



ANÁLISE METABOLÔMICA SÉRICA DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN EM USO DE INFLIXIMABE

Palavras-Chave: Doença de Crohn; infliximabe; análise metabolômica

Autores(as):

Filipe Botto Crispim Silva, FCM - Unicamp

Luís Eduardo Miani Gomes, FCM - Unicamp

Lívia Moreira Genaro, FCM – Unicamp

Beatriz Alves Guerra Rodrigues, FCM – Unicamp

Arthur Noin de Oliveira, FCF - Unicamp

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino, FCF - Unicamp

Prof.^a Dr.^a Raquel Franco Leal (orientadora), FCM – Unicamp

INTRODUÇÃO:

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica que atinge trato gastrointestinal, capaz de acometer qualquer porção do tubo digestivo. A região mais comumente afetada é o íleo terminal e ceco (1). A doença é categorizada como uma doença inflamatória intestinal (DII). A etiologia da condição ainda não é desconhecida, estando associada à determinados diversos fatores de riscos, como fatores genéticos, fatores ambientais e fatores ligados à microbiota intestinal (2).

A apresentação mais comum da doença é de uma inflamação transmural, usualmente segmentar e assimétrica, que se manifesta de forma recidivante. O quadro mais comum da DC tem como sintomas dor no quadrante inferior direito, diarreia crônica, sangramento retal e perda de peso, sempre a depender da gravidade da inflamação. A condição se apresenta por períodos de recidivas intercalados por períodos de remissão (2).

O objetivo das abordagens terapêuticas na DC é de controle da inflamação, impedindo o avanço da condição, o qual pode levar a complicações mais graves como danos intestinais permanentes, além de assegurar que a remissão atingida se perdure (4). A melhora das lesões endoscópicas tem sido um alvo das terapias, já que está associada à menores índices de recaídas e necessidade de acessos cirúrgicos (2). O uso de agentes biológicos tem se apresentado como uma terapia bastante utilizada em casos leves ou graves da doença, conseguindo atingir uma melhora do quadro (2,3).

O Infliximabe (IFX) é um desses agentes biológicos, sendo um anticorpo quimérico monoclonal com alta afinidade à TNF- α , citocina pró inflamatória que possui papel importante na patogênese da DC (4,5). É utilizado tanto na fase aguda da DC, para indução da remissão, quanto para manutenção da fase da remissão.

Apesar de alta eficácia, cerca de 30% dos pacientes submetidos à terapia com IFX não possuem resposta ao tratamento e grande parcela dos pacientes que possuem efeito inicial, perdem a resposta ao uso da droga, necessitando o aumento de dose ou alteração do medicamento (4). A perda de resposta ao tratamento está associada ao desenvolvimento de anticorpos anti-IFX – processo chamado de imunogenicidade – que fazem com que a droga seja metabolizada com mais rapidez e tenha seu nível sérico diminuído.

Com o crescimento dos estudos ômicos no entendimento de processo no funcionamento e desenvolvimento de diversas doenças, pensa-se nessa forma de investigação como um recurso de se obter dados a serem utilizados no processo de decisão em diversos tratamentos e terapias, podendo ser uma ferramenta na evolução da medicina de precisão (6). Esses estudos permitem analisar o perfil biológico e bioquímico de amostras orgânicas,

evidenciando vias metabólicas e moléculas sob determinadas situações, levando em consideração o metabolismo dos indivíduos (7).

Na DII, os estudos metabolômicos permitem analisar padrões metabólitos e perfis bioquímicos dos pacientes, evidenciar novos biomarcadores da doença, entender previamente possíveis mecanismos que levam a falhas e identificar indivíduos com maior probabilidade de falhas em determinadas terapias (8-10).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A terapia com o IFX é de grande valia no tratamento de indivíduos com DC, seja através do estímulo de remissão ou manutenção dessa, trazendo melhora da condição de vida de diversos pacientes acometidos pela condição. Apesar disso, diversos pacientes sofrem com a perda de responsividade à terapia, o que pode influenciar de forma incisiva no curso da doença nesses indivíduos.

Dessa forma, estudo metabolômico de amostras colhidas de pacientes com e sem perda de responsividade à terapia biológica anti-TNF- α mostra-se como uma variável de análise de grande valia para entendimento do processo associado ao desenvolvimento da imunogenicidade. Assim, com esse estudo, espera-se a elucidação sobre possíveis moléculas e vias metabólicas envolvidas nesse processo de perda de responsividade ao IFX.

METODOLOGIA

Local do estudo e População da Amostra

Pesquisa realizada no Ambulatório de DII do Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sendo uma coorte de 75 pacientes com doença de Crohn tratados com IFX, adultos (18 a 60 anos), ambos os sexos, em acompanhamento no ambulatório. Foram incluídos no estudo os pacientes em tratamento com IFX, na fase de manutenção, com regularidade nas consultas e seguindo permanentemente no esquema de aplicação de IFX, e com confirmação de diagnóstico clínico e endoscópico de DC. Foram excluídos os pacientes que não estavam em acompanhamento ambulatorial, bem como aqueles que estavam ausentes no esquema terapêutico de aplicação do IFX no ambulatório ou que não possuíam exames que permitiam determinar a atividade da doença.

Coleta de dados e considerações éticas

A coleta de dados foi realizada antes da aplicação do IFX endovenoso. As características demográficas, clínicas, laboratoriais e o tratamento realizado, bem como a dosagem de IFX foram registrados através de questionário estruturado. A amostra de sangue foi coletada antes da aplicação do IFX e em seguida foi realizado a centrifugação da amostra, obtendo-se a amostra de soro que foi devidamente congelado a -80°C.

Foi realizada a separação dos pacientes em dois grupos – Doença de Crohn em Atividade (DCA) e Doença de Crohn em Remissão (DCR), a partir de dados obtidos por ileocolonosopia e/ou enterorressonância magnética. A mensuração do nível sérico de IFX foi realizada por testes de Elisa (Promonitor) e Ensaio de Fluxo Lateral (Buhlmann), enquanto a dosagem de Anticorpo anti-IFX foi realizada por Elisa. As medições do nível de IFX e a presença de anticorpos foram realizados seguindo estritamente as instruções dos fabricantes.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número do CAAE: 53097116.2.0000.5404.

Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva com graus de posição e dispersão para variáveis contínuas e tabelas de frequência para variáveis categóricas. Utilizou-se teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fischer, quando imprescindível, para verificar a associação ou comparação de proporções. Para comparar medidas contínuas ou ordenáveis entre grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%.

Análise metabolômica

Para a análise da metabolômica, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas por cromatografia líquida. Na preparação, a amostra sérica coletada foi homogeneizada e ionizada por solvente, sendo submetida à infusão direta no espectrofotômetro de massas de alta resolução. Moléculas de baixo peso molecular alteradas foram observadas e determinadas, sendo posteriormente associadas aos processos metabólicos envolvidos na doença.

RESULTADOS

As 75 amostras foram coletadas e, em seguida separado o soro e submetido aos ensaios com o kit Elisa – Promonitor e o Ensaio de Fluxo Lateral–Bulhmann, de acordo com as especificações de cada. Igualmente, essas amostras foram submetidas à dosagem de anticorpos com uso do kit de Elisa – Promonitor, seguindo suas especificações.

Em nossa casuística, tivemos 35 pacientes incluídos no grupo DCA e 40 no grupo DCR. Do grupo DCA, a mediana de idade foi de 36 anos (19-59), sendo a mediana da duração da doença de 8 anos. A mediana dos índices IADC (índice de atividade da doença de Crohn) e CDEIS (índice endoscópico de gravidade da doença de Crohn) foi de 226,4 (51,6-574,3) e 9,4 (0-30), respectivamente. No grupo DCR, a mediana da idade do grupo foi de 36 anos (19-63), com duração média de 8 anos e 6 meses. Os índices de IADC e CDEIS foram 155,2 (53,7-497,5) e 0 (0-4,75), respectivamente. Desses pacientes, no grupo DCA 25 pacientes haviam sido submetidos à intervenção cirúrgica, enquanto no grupo DCR, 28 desses indivíduos passaram por intervenções. Ainda, no grupo em atividade, 27 dos indivíduos faziam uso concomitante de imunossupressão, em contrapartida à 23 dos 40 indivíduos com a doença em remissão.

Quando avaliados os níveis séricos de IFX nesses pacientes, encontramos para a metodologia de Elisa – Promonitor, 19 pacientes no grupo DCA apresentando níveis de droga supra terapêuticos ($[IFX] > 3-7 \mu\text{g/mL}$), enquanto para os integrantes do grupo DCR, 14 apresentaram o mesmo nível. Em níveis terapêuticos ($[IFX] = 3-7 \mu\text{g/mL}$) havia 3 pacientes do grupo DCA e 6 pacientes do grupo DCR. 13 pacientes do grupo DCA encontravam-se em níveis infra terapêuticos ($[IFX] < 3-7 \mu\text{g/mL}$) nesse teste, em contrapartida aos 20 pacientes do grupo DCR.

Quando mensurados com o teste Bulhmann, havia 14 pacientes com níveis supra terapêuticos no grupo DCA e 10 no grupo DCR. Para níveis definidos como terapêuticos, havia 7 pacientes no grupo DCA e 12 no grupo DCR. Por fim, dos níveis abaixo da dosagem estabelecida como terapêutica, 14 pacientes estavam no grupo atividade e 18 em remissão.

Uma pequena alíquota de cada soro foi retirada e extraída com uso de solventes orgânicos polares, passando por um processo de homogeneização e centrifugação. Em seguida, essa amostra sofreu uma etapa de ionização, passando, após, por uma infusão direta no espectrômetro de massas de alta resolução ESI-LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Essa metodologia nos traz como resultado a observação de compostos de baixo peso molecular, em forma de variáveis (m/z) tendo passado por uma análise estatística multivariada. Para cada sinal de m/z notado dentro das amostras, temos uma faixa de diversas moléculas, que podem estar presentes em nossos pacientes e correlacionadas à resposta do paciente, sendo potenciais biomarcadores para resposta a serem investigados.

Dessa forma, obtivemos 18 razões m/z relevantes nos pacientes não respondedores e 22 sinais para os pacientes não respondedores. Esses valores massa/carga foram consultados na plataforma pública METLIN (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA) e foram, assim, encontradas 942 moléculas possíveis de estarem presentes na amostra e com possibilidade de estarem correlacionadas aos grupos estudados.

Em seguida, a partir dos dados obtidos, foi realizado um processo de triagem manualmente, a fim de selecionar as moléculas de interesse. Foi consultada molécula a molécula nas bases de dados seguintes: HMDB v.4.0 (Human Metabolome database—www.hmdb.ca), Lipid MAPS (Universidade da Califórnia, San Diego, CA—www.lipidmaps.org) e em dados da literatura.

Nessa etapa, foram excluídas moléculas que são isômeros entre si (molécula da mesma família com mesma exata razão massa/carga, porém com fórmula química diferente), moléculas não existentes em humanos ou que não de origem animal (flavonoides, ácidos graxos de origem vegetal e peptídeos de pequena massa). Foram incluídos proteínas, glicosídeos, ácidos graxos e demais metabólitos presentes em humanos ou com potencial relação com a doença de Crohn – correlação com microbiota intestinal, presente em células intestinais ou algum dado da literatura que poderia corroborar para um potencial marcador. Por fim, na etapa final desse processo, foram triadas 269 moléculas com potencial para serem utilizadas com biomarcadores.

Das 269 moléculas triadas, 59 dessas foram encontradas no grupo dos pacientes respondedores ao tratamento (remissão) e 210 nos pacientes não respondedores (atividade). Incluídos nessa triagem, foram encontrados diversos

oligosacarídeos, ácidos graxos, fosfolípidios presentes em células da mucosa e moléculas já conhecidas como marcadores já conhecidos de outras condições ou mediadores inflamatórios. No grupo dos respondedores, foram encontrados intermediários das vias metabólicas de síntese da Vit. B12, marcadores tumorais, peptídeos moduladores da mobilidade intestinais, intermediários e metabólitos de vias de formação e degradação de ácidos graxos, intermediários da formação de fosfolípidios e esfingolipídeos, e moléculas presentes no metabolismo de bactérias Gram-negativas.

Inseridas nas 210 moléculas presentes nas amostras dos pacientes não respondedores, foram encontradas da mesma forma que no grupo dos respondedores diversos intermediários da síntese da vitamina B12, esfingolipídeos, glicerolipídeos, fosfolípidios, oligo e polissacarídeos, metabólitos presentes em bactérias Gram-negativas presentes na microbiota intestinal. Ademais, foram encontradas prostamidas, intermediários de via da vitamina D2 e B5 e moléculas anti-inflamatórias (especificamente anti-TNF α).

CONCLUSÕES:

É possível ver com os dados que o uso da metabolômica permite a associação de diversas alterações de vias metabólicas com a doença de Crohn, e o entendimento desses dados e presença de metabólitos pode-se mostrar útil tanto como ferramenta diagnóstica da condição, quanto pra manejo da terapia a ser implementada no tratamento da condição.

BIBLIOGRAFIA

1. Gajendran M, Loganathan P, Catinella AP, Hashash JG. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month* [Internet]. 2018;64(2):20–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2017.07.001>
2. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet*. 2017;389(10080):1741–55.
3. Lima CCG, Queiroz NSF, Sobrado CW, Silva GLR, Nahas SC. Critical analysis of anti-tnf use in the era of new biological agents in inflammatory bowel disease. *Arq Gastroenterol*. 2020;57(3):323–32.
4. Adegbola SO, Sahnun K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):1–21.
5. Torres U dos S, Satomi G, Ronchi LS, Netinho JG. Influximabe na doença de crohn: experiência clínica de um centro terciário paulista. *Rev Bras Coloproctol*. 2009;29(1):38–45.
6. Olivier M, Asmis R, Hawkins GA, Howard TD, Cox LA. The need for multi-omics biomarker signatures in precision medicine. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
7. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell* [Internet]. 2018;173(4):822–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.055>
8. Lee JWJ, Plichta D, Hogstrom L, Borren NZ, Lau H, Gregory SM, et al. Multi-omics reveal microbial determinants impacting responses to biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Cell Host and Microbe*. 2021 Aug 11;29(8):1294-1304.e4.
9. de Preter V. Metabolomics in the Clinical Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. *Digestive Diseases*. 2015 Sep 23;33:2–10.
10. Lins Neto MÁ de F, Verdi GMX, Veras A de O, Veras M de O, Caetano LC, Ursulino JS. Use of metabolomics to the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2020;57(3):311–5
11. Akbulut S. An assessment of serum vitamin B12 and folate in patients with Crohn's disease. *Medicine*. 2022 Dec 16;101(50):e31892.
12. Zhu X, Xiang S, Feng X, Wang H, Tian S, Xu Y, et al. Impact of Cyanocobalamin and Methylcobalamin on Inflammatory Bowel Disease and the Intestinal Microbiota Composition. *J Agric Food Chem*. 2019 Jan 23;67(3):916–26.
13. Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*. 2012 Nov 16;3(6):544–55.
14. ter Beek WP. Gastrin releasing peptide receptor expression is decreased in patients with Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *J Clin Pathol*. 2004 Oct 1;57(10):1047–51.
15. Yau Y. Profiling the low-mass serum proteome of the behavioural phenotypes of Crohn's disease Profiling the low-mass serum proteome of the behavioural phenotypes of Crohn's disease Title: Profiling the low-mass serum proteome of Crohn's disease behavioural phenotypes. 2015; Available from: <http://hdl.handle.net/1959.4/55283inhttps://unsworks.unsw.edu.auon2023-07-09>
16. Li Y, Soendergaard C, Bergenheim FH, Aronoff DM, Milne G, Riis LB, et al. COX-2–PGE2 Signaling Impairs Intestinal Epithelial Regeneration and Associates with TNF Inhibitor