

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO  
PROFISSIONAL EM MEDICINA**

**Projeto:** IMPACTO DOS INIBIDORES DE *CHECKPOINT* IMUNE NAS CONDIÇÕES ADVERSAS RELACIONADAS AO SISTEMA ENDÓCRINO: UM ESTUDO PROSPECTIVO

**Aluno:** VINICIUS FERNANDO MACHADO BELDI

**Orientador:** Margaret de Castro/ Cristina Del Ben

**Colaborador de Pesquisa:** Leandro Machado Colli  
Paula L. C. Elias

## RESUMO

Os inibidores de *checkpoint* imune (ICI) são drogas que revolucionaram o tratamento de vários tipos de câncer, como o melanoma, carcinoma pulmonar de pequenas células, o carcinoma de células renais, entre outros. Estas drogas atuam em receptores que, em situações fisiológicas, previnem a autoimunidade e auxiliam a manter o equilíbrio no sistema imune, evitando danos aos tecidos durante respostas a infecções e tumores. Nesse grupo de medicamentos, o anticorpo contra receptor celular antígeno 4 de linfócito T citotóxico (anti CTLA-4) e o anticorpo contra receptor Morte Celular Programada (anti-PD1) são ICI que atuam, em última instância, aumentando a atividade do sistema imune e, conseqüentemente, acarretando morte das células cancerosas. No entanto, essas drogas tem como efeitos adversos a destruição autoimune de glândulas endócrinas, com perda de sua função, às vezes, transitória, mas, muitas vezes, de forma permanente. Uma abordagem sistemática para diagnóstico, tratamento e acompanhamento, incluindo testes para 2022 avaliar a função tireoidiana, adrenal, gonadal, paratireoidianas, pancreática e hipofisária são necessários. No presente estudo, será coletado material, em um ano, para análise clínica, laboratorial e genômica de 35 pacientes com câncer renal metastático em primeira linha que receberão Ipilimumabe e Nivolumabe, ICIs aprovados no Brasil para tratamento de carcinoma renal de células claras (CCR). Esses pacientes serão avaliados do ponto de vista endocrinológico com dosagens hormonais e exames de imagem, antes do tratamento e sequencialmente por 12 meses após a introdução das drogas. Não temos notícias de trabalhos prospectivos neste sentido; assim esse estudo contribuirá para a elaboração de um protocolo clínico a ser utilizado para avaliar a função endócrina em indivíduos tratados com ICIs. Esse é um subproduto de um projeto maior “Caracterização dos mecanismos somáticos e germinativos que impactam na resposta ao tratamento e prognóstico de pacientes com câncer renal” sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Leandro Machado Colli.

Palavras-chave: inibidores de *checkpoint* imunológico, autoimunidade, adrenalite, hipofisite, tireoidite.

## **ABSTRACT**

Immune checkpoint inhibitors (ICI) are drugs that have revolutionized the treatment of various types of cancer, such as melanoma, small cell lung carcinoma, renal cell carcinoma, among others. These drugs act on receptors that, in physiological situations, prevent autoimmunity and maintain balance in the immune system, preventing tissue damage during responses to infections and tumors. In this group of drugs, the antibody against cytotoxic T lymphocyte antigen 4 cell receptor (anti CTLA-4) and the antibody against Programmed Cell Death receptor (anti-PD1) are ICIs that act, ultimately, by increasing the activity of the immune system, and, consequently, causing the death of cancer cells. However, these drugs have as adverse effects the autoimmune destruction of endocrine glands, with loss of their function, sometimes transient, but often permanently. A systematic approach to diagnosis, treatment, and follow-up, including tests to assess thyroid, adrenal, gonadal, pancreatic, and pituitary function, are needed. In the present study, material will be collected, in one year, for clinical, laboratory and genomic analysis from 35 patients with first-line metastatic renal cancer who will receive Ipilimumab and Nivolumab, ICIs approved in Brazil for the treatment of clear cell renal carcinoma (CRC). These patients will be evaluated from an endocrinological point of view with hormonal measurements and imaging tests, before treatment and sequentially for 12 months after the introduction of the drugs. There are no prospective studies on this issue; thus, this study will contribute to the development of a clinical protocol to be used to assess endocrine function in individuals treated with ICIs. This is a subproject of a larger project “Characterization of somatic and germinal mechanisms that impact the response to treatment and prognosis of patients with renal cancer” under the responsibility of researcher Prof. Dr. Leandro Machado Colli.

Keywords: immune checkpoint inhibitors, autoimmunity, adrenalitis, hypophysitis, thyroiditis.

## 1. Introdução

Os inibidores de ponto de checagem imunológica, ou inibidores de *checkpoint* imune (ICI) são drogas que revolucionaram o tratamento de vários tipos de câncer, envolvendo o melanoma, o carcinoma pulmonar de pequenas células, e também o carcinoma de células renais, entre outros, chegando a se tornar terapia de primeira linha em vários casos. Estas drogas atuam em receptores que são cruciais para, em situações fisiológicas, manter o equilíbrio no sistema imune (SI), prevenindo a autoimunidade e também evitando o dano aos tecidos quando nosso SI está respondendo a infecções tumores. Alguns tipos de tumor podem expressar estes receptores, obtendo um importante modo de resistência ao sistema imune (1-3).

O anticorpo contra Antígeno-4 de linfócito T citotóxico (anti- CTLA-4) foi a primeira classe desse tipo de medicações a adquirir aprovação do *US Food and Drug Administration* (4). Na célula T citotóxica, CTLA-4 compete com CD28 na ligação às moléculas CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) das células apresentadoras de antígeno, inibindo assim a ativação imune, por levar a uma redução na liberação de citocinas pró-efetoras como IL-12 e enzimas citotóxicas como perforina e granzima B (5-6). O antagonista do CTLA-4, portanto, provoca a diferenciação e proliferação das células T citotóxicas.

O receptor conhecido como Morte Celular Programada - *Programmed Death 1* (PD-1), é uma proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células do sistema imune, como células T, B, NK e células supressoras derivadas de mieloides (MDSC). O PD-1 se une a seu ligante (PD-L1), e esta união acarreta vários mecanismos, como inibição da apoptose da célula tumoral,

exaustão das células T efetoras periféricas e transformação das T efetoras em T reguladoras (Treg). Um bloqueio desta via, com o anticorpo contra PD-1 (anti-PD1), pode provocar redução do controle do sistema imune, acarretando morte das células cancerosas (7-8).

Dentre os efeitos colaterais destas novas terapias, destacam-se alguns efeitos bastante diferentes daqueles presentes na quimioterapia tradicional, como desordens da hipófise e da tireoide (9-11). Eventos adversos podem resultar na destruição permanente com perda de função do órgão, sendo que esta costuma se manifestar nas primeiras semanas ou meses da terapia, embora isto possa acontecer mesmo após a cessação do tratamento (11).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), está em andamento o projeto “CLARA TRIAL”. Nesse projeto, indivíduos com carcinoma renal de células claras são submetidos à terapia com Ipilimumabe e Nivolumabe, dois ICI em combinação e, dessa forma, são avaliados prospectivamente diversos aspectos da evolução destes pacientes. Sabemos que as glândulas endócrinas estão sujeitas aos efeitos colaterais da aplicação dos ICI, como insuficiência hipofisária (12-15), tireoidiana (16, 17), pancreática (18-20), adrenal (21), paratireoidiana (22-27) e, em casos raros, síndromes poliglandulares autoimunes também podem surgir (28-30). No entanto os estudos utilizados para descrever essas doenças são retrospectivos. Não é de nosso conhecimento estudos que acompanhem prospectivamente pacientes com câncer renal metastático em uso dessas medicações. Assim esse estudo contribuirá para a elaboração de um protocolo clínico a ser utilizado para avaliar a função endócrina em indivíduos tratados com ICIs.

## **2. Objetivos e Justificativa**

Esse é um subproduto de um projeto maior “Caracterização dos mecanismos somáticos e germinativos que impactam na resposta ao tratamento e prognóstico de pacientes com câncer renal” sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Leandro Machado Colli.

Uma abordagem sistemática para diagnóstico, tratamento e acompanhamento, incluindo testes para avaliar a função tireoidiana, adrenal, gonadal, pancreática e hipofisária são necessários para avaliar a história natural das consequências do tratamento com ICIs na função endócrina. Acreditamos que esse estudo ajudará a compreender de forma mais aprofundada os efeitos adversos dessas drogas na autoimunidade nas glândulas endócrinas e, assim, estabelecermos padrões de evolução dos pacientes nesta condição. Não há trabalhos prospectivos neste sentido; assim esse estudo contribuirá para a elaboração de um protocolo clínico a ser utilizado para avaliar a função endócrina em indivíduos tratados com ICIs.

## **3. Metodologia**

### **a. Desenho de estudo**

Para este estudo, avaliaremos os pacientes recrutados no primeiro ano do projeto CLARA TRIAL (n= 35 pacientes). Pacientes recém-diagnosticados com CCR em estágio IV serão recrutados pelo professor Leandro Colli, responsável pela oncologia clínica do HCFMRP-USP. Os pacientes serão tratados com a combinação de ICIs: nivolumabe (3 mg por quilograma de peso corporal) associado a ipilimumabe (1 mg por quilograma) por via intravenosa (IV) a cada 3 semanas até a quarta dose. A seguir, o tratamento será feito com

nivolumabe (3 mg por quilograma) a cada 2 semanas, como proposto na fase 3 do estudo seminal. Os pacientes serão acompanhados quanto ao resultado clínico, ou seja, desenvolvimento de falência ou produção excessiva dos hormônios das diferentes glândulas endócrinas.

## **b. População de estudo**

### i) Linhas gerais

O recrutamento dos pacientes e os Critérios de inclusão serão de responsabilidade do **CLARA TRIAL**, sob responsabilidade do professor Leandro Colli. Resumidamente, pacientes que serão seguidos no HCFMRP-USP cujos **critérios de inclusão** são:

- Paciente com carcinoma de células renais: tumor de células claras confirmado histologicamente;
- Tratamento metastático de primeira linha;
- AJCC Estágio IV com pelo menos uma lesão medida;
- Disponível tecido de tumor primário recém-congelado;
- Sem tratamento prévio com imunoterapia ou com TKI;
- Todos os IMDCs;
- KPS  $\geq$  70;
- Idade maior ou igual a 18 anos.

Os **Critérios de exclusão** são:

- História de uma doença autoimune conhecida ou suspeita;
- Qualquer condição que requeira tratamento sistêmico com corticosteroides;
- Depuração de creatinina  $<$  40mL/min;

- AST ou ALT > 5 x ULN; e Mulheres grávidas.

### **c. Coletas de amostras**

As **coletas de amostras** também serão de responsabilidade do grupo de pesquisadores do **CLARA TRIAL**. No presente subprojeto, conforme a rotina de atendimento, todos os pacientes serão submetidos à avaliação endocrinológica clínica e laboratorial. Utilizaremos as amostras de sangue, soro ou plasma para as dosagens de:

**Avaliação adrenal:** ACTH e cortisol, se necessário teste com cortrosina.

**Avaliação tireoidiana:** TSH e T4L, se necessário, T3, anticorpos anti-peroxidase (TPO) e anti-tireoglobulina (TG) e anti-receptor de TSH (TRAB).

**Avaliação paratireoide:** Calcio, fosforo e PTH

**Avaliação gonadal:** LH, FSH, testosterona ou estradiol

**Avaliação Hipófise:** Prolactina, IGF1, LH, FSH, testosterona ou estradiol, ACTH e cortisol, TSH e T4L e se necessário Ressonância nuclear magnética.

**Avaliação Pâncreas:** glicemia, hemoglobina glicada e se necessário, peptídeo C e insulina, GADA, IA2, IAA.

Todas as dosagens serão realizadas nos laboratórios do HCFMRP-USP. Os níveis de cortisol e testosterona serão medidos por radioimunoensaio, Tiroxina livre (FT4) e o hormônio tireo-estimulante (TSH) serão medidos por quimioluminescência (Immulate, DPC Cirrus Inc. Los Angeles, CA). Os níveis do hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo-estimulante (FSH), prolactina (PRL) e do estradiol serão medidos pelo ensaio imunofluorimétrico (IFMA - DELFIA 80/505 Wallac Oy, Turku, Finland), e níveis de IGF-I serão medidos por ensaio imunoradiométrico (DSL- Diagnostic Systems Laboratories, USA).



#### **d. Considerações éticas**

Este estudo será conduzido de acordo com as Boas Práticas Clínicas (BPC), conforme definido pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) e de acordo com os princípios éticos que regem a regulamentação ética brasileira (Resolução 466). Antes do início do estudo, o protocolo será avaliado pelo IRB local. O estudo será realizado em conformidade com o protocolo. O protocolo, quaisquer emendas e o consentimento receberão avaliação do IRB. Todos os pacientes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) sobre o presente estudo, especificamente para a análise genômica.

A assinatura e guarda do TCLE e a coleta dos dados serão realizados através do REDCap. Cópia impressa será disponibilizada para os participantes. Os medicamentos Ipilimumabe e o Nivolumabe já são aprovados para uso no Brasil e foram doados para o desenvolvimento do projeto CLARA TRIAL.

#### **e. Avaliações do estudo relacionado apenas ao presente projeto**

Os pacientes serão avaliados a cada três semanas por busca ativa no RedCap quanto à resposta hormonal. Ainda, serão realizados exames de imagem: ultrassonografia para avaliação da tireoide e ressonância nuclear magnética de sela túrcica para avaliação da hipófise. Esses exames serão coletados antes do início do tratamento (basal) e após cada ciclo dos medicamentos. Início, após a inscrição no estudo, a cada 3 semanas,

continuando a cada 6 semanas durante 6 meses e, em seguida, a cada 12 semanas até completar um ano.

#### **f. Análise e considerações estatísticas**

Estudo prospectivo qualitativo para caracterizar a prevalência e a incidência clínica e laboratorial dos eventos adversos endócrinos - Hipofisite, Distúrbio da tireoide (doença de Graves, tireoidite e hipotireoidismo, oftalmopatia da tireoide, hipertireoidismo), Insuficiência adrenal primária, diabetes mellitus tipo 1 e outros (hipoparatiroidismo, síndrome de Cushing ACTH-dependente) durante o período de observação dos pacientes sob tratamento com inibidores do checkpoint imunológico. Avaliar a necessidade de intervenção quanto ao início do tratamento da(s) endocrinopatia(s) pela reposição hormonal e/ou a necessidade de modificação da dose/suspensão/descontinuação da droga inibidora do checkpoint imunológico. Avaliar o tempo de recuperação do evento adverso total ou parcial dos eixos hipofisários, a disfunção orgânica contínua/permanente, hospitalização e Mortalidade relacionada aos eventos adversos.

#### **g. Plano de Compartilhamento de Recursos**

O pesquisador responsável está empenhado em compartilhar os dados gerados por este projeto com a comunidade científica. Além da publicação em periódicos revisados por pares, está prevista a apresentação do trabalho em encontros internacionais e nacionais. O pesquisador garantirá que o software criado para este projeto e os dados armazenados no RedCap estarão disponíveis gratuitamente para pesquisadores

biomédicos e educadores do setor sem fins lucrativos, confirmado por meio do lançamento do site no repositório GitHub. Além disso, no que se refere aos recursos experimentais, o pesquisador se compromete a compartilhar os protocolos, procedimentos e ferramentas necessárias à realização dos experimentos realizados neste estudo. No geral, ele está empenhado em promover a colaboração e contribuir para o avanço da ciência.

#### 4. Cronograma

Período	Etapa
Abril - Maio 2022	Revisão bibliográfica
Maio - Junho 2022	Redação do projeto
Maio 2022- abril 2023	Coleta de dados
Junho 2022 -abril 2023	Análise dos resultados
Abril 2022 - maio 2023	Redação da tese e do artigo
Maio 2023	Defesa do MP com a Apresentação do trabalho e do manuscrito para publicação

#### 5. Bibliografia

1. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2015 May 21;372(21):2006–17.
2. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery*. 2018 Aug 16;8(9):1069–86.
3. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, Garje R, Chandra AB. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers*. 2020 Mar 20;12(3):738.
4. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et

al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015 Jun 10;33(17):1889–94.

5. Greenwald, R.J.; Boussiotis, V.A.; Lorusso, R.B.; Abbas, A.K.; Sharpe, A.H. CTLA-4 Regulates Induction of Anergy In Vivo. *Immunity* 2001, 14, 145–155. [CrossRef]

6. Walker, L.S.; Sansom, D.M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, 11, 852–863. [CrossRef] [PubMed]

7. Amarnath, S.; Mangus, C.W.; Wang, J.C.; Wei, F.; He, A.; Kapoor, V.; Foley, J.E.; Massey, P.R.; Felizardo, T.C.; Riley, J.L.; et al. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3, 111ra120. [CrossRef] [PubMed]

8. Francisco, L.M.; Salinas, V.H.; Brown, K.E.; Vanguri, V.K.; Freeman, G.J.; Kuchroo, V.K.; Sharpe, A.H. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 3015–3029. [CrossRef]

9. Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, Flores-Chávez A, Keegan N, Khamashta MA, et al. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):38.

10. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, Atkins MB, Brassil KJ, Caterino JM, et al. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2018;36(17):1714-68.

11. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2018;4(12):1721-8.

12. Fernandes S, Varlamov EV, McCartney S, Fleseriu M. A Novel Etiology of Hypophysitis: Immune Checkpoint Inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020;49(3):387-99.

13. Di Dalmazi G, Ippolito S, Lupi I, Caturegli P. Hypophysitis induced by immune checkpoint inhibitors: a 10-year assessment. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2019;14(6):381-98.

14. Tan MH, Iyengar R, Mizokami-Stout K, Yentz S, MacEachern MP,

Shen LY, et al. Spectrum of immune checkpoint inhibitors-induced endocrinopathies in cancer patients: a scoping review of case reports. Clin Diabetes Endocrinol. 2019;5:1.

15. Faje AT, Lawrence D, Flaherty K, Freedman C, Fadden R, Rubin K, et al. High-dose glucocorticoids for the treatment of ipilimumab-induced hypophysitis is associated with reduced survival in patients with melanoma. Cancer. 2018;124(18):3706-14.

16. Stelmachowska-Banas M, Czajka-Oraniec I. Management of endocrine immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: an updated review. Endocr Connect. 2020;9(10):R207-R28.

17. Iyer PC, Cabanillas ME, Waguespack SG, Hu MI, Thosani S, Lavis VR, et al. Immune-Related Thyroiditis with Immune Checkpoint Inhibitors. Thyroid. 2018;28(10):1243-51.

18. Tsang VHM, McGrath RT, Clifton-Bligh RJ, Scolyer RA, Jakrot V, Guminski AD, et al. Checkpoint Inhibitor-Associated Autoimmune Diabetes Is Distinct From Type 1 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2019;104(11):5499-506.

19. Kotwal A, Haddox C, Block M, Kudva YC. Immune checkpoint inhibitors: an emerging cause of insulin-dependent diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care. 2019;7(1):e000591.

20. Stamatouli AM, Quandt Z, Perdigoto AL, Clark PL, Kluger H, Weiss SA, et al. Collateral Damage: Insulin-Dependent Diabetes Induced With Checkpoint Inhibitors. Diabetes. 2018;67(8):1471-80.

21. Grouthier V, Lebrun-Vignes B, Moey M, Johnson DB, Moslehi JJ, Salem JE, et al. Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Primary Adrenal Insufficiency: WHO VigiBase Report Analysis. Oncologist. 2020;25(8):696-701.

22. Dadu R, Rodgers TE, Trinh VA, Kemp EH, Cubb TD, Patel S, et al. Calcium-sensing receptor autoantibody-mediated hypoparathyroidism associated with immune checkpoint inhibitor therapy: diagnosis and long-term follow-up. J Immunother Cancer. 2020;8(1).

23. Lupi I, Brancatella A, Cetani F, Latrofa F, Kemp EH, Marcocci C. Activating Antibodies to The Calcium-sensing Receptor in Immunotherapy-induced Hypoparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(5).

24. Piranavan P, Li Y, Brown E, Kemp EH, Trivedi N. Immune Checkpoint Inhibitor-Induced Hypoparathyroidism Associated With Calcium-Sensing

Receptor-Activating Autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(2):550-6.

25. Trinh B, Sanchez GO, Herzig P, Laubli H. Inflammation-induced hypoparathyroidism triggered by combination immune checkpoint blockade for melanoma. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):52.

26. Umeguchi H, Takenoshita H, Inoue H, Kurihara Y, Sakaguchi C, Yano S, et al. Autoimmune-Related Primary Hypoparathyroidism Possibly Induced by the Administration of Pembrolizumab: A Case Report. *J Oncol Pract.* 2018;14(7):449-51.

27. Win MA, Thein KZ, Qdaisat A, Yeung SJ. Acute symptomatic hypocalcemia from immune checkpoint therapy-induced hypoparathyroidism. *Am J Emerg Med.* 2017;35(7):1039 e5- e7.

28. Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block C. Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med.* 2009;67(11):376-87.

29. Erichsen MM, Løvås K, Skinningsrud B, Wolff AB, Undlien DE, Svartberg J, et al. Clinical, Immunological, and Genetic Features of Autoimmune Primary Adrenal Insufficiency: Observations from a Norwegian Registry. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2009;94(12):4882-90.

30. Dalin F, Nordling Eriksson G, Dahlqvist P, Hallgren Å, Wahlberg J, Ekwall O, et al. Clinical and Immunological Characteristics of Autoimmune Addison Disease: A Nationwide Swedish Multicenter Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2016;102(2):379-89.