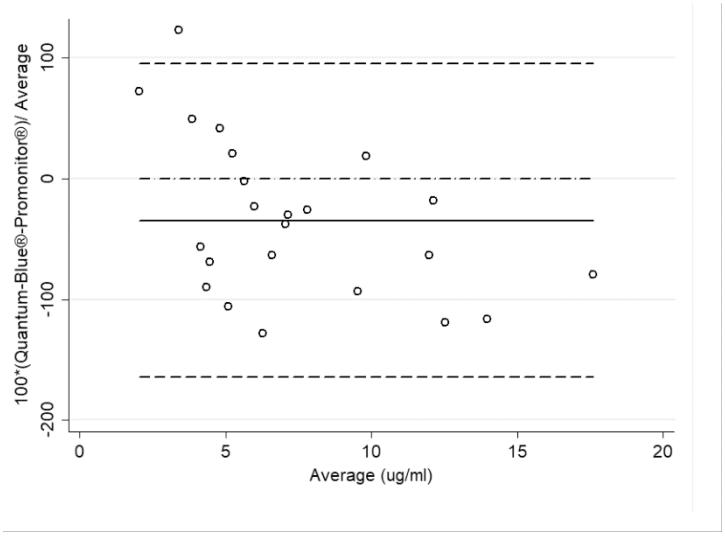

Figura 10. Comparação entre medições pelos testes Promonitor (ELISA) e Quantum-Blue (ensaio de fluxo lateral). *O gráfico Bland-Altman foi utilizado para representar a análise comparativa entre as duas medições, onde a diferença entre as concentrações medidas (em mg/L) é plotada no eixo y, enquanto a média das duas medições (também em mg/L) é representada no eixo x. O coeficiente de Spearman entre as diferenças e a média das medições corresponde a –0.603, com p=0,002.*

4.4. Detecção de anticorpos anti-adalimumabe nos pacientes com doença de Crohn

Para avaliar a ocorrência de processos imunogênicos em pacientes em tratamento com adalimumabe, inicialmente mensuramos a presença ADA em pacientes que apresentavam níveis infraterapêuticos do medicamento. Foram detectados níveis infraterapêuticos em 12 pacientes pelo ensaio Quantum-Blue e em 15 pacientes pelo ensaio Promonitor. Para a detecção de ADA, utilizamos o ensaio Promonitor conforme as especificações do fabricante, considerando como resultados positivos aqueles com valores superiores a 10 UA/ml.

Dos pacientes com níveis infraterapêuticos de adalimumabe, 3 foram identificados exclusivamente pelo teste Quantum-Blue, com um paciente apresentando ADA positivo, sendo este do grupo DCA. Seis pacientes foram identificados como infraterapêuticos exclusivamente pelo ensaio Promonitor, e nove foram estratificados como infraterapêuticos tanto pelo ensio Quantum Blue quanto pelo Promonitor. Destes, 3 pacientes apresentaram ADA positivo, sendo dois pertencentes ao grupo DCA e um ao DCR (Figura 11). Esses resultados

indicam que a presença de processos imunogênicos pode ser relevante em uma parte significativa dos pacientes com níveis infraterapêuticos de adalimumabe, sublinhando a importância do monitoramento contínuo e preciso para uma gestão terapêutica eficaz.

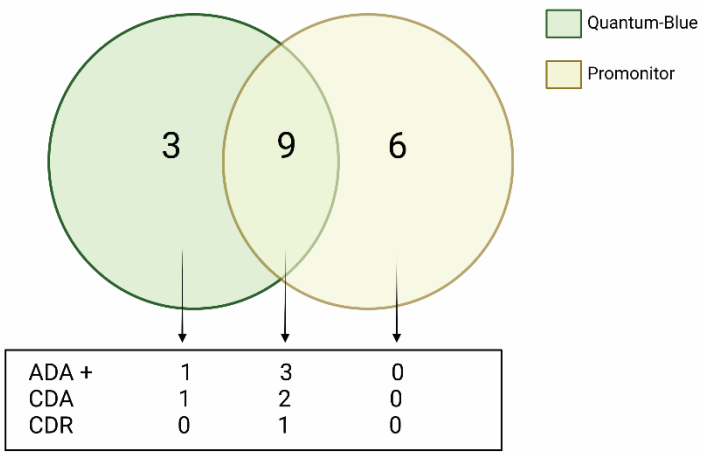

Figura 11. Detecção de ADA em pacientes com níveis infraterapêuticos de adalimumabe conforme determinação pelos ensaios Quantum-Blue e Promonitor. *O diagrama de Venn ilustra a positividade para ADA entre pacientes com níveis infraterapêuticos de adalimumabe, conforme determinado por dois ensaios diagnósticos distintos. A região verde representa os pacientes (n=3) identificados como infraterapêuticos exclusivamente pelo ensaio Quantum-Blue. A região amarela denota os pacientes (n=6) identificados como infraterapêuticos unicamente pelo ensaio Promonitor. A área de intersecção indica os pacientes (n=9) classificados como infraterapêuticos por ambos os ensaios diagnósticos. ADA: Anticorpo Anti-Droga. Figura criada com BioRender.com.*

4.5. Mensuração da formação de complexos imunes

Continuando a investigação quanto aos possiveis mecanismos de imunogenicidade que poderiam explicar a falha terapêutica ao adalimumabe, avaliou-se a formação de complexos imunes, esses formados por agrupamentos de anticorpos produzidos em resposta à medicação biológica. Encontramos diferenças significativas quando comparamos os níveis de complexos imunes entre os grupos, em que pacientes em atividade apresentaram maiores concentrações destes, quando comparados aos pacientes em remissão (Figura

12).

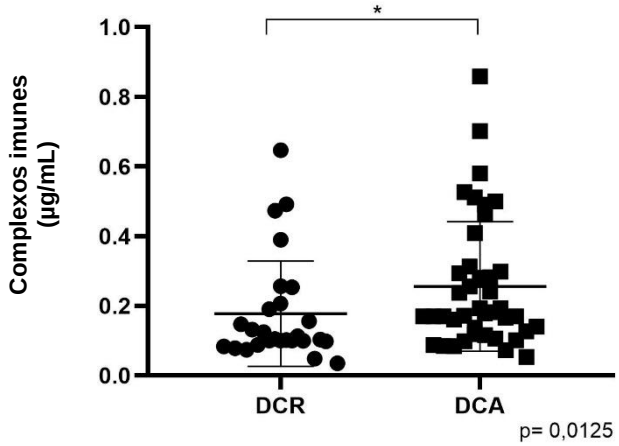

Figura 12. Avaliação da formação de complexos imunes como processo imunogênico. *As concentrações dos complexos imunes foram mensuradas por ensaio de ELISA. *p <0.05 é considerado estatisticamente significativo versus DCA. DCR: grupo de pacientes com doença de Crohn em remissão; DCA: grupo de pacientes com doença de Crohn em atividade.*

4.6. Avaliação dos genótipos de polimorfismos para *ATGL16L1*, *CD96* e *CD155*

Para a avaliação genotípica, foram escolhidos três genes de interesse, a saber, *ATG16L1*, *CD96* e *CD155*. O número de pacientes nessas análises difere do total incluído no estudo devido ao fato de perda de seguimento durante a pandemia, não sendo possível a coleta de sangue específica de alguns indivíduos para esses experimentos.

Durante os experimentos de genotipagem, não encontramos pacientes portadores do genótipo variante AA da *Single Nucleotide Variants* (SNV) do gene *CD155*, dessa forma não foi possível dar prosseguimento à avaliação de polimorfismos. Entretanto, realizamos a análise da frequência entre os homozigotos e heterozigotos selvagens (GG/GA, respectivamente) segundo variáveis categóricas, conforme explicitado na Tabela 2. Dentre as variáveis avaliadas, não encontramos nenhuma relação entre a homozigose/heterozigose deste gene e características específicas, gravidade da doença ou resposta ao adalimumabe.

***Tabela 2*. Comparação das frequências de selvagens homozigotos e heterozigotos do gene *CD155* em relação a variáveis categóricas.**

Características	**n**	***CD155***	
		GG (%)	**GA (%)**
Idade do diagnóstico (mediana)			
≤ 31	39	38 (97,4)	1 (2.6)
> 31	27	25 (92,6)	2 (7.4)
p-valor		0,56	
Tempo de evolução da doença (mediana)			
≤ 13 anos	38	35 (92,1)	3 (7.9)
> 13 anos	28	28 (100,0)	0 (0.0)
p-valor		0,25	
Grupo			
Atividade	41	38 (92,7)	3 (7.3)
Remissão	25	25 (100,0)	0 (0.0)
p-valor		0,28	
Montreal A			
1	7	7 (100,0)	0 (0.0)
2 ou 3	59	56 (94,9)	3 (5.1)
p-valor		1,00	
Montreal A			
1 ou 2	51	50 (98,0)	1 (2.0)
3	15	13 (86,7)	2 (13.3)
p-valor		0,12	
Montreal L			
1	16	16 (100,0)	0 (0.0)
2 ou 3	50	47 (94,0)	3 (6.0)
p-valor		1,00	
Montreal L			
1 ou 2	38	37 (97,4)	1 (2.6)
3	28	26 (92,9)	2 (7.1)
p-valor		0,57	

Montreal B				
1	32	30 (93,8)		2 (6.2)
2 ou 3	34	33 (97,1)		1 (2.9)
p-valor			0,60	
Montreal B				
1 ou 2	48	46 (95,8)		2 (4.2)
3	18	17 (94,4)		1 (5.6)
p-valor			1,00	
Doença perineal				
Sim	25	24 (96,0)		1 (4.0)
Não	41	39 (95,1)		2 (4.9)
p-valor			1,00	
CDAI*				
Remissão ou leve	47	45 (95,7)		2 (4.3)
Moderada ou severa	18	17 (94,4)		1 (5.6)
p-valor			1,00	
Cirurgia prévia				
Sim	41	39 (95,1)		2 (4.9)
Não	25	24 (96,0)		1 (4.0)
p-valor			1,00	
Manifestações extra-intestinais				
Sim	36	35 (97,2)		1 (2.8)
Não	30	28 (93,3)		2 (6.7)
p-valor			0,58	
Reações adversas ao adalimumabe				
Sim	7	6 (85,7)		1 (14.3)
Não	59	57 (96,6)		2 (3.4)
p-valor			0,29	
Nível terapêutico (Quantum Blue)				
Infra	30	28 (93,3)		2 (6.7)
Ideal ou Supra	36	35 (97,2)		1 (2.8)
p-valor			0,58	

Nível terapêutico (Promonitor)				
Infra	45	42 (93,3)		3 (6.7)
Ideal ou Supra	21	21 (100,0)		0 (0.0)
p-valor			0,54	
Complexo Imune				
Positivo	53	50 (94,3)		3 (5.7)
Negativo	13	13 (100,0)		0 (0.0)
p-valor			1,00	
Plaquetas* (mediana)				
$\leq 282,5/mm^3$	32	31 (96,9)		1 (3.1)
$> 282,5/mm^3$	33	31 (93,9)		2 (6.1)
p-valor			1,00	

CDAI: índice de atividade da doença de Crohn. N=66 (pacientes que foram incluídos na genotipagem). * Um paciente não apresentava CDAI e níveis de plaquetas no prontuário. p≤0,05 é considerado significativo.

De modo a analisar as variáveis categóricas reais para os genes em que encontramos variações de SNV, as separamos pelos genes de interesse, sendo o *ATG16L1* representado na Tabela 3 e o *CD96* na Tabela 4. Para o *ATG16L1* encontramos uma diferença significativa quanto aos valores de plaquetas, sendo menores nos portadores do genótipo variante (TT). Em relação ao *CD96*, observamos que a frequência do genótipo CC foi maior nos pacientes com DC colônica do que naqueles com os genótipos CT ou TT (88,0% versus 12,0%, p= 0,05). Além disso, encontramos uma associação significativa entre os níveis infraterapêuticos, mensurados pelo teste Promonitor, e a presença do genótipo *CD96* de tipo selvagem. Três dos quatro pacientes positivos para ADA apresentavam o genótipo selvagem *CD96*.

Tabela 3. Comparação das frequências dos polimorfismos do gene *ATG16L1* em relação a variáveis categóricas.

Características	n	*ATG16L1*			
		CC (%)	CT+TT (%)	CC+CT (%)	TT (%)
Idade no diagnóstico (mediana)					
≤ 31	39	9 (23,1)	30 (76,9)	33 (84,6)	6 (15.4)
> 31	27	7 (25,9)	20 (74,1)	18 (66,7)	9 (33.3)
p-valor		0,78		0,13	
Tempo de evolução da doença (mediana)					
≤ 13 anos	38	9 (23,7)	29 (76,3)	31 (81,6)	7 (18.4)
> 13 anos	28	7 (25,0)	21 (75,0)	20 (71,4)	8 (28.6)
p-valor		1,00		0,38	
Grupo					
Atividade	41	13 (31,7)	28 (68,3)	34 (82,9)	7 (17.1)
Remissão	25	3 (12,0)	22 (88,0)	17 (68,0)	8 (32.0)
p-valor		0,08		0,22	
Montreal A					
1	7	2 (28,6)	5 (71,4)	7 (100,0)	0 (0.0)
2 ou 3	59	14 (23,7)	45 (76,3)	44 (74,6)	15 (25.4)
p-valor		1,00		0,33	
Montreal A					
1 ou 2	51	12 (23,5)	39 (76,5)	41 (80,4)	10 (19.6)
3	15	4 (26,7)	11 (73,3)	10 (66,7)	5 (33.3)
p-valor		1,00		0,30	
Montreal L					
1	16	3 (18,8)	13 (81,2)	12 (75,0)	4 (25.0)
2 ou 3	50	13 (26,0)	37 (74,0)	39 (78,0)	11 (22.0)
p-valor		0,74		1,00	
Montreal L					
1 ou 2	38	8 (21,1)	30 (78,9)	28 (73,7)	10 (26.3)
3	28	8 (28,6)	20 (71,4)	23 (82,1)	5 (17.9)
p-valor		0,56		0,55	

Montreal B						
1	32	8 (25,0)	24 (75,0)	23 (71,9)	9 (28.1)	
2 ou 3	34	8 (23,5)	26 (76,5)	28 (82,4)	6 (17.6)	
p-valor		1,00		0,38		
Montreal B						
1 ou 2	48	13 (27,1)	35 (72,9)	36 (75,0)	12 (25.0)	
3	18	3 (16,7)	15 (83,3)	15 (83,3)	3 (16.7)	
p-valor		0,52		0,74		
Doença perineal						
Sim	25	6 (24,0)	19 (76,0)	20 (80,0)	5 (20.0)	
Não	41	10 (24,4)	31 (75,6)	31 (75,6)	10 (24.4)	
p-valor		1,00		0,76		
CDAI*						
Remissão ou leve	47	10 (21,3)	37 (78,7)	36 (76,6)	11 (23.4)	
Moderada ou severa	18	6 (33,3)	12 (66,7)	14 (77,8)	4 (22.2)	
p-valor		0,34		1,00		
Cirurgia Prévia						
Sim	41	13 (31,7)	28 (68,3)	35 (85,4)	6 (14.6)	
Não	25	3 (12,0)	22 (88,0)	16 (64,0)	9 (36.0)	
p-valor		0,08		0,06		
Manifestações extraintestinais						
Sim	36	9 (25,0)	27 (75,0)	27 (75,0)	9 (25.0)	
Não	30	7 (23,3)	23 (76,7)	24 (80,0)	6 (20.0)	
p-valor		1,00		0,77		
Reações adversas ao adalimumabe						
Sim	7	3 (42,9)	4 (57,1)	6 (85,7)	1 (14.3)	
Não	59	13 (22,0)	46 (78,0)	45 (76,3)	14 (23.7)	
p-valor		0,40		1,00		
Níveis terapêuticos (Quantum Blue)						
Infra	30	6 (20,0)	24 (80,0)	23 (76,7)	7 (23.3)	
Ideal ou Supra	36	10 (27,8)	26 (72,2)	28 (77,8)	8 (22.2)	
p-valor		0,56		1,00		
Níveis terapêuticos						

(Promonitor)						
Infra	45	9 (20,0)		36 (80,0)	34 (75,6)	11 (24.4)
Ideal ou Supra	21	7 (33,3)		14 (66,7)	17 (81,0)	4 (19.0)
p-valor			0,35			0,75
Complexos imunes						
Positivos	53	13 (24,5)		40 (75,5)	41 (77,4)	12 (22.6)
Negativos	13	3 (23,1)		10 (76,9)	10 (76,9)	3 (23.1)
p-valor			1,00			1,00
Hematócrito*						
(mediana)						
≤ 40.9%	34	7 (20,6)		27 (79,4)	23 (67,6)	11 (32.4)
> 40.9%	31	9 (29,0)		22 (71,0)	27 (87,1)	4 (12.9)
p-valor			0,56			0,08
Plaquetas*						
(mediana)						
≤ 282.5/mm^3	32	6 (18,8)		26 (81,2)	21 (65,6)	11 (34.4)
> 282.5/mm^3	33	10 (30,3)		23 (69,7)	29 (87,9)	4 (12.1)
p-value			0,38			**0,04**

CDAI: índice de atividade da doença de Crohn. n=66 (pacientes que foram incluídos na genotipagem). *Um paciente não apresentava CDAI, hematócrito e níveis de plaquetas no prontuário. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 4. Comparação das frequências dos polimorfismos do gene *CD96* em relação a variáveis categóricas.

Características	n	*CD96*			
		CC (%)	CT+TT (%)	CC+CT (%)	TT (%)
Idade no diagnóstico (mediana)					
≤ 31	39	32 (82.1)	7 (17.9)	39 (100.0)	0 (0.0)
> 31	27	22 (81.5)	5 (18.5)	26 (96.3)	1 (3.7)
p-valor		1.00		0.40	
Tempo de evolução da doença (mediana)					
≤ 13 anos	38	32 (84.2)	6 (15.8)	38 (100.0)	0 (0.0)
> 13 anos	28	22 (78.6)	6 (21.4)	27 (96.4)	1 (3.6)
p-valor		0.74		0.42	
Grupo					
Atividade	41	32 (78.0)	9 (22.0)	40 (97.6)	1 (2.4)
Remissão	25	22 (88.0)	3 (12.0)	25 (100.0)	0 (0.0)
p-valor		0.51		1.00	
Montreal A					
1	7	7 (100.0)	0 (0.0)	7 (100.0)	0 (0.0)
2 ou 3	59	47 (79.7)	12 (20.3)	58 (98.3)	1 (1.7)
p-valor		0.33		1.00	
Montreal A					
1 ou 2	51	42 (82.4)	9 (17.6)	50 (98.0)	1 (2.0)
3	15	12 (80.0)	3 (20.0)	15 (100.0)	0 (0.0)
p-valor		1.00		1.00	
Montreal L					
1	16	10 (62.5)	6 (37.5)	15 (93.8)	1 (6.2)
2 ou 3	50	44 (88.0)	6 (12.0)	50 (100.0)	0 (0.0)
p-valor		0.05		0.24	
Montreal L					
1 ou 2	38	30 (78.9)	8 (21.1)	37 (97.4)	1 (2.6)
3	28	24 (85.7)	4 (14.3)	28 (100.0)	0 (0.0)
p-valor		0.53		1.00	

Montreal B						
1	32	27 (84.4)		5 (15.6)	31 (96.9)	1 (3.1)
2 ou 3	34	27 (79.4)		7 (20.6)	34 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.75		0.48	
Montreal B						
1 ou 2	48	41 (85.4)		7 (14.6)	47 (97.9)	1 (2.1)
3	18	13 (72.2)		5 (27.8)	18 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.28		1.00	
Doença perineal						
Sim	25	19 (76.0)		6 (24.0)	24 (96.0)	1 (4.0)
Não	41	35 (85.4)		6 (14.6)	41 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.34		0.37	
CDAI*						
Remissão ou leve	47	39 (83.0)		8 (17.0)	46 (97.9)	1 (2.1)
Moderada ou severa	18	14 (77.8)		4 (22.2)	18 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.72		1.00	
Cirurgia prévia						
Sim	41	34 (82.9)		7 (17.1)	40 (97.6)	1 (2.4)
Não	25	20 (80.0)		5 (20.0)	25 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.75		1.00	
Manifestação Extraintestinal						
Sim	36	29 (80.6)		7 (19.4)	35 (97.2)	1 (2.8)
Não	30	25 (83.3)		5 (16.7)	30 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			1.00		1.00	
Efeitos adversos ao adalimumabe						
Sim	7	4 (57.1)		3 (42.9)	7 (100.0)	0 (0.0)
Não	59	50 (84.7)		9 (15.3)	58 (98.3)	1 (1.7)
p-valor			0.15		1.00	
Nível terapêutico (Quantum Blue)						
Infra	30	26 (86.7)		4 (13.3)	29 (96.7)	1 (3.3)
Ideal ou Supra	36	28 (77.8)		8 (22.2)	36 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.52		0.45	
Nível terapêutico						

(Promonitor)						
Infra	45	40 (88.9)		5 (11.1)	44 (97.8)	1 (2.2)
Ideal ou Supra	21	14 (66.7)		7 (33.3)	21 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			**0.04**		1.00	
Complexo imunes						
Positivo	53	41 (77.4)		12 (22.6)	52 (98.1)	1 (1.9)
Negativo	13	13 (100.0)		0 (0.0)	13 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.10		1.00	
Hematócrito*						
(mediana)						
≤ 40,9%	34	26 (76.5)		8 (23.5)	33 (97.1)	1 (2.9)
> 40,9%	31	27 (87.1)		4 (12.9)	31 (100.0)	0 (0.0)
p-valor			0.34		1.00	
Plaquetas* (mediana)						
≤ 282,5/mm^3	32	25 (78.1)		7 (21.9)	32 (100.0)	0 (0.0)
> 282,5/mm^3	33	28 (84.8)		5 (15.2)	32 (97.0)	1 (3.0)
p-valor			0.53		1.00	

CDAI: Crohn's Disease Activity Index. n=66 (pacientes que foram incluídos na genotipagem). *Um paciente não apresentava CDAI, hematócrito e níveis de plaquetas no prontuário. p ≤0,05 é considerado significativo.

Para a análise das variáveis contínuas, procedemos à comparação entre os genótipos selvagem e variante em relação a cada variável, de maneira individual para *ATG16L1*, *CD96* e *CD155*, sendo hematócrito (Tabela 5), PCR (Tabela 6), Albumina (Tabela 7), CDEIS (Tabela 8), VHS (Tabela 9), e Calprotectina fecal (Tabela 10).

Nossos achados demonstraram que os pacientes com genótipo selvagem CC para o gene CD96 apresentaram maiores valores de PCR (Tabela 7) em comparação ao grupo dos pacientes portadores dos genótipos variantes sozinho (TT), ou na forma heterozigótica (CT).

Os pacientes com o genótipo CC para *ATG16L1* apresentaram maiores valores de CDEIS quando comparado ao genótipo variante tanto sozinho, quanto como

apresentado em forma de heterozigoto (Tabela 8).

Similarmente, em relação à calprotectina fecal, os pacientes com genótipo CC para *ATG16L1* apresentam aumento nos valores deste parâmetro quando comparados àqueles portadores dos demais genótipos. Assim, esses pacientes apresentam duas vezes mais níveis de calprotectina fecal (Tabela 10).

Tabela 5. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1*, *CD96* e *CD155* em relação aos níveis de hematócrito.

Genótipos	n	Hematócrito (%) (média)*	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	16	40,5	7,7	Referência
CT	34	41,8	5,1	0,95
TT	15	40,0	3,7	0,33
CC	16	40,5	7,7	Referência
CT ou TT	49	41,3	4,7	0,67
CC ou CT	50	41,4	6,0	Referência
TT	15	40,0	3,7	0,17
CD96				
CC	53	41,1	5,7	Referência
CT	11	41,2	4,8	0,41
TT	1	35,9	NA	NA
CC	53	41,1	5,7	Referência
CT ou TT	12	40,8	4,8	0,50
CC ou CT	64	41,2	5,6	Referência
TT	1	35,9	NA	NA
CD155				
GG	62	40,9	5,6	Referência
GA	3	43,7	3,1	0,31

Para distribuição dos genótipos *ATG16L1, CD96, CD155* em relação aos níveis de hematócrito, n = 65. * Os valores de hematócritos foram obtidos de 65 pacientes que foram genotipados. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 6. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1*, *CD96* e *CD155* em relação aos níveis de Proteína C Reativa (PCR).

Genótipos	n	PCR (mg/L) (média)*	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	16	14,0	20,6	Referência
CT	30	8,4	12,0	0,23
TT	15	8,4	15,0	0,17
CC	16	14,0	20,6	Referência
CT ou TT	45	8,4	12,9	0,15
CC ou CT	46	10,3	15,4	Referência
TT	15	8,4	15,0	0,33
CD96				
CC	49	11,6	16,5	Referência
CT	11	2,6	3,4	0,06
TT	1	5,7	NA	NA
CC	49	11,6	16,5	Referência
CT ou TT	12	2,9	3,4	**0,03**
CC ou CT	60	9,9	15,3	Referência
TT	1	5,7	NA	NA
CD155				
GG	58	9,3	15,0	Referência
GA	3	15,6	19,4	0,34

Para distribuição dos genótipos *ATG16L1, CD96, CD155* em relação aos níveis de PCR, n = 61. *O nível de PCR foi obtido de 61 pacientes que foram genotipados. PCR: Proteína C-reativa. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 7. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1, CD96 e CD155* em relação aos níveis de albumina.

Genótipos	n	Albumina (g/dL) (média)*	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	14	4,0	0,5	Referência
CT	21	4,1	0,5	0,63
TT	11	3,9	0,5	0,60
CC	14	4,0	0,5	Referência
CT ou TT	32	4,0	0,5	0,89
CC ou CT	35	4,0	0,5	Referência
TT	11	3,9	0,5	0,40
CD96				
CC	35	3,9	0,5	Referência
CT	11	4,1	0,5	0,37
TT	0	NA	NA	NA
CC	35	3,9	0,5	Referência
CT ou TT	11	NA	NA	0,38
CC ou CT	46	4,0	0,5	Referência
TT	0	NA	NA	NA
CD155				
GG	43	4,0	0,5	Referência
GA	3	4,0	0,2	0,90

Para distribuição dos genótipos *ATG16L1, CD96, CD155* em relação aos níveis de hematócrito, n = 46. * Os valores de albumina foram obtidos de 46 pacientes que foram genotipados. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 8. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1, CD96 e CD155* em relação aos Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS).

Genótipos	n	CDEIS (média)*	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	10	9,1	9,4	Referência
CT	17	4,9	6,6	0,28
TT	10	1,6	2,5	**0,02**
CC	10	9,1	9,4	Referência
CT ou TT	27	3,7	5,6	0,08
CC ou CT	27	6,5	7,8	Referência
TT	10	1,6	2,5	**0,03**
CD96				
CC	34	5,3	6,5	Referência
CT	3	3,4	2,9	0,89
TT	0	NA	NA	NA
CC	34	5,3	6,5	Referência
CT ou TT	3	3,4	2,9	NA
CC ou CT	37	5,2	6,3	Referência
TT	0	NA	NA	NA
CD155				
GG	34	4,5	5,5	Referência
GA	3	12,3	10,7	0,11

Para distribuição dos genótipos *ATG16L1, CD96, CD155* em relação ao CDEIS, n = 37. * O CDEIS foi calculado em 37 pacientes que foram genotipados. CDEIS: *Crohn's Disease Index of Severity*. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 9. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1, CD96 e CD155* em relação aos níveis de Velocidade de Hemossedimentação (VHS).

Genótipos	n*	VHS (mm/h) (média)	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	5	45,2	46,2	Referência
CT	9	31,7	21,1	0,89
TT	10	39,9	28,3	0,85
CC	5	45,2	46,2	Referência
CT ou TT	19	36,0	24,8	1,00
CC ou CT	14	36,5	31,2	Referência
TT	10	39,9	28,3	0,62
CD96				
CC	19	41,6	31,0	Referência
CT	5	23,8	19,1	0,18
TT	0	NA	NA	NA
CC	19	41,6	31,0	Referência
CT ou TT	5	23,8	19,1	NA
CC ou CT	24	37,9	29,5	Referência
TT	0	NA	NA	NA
CD155				
GG	22	39,2	30,0	Referência
GA	3	24,0	26,9	0,52

*O número de pacientes difere do total citado no estudo (n= 66), pois não foi possível obter informações de VHS em alguns casos. VHS: Velocidade de Hemossedimentação. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

Tabela 10. Comparação entre os genótipos selvagens, variante e heterozigotos para os genes *ATG16L1, CD96 e CD155* em relação aos níveis de calprotectina fecal.

Genótipos	n	Calprotectina fecal (µg/g) (média)*	Desvio padrão	Valor de *p*
ATG16L1				
CC	7	1149,1	834,3	Referência
CT	7	499,0	416,3	0,07
TT	9	506,7	484,3	0,09
CC	7	1149,1	834,3	Referência
CT ou TT	16	503,3	441,0	**0,03**
CC ou CT	14	824,1	717,6	Referência
TT	9	506,7	484,3	0,36
CD96				
CC	17	605,2	684,2	Referência
CT	5	961,6	512,2	0,12
TT	1	1000,0	NA	NA
CC	17	605,2	684,2	Referência
CT ou TT	6	968,0	458,4	0,08
CC ou CT	22	686,2	655,7	Referência
TT	1	1000,0	NA	NA
CD155				
GG	22	701,0	659,1	Referência
GA	1	676,0	NA	NA

Para distribuição dos genótipos *ATG16L1*, *CD96*, *CD155* em relação aos níveis de calprotectina fecal, n = 23. * A calprotectina fecal foi medida em 23 pacientes que foram genotipados. NA: não aplicável. p ≤0,05 é considerado significativo.

5. DISCUSSÃO

O uso de anticorpos monoclonais anti-TNF-α como estratégia medicamentosa para a DC tem sido amplamente difundido, consolidando-se como uma das modalidades terapêuticas mais predominantes. Essa abordagem teve início na década de 90, visando estender a fase de remissão da doença, prevenir complicações e aprimorar a qualidade de vida dos pacientes (97-99). Embora tenha representado uma significativa revolução no manejo das DIIs, a persistência da perda de resposta continua a ser um desafio considerável a ser enfrentado, que prejudica a permanência do paciente no estado de remissão (73).

Essa perda, que pode manifestar-se como primária ou secundária, tem sido objeto de diversos estudos que visam esclarecer os mecanismos a ela associados, com o propósito de compreendê-la mais profundamente e preveni-la. Em um estudo conduzido por Ben-Horin et al., fatores clínicos como tabagismo, duração da doença superior a dois anos, comprometimento ileal, fenótipos complicados e falha prévia a outro tratamento com anti-TNF-α foram identificados como correlacionados a um aumento no risco de falha primária de resposta em pacientes com DC (100). Além disso, fatores como níveis séricos de anti-TNF-α, níveis de proteína C-reativa, e produção de anticorpos contra o medicamento podem explicar a variabilidade clínica encontrada nos pacientes (101, 102).

A quantificação dos níveis séricos configura-se como uma estratégia que viabiliza um controle mais efetivo da terapia, revelando-se de extrema utilidade para o manejo clínico. Diversas pesquisas têm se dedicado a compreender a correlação entre os níveis de adalimumabe e suas implicações

clínicas/endoscópicas, explorando a possibilidade de utilização desses dados para prevenir a progressão desfavorável da doença (103). Fernandes et al. demonstraram a importância do monitoramento sérico e sua relação com o aumento da cicatrização de mucosa e menor ocorrência de eventos desfavoráveis nos pacientes em que é empregado o procedimento (104).

Dessa maneira, buscamos avaliar a possível relação entre os níveis séricos de adalimumabe e a atividade/remissão da DC. Em nossa coorte, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis séricos e a atividade da doença, independentemente do teste utilizado para a mensuração. Nossos achados concordam aos de Ward et al., que também não encontraram relação entre os níveis de adalimumabe e índices de atividade da doença (105).

O uso de imunomoduladores de forma combinada aos anti-TNF-α tem sido descrito pela literatura como uma forma de se evitar a ocorrência de processos imunogênicos, sendo mais efetivos do que o uso isolado da terapia biológica, principalmente durante o uso de infliximabe (106). Em nossa coorte, ao analisarmos o uso do imunomodulador concomitante ao adalimumabe, não identificamos diferenças nos níveis séricos, apesar de termos encontrado uma tendência quando mensurados pelo ensaio Quantum-Blue. Nossos achados novamente corroboram aos de Ward et al., nos quais o uso do adalimumabe seja em monoterapia ou em associação com um imunomodulador, não demonstrou impactar diretamente nos níveis séricos do fármaco; e aos de Arieira et al., que não encontraram uma correlação entre o uso da azatioprina e a farmacocinética do adalimumabe (105, 107). Chanchlani et al. encontraram benefício no uso de imunomoduladores quando esses eram utilizados antes do início do adalimumabe, ou dados simultaneamente. Ao serem utilizados dessa forma,

houve diferença significativa quanto à produção de ADA. Entretanto, a introdução do imunomodulador após o início do anti-TNF-α não trouxe vantagem neste quesito (108). Em nossa coorte, a maioria dos pacientes inicialmente utilizou o adalimumabe em monoterapia, sendo adicionado o imunomodulador apenas quando houvesse indícios de recorrência da atividade da doença (clínica e/ou endoscópica), podendo ser um dos fatores que contribuíram para a não eficácia da comboterapia.

Colombel et al. analisaram seis estudos que visaram compreender a eficácia do uso de imunomoduladores associados ao adalimumabe, através de análise *post hoc* em pacientes com DC e RCU. Como resultado, foi demonstrado que o alcance da remissão foi similar tanto nos pacientes em monoterapia quanto em combinação, dessa forma não houve eficácia comprovada do benefício do imunomodulador para os pacientes em uso de adalimumabe, algo também visto em nossa coorte de pacientes (109).

A importância do monitoramento sérico nas DII está bem documentada na literatura, evidenciando a eficácia dessa estratégia no manejo terapêutico, ajustando-se às particularidades de cada paciente. Ademais, essa prática resulta em economia para o sistema de saúde, considerando o alto custo das medicações envolvidas. Portanto, é crucial que os ensaios comerciais disponíveis para a mensuração dos níveis séricos sejam eficazes, seguros e confiáveis em suas detecções.

Diversos testes estão disponíveis para essa mensuração, sendo o ELISA e o ensaio de fluxo lateral os mais comumente utilizados. Ambos os métodos mostraram-se eficazes e confiáveis, conforme demonstrado por diversos estudos (110, 111). No entanto, as vantagens dos ensaios de fluxo lateral em

relação ao ELISA, como a possibilidade de serem realizados em clínicas e até mesmo à beira do leito, sem a necessidade de instalações laboratoriais específicas, e a realização de forma unitária, sem a necessidade de esperar por um determinado número de amostras, destacam a necessidade de estudos que avaliem a intercambialidade entre esses métodos.

Dessa forma, buscamos avaliar se as metodologias apresentavam comportamentos similares e se poderiam ser comparadas quanto à eficiência. Nossas análises de intercambialidade entre os ensaios Quantum Blue e Promonitor demonstraram que há uma diferença significativa entre os testes. No entanto, foi observada uma correlação moderada entre eles. Esses achados são similares aos de Gomes et al., que também identificaram uma diferença significativa e uma correlação moderada nos mesmos ensaios, embora avaliando os níveis séricos de infliximabe (71).

Nossos resultados demonstraram que, quando mensurados pelo ensaio Quantum Blue, os níveis séricos foram mais altos em comparação com aqueles avaliados pelo ensaio Promonitor. Este achado corrobora os resultados observados por Cherry et al., em que os valores dos níveis de adalimumabe mensurados por testes rápidos foram mais elevados em comparação aos obtidos por ensaios de ELISA (112). Nossos achados demonstram que ambos os testes são eficazes; contudo, não é aconselhável alternar entre os ensaios durante o curso do tratamento. Recomenda-se a utilização do mesmo teste ao longo de todo tratamento para evitar possíveis alterações inadequadas nos resultados, e consequentemente na terapêutica.

Estima-se que o custo para tratar as DII exceda 7 bilhões de dólares nos Estados Unidos e 5 bilhões de euros na Europa. Com o advento dos anticorpos

monoclonais para o tratamento, esses valores tornam-se ainda maiores, ultrapassando os custos associados a DII, como hospitalizações e cirurgias (113-115). Segundo van der Valk et al., o custo dos medicamentos biológicos utilizados por pacientes com DC nos Estados Unidos corresponde a aproximadamente 30% do gasto total com saúde, enquanto o custo de um paciente internado corresponde a aproximadamente 23% do total (116).

Considerando os elevados custos com a saúde pública gerados pelo tratamento das DII, o monitoramento terapêutico surge como uma ferramenta relevante não somente para a otimização do tratamento, mas também para a redução dos custos associados. Em uma revisão sistemática conduzida por Yao et al., foi demonstrado que o monitoramento dos anticorpos monoclonais anti-TNF-α se apresenta como uma abordagem mais custo-efetiva e econômica em comparação com mudanças empíricas no tratamento (117). Portanto, a realização do monitoramento terapêutico apresenta benefícios significativos não apenas para a personalização da terapia de acordo com as necessidades específicas do paciente, mas também para a economia da saúde pública.

Apesar de variados trabalhos procurarem investigar a relação entre níveis séricos mensurados e a atividade da doença, ainda não há um consenso sobre esse aspecto. Estudos como o Ward et al. citado anteriormente, e o de Yarur et al., no qual os autores encontraram níveis baixos de adalimumabe em pacientes que apresentavam inflamação endoscópica, demonstram essa dualidade (105, 118). Diversos fatores podem impactar nos níveis séricos, incluindo variáveis individuais como índice de massa corporal, sexo, gravidade da doença (119). Como apontado por Hinojosa et al., os níveis costumam ser mensurados quando um platô foi alcançado, o que pode levar meses devidos essas variáveis

individuais (119). A biodisponibilidade do adalimumabe é mais instável quando comparada ao infliximabe devido a sua via administração subcutânea, fazendo com que a variação inter-ciclo dos níveis séricos possa ser grande, sendo esta também relacionada à variáveis individuais dos pacientes (105).

Uma das vantagens biológicas do adalimumabe perante o infliximabe, é o seu portencial imunogênico reduzido, e dessa forma esperava-se uma diminuição na perda de resposta com o seu uso. Isso se daria pela sua composição totalmente humana (52), diferente do infliximabe que apresenta porção murina (25%). Entretanto, ao comparar-se os anticorpos monoclonais quiméricos (como o infliximabe) com os humanizados (adalimumabe e certolizumabe), as taxas de respostas não são muito diferentes entre eles (100). Assim, buscamos investigar em nossa coorte a produção de ADA em resposta ao adalimumabe, e se haveria alguma relação entre a sua produção e o nível sérico dos pacientes.

Entre nossos pacientes que apresentaram níveis infraterapêuticos de adalimumabe, 33,3% e 20% testaram positivo para ADA, quando mensurados pelo Qauntum-Blue e Promonitor, respectivamente. Nossas porcentagens foram um pouco maiores do que as descobertas de West et al., que relataram ADA positivo em 17% de sua coorte.(120). Similarmente, Sun et al. encontraram uma porcentagem de 18,7% de seus pacientes com positivade para ADA (121), um dado próximo ao encontrado por nós.

A literatura já demonstrou que após a obtenção da indução da remissão nos pacientes com DII há um risco da ocorrência de perda de resposta posterior estimada em 13% a 21% por ano de tratamento (73, 122-124). Neste contexto, Schultheiss et al. buscaram avaliar a incidência de perda de resposta em

pacientes com DC e RCU que estavam sendo tratados com anti-TNF-α. Seus resultados demonstraram que após o primeiro ano, a incidência da perda foi três vezes maior, e que dentre os pacientes que responderam de forma positiva após dois anos de tratamento, o risco de perda de resposta foi menor (125). Em nossa coorte, encontramos resultado similar, no qual os pacientes que encontravam-se em atividade apresentavam um menor tempo de uso de adalimumabe, quando comparados ao pacientes em remissão (p=0,0390). Com isso podemos inferir que os pacientes que apresentam benefício tolerado a longo prazo ao adalimumabe explicitam uma eficácia mais favorável ao seu uso.

Quando há a presença de ADA circulante, esses ao se ligarem ao medicamento, podem levar à formação de complexos imunes. Sendo de fácil depuração, estes afetam a farmacocinética do anticorpo monoclonal e, consequentemente, auxiliam na perda de resposta (126-128). Além disso, os complexos imunes podem se depositar na vasculatura, podendo ativar vias de complemento e/ou coagulação/fibrinolíticas, que resultam em uma resposta pró-inflamatória sistêmica e levar a condições potencialmente patológicas (129, 130). Dessa maneira, a detecção destes demonstra ser importante e válida. Estudos avaliaram o favorecimento da formação de complexos imunes induzidos por ADA, formados a partir do uso de infliximabe. A sua formação foi associada a eventos adversos a curto prazo, logo após a infusão, como dores de cabeça, nausea, febre e dispneia (131-134). Em nossos pacientes, encontramos uma diferença significativa na presença de complexos imunes entre aqueles com doença ativa e aqueles em remissão, sugerindo uma relação com a atividade da doença provavelmente causada pela presença de ADA e sua consequente falha terapêutica. Até o momento, nosso trabalho foi o único a avaliar a formação dos

complexos imunes associados ao uso do adalimumabe na DC.

Devido à morfologia dos complexos imunes, composta por agregados de ADA-medicamento, a detecção de ADA pode apresentar dificuldades quando mensuradas através de ensaios imunológicos. Dessa forma, acredita-se haver uma subidentificação de casos positivos para a formação de ADA, visto que muitas vezes os antígenos presentes nos kits de detecção não conseguem ligar-se ao ADA e consequentemente mensurá-lo. Isso pode ser inferido não somente pela morfologia dos complexos imunes, mas também por sua rápida depuração, essa facilmente identificada pelo sistema retículo-endotelial devido ao seu tamanho e peso (72, 82).

O nosso estudo enfatiza a necessidade de pesquisas futuras para avaliar a composição dos anticorpos que formam os complexos imunes. A presença de complexos imunes em pacientes com DC também fornece evidências adicionais que corroboram a potencial etiologia autoimune da doença. Esses achados são consistentes com os resultados de Silva et al., que identificaram uma regulação significativa de vias associadas à funcionalidade das células B (135). A literatura sobre doenças autoimunes documenta amplamente os complexos imunes. Especificamente, complexos imunes circulantes foram observados em pacientes com hepatite crônica ativa autoimune associada à síndrome de Sjögren e doença renal (136). Achados semelhantes foram relatados em pacientes com síndrome de Sjögren, onde Yamane et al. identificaram uma correlação entre complexos imunes na saliva dos pacientes (137).

Além dos mecanismos clássicos associados à falha terapêutica, como a formação de ADA e de complexos imunes, estudos evidenciaram a influência da variabilidade genética na eficácia das respostas aos anticorpos monoclonais.

Dessa forma, Steenholdt et al. avaliaram a influência do polimorfismo genético para *TNFRSF1B* e *TNFRSF6*, estes genes que codificam receptores de TNF-α, na resposta ao infliximabe. Seus resultados indicaram que pacientes portadores do alelo de menor frequência para *TNFRSF1B* apresentaram maior propensão à perda de resposta à terapia, enquanto aqueles com os alelos de menor frequência para *TNFRSF6* demonstraram maior suscetibilidade a reações durante a infusão (138).

Visto a contribuição genética não só para a etiologia da DC, mas também sua capacidade de influenciar na resposta terapêutica, buscamos avaliar o papel de genes descritos previamente na literatura como atuantes na resposta ao adalimumabe, e seu possível papel em nossos pacientes.

Primeiramente avaliamos os polimorfismos genéticos para os genes *ATG16L1* (rs10210302) e *CD96* (rs9828223). Os pacientes de nossa coorte que eram portadores dos genótipos selvagens (CC) para *ATG16L1* apresentavam maiores valores de CDEIS e calprotectina fecal, inferindo que o genótipo variante está associado à remissão. Esses achados corroboram aos vistos por Nuij et al., no qual em sua coorte, os pacientes que apresentavam genótipo variantes respondiam de forma melhor ao adalimumabe (94). Além disso, os autores não encontraram associação entre resposta ao fármaco e ocorrência de efeitos colaterais com os polimorfismos, algo também não visto em nossos pacientes. Nossos resultados também corroboram aos encontrados por Koder et al., cujos pacientes com genótipo CC para o *ATG16L1* apresentavam uma perda de resposta a longo prazo, enquanto os pacientes com genótipo variantes demonstravam uma melhor resposta ao adalimumabe, sendo este um gene importante para a predição de resposta ao medicamento. Tal qual em nossos

pacientes, a presença de ao menos um alelo variante já bastava para uma melhor resposta (139). O mesmo foi visto por Barber et al., cujos dados demonstraram que a presença de um alelo T, em homozigose ou heterozigose, levava o paciente a responder de forma melhor ao adalimumabe (140).

Quando avaliamos o papel do *CD96*, encontramos que os pacientes portadores do genótipo selvagem apresentaram uma tendência quanto ao acometimento colônico, sendo este mais grave, quando comparados ao portadores do genótipo variante. Esse genótipo selvagem também foi associado a maiores valores de PCR, e consequentemente à atividade da doença, demonstrando que o genótipo variante atua como protetor. Nossos pacientes que apresentavam o genótipo selvagem também apresentavam niveis séricos de adalimumabe (mensurados pelo teste Promonitor) infraterapêuticos.

Dentre os quatro pacientes que testaram positivo para ADA, três tinham o genótipo *CD96* selvagem, sendo dois do grupo CDA, o que pode estar associado a níveis séricos insuficientes, presença de imunogenicidade e doença mais grave. Estes dados acabam em desacordo com os vistos por Aterido et al., que identificaram uma associação entre a produção de ADA e a presença do alelo variante para *CD96* (93). Além da diferença ambiental, que exerce influência epigenética nos indivíduos, uma limitação adicional reside no tamanho da amostra estudada, o qual foi inferior ao encontrado no estudo de Aterido et al. Possivelmente, uma amostra mais ampla poderia permitir visualizar tal relação.

Como limitações do nosso estudo, destaca-se o número de pacientes incluídos, decorrente da realização da pesquisa durante a pandemia de COVID-19, período em que apenas pacientes com demandas de urgência eram atendidos nos ambulatórios dos quais os pacientes eram provenientes. Esse fato

possivelmente influenciou nossa análise genética, o que pode explicar a ausência de variantes de nucleotídeo único (SNV) para o gene *CD155.* Além disso, a utilização de apenas uma metodologia de ensaio para a avaliação de ADA também pode ser considerada uma limitação significativa.

Nossos resultados indicam que, apesar da sua composição inteiramente humanizada, o adalimumabe pode desencadear respostas imunogênicas que possivelmente comprometem a eficácia do tratamento. A monitorização dos níveis séricos de adalimumabe, a detecção de ADA, a avaliação da formação de complexos imunes e a investigação de polimorfismos genéticos são cruciais para o avanço da medicina de precisão. Essas abordagens possibilitam estratégias terapêuticas personalizadas, adaptadas aos perfis individuais dos pacientes, o que pode otimizar os resultados terapêuticos com os medicamentos disponíveis.

Nosso estudo também enfatiza a importância de adotar uma metodologia de teste consistente para garantir a confiabilidade e a consistência no monitoramento dos dados. Essa abordagem multifacetada é essencial para a compreensão e o tratamento da DC, integrando a monitorização dos medicamentos, os mecanismos imunológicos e os fatores genéticos. Este enfoque integrado pode fornecer percepções valiosas para a adaptação de estratégias terapêuticas que maximizem a eficácia e minimizem os riscos associados ao tratamento com adalimumabe, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (Figura 13).

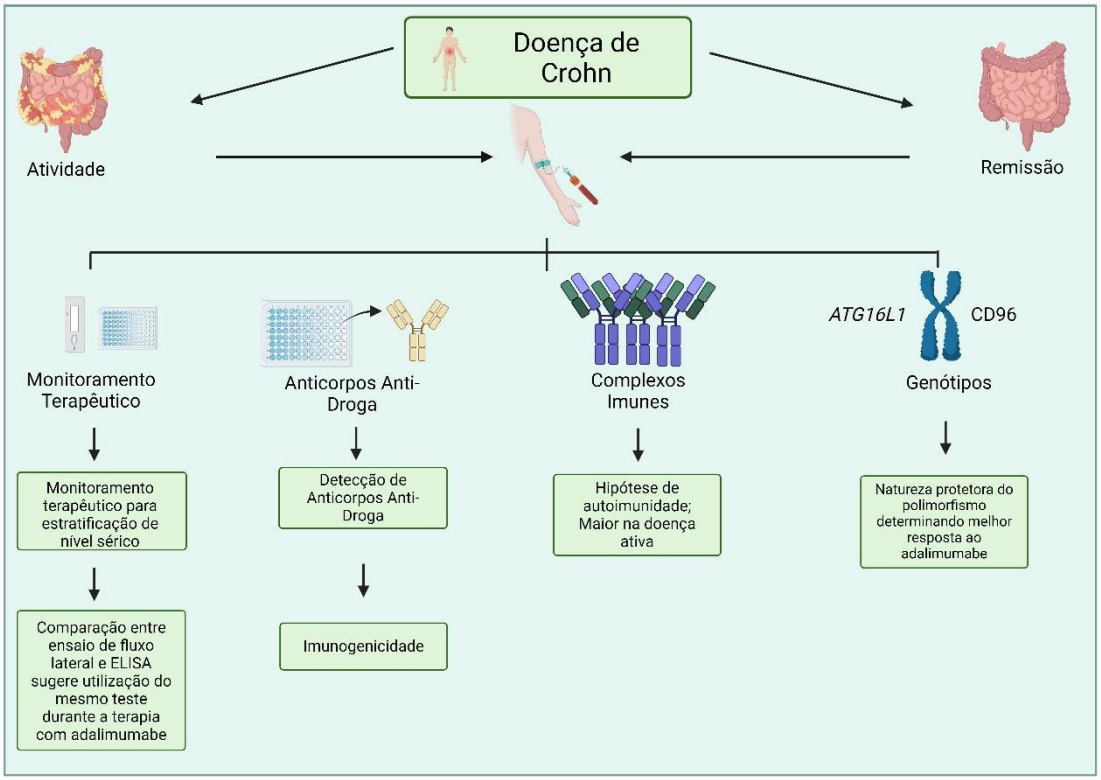

Figura 13. A medicina de precisão no contexto da terapia com adalimumabe para a doença de Crohn implica uma abordagem abrangente para a otimização do tratamento. *Uma proposta com abordagem personalizada para pacientes com doença de Crohn em uso de adalimumabe inclui monitoramento terapêutico meticuloso (monitoramento de nível mínimo de medicamentos e detecção de anticorpos antidrogas), avaliação de complexos imunes e avaliação de polimorfismos genéticos, o que pode melhorar os resultados e a qualidade de vida dos pacientes. Estas estratégias integradas podem contribuir para otimizar a utilização do adalimumabe, garantindo regimes terapêuticos personalizados que se alinhem com as características individuais do paciente e com a medicina de precisão. Figura criada com BioRender.com.*

6. CONCLUSÃO

Não houve diferenças significativas entre os grupos de pacientes com DC em atividade e em remissão quanto aos níveis de adalimumabe, tanto pelo teste de ELISA quanto pelo teste rápido de fluxo lateral. Também não se encontrou diferença significativa dos níveis séricos de adalimumabe quanto ao uso de imunomodulador.

Ao avaliar a intercambialidade entre os ensaios que mensuraram níveis séricos de adalimumabe, encontrou-se diferença significativa, embora os testes tenham demonstrado concordância moderada.

Os pacientes em atividade apresentaram concentrações significativamente maiores de complexos imunes em comparação com aqueles em remissão, indicando uma associação com a não resposta ao adalimumabe.

Quanto aos resultados da genotipagem, no que diz respeito ao *ATG16L1*, o genótipo selvagem foi associado a maiores valores de CDEIS e calprotectina fecal, enquanto o genótipo variante apresentou menores valores de plaquetas. Além disso, a avaliação genotípica revelou associações significativas para o genótipo *CD96* selvagem com níveis mais elevados de PCR, envolvimento colônico e níveis infraterapêuticos de adalimumabe. As diferenças genotípicas encontradas demonstram a correlação entre os genótipos selvagem tanto para *CD96* quanto para *ATG16L1* com a resposta laboratorial e endoscópica desfavorável ao adalimumabe.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier Saunders 2018.

2. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. Lancet. 2007;369(9573):1641-57.

3. Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, Fried M, Gearry R, Goh KL, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease: Update August 2015. J Clin Gastroenterol. 2016;50(10):803-18.

4. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007;448(7152):427-34.

5. Tavakoli P, Vollmer-Conna U, Hadzi-Pavlovic D, Grimm MC. A Review of Inflammatory Bowel Disease: A Model of Microbial, Immune and Neuropsychological Integration. Public Health Rev. 2021;42:1603990.

6. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel JF. Ulcerative colitis. Lancet. 2017;389(10080):1756-70.

7. Ocansey DKW, Zhang L, Wang Y, Yan Y, Qian H, Zhang X, et al. Exosome-mediated effects and applications in inflammatory bowel disease. Biol Rev Camb Philos Soc. 2020;95(5):1287-307.

8. Dam AN, Berg AM, Farraye FA. Environmental influences on the onset and clinical course of Crohn's disease-part 1: an overview of external risk factors. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2013;9(11):711-7.

9. Roda G, Chien Ng S, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, et al. Crohn's disease. Nat Rev Dis Primers. 2020;6(1):22.

10. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001;411(6837):599-603.

11. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, Anderson CA, Barrett JC, Beckly J, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. Inflamm Bowel Dis. 2007;13(8):941-6.

12. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. Lancet. 2017;390(10114):2769-78.

13. Vedamurthy A, Ananthakrishnan AN. Influence of Environmental Factors in the Development and Outcomes of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2019;15(2):72-82.

14. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al.

Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology. 2012;142(1):46-54.e42; quiz e30.

15. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. Am J Med. 1932;13(5):583-90.

16. Van Hootegem P, Travis S. Is Crohn's Disease a Rightly Used Eponym? J Crohns Colitis. 2020;14(6):867-71.

17. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. Lancet. 2017;389(10080):1741-55.

18. Flynn S, Eisenstein S. Inflammatory Bowel Disease Presentation and Diagnosis. Surg Clin North Am. 2019;99(6):1051-62.

19. Cheifetz AS. Management of active Crohn disease. Jama. 2013;309(20):2150-8.

20. Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. Ann Surg. 2000;231(1):38-45.

21. Pagnini C, Cominelli F. Tumor Necrosis Factor's Pathway in Crohn's Disease: Potential for Intervention. Int J Mol Sci. 2021;22(19).

22. Larsen S, Bendtzen K, Nielsen OH. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease: epidemiology, diagnosis, and management. Ann Med. 2010;42(2):97-114.

23. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. Mayo Clin Proc. 2017;92(7):1088-103.

24. Saez A, Herrero-Fernandez B, Gomez-Bris R, Sánchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. Int J Mol Sci. 2023;24(2).

25. Gomez-Bris R, Saez A, Herrero-Fernandez B, Rius C, Sanchez-Martinez H, Gonzalez-Granado JM. CD4 T-Cell Subsets and the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci. 2023;24(3).

26. Li N, Shi RH. Updated review on immune factors in pathogenesis of Crohn's disease. World J Gastroenterol. 2018;24(1):15-22.

27. da Silva Júnior RT, Apolonio JS, de Souza Nascimento JO, da Costa BT, Malheiro LH, Silva Luz M, et al. Crohn's disease and clinical management today: How it does? World J Methodol. 2023;13(5):399-413.

28. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2014;14(5):329-42.

29. Chen ML, Sundrud MS. Cytokine Networks and T-Cell Subsets in Inflammatory Bowel Diseases. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(5):1157-67.

30. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. Br J Pharmacol. 2002;135(4):855-75.

31. Leppkes M, Roulis M, Neurath MF, Kollias G, Becker C. Pleiotropic functions of TNF-α in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. Int Immunol. 2014;26(9):509-15.

32. Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008;14(27):4280-8.

33. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut. 2006;55(6):749-53.

34. Winship DH, Summers RW, Singleton JW, Best WR, Becktel JM, Lenk LF, et al. National Cooperative Crohn's Disease Study: study design and conduct of the study. Gastroenterology. 1979;77(4 Pt 2):829-42.

35. Papay P, Ignjatovic A, Karmiris K, Amarante H, Milheller P, Feagan B, et al. Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. J Crohns Colitis. 2013;7(8):653-69.

36. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. Gastrointest Endosc. 2004;60(4):505-12.

37. Gordon H, Biancone L, Fiorino G, Katsanos KH, Kopylov U, Al Sulais E, et al. ECCO Guidelines on Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. J Crohns Colitis. 2023;17(6):827-54.

38. Neurath MF, Vieth M. Different levels of healing in inflammatory bowel diseases: mucosal, histological, transmural, barrier and complete healing. Gut. 2023;72(11):2164-83.

39. Esaki M, Sakata Y. Clinical Impact of Endoscopic Evaluation of the Small Bowel in Crohn's Disease. Digestion. 2023;104(1):51-7.

40. Turner D, Ricciuto A, Lewis A, D'Amico F, Dhaliwal J, Griffiths AM, et al. STRIDE-II: An Update on the Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE) Initiative of the International Organization for the Study of IBD (IOIBD): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target strategies in IBD. Gastroenterology. 2021;160(5):1570-83.

41. Cardozo WS, Sobrado CW. Doença Inflamatória Intestinal. 2 ed: Editora Manole; 2015.

42. Yeshi K, Ruscher R, Hunter L, Daly NL, Loukas A, Wangchuk P. Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products. J Clin Med. 2020;9(5).

43. Moreno LO, Fernández-Tomé S, Abalo R. Biological Treatments in Inflammatory Bowel Disease: A Complex Mix of Mechanisms and Actions. Biologics. 2021;1:189-210.

44. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2020;14(1):4–22.

45. D'Haens G, Geboes K, Ponette E, Penninckx F, Rutgeerts P. Healing of severe recurrent ileitis with azathioprine therapy in patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 1997;112(5):1475-81.

46. MOTA FB, CASSIOLATO J, GADELHA C. F uturo da pesquisa, desenvolvimento tecnológico e produção industrial de biofarmacêuticos no Brasil. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde** , [Sl. 2014;8:461-77.

47. Waldmann H. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. Methods Mol Biol. 2019;1904:1-10.

48. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(10):767-74.

49. Wang S. Advances in the production of human monoclonal antibodies. Antibody Technology Journal. 2011(1).

50. Manis JP. Overview of therapeutic monoclonal antibodies: www.uptodate.com 2023

51. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. Gastroenterology. 2006;130(2):323-33; quiz 591.

52. Farmacêutica A. Humira (Adalimumabe) [bula do medicamento].

53. Agency EM. Scientific discussion for the approval of Humira. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/humira-epar-scientific-discussion_en.pdf2004

54. Cote-Daigneault J, Bouin M, Lahaie R, Colombel JF, Poitras P. Biologics in inflammatory bowel disease: what are the data? United European Gastroenterol J. 2015;3(5):419-28.

55. Nguyen DL, Flores S, Sassi K, Bechtold ML, Nguyen ET, Parekh NK. Optimizing the use of anti-tumor necrosis factor in the management of patients with Crohn's disease. Ther Adv Chronic Dis. 2015;6(3):147-54.

56. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. Ann Intern Med. 2007;146(12):829-38.

57. Orfanoudaki E, Foteinogiannopoulou K, Theodoraki E, Koutroubakis IE. Recent Advances in the Optimization of Anti-TNF Treatment in Patients with Inflammatory Bowel Disease. J Clin Med. 2023;12(7).

58. Papamichael K, Cheifetz AS, Melmed GY, Irving PM, Vande Casteele N, Kozuch

PL, et al. Appropriate Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents for Patients With Inflammatory Bowel Diseases. Clin Gastroenterol Hepatol. 2019;17(9):1655-68.e3.

59. Silva-Ferreira F, Afonso J, Pinto-Lopes P, Magro F. A Systematic Review on Infliximab and Adalimumab Drug Monitoring: Levels, Clinical Outcomes and Assays. Inflamm Bowel Dis. 2016;22(9):2289-301.

60. Moore C, Corbett G, Moss AC. Systematic Review and Meta-Analysis: Serum Infliximab Levels During Maintenance Therapy and Outcomes in Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis. 2016;10(5):619-25.

61. Su HY, Ward MG, Sparrow MP. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease: too little too early?-comments on the American Gastroenterology Association Guideline. Transl Gastroenterol Hepatol. 2. China2017. p. 113.

62. 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. 2016;22(2):409-15.

63. Zittan E, Steinhart AH, Goldstein P, Milgrom R, Gralnek IM, Silverberg MS. Post-Induction High Adalimumab Drug Levels Predict Biological Remission at Week 24 in Patients With Crohn's Disease. Clin Transl Gastroenterol. 2021;12(10):e00401.

64. Ungar B, Levy I, Yavne Y, Yavzori M, Picard O, Fudim E, et al. Optimizing Anti-TNF-α 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.e2.

65. Mitrev N, Vande Casteele N, Seow CH, Andrews JM, Connor SJ, Moore GT, et al. Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases. Aliment Pharmacol Ther. 2017;46(11-12):1037-53.

66. Pouw MF, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van der Kleij D, Aarden L, Rispens T, et al. Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve. Ann Rheum Dis. 2015;74(3):513-8.

67. Negoescu DM, Enns EA, Swanhorst B, Baumgartner B, Campbell JP, Osterman MT, et al. Proactive Vs Reactive Therapeutic Drug Monitoring of Infliximab in Crohn's Disease: A Cost-Effectiveness Analysis in a Simulated Cohort. Inflamm Bowel Dis. 2020;26(1):103-11.

68. Soenen R, Stove C, Capobianco A, De Schutter H, Dobbelaere M, Mahjor T, et al. Promising Tools to Facilitate the Implementation of TDM of Biologics in Clinical Practice. J Clin Med. 2022;11(11).

69. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. Essays Biochem. 2016;60(1):111-

20.

70. Cheli S, Savino D, Penagini F, Zuccotti G, Zuin G, Clementi E, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Anti-TNFα Inhibitors: A Matter of Cut-Off Ranges. Pharmaceutics. 2023;15(7).

71. Gomes LEM, Genaro LM, Castro MMd, Ricci RL, Pascoal LB, Silva FBC, et al. Infliximab monitoring in Crohn's disease: a neural network approach for evaluating disease activity and immunogenicity. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2024;17:1-19.

72. Genaro LM, Gomes LEM, Franceschini A, Ceccato HD, de Jesus RN, Lima AP, et al. Anti-TNF therapy and immunogenicity in inflammatory bowel diseases: a translational approach. Am J Transl Res. 2021;13(12):13916-30.

73. Ben-Horin S, Chowers Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2011;33(9):987-95.

74. Billioud V, Sandborn WJ, Peyrin-Biroulet L. Loss of response and need for adalimumab dose intensification in Crohn's disease: a systematic review. Am J Gastroenterol. 2011;106(4):674-84.

75. Nakase H, Motoya S, Matsumoto T, Watanabe K, Hisamatsu T, Yoshimura N, et al. Significance of measurement of serum trough level and anti-drug antibody of adalimumab as personalised pharmacokinetics in patients with Crohn's disease: a subanalysis of the DIAMOND trial. Aliment Pharmacol Ther. 2017;46(9):873-82.

76. Purcell RT, Lockey RF. Immunologic responses to therapeutic biologic agents. J Investig Allergol Clin Immunol. 2008;18(5):335-42.

77. Vermeire S, Gils A, Accossato P, Lula S, Marren A. Immunogenicity of biologics in inflammatory bowel disease. Therap Adv Gastroenterol. 2018;11:1756283x17750355.

78. Cui G, Fan Q, Li Z, Goll R, Florholmen J. Evaluation of anti-TNF therapeutic response in patients with inflammatory bowel disease: Current and novel biomarkers. EBioMedicine. 2021;66:103329.

79. Vaisman-Mentesh A, Rosenstein S, Yavzori M, Dror Y, Fudim E, Ungar B, et al. Molecular Landscape of Anti-Drug Antibodies Reveals the Mechanism of the Immune Response Following Treatment With TNFα Antagonists. Front Immunol. 2019;10:2921.

80. Colombel JF, Feagan BG, Sandborn WJ, Van Assche G, Robinson AM. Therapeutic drug monitoring of biologics for inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2012;18(2):349-58.

81. López-Ibáñez M, Marín-Jiménez I. Drugs and anti-drug antibody levels in the management of patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterol Hepatol. 2016;39(4):265-72.

82. Moss AC, Brinks V, Carpenter JF. Review article: immunogenicity of anti-TNF

biologics in IBD - the role of patient, product and prescriber factors. Aliment Pharmacol Ther. 2013;38(10):1188-97.

83. Gomes LEM, da Silva FAR, Pascoal LB, Ricci RL, Nogueira G, Camargo MG, et al. Serum Levels of Infliximab and Anti-Infliximab Antibodies in Brazilian Patients with Crohn's Disease. Clinics (Sao Paulo). 2019;74:e824.

84. Adegbola SO, Sahnan K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. Int J Mol Sci. 2018;19(8).

85. Strand V, Balsa A, Al-Saleh J, Barile-Fabris L, Horiuchi T, Takeuchi T, et al. Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. BioDrugs. 2017;31(4):299-316.

86. Holleran G, Lopetuso L, Petito V, Graziani C, Ianiro G, McNamara D, et al. The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease. Int J Mol Sci. 2017;18(10).

87. van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EE, Kruithof S, de Groot E, et al. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. Ann Rheum Dis. 2013;72(1):104-9.

88. Kroenke MA, Barger TE, Hu J, Miller MJ, Kalenian K, He L, et al. Immune Complex Formation Is Associated With Loss of Tolerance and an Antibody Response to Both Drug and Target. Front Immunol. 2021;12:782788.

89. Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002;70(4):845-57.

90. Chouchana L, Narjoz C, Beaune P, Loriot MA, Roblin X. Review article: the benefits of pharmacogenetics for improving thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2012;35(1):15-36.

91. Hlavaty T, Ferrante M, Henckaerts L, Pierik M, Rutgeerts P, Vermeire S. Predictive model for the outcome of infliximab therapy in Crohn's disease based on apoptotic pharmacogenetic index and clinical predictors. Inflamm Bowel Dis. 2007;13(4):372-9.

92. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med. 1989;169(5):1747-56.

93. Aterido A, Palau N, Domenech E, Nos Mateu P, Gutierrez A, Gomollon F, et al. Genetic association between CD96 locus and immunogenicity to anti-TNF therapy in Crohn's disease. Pharmacogenomics J. 2019;19(6):547-55.

94. Nuij V, Peppelenbosch MP, van der Woude CJ, Fuhler GM. Genetic

polymorphism in ATG16L1 gene is associated with adalimumab use in inflammatory bowel disease. J Transl Med. 2017;15(1):248.

95. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. J Clin Chem Clin Biochem. 1983;21(11):709-20.

96. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. Biochem Med (Zagreb). 2011;21(1):49-52.

97. Windsor JW, Kaplan GG. Evolving Epidemiology of IBD. Curr Gastroenterol Rep. 2019;21(8):40.

98. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. J Crohns Colitis. 2016;10(8):989-97.

99. Casellas F, Robles V, Borruel N, Torrejón A, Castells I, Navarro E, et al. Restoration of quality of life of patients with inflammatory bowel disease after one year with antiTNFα treatment. J Crohns Colitis. 2012;6(9):881-6.

100. Ben-Horin S, Chowers Y. Tailoring anti-TNF therapy in IBD: drug levels and disease activity. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014;11(4):243-55.

101. Yanai H, Lichtenstein L, Assa A, Mazor Y, Weiss B, Levine A, et al. Levels of drug and antidrug antibodies are associated with outcome of interventions after loss of response to infliximab or adalimumab. Clin Gastroenterol Hepatol. 2015;13(3):522-30.e2.

102. Strik AS, Bots SJ, D'Haens G, Löwenberg M. Optimization of anti-TNF therapy in patients with Inflammatory Bowel Disease. Expert Rev Clin Pharmacol. 2016;9(3):429-39.

103. Paul S, Moreau AC, Del Tedesco E, Rinaudo M, Phelip JM, Genin C, et al. Pharmacokinetics of adalimumab in inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. Inflamm Bowel Dis. 2014;20(7):1288-95.

104. Fernandes SR, Bernardo S, Simões C, Gonçalves AR, Valente A, Baldaia C, et al. Proactive Infliximab Drug Monitoring Is Superior to Conventional Management in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2020;26(2):263-70.

105. Ward MG, Warner B, Unsworth N, Chuah SW, Brownclarke C, Shieh S, et al. Infliximab and adalimumab drug levels in Crohn's disease: contrasting associations with disease activity and influencing factors. Aliment Pharmacol Ther. 2017;46(2):150-61.

106. Kennedy NA, Heap GA, Green HD, Hamilton B, Bewshea C, Walker GJ, et al. Predictors of anti-TNF treatment failure in anti-TNF-naive patients with active luminal Crohn's disease: a prospective, multicentre, cohort study. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2019;4(5):341-53.

107. Arieira C, Dias de Castro F, Cúrdia Gonçalves T, Moreira MJ, Cotter J. Combination therapy in inflammatory bowel disease patients: do we need to maximize the dose of azathioprine? Scand J Gastroenterol. 2020;55(8):920-3.

108. Chanchlani N, Lin S, Bewshea C, Hamilton B, Thomas A, Smith R, et al. Mechanisms and management of loss of response to anti-TNF therapy for patients with Crohn's disease: 3-year data from the prospective, multicentre PANTS cohort study. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2024.

109. Colombel JF, Jharap B, Sandborn WJ, Feagan B, Peyrin-Biroulet L, Eichner SF, et al. Effects of concomitant immunomodulators on the pharmacokinetics, efficacy and safety of adalimumab in patients with Crohn's disease or ulcerative colitis who had failed conventional therapy. Aliment Pharmacol Ther. 2017;45(1):50-62.

110. Facchin S, Buda A, Cardin R, Agbariah N, Zingone F, De Bona M, et al. Rapid point-of-care anti-infliximab antibodies detection in clinical practice: comparison with ELISA and potential for improving therapeutic drug monitoring in IBD patients. Therap Adv Gastroenterol. 2021;14:1756284821999902.

111. Novakovic V, Abdija S, Larsen PB, Fenger M, Gredal L, Jacobsen KK. Comparison of the Quantum Blue® reader Point-of-Care system versus ELISA technique for therapeutic drug monitoring of Infliximab levels. Clin Biochem. 2019;74:73-5.

112. Cherry M, Dutzer D, Nasser Y, Berger AE, Roblin X, Paul S. Point-of-Care Assays Could Be Useful for Therapeutic Drug Monitoring of IBD Patients in a Proactive Strategy with Adalimumab. J Clin Med. 2020;9(9).

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

114. Cohen RD, Yu AP, Wu EQ, Xie J, Mulani PM, Chao J. Systematic review: the costs of ulcerative colitis in Western countries. Aliment Pharmacol Ther. 2010;31(7):693-707.

115. Yu AP, Cabanilla LA, Wu EQ, Mulani PM, Chao J. The costs of Crohn's disease in the United States and other Western countries: a systematic review. Curr Med Res Opin. 2008;24(2):319-28.

116. van der Valk ME, Mangen MJ, Leenders M, Dijkstra G, van Bodegraven AA, Fidder HH, et al. Healthcare costs of inflammatory bowel disease have shifted from hospitalisation and surgery towards anti-TNFα therapy: results from the COIN study. Gut. 2014;63(1):72-9.

117. Yao J, Jiang X, You JHS. A Systematic Review on Cost-effectiveness Analyses of Therapeutic Drug Monitoring for Patients with Inflammatory Bowel Disease: From Immunosuppressive to Anti-TNF Therapy. Inflamm Bowel Dis. 2021;27(2):275-82.

118. 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. 2016;65(2):249-55.

119. Hinojosa J, Muñoz F, Martínez-Romero GJ. Relationship between Serum Adalimumab Levels and Clinical Outcome in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis. 2019;37(6):444-50.

120. West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, Kuipers EJ, Stokkers PC, van der Woude CJ. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2008;28(9):1122-6.

121. Sun M, Ju J, Xu H, Luo M, Li Z, Wang Y. Antibiotics influence the risk of anti-drug antibody formation during anti-TNF therapy in Chinese inflammatory bowel disease patients. Front Pharmacol. 2024;15:1360835.

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

123. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. Clin Transl Gastroenterol. 2016;7(1):e135.

124. Qiu Y, Chen BL, Mao R, Zhang SH, He Y, Zeng ZR, et al. Systematic review with meta-analysis: loss of response and requirement of anti-TNFα dose intensification in Crohn's disease. J Gastroenterol. 2017;52(5):535-54.

125. Schultheiss JPD, Mahmoud R, Louwers JM, van der Kaaij MT, van Hellemondt BP, van Boeckel PG, et al. Loss of response to anti-TNFα agents depends on treatment duration in patients with inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2021;54(10):1298-308.

126. Chirmule N, Jawa V, Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. Aaps j. 2012;14(2):296-302.

127. Opolka-Hoffmann E, Jordan G, Otteneder M, Kieferle R, Lechmann M, Winter G, et al. The impact of immunogenicity on therapeutic antibody pharmacokinetics: A preclinical evaluation of the effect of immune complex formation and antibody effector function on clearance. MAbs. 2021;13(1):1995929.

128. Ponce R, Abad L, Amaravadi L, Gelzleichter T, Gore E, Green J, et al. Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: assessment and interpretation of nonclinical safety studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2009;54(2):164-82.

129. Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, et al. Formation, clearance, deposition, pathogenicity, and identification of biopharmaceutical-related immune complexes: review and case studies. Toxicol Pathol. 2014;42(4):725-64.

130. Leach MW, Rottman JB, Hock MB, Finco D, Rojko JL, Beyer JC. Immunogenicity/hypersensitivity of biologics. Toxicol Pathol. 2014;42(1):293-300.

131. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP. Systematic review:

antibodies and anti-TNF-α levels in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2012;35(9):971-86.

132. Bendtzen K, Ainsworth M, Steenholdt C, Thomsen O, Brynskov J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. Scand J Gastroenterol. 2009;44(7):774-81.

133. Cassinotti A, Travis S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. Inflamm Bowel Dis. 2009;15(8):1264-75.

134. Cassinotti A, Ardizzone S, Porro GB. Adalimumab for the treatment of Crohn's disease. Biologics. 2008;2(4):763-77.

135. da Silva FAR, Pascoal LB, Dotti I, Setsuko Ayrizono ML, Aguilar D, Rodrigues BL, et al. Whole transcriptional analysis identifies markers of B, T and plasma cell signaling pathways in the mesenteric adipose tissue associated with Crohn's disease. J Transl Med. 2020;18(1):44.

136. Penner E. Nature of immune complexes in autoimmune chronic active hepatitis. Gastroenterology. 1987;92(2):304-8.

137. Yamane K, Nakamura H, Hamasaki M, Minei Y, Aibara N, Shimizu T, et al. Immune complexome analysis reveals the presence of immune complexes and identifies disease-specific immune complex antigens in saliva samples from patients with Sjögren's syndrome. Clin Exp Immunol. 2021;204(2):212-20.

138. Steenholdt C, Enevold C, Ainsworth MA, Brynskov J, Thomsen O, Bendtzen K. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1b and fas ligand are associated with clinical efficacy and/or acute severe infusion reactions to infliximab in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2012;36(7):650-9.

139. Koder S, Repnik K, Ferkolj I, Pernat C, Skok P, Weersma RK, et al. Genetic polymorphism in ATG16L1 gene influences the response to adalimumab in Crohn's disease patients. Pharmacogenomics. 2015;16(3):191-204.

140. Barber GE, Yajnik V, Khalili H, Giallourakis C, Garber J, Xavier R, et al. Genetic Markers Predict Primary Non-Response and Durable Response To Anti-TNF Biologic Therapies in Crohn's Disease. Am J Gastroenterol. 2016;111(12):1816-22.

8. APÊNDICE

8.1. Questionário de dados clínicos e demográficos

Questionário de Inclusão dos Pacientes - Amostra nº____

- Data da coleta___/____/_____

Nome:_____Prontuário:_____

Data de Nascimento:___/___/_____ Idade: _____

Etnia:_____Procedência:_____

( )Retocolite Ulcerativa Inespecífica ⦾ **Mayo parcial _____**

( ) Doença de Crohn ⦾ **IADC _____**

Tempo de Evolução da doença:_____

Mês e ano de início:_____/_____Idade ao início da doença:_____

Fenótipo DC: ( ) inflamatório ( ) estenosante ( ) fistulizante

Local de acometimento: ( ) Esôfago, estômago ou duodeno ( ) jejuno ( ) íleo ( )íleo distal ( ) ceco ( ) cólon ascendente ( ) cólon transverso ( ) cólon descendente ( ) sigmóide ( ) reto ( ) perianal

Cirurgias prévias (tipo e data): _____

Apendicectomia prévia: ( )sim ( )não Tabagismo: ( )sim ( )não

Manifestações extra-intestinais: ( ) sim ( ) não Qual?_____

Medicações prévias:_____

Medicação atual e dose: _____

Tempo de tratamento com Adalimumabe:____

Reações adversas apresentadas após a aplicação desde o início do tratamento:_____

Hematócrito:____PCR:_____VHS:_____Plaquetas:_____

Colonoscopia (___/___/___):

Enterorressonância (___/___/___):

Radiograma de Trânsito intestinal (___/___/___):

9. ANEXOS

9.1. Aprovação do Comitê de Ética

UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação do nível sérico de adalimumabe e detecção de anticorpos anti-adalimumabe em pacientes com doença inflamatória intestinal

Pesquisador: Raquel Franco Leal

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 92894418.4.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.037.447

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CAMPINAS, 20 de Maio de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

9.2. Indice de Atividade da Doença de Crohn (IADC)

Índice de Atividade da doença de Crohn IADC - Amostra nº_____

- Data da coleta___/____/_____ Número de

Evacuações líquidas ou pastosas, por dia, nos últimos sete dias (X2):_____ (soma dos sete dias X2)

Dor abdominal nos últimos sete dias (soma dos sete dias X5)

(0- sem dor, 1- dor leve, 2- dor moderada, 3- dor acentuada) (X5): _____

Sensação de bem-estar, dos últimos sete dias (soma dos sete dias X7)

(0-ótimo, 1-bom, 2- regular, 3-mau, 4-péssimo) (X7):_____.

Número de complicações (X20): _____

1. artrite ou artralgia
2. irite ou uveíte
3. eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide
4. fissura anal ou fístula ou abscesso perianal
5. outras fístulas
6. febre acima de 37,8 ^{0}C

Consumo de antidiarréico (não=0, sim=1) (X30): _____

Massa abdominal(ausente=0, duvidosa=2, bem definida=5) (X10): _____

Déficit de hematócrito (homens:47-Ht; mulheres 42-Ht) (X6): _____
(Diminuir em vez de somar no caso de o Ht do paciente ser > do que o padrão)

Peso: porcentagem abaixo do esperado: 1-(peso/peso habitual) x100_____
(Diminuir em vez de somar se o peso do paciente for maior que o esperado)

TOTAL _____

9.3. *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity* (CDEIS)

Crohn's Disease Endoscopic Índex of Severity (CDEIS)

- Amostra _____

- Data da coleta ___/____/_____

1. Estimar a superfície ocupada pelas lesões e ulceras em % por segmento explorado:

Íleo: lesões ____% úlceras ____%

Ceco e cólon ascendente: lesões ____% úlceras ____%

Transverso: lesões ____% úlceras ____%

Sigmóide e cólon descendente: lesões ____% úlceras ____%

Reto: lesões ____% úlceras ____%

2.

	Úlceras profundas (Apontar 12 se +)	Úlceras superficiais (Apontar 6 se +)	Superfície das úlceras (% ÷10)	Superfícies das lesões (% ÷ 10)	TOTAL
Íleo					
Direito					
Transverso					
Esquerdo					
Reto					

TOTAL (soma de todos os casos) = [___]

TOTAL ÷ número de segmentos explorados = [___]

Adicionar +3 se presença de úlcera na estenose = [___]

Adicionar +3 se presença de estenose não ulcerada= [___]

CDEIS = [___]