



UNIVERSIDADE D
COIMBRA FACULDADE
DE
MEDICINA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA SOFIA CASTELO BRANCO TEIXEIRA DE CARVALHO

*VÍRUS EPSTEIN-BARR: IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO E
ABORDAGEM TERAPÊUTICA NO CARCINOMA DA NASOFARINGE*

ARTIGO DE REVISÃO
ÁREA CIENTÍFICA DE ONCOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
MESTRE JOÃO EDUARDO CASALTA LOPES
PROFESSOR DOUTOR JOSÉ MANUEL BORGES NASCIMENTO COSTA

Maio, 2020

***Vírus Epstein-Barr: Implicações no Prognóstico e
Abordagem Terapêutica no Carcinoma da Nasofaringe***

Ana Castelo Branco¹; João Casalta-Lopes^{1,2,3}; José Nascimento Costa^{1,3,4}

¹ Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

³ Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra

⁴ Hospital da Luz Coimbra

Maio, 2020

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
ABSTRACT	5
RESUMO	7
INTRODUÇÃO	9
MATERIAIS E MÉTODOS	15
RESULTADOS	17
Caracterização da literatura	17
Valor prognóstico do doseamento de pEBV ao diagnóstico	20
Valor prognóstico do doseamento de pEBV durante o tratamento	24
Valor prognóstico do doseamento de pEBV no término do tratamento	25
Impacto prognóstico de outros biomarcadores no NPC	29
Implicações na abordagem terapêutica da positividade para o pEBV	32
DISCUSSÃO	39
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC — *American Joint Committee on Cancer*
AMPK — *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*
Akt — *protein kinase B*
cChRT — *concomitant chemoradiotherapy*
ChT — *chemotherapy*
CT — *computed tomography*
DFS — *disease free survival*
DMFS — *distant metastasis free survival*
EBNA — *Epstein-Barr nuclear antigen*
EBV — *Epstein-Barr virus; Human herpes virus 4*
EGFR — *epidermal growth factor receptor*
¹⁸F-FDG — *18F-fluorodeoxyglucose*
GTV — *gross tumour volume*
iChT — *induction chemotherapy*
IFN — *interferon*
IMRT — *intensity-modulated radiotherapy*
JAK/STAT — *janus kinase/signal transducers and activators of transcription*
LMP — *latent membrane protein*
MAPK — *mitogen-activated protein kinase*
NCCN — *National Comprehensive Cancer Network*
NK — *natural killer cells*
NPC — *nasopharyngeal cancer*
LRFS — *locoregional recurrence-free survival*
OS — *overall survival*
PCR — *Polymerase Chain Reaction*
PD-1 — *membrane-bound molecular programmed death 1*
pEBV — *plasma Epstein-Barr virus*
PET — *positron emission tomography*
PFS — *progression-free survival*
PI3K — *phosphoinositide 3-kinase*
PK — *protein kinase A*
RT — *radiotherapy*
sPD-1 — *soluble membrane-bound molecular programmed death 1*
TRAIL — *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
Treg — *regulatory T cells*
WHO — *World Health Organization*

ABSTRACT

Background. Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a frequent head and neck malignancy. Its pathology, especially in regions where it is endemic, is strongly linked with the Epstein-Barr virus (EBV) infection. This carcinoma has a very unique presentation because of this etiological connection with the virus. It typically presents in the sixth decade of life and in young adults. Clinically, it is regarded as quite locally invasive, with a relevant potential for distant metastasis. That causes nasopharyngeal carcinoma to have a rather poor prognostic outcome once the diagnosis is postponed. Nonetheless, this neoplasm is very sensitive to chemotherapy and to radiotherapy. As NPC has a very heterogenous presentation, it has become a challenge to assess prognosis and treatment response in these patients.

Purpose. In this review, we aim to understand the prognostic and therapeutic value in titrating EBV in NPC patients.

Methods. It was carried out a research in MEDLINE® with the keywords “nasopharyngeal carcinoma” and “Epstein-Barr virus”, which was narrowed down to comprise only english written articles published in the last five years.

Results. Data regarding patients with EBV related NPC, was gathered from 26 studies. Patients with higher levels of plasmatic EBV (pEBV) have a poorer clinical outcome than those who have undetectable pEBV levels. It was furthermore established its relevance in the management of these patients. Moreover, regarding EBV role on NPC oncogenesis novel treatments with aim at pEBV reduction have also been described.

Conclusion. Including pEBV titration in NPC patient’s assessment might have the potential to stratify patients according to their prognosis and offer better treatment options.

Keywords: Epstein–Barr virus; Oncogenesis; Nasopharyngeal carcinoma; Head and neck cancer; Biomarkers.

RESUMO

Introdução. O carcinoma da nasofaringe (NPC, do inglês *nasopharyngeal carcinoma*) é um dos tumores mais comuns da cabeça e pescoço. Nos locais onde é endêmico, este tumor tem uma relação estreita com a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês Epstein-Barr Virus), o que lhe confere um perfil muito típico. A par da incidência na sexta década de vida, o NPC surge em doentes jovens. Embora apresente boa sensibilidade à radioterapia e à quimioterapia, é clinicamente invasivo e tem um potencial de metastização à distância relevante. Estes fatores conferem a esta neoplasia um prognóstico reservado aquando de diagnóstico tardio. Avaliar o prognóstico e resposta à terapêutica em doentes com NPC é, pela heterogeneidade da doença, um desafio.

Objetivo. Nesta revisão descreve-se o estado da arte sobre as implicações do doseamento plasmático de EBV no prognóstico e tratamento de doentes com carcinoma da nasofaringe.

Métodos. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica na MEDLINE®, com recurso às palavras chave “*nasopharyngeal carcinoma*” e “*Epstein-Barr vírus*”, que foi posteriormente restringida a artigos escritos na língua inglesa e publicados nos últimos cinco anos.

Resultados. Foram incluídos 26 artigos, selecionados de acordo com a sua pertinência, dos quais foi recolhida informação para caracterização deste grupo de doentes. O doseamento de pEBV é um fator de prognóstico relevante no NPC relacionado com o EBV. É também importante na orientação terapêutica, dado que permite estratificar doentes, avaliar a sua resposta ao tratamento e instituir estratégias terapêuticas que o tenham como alvo terapêutico.

Conclusão. Incluir a titulação de pEBV em doentes com carcinoma da nasofaringe pode revelar potencial na estratificação prognóstica dos doentes e na abordagem terapêutica.

Palavras-chave: Vírus Epstein-Barr; Carcinogénese; Carcinoma da nasofaringe; Tumores da cabeça e pescoço; Biomarcadores.

INTRODUÇÃO

O carcinoma da nasofaringe (NPC, do inglês *nasopharyngeal carcinoma*) é um tumor da cabeça e pescoço com marcado tropismo pelas paredes laterais e superior da nasofaringe,¹ que se destaca das restantes neoplasias deste grupo a nível da epidemiologia, história natural e resposta ao tratamento, pela sua relação etiológica com o vírus Epstein-Barr (EBV, do inglês *Epstein-Barr virus*).

O NPC tem marcada prevalência na África subsariana, no sudeste asiático, no sul da China, na Malásia¹⁻³ e em determinadas populações do Ártico (Inuítes) e do Médio Oriente.³ Nestas regiões a sua incidência ultrapassa as 20/100.000 pessoas por ano, incidência 20 vezes superior à da sua forma esporádica.^{1,3}

Em Portugal, o NPC é a trigésima neoplasia maligna mais frequente, com uma incidência de 0,8/100.000 habitantes por ano, sendo responsável por 0,27% das mortes relacionadas com o cancro.⁴

Nas áreas onde é endémico, este herpes vírus representa mais de 97% das causas de NPC.^{2,5} Curiosamente, mais de 90% da população mundial tem uma resposta serológica positiva que confirma que terão tido uma infeção prévia.^{2,6} O padrão de seroconversão, no entanto, difere entre países em desenvolvimento e países desenvolvidos - a maioria das crianças dos primeiros é seropositiva até aos 5 anos, enquanto que nos últimos a seroconversão é mais tardia, já no adulto jovem.⁶ Estas taxas de infeção pelo EBV são explicadas pela sua transmissão através do contacto com secreções respiratórias, com entrada no sistema reticuloendotelial da vias aéreas superiores.⁶

As implicações do *timing* desta infeção prendem-se essencialmente com a clínica da primo-infeção. A infeção na criança tem um curso benigno e frequentemente subclínico, enquanto que no jovem adulto se manifesta com uma clínica clássica de mononucleose infecciosa.^{6,7} A capacidade de estabelecer uma infeção latente após esta primo-infeção caracteriza os vírus da família *herpesviridae*.⁸ Essa particularidade constitui um mecanismo de escape ao sistema imune, que é particularmente relevante nestes doentes. Após a primo-infeção, o EBV permanece latente nas células epiteliais da nasofaringe. Este estágio de latência é promovido pela transcrição do genoma viral, em particular das proteínas latentes de membrana 1 e 2 (LMP1 e 2, do inglês *latent membrane protein 1, 2*) e do antígeno nuclear do EBV (EBNA, do inglês *Epstein-Barr nuclear antigen*),^{3,7} proteínas implicadas na sinalização celular. Considera-se que os NPC associados ao EBV se possam dever numa primeira fase a uma proliferação clonal de células colonizadas com EBV em estado de latência, que depois sofrerá transformação maligna.^{3,9} A presença de transcriptases altera o padrão genético e a expressão génica das células infetadas, o que não só é responsável pelo referido

escape imunológico mas também despoletará mecanismos de oncogénese. Destaca-se a LMP1, principal oncoproteína implicada na carcinogénese pela ativação da via MAPK, PL3K, NFkB e EGFR e no mecanismo de imortalização celular.³ Disto resulta um aumento do potencial de proliferação, de invasão, inibição da apoptose, angiogénese e outras alterações do microambiente, fenómenos que são percussores da transformação maligna.³

A distribuição geográfica dos fenótipos do EBV é explicada pelo *background* genético, por fatores ambientais (clima, malária, etc), pela dieta (peixe salgado) e pela estirpe de EBV.

A sequenciação do EBV revelou que existem várias estirpes, com uma distribuição característica pelo globo, sem que, no entanto, esteja provada uma associação das estirpes relacionadas ao NPC e a outros tumores relacionados com o EBV nas zonas onde estes são endémicos.

As variantes do EBV mais importantes são a tipo 1 (tipo A) e tipo 2 (tipo B). A tipo 1 é a mais prevalente no mundo e a tipo 2 em África subsariana. A sua diferença traduz-se em transformações no gene EBNA2 que aparenta contribuir para a eficácia da transformação maligna mediada pelo EBV. São porém as diferenças funcionais entre as 6 variantes da LMP1, que mais provavelmente concorrem para os diferentes fenótipos virais. No entanto, a identificação destes EBV de maior risco é difícil porque há múltiplas variantes genéticas implicadas que podem conferir este potencial carcinogénico ao EBV.²

Como o EBV se estabelece antes da transformação maligna, este está clonalmente presente em todas as células tumorais.⁹ Quando uma célula sofre morte celular, quer por apoptose quer por necrose, o DNA do EBV contido nelas extravasa para a circulação sistémica.^{3,10} Estes fragmentos de DNA circulante não encapsulado podem ser quantificados em tempo real com recurso à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).¹¹ A titulação do DNA plasmático do EBV (pEBV, do inglês *plasma Epstein-Barr virus*) demonstrou boa sensibilidade e especificidade na deteção do NPC antes do tratamento³ e poderá ser relevante na descoberta de novas terapêuticas-alvo. Adicionalmente, outras citocinas associadas à infeção poderão ser marcadores de diagnóstico e prognóstico, tais como a interleucina 6 (IL-6, do inglês *interleukin 6*) e o CD40 ligando solúvel plasmático; no entanto não serão tão específicas para o NPC relacionado com o EBV como o pEBV.¹

Relativamente à histopatologia, os NPC classificam-se quanto à presença de queratinização e quanto à sua diferenciação. Segundo a classificação histológica da Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), estes são agrupados em (1) tipo I: carcinoma escamoso bem diferenciado ou queratinizado; (2) tipo II: carcinoma não queratinizado e diferenciado; ou (3) tipo III: carcinoma não queratinizado e

indiferenciado. Os NPC relacionados com o EBV são tipicamente carcinomas não queratinizados e indiferenciados (tipo III WHO).⁹

Os NPC indiferenciados, ao invés dos NPC diferenciados que têm uma apresentação clínica semelhante aos restantes tumores da cabeça e pescoço, são mais sensíveis à quimioterapia (ChT, do inglês *chemotherapy*) e à radioterapia (RT, do inglês *radiotherapy*) e são mais invasivos, o que lhes confere uma tendência para disseminação metastática.^{5,12}

Para avaliar a extensão da doença e estadiar estes doentes recorre-se ao sistema TNM da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). A classificação T refere-se à extensão local da doença, a N à afeção de gânglios linfáticos e a M à presença de metastização à distância (tabela 1).¹³

Tabela 1. Definições da classificação TNM da AJCC. Adaptado da AJCC 8ª edição¹³

Classificação T	Critérios
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário, mas há envolvimento de gânglios cervicais com EBV
Tis	Tumor <i>in situ</i>
T1	Tumor confinado à nasofaringe ou que se estende à orofaringe e/ou cavidade nasal sem envolvimento parafaríngeo
T2	Tumor que se estende ao espaço parafaríngeo e/ou com envolvimento dos tecidos moles adjacentes (músculos pterigóide medial, pterigóide lateral e pré-vertebrais)
T3	Tumor que infiltra estruturas ósseas na base do crânio, vértebras cervicais, estruturas pterigóideas, e/ou seios paranasais
T4	Tumor com extensão intracraniana, envolvimento dos pares cranianos, hipofaringe, órbita, glândula parótida e/ou infiltração extensa dos tecidos moles para além do bordo lateral dos músculos pterigóides laterais
Classificação N	
NX	Os gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Não há evidência de metastização dos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases unilaterais em gânglios linfáticos cervicais e/ou metástases unilaterais ou bilaterais em gânglios linfáticos retrofaríngeos, com comprimento igual ou inferior a 6cm (avaliado na maior dimensão), acima do bordo caudal da cartilagem cricóideia
N2	Metástases bilaterais em nódulos cervicais, com comprimento igual ou inferior a 6cm, acima do bordo caudal da cartilagem cricóideia
N3	Metástases unilaterais ou bilaterais em nódulos cervicais, com comprimento superior a 6cm e/ou com extensão inferior ao bordo caudal da cartilagem cricóideia
Classificação M	
cM0	Sem evidência de metastização à distância
cM1	Metastização à distância
pM1	Metastização à distância, confirmada por microscopia

A divisão dos doentes em estádios prognósticos é feita com base nestas três categorias, em estágio I, II, III e IV.

Doentes em estágio I apresentam um tumor confinado à nasofaringe, sem metastização ganglionar ou à distância (T₁ N₀ M₀). São classificados como estágio II os doentes que não foram estadiados como estágio I e cujo tumor se estende ao espaço parafaríngeo e/ou aos tecidos moles circundantes e/ou que tenham invasão ganglionar unilateral de gânglios cervicais ou retrofaríngeos, sem metastização à distância (T₂ N₀ M₀ ou T₀₋₂ N₁ M₀). O estágio III corresponde aos doentes que apresentam doença localmente avançada sem metastização à distância, ou seja, doentes com um tumor que infiltra estruturas ósseas e/ou que tenham metastização ganglionar bilateral (T₃ N₁₋₂ M₀ ou T₀₋₃ N₂ M₀). Por fim os doentes estadiados como IV são os doentes que (A) apresentam doença localmente avançada com invasão intracraniana, da hipofaringe, dos pares cranianos, da órbita ou da glândula parótida, com qualquer estágio de invasão ganglionar (T₄ N₀₋₂ M₀) ou que apresentem adenopatias unilaterais ou bilaterais com tamanhos superior a seis centímetros ou localizados abaixo do bordo inferior da cartilagem cricóide, independentemente da classificação T (T₀₋₄ N₃ M₀) ou (B) que tenham metastização à distância independentemente da classificação T ou N (T₀₋₄ N₀₋₃ M₁).¹³ A correspondência da classificação TNM com cada estágio prognóstico encontra-se mais sucintamente caracterizada na tabela 2.

Tabela 2. Grupos de estadiamento prognóstico da AJCC. Adaptado da AJCC 8ª edição¹³

Estádio	Classificação TNM
I	T ₁ N ₀ M ₀
II	T ₂ N ₀ M ₀
	T ₀₋₂ N ₁ M ₀
III	T ₃ N ₁ M ₀
	T ₀₋₃ N ₂ M ₀
IV _A	T ₄ N ₀₋₂ M ₀
	T ₀₋₄ N ₃ M ₀
IV _B	T ₀₋₄ N ₀₋₃ M ₁

Clinicamente, 75-90% dos doentes com NPC têm doença loco-regional à apresentação.³ Desses doentes, 75% apresentam invasão ganglionar (estádio II ou III).^{1,13}

A primeira linha de tratamento para os doentes em estágio I é a RT de intensidade modulada (IMRT, do inglês *intensity-modulated radiotherapy*). No NPC não metastático, a IMRT é geralmente associada a ChT nos doentes em estádios II-IV_A. Opta-se por estes esquemas terapêuticos dado que estes tumores são sensíveis à RT e à ChT e pela sua localização e relações anatómicas são de difícil abordagem cirúrgica. No estágio IV_B está

recomendada a realização de QT paliativa, podendo ser realizada RT paliativa sobre o tumor primário ou as lesões secundárias, dependendo da sintomatologia do doente e do órgão envolvido.^{9,11} Deve ser preferida a IMRT relativamente à RT convencional pelas vantagens que traz no controlo local da doença e pela redução dos efeitos secundários associados à irradiação de estruturas, como as glândulas parótidas e submandibulares, que são mais facilmente poupadas com esta técnica, conferindo melhor qualidade de vida ao doente. Como há geralmente elevada incidência de envolvimento ganglionar sem que haja evidência clínica ou imagiológica está preconizada a irradiação profilática do pescoço. A metastização ganglionar ocorre num padrão cefalo-caudal com afeção por último da fossa supraclavicular, no entanto, estudos randomizados mostram que não há vantagem na irradiação preferencial destas áreas *versus* a irradiação total.

As associações de iChT à RT e de iChT à ChT adjuvante, são ainda tópicos controversos de acordo com Nakanishi e colaboradores, embora as orientações da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) as proponham. O esquema que mais se destaca inclui docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracilo. Por outro lado a ChT adjuvante tem vindo a ser afastada pela sua toxicidade que condiciona a finalização dos tratamentos.

O NPC é o tumor da cabeça e pescoço que tem maior predisposição para a doença à distância, com 4,4-6% dos doentes a terem metastização como forma de apresentação. A incidência de metástases em todos os doentes com NPC é 25-34%, apesar do sucesso da terapêutica do NPC primário.^{9,14} O NPC em estágio IV apresenta um mau prognóstico,^{3,12} com uma sobrevivência global (OS, do inglês *overall survival*) a 5 anos inferior a 10%³, sendo que os doentes que apresentaram metastização *ab initio* (estádio IV_B) têm uma sobrevivência mediana de 10-26 meses,⁹ e os com metastização metácrona de 9,5-15 meses.⁹

Trata-se de uma doença bastante heterogénea, com distribuição etária bimodal com picos nas terceira e na sexta décadas de vida. Sendo o prognóstico reservado aquando de doença avançada, é premente identificar fatores de diagnóstico, de monitorização da resposta ao tratamento e de prognóstico que sejam sensíveis numa fase precoce da doença.^{3,9,10}

Sendo o EBV o principal agente etiológico do NPC é relevante perceber qual é o seu papel na carcinogénese, quais são as implicações da sua quantificação no diagnóstico e estadiamento, tratamento e prognóstico destes doentes, e quais os fármacos que têm o EBV como alvo terapêutico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Com o intuito de identificar artigos que relatem a relação do EBV e os seus mecanismos de carcinogênese no NPC com as implicações diagnósticas e terapêuticas nestes doentes, foi realizada uma pesquisa de literatura recorrendo ao motor de busca PubMed Central®, na base de dados Medline®, e aos termos MeSH® (do inglês *Medical Subject Headings*) *major topics*. A pesquisa regeu-se pela equação de pesquisa “*Nasopharyngeal Neoplasms*”[Majr] AND “*Epstein-Barr Virus Infections*”[Majr]. Os resultados foram limitados, temporalmente, aos anos de 2014 a 2019, e a publicações redigidas em língua inglesa (figura 1).

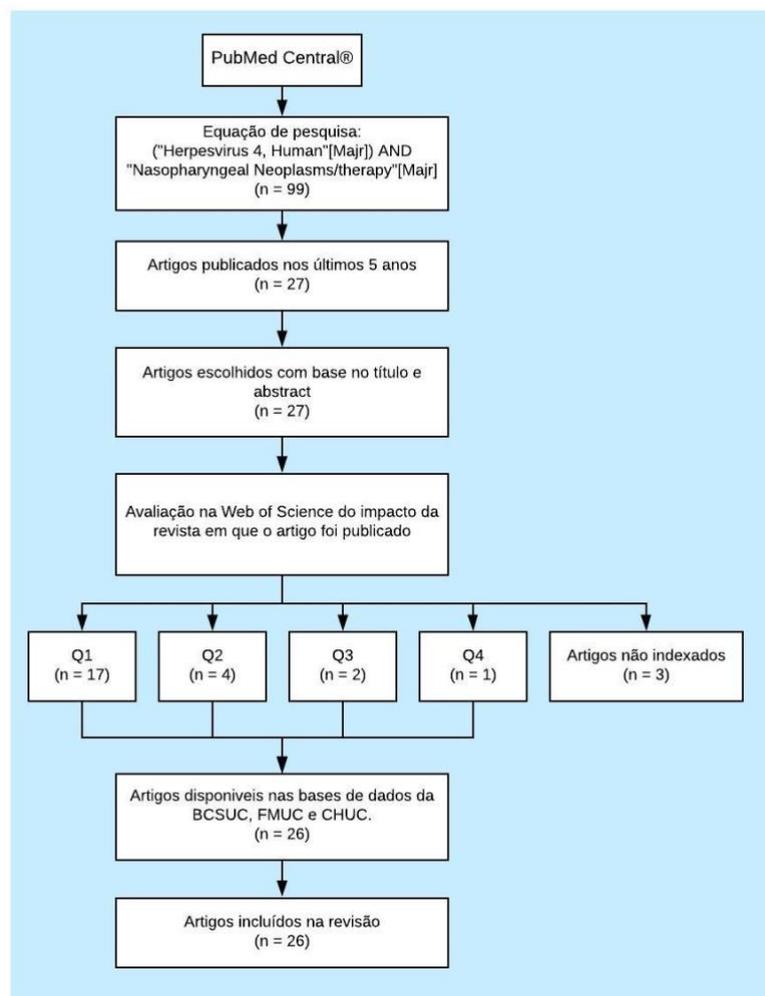


Figura 1. Flowchart com algoritmo de pesquisa e seleção de publicações para inclusão no trabalho.

Q1-Q4: primeiro ao quarto quartis.

Da pesquisa resultaram 27 publicações. Destas foram selecionadas 26 publicações, tendo em conta a disponibilidade nas bases de dados da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Biblioteca das Ciências da Saúde da Universidade de Coimbra e Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra. Os artigos foram selecionados manualmente de acordo com a pertinência do título, resumo e relevância para o trabalho.

Os artigos em questão foram caracterizados quanto ao tipo de estudo, *endpoints* avaliados e características da população em causa (número de doentes, idade, sexo, classificação histológica segundo a WHO, estágio da AJCC).

Foram ainda consultadas fontes bibliográficas constantes das referências dos artigos selecionados, assim como livros e recomendações internacionais relevantes na área científica.

RESULTADOS

Caracterização da literatura

Dos 26 artigos incluídos, foram identificadas três revisões/meta-análises, treze publicações referentes às implicações prognósticas da presença de pEBV em doentes com NPC e dez relativas à abordagem terapêutica nestes doentes. As tabelas 3 e 4 resumem as principais características das publicações implicadas na avaliação prognóstica e terapêutica do pEBV, respetivamente.

Tabela 3. Características dos artigos relacionados com a implicação prognóstica incluídos nesta revisão

Estudo (ano)	Desenho do estudo	Impacto revista	Casos	Controlo	Idade (anos) (%)	Sexo masc. (%)	Classificação histológica OMS (%)	Estádio UICC (%)	Endpoints avaliados
Liu <i>et al</i> (2015) ¹⁵	Coorte prospetivo	Q1	185	NA	—	60,5	II e III	—	PFS
Yang <i>et al</i> (2015) ¹²	Coorte retrospectivo	Q1	1168	756	>45: 46,6	73,4	NA	I: 3,7 II: 15,9 III: 54,6 IV: 25,8	OS, DMFS
Lu <i>et al</i> (2016) ¹⁶	Coorte prospetivo	Q1, Q2	185	NA	>40: 61,7%	73,9	II: 10,6 III: 89,4	I: 3,9 II: 20,6 III: 55,6 IVA: 16,7 IVB: 3,2	OS
Peng <i>et al</i> (2016) ¹¹	Coorte retrospectivo	Q1	584	NA	>50: 30,7%	74,7	I: 6,2 II e III: 93,8	I: 5,8 II: 23,5 III: 48,1 IV: 22,6	DFS, OS, DMFS, LRFS
Wang <i>et al</i> (2016) ¹⁷	Coorte retrospectivo	Q1, Q2	125	NA	48	70,4	I: 0,8 II: 75,2 III: 24	IV: 60,9	OS, LRFS, DMFS
Zhang <i>et al</i> (2016) ¹⁸	Coorte retrospectivo	Q1, Q2	1467	NA	—	71,0	II: 5,12 III: 94,88	I: 4,1 II: 11,8 III: 54,0 IVB: 30,1	OS
Zhang <i>et al</i> (2016) ¹⁹	Coorte	Q1, Q2	266	NA	>50: 27,8%	73,7	II: 4,5 III: 95,5	I: 8,3 II: 22,9 III: 47,7 IV: 21,1	PFS, DMFS, LRFS, OS
Lee <i>et al</i> (2017) ²⁰	Coorte	Q1, Q2	260	NA	53	70,4	—	I: 6,5 II: 14,6 III: 51,9 IVA: 13,5 IVB: 13,5	LRFS, DMFS, DMFS, PFS, CSS, OS
Chen <i>et al</i> (2018) ²¹	Coorte	Q2	385	NA	>45: 55,8%	30,1	II: 1 III: 99	II: 100	PFS
Huang <i>et al</i> (2019) ¹⁰	Coorte retrospectivo	Q1	278	NA	>50: 27,7%	78,8	II: 1,1 III: 98,9	III: 36,7 IV: 63,3	Carga viral pós-RT, OS, DMFS, DFS, LRFS
Ruan <i>et al</i> (2019) ¹	Caso-controlo	Q2	37	40	53 – 50	67,5 – 60	—	I: 8,1 II: 35,1 III: 45,9 IV: 10,8	Alterações das citocinas e EBV pós IMRT
Zhang <i>et al</i> (2019) ²²	Coorte	Q1	3269	NA	45	73,7	—	—	DFS, OS, DMFS, LRFS
Chen <i>et al</i> (2019) ²³	Coorte	Q2	37	40	53 – 50	67,5 – 57,5	I: 8,1 II e III: 83,8	I e II: 43,2 III e IV: 56,8	relação EBV e número de CD8+PD1+ e Treg

DFS: sobrevivência livre de doença; DMFS: sobrevivência livre de metastização à distância; LRFS: sobrevivência livre de doença locorregional; NA: não avaliado; OS: sobrevivência global; PFS: sobrevivência livre de progressão; Q1-Q4: primeiro ao quarto quartis; Tipo I: carcinoma escamoso bem diferenciado; Tipo II: não queratinizado, diferenciado; Tipo III: não queratinizado, indiferenciado; — : não descrito.

No que toca ao valor prognóstico (tabela 3), os autores focam-se primariamente na caracterização de marcadores de sobrevivência em dois tempos da doença: ao diagnóstico e após o tratamento, seja ele RT, ChT ou ambos. Complementarmente, algumas publicações

mencionam de forma breve o impacto do doseamento de pEBV durante o tratamento, no entanto, nenhum grupo de autores aprofunda este tópico.

Para além do pEBV, também outros fatores, tais como a carga tumoral e proteínas solúveis de *checkpoints* foram caracterizados pelo seu claro valor prognóstico e pela sua possível relação com o pEBV.

Os referidos estudos que avaliam o impacto prognóstico são na sua maioria estudos de coorte e avaliam padrões de sobrevivência de doentes nos vários estádios da doença. Apenas três estudos se cingem à avaliação de doentes num único estádio prognóstico. Uma dessas publicações colocou enfoque nos doentes em estádio II que, por pertencerem a um subgrupo de doentes com uma resposta à terapêutica mais heterogénea, beneficiam de fatores de estratificação adicionais. Os outros dois grupos avaliam apenas doentes em estádios avançados.

Quando à distribuição de género, com excepção de uma publicação, a doença é mais comum no sexo masculino, o que corrobora a tendência epidemiológica. É transversal nas publicações estudadas que a classificação histológica predominante seja o carcinoma não queratinizado indiferenciado, tipo III da WHO.

O valor do pEBV no tratamento prende-se com a resposta destes doentes à terapêutica instituída e com a possibilidade de adaptação de regimes terapêuticos e de criação de novas terapêuticas-alvo. Assim sendo, as publicações referentes aos mesmos são bastante mais heterogéneas (tabela 4).

Tabela 4. Características dos artigos relacionados com a implicação terapêutica incluídos nesta revisão

Estudo (ano)	Desenho do estudo	Impacto revista	Casos	Idade (anos)	Sexo masc. (%)	Classificação histológica OMS (%)	Estádio UICC (%)
Hsu <i>et al</i> (2015) ²⁴	Experimental: <i>in vivo</i> + <i>in vitro</i>	Q1, Q2	NA	NA	NA	NA	NA
Stroker <i>et al</i> (2015) ⁹	Estudo fase I/II	Q2	8	>50: 62,5%	87,5	—	III: 25 IVA: 35,5 IVB: :37,5 NA
Lu <i>et al</i> (2016) ²⁵	Experimental: <i>in vivo</i> + <i>in vitro</i>	Q1	NA	NA	NA	NA	NA
Wu <i>et al</i> (2016) ²⁶	Experimental: <i>in vivo</i> + <i>in vitro</i>	Q1	NA	NA	NA	NA	NA
Hung <i>et al</i> (2017) ²⁷	Coorte retrospectivo	Q3	41	47	63,4	I: 4,8 II: 9,8 III: 85,4	IV: 100
Chen <i>et al</i> (2018) ²⁸	Coorte prospetivo	Q1	59	>55: 23,7%	69,5	—	II/III: 50,8 IV: 49,1
Ma <i>et al</i> (2018) ²⁹	Coorte prospetivo	NI	58	50	82,8	II: III:	IV: 43,1 IVB/recorrente: 56,9
Zhang <i>et al</i> (2018) ³⁰	Coorte retrospectivo	Q3	6218	45	65,03	—	—
Zhang <i>et al</i> (2018) ³¹	Experimental <i>in vitro</i> + <i>in vivo</i>	Q1, Q2	NA	NA	NA	NA	NA
Makowska <i>et al</i> (2019) ³²	Experimental <i>in vitro</i> + <i>in vivo</i>	Q1	2	18	0	—	II: 50 III: 50

DMFS: sobrevivência livre de metastização à distância; LRFS: sobrevivência livre de doença locorregional; NA: não avaliado; NI: não indexado; OS: sobrevivência global; PFS: sobrevivência livre de progressão; Q1-Q4: primeiro ao quarto quartis; Tipo I: carcinoma escamoso bem diferenciado; Tipo II: não queratinizado, diferenciado; Tipo III: não queratinizado, indiferenciado; —: não descrito.

A avaliação da resposta à terapêutica é feita, à semelhança dos estudos prévios, num desenho de estudo tipo coorte, no qual as características dos doentes se assemelham às supracitadas. No entanto, quando são referentes a novas hipóteses terapêuticas, os autores trabalham essencialmente com modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Apenas uma publicação incluída é um estudo de fase I/II, que inclui poucos doentes, pelo que a caracterização da sua população está sujeita a viés.

Valor prognóstico do doseamento de pEBV ao diagnóstico

A avaliação do valor prognóstico do pEBV engloba a avaliação, nos diversos momentos do acompanhamento do doente, da correlação dos seus níveis plasmáticos com a OS, a sobrevivência livre de doença (DFS, do inglês *disease free survival*), a sobrevivência livre de progressão de doença (PFS, do inglês *progression free survival*), a sobrevivência livre de doença locorregional (LRFS, do inglês *locoregional relapse free disease*), a sobrevivência livre de doença metastática (DMFS, do inglês, *distant metastasis free survival*) e/ou a sobrevivência específica da doença (CSS, do inglês *cancer specific survival*).

É consensual que o pEBV tem um valor prognóstico inigualável no NPC, esta é uma premissa incontestável para a grande maioria dos autores, apesar da falta de normalização da metodologia laboratorial para doseamento, que torna os pontos de corte díspares entre estudos e, como tal, a comparação de resultados difícil. Nakanishi e colaboradores reiteram isso mesmo numa revisão narrativa que refere que a carga viral de pEBV reflete a carga tumoral e está relacionada positivamente com o estágio do doente.⁵

Numa meta-análise de 2017 este papel é ainda mais reforçado. Liu e colaboradores incluíram 16 estudos que correlacionam os níveis de pEBV antes do tratamento com o prognóstico destes doentes, concluindo que o doseamento deste biomarcador está fortemente associado com o aumento do risco de recidiva ou recorrência da doença, com a progressão da doença e com a metastização, o que se traduz num maior risco de morte. Apesar de haver algumas lacunas, como, por exemplo, não se verificar haver correlação entre o pEBV antes do tratamento e a falência locorregional, enfatizam que a relação entre a carga viral e a sobrevivência global é extremamente robusta, o que faz do pEBV um excelente indicador de prognóstico em doentes com NPC.³ Adicionalmente, os autores reforçam que estes achados são congruentes com os de outras publicações, nomeadamente de Zhang e colaboradores, que numa meta-análise de 2015, mostram que o aumento no título de EBV e a redução da depuração do mesmo estava associado a pior OS.³³

Em estudos caso-controlo, nos quais doentes com NPC são comparados com indivíduos saudáveis, notou-se que o pEBV se encontra significativamente mais elevado no grupo de doentes do que no de controlos.^{1,23} De facto, no âmbito de avaliar o pEBV e proteínas de *checkpoints* solúveis após IMRT definitiva, Ruan e colaboradores incluíram 37 doentes e 40 controlos e perceberam que o pEBV estava particularmente aumentado antes do tratamento e nos indivíduos com NPC.¹ Também, Chen e colaboradores verificaram que a concentração de pEBV estava claramente aumentada nos 37 casos, relativamente aos 40 controlos estudados.²³

Este aumento da virémia acompanha o diagnóstico de NPC em cerca de 77,7% dos doentes. Quem relatou este achado foram Peng e colaboradores, que avaliaram os níveis de pEBV ao diagnóstico e ao primeiro mês após IMRT em 584 doentes com diagnóstico inaugural de NPC. Constatou-se também que o pEBV pré-IMRT está fortemente associado à classificação T, não tendo, porém, capacidade de destrinçar entre doentes que virão a desenvolver recidiva loco-regional ou metastização.¹¹

Entre os *endpoints* avaliados nos diversos estudos revistos, o doseamento de pEBV mostrou ser fator de prognóstico independente para a PFS, LRFS e DMFS a 3 anos^{10,21} e para a OS, PFS, LRFS e DMFS a 5 anos.¹⁸ Na coorte estudada, Huang e colaboradores revelam que doseamentos de pEBV iguais ou superiores a 7000 cópias/mL estão associados a pior DFS a 3 anos (77,9% vs. 88,6%), mas não a pior OS ou LRFS.¹⁰ Também Chen e colaboradores, numa coorte constituída apenas por doentes em estágio II, referem que o níveis positivos de pEBV antes do tratamento resultam em redução da LRFS (94,3% vs. 98,2%), da DMFS (94,2% vs. 98,6%) e, mais marcadamente, da PFS (89,1% vs. 96,4%) a 3 anos.²¹ Para estudar a hipótese de utilizar o pEBV para aperfeiçoar o estadiamento TNM, Zhang verificou da mesma forma que valores de pEBV > 4000 cópias/mL antes do tratamento se traduzem numa diminuição da OS (78,1% vs. 94,8%), da PFS (68,9% vs. 88,5%), da DMFS (77,7% vs. 93,7%) e da LRFS (88,6% vs. 94,8%) a 5 anos (tabela 5).¹⁸

Chen e colaboradores, inferem que esta relação estreita verificada entre o pEBV e os marcadores de avaliação prognóstica deve-se por um lado à sua associação com o estadiamento T e por outro à íntima relação que os níveis de pEBV têm com a invasão faríngea, ganglionar e do espaço retrofaríngeo.²¹

Tabela 5. Impacto do doseamento de pEBV ao diagnóstico

	OS (%)		DFS (%)		DMFS (%)		LRFS (%)		PFS (%)	
	pEBV reduzido*	pEBV elevado*								
Huang et al (2019) ¹⁰	—	—	88,6	77,9	—	—	—	—	—	—
Chen et al (2018) ²¹	—	—	—	—	98,6	94,2	98,6	94,3	96,4	89,1
Zhang et al (2016) ¹⁸	94,8	78,1	—	—	93,7	77,7	94,8	88,6	88,5	68,9

* O valor de pEBV é elevado ou reduzido consoante o cut-off utilizado pelos autores. Para Huang *et al* (2019) são 7000 cópias/mL, para Chen *et al* (2018) são 0 cópias/mL e para Zhang *et al* (2016) são 4000 cópias/mL.

DFS: sobrevivência livre de doença; DMFS: sobrevivência livre de metastização à distância; LRFS: sobrevivência livre de doença locorregional; OS: sobrevivência global; PFS: sobrevivência livre de progressão.

Impacto do pEBV no estadiamento TNM

Com base nas orientações atuais, a realização um de estadiamento aos doentes com diagnóstico de NPC, tendo esse por base o estadiamento TNM, proposto pela AJCC (do inglês *American Joint Committee on Cancer*), presentemente na 8ª edição, datada de 2018, é essencial.¹³

Esta avaliação é um pilar na caracterização dos doentes quanto ao seu prognóstico e na orientação da terapêutica. No entanto, tem-se reportado variabilidade na resposta ao tratamento de doentes no mesmo estágio TNM, pelo que é crucial perceber que outros fatores de prognóstico podem ser utilizados para a aprimorar.^{34,35}

Zhang e colaboradores categorizaram, de acordo com os níveis de pEBV ao diagnóstico, os doentes em de alto ou de baixo risco. Avaliada retrospectivamente a repercussão da presença de pEBV na OS, verificou-se que a diferença entre os dois grupos foi significativa, com valores de OS a 5 anos de 94,8% e de 78,1%, respetivamente. Ao demonstrarem, em concordância com estudos previamente citados,^{1,11,17,18,21} que o doseamento do pEBV antes do tratamento é um fator independente de prognóstico, que inclusivamente se sobrepõe ao estadiamento TNM, realçam a necessidade de reclassificar os doentes, combinando o nível de pEBV e o estadiamento TNM. Os autores sugerem assim segregar os doentes nos grupos (1) muito baixo risco: estágio I; (2) baixo risco: estágio II-IV e níveis baixos de pEBV; (3) risco intermédio: estágio II-III e níveis elevados de pEBV; (4) risco elevado: estágio IV e níveis elevados de pEBV.¹⁸

Impacto do pEBV na elaboração de nomogramas

Os nomogramas são ferramentas que permitem quantificar o risco de um indivíduo, muitas vezes com maior precisão do que a classificação TNM, por incorporarem vários fatores de risco que estão implicados no prognóstico.

Até à proposta de Yang e colaboradores, não havia nomogramas validados que predissessem com precisão a DMFS e OS para doentes com NPC não metastizado após RT. Para o desenvolvimento destes nomogramas foram recolhidos dados demográficos, laboratoriais e clínicos de uma coorte de 1168 doentes. Após a construção do nomograma, uma coorte de 756 doentes com NPC não metastizado foi incluída para validar o modelo proposto. Os autores verificaram que eram fatores de mau prognóstico para a OS a idade avançada, o sexo masculino, ser fumador, lactato desidrogenase elevada, proteína C reativa positiva, doseamento de pEBV elevado, diminuição da albuminémia, títulos elevados de imunoglobulina A anti-EBV precoce e estádios T e N avançados. Já os fatores de mau prognóstico para a DMFS incluíam género, LDH, PCR, pEBV, estágio T e estágio N.¹²

Todas as variáveis de relevo foram introduzidas num modelo de regressão de Cox, que relevou que a idade, género, LDH, PCR, pEBV, estágio T e estágio N são fatores independentes de prognóstico para o NPC. Curiosamente, o estadiamento N mostrou ser o fator de prognóstico mais relevante para a predição da OS e da DMFS.¹²

A cada uma destas variáveis foi atribuído um score consoante os coeficientes resultantes do modelo Cox e os doentes foram estratificados em três subgrupos de risco com prognósticos bem distintos, representados nos nomogramas da figura 2. A OS estimada a 5 anos foi para os doentes de baixo risco de 96,2% e 94,3%, para os doentes de risco intermédio de 87,7% e 84,4% e para os de alto risco de 66,8% e 69,5%, para as coortes de treino e de validação respetivamente. Relativamente à DMFS a 5 anos, foi para o grupo de baixo risco 95,3% e 92,4%, para os de risco intermédio 87,4% e 85,0% e para os de alto risco 73,0% e 69,8%, nas coortes de treino e validação respetivamente.¹²

Apesar das suas limitações, nomeadamente a inclusão de apenas fatores de prognóstico clínicos e laboratoriais, este foi o primeiro estudo a incorporar o pEBV num modelo prognóstico (figura 2).

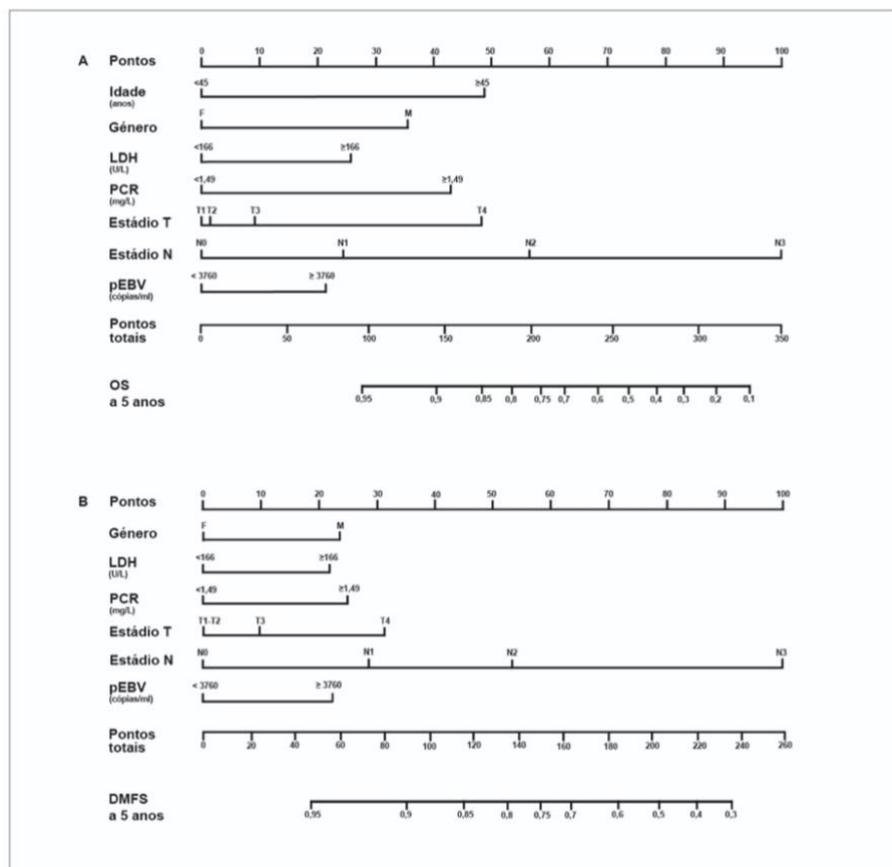


Figura 2. Nomogramas de doentes com NP não metastático após RT para a OS (A) e DMFS (B) a 5 anos. Adaptado de Yang *et al* (2015)¹²

DMFS: sobrevivência livre de metastização à distância; F: feminino; LDH: lactato desidrogenase; M: masculino; OS: sobrevivência global; PCR: proteína C reativa; pEBV: EBV plasmático.

Valor prognóstico do doseamento de pEBV durante o tratamento

Mostrou-se rara a pertinência da avaliação do pEBV no curso do tratamento, uma vez que é expectável que haja uma flutuação do valor de pEBV com a agressão das células tumorais e consequente extravasamento do seu conteúdo.³⁶

Num estudo cujo objetivo primário era a avaliação da resposta à radioquimioterapia concomitante (cChRT, do inglês *concomitant chemoradiotherapy*), foi também doseado o pEBV durante o curso de tratamento. Neste, os autores referem que a manutenção de doseamento elevado de pEBV durante o tratamento prediz pior OS [HR (do inglês, *Hazard Ratio*) 4,173, $p < 0,001$],²⁸ à semelhança do que tinha sido previsto por He e colaboradores.³⁶ Nesta coorte composta por 949 doentes, os autores estudaram as variações dinâmicas do pEBV, e verificaram que doentes com pEBV > 871 cópias/mL durante o tratamento tiveram pior OS, DMFS e PFS. Este efeito é ainda mais notório nos doentes com NPC avançado, nos quais elevação do pEBV durante o tratamento está mais associado a falência à distância e redução da PFS e OS.³⁶

Adicionalmente, Kim e colaboradores relevaram numa revisão narrativa que, pelo seu valor prognóstico, o pEBV doseado durante o tratamento permite adequar a terapêutica com iChT, descalando ou aumentando a intensidade da terapêutica consoante os títulos de pEBV. Advertem, no entanto, que os dados a este respeito são raros e de difícil interpretação. Adicionalmente referem que doentes com metastização à distância cujo pEBV foi reduzido significativamente durante a RT apresentam melhor prognóstico.³⁷

Valor prognóstico do doseamento de pEBV no término do tratamento

Zhang e colaboradores avaliaram o significado dos padrões de pEBV, com particular ênfase nos primeiros três meses após a terapêutica médica, numa coorte de 266 doentes com NPC não metastático.¹⁹ Os doentes foram submetidos a IMRT quando em estágio I e IMRT associada a ChT quando se encontravam em estádios mais avançados. Os autores verificaram que apenas 7% dos doentes apresentavam doseamentos de pEBV positivos no término do esquema terapêutico, valor esse concordante com os 8,5% que Peng e colaboradores evidenciaram.¹¹ Este valor cai para 5% dos doentes na avaliação dos três meses. Tanto o doseamento de pEBV imediatamente após tratamento como aos três meses, revelaram ser fatores de prognóstico independentes para a DFS e DMFS. Adicionalmente, a presença de pEBV aos 3 meses mostrou uma correlação significativa com pior DFS (16,7% vs. 93,5%), OS (65,5 vs. 97,3%) e LRFS (62,2% vs. 94,4%) a 3 anos (tabela 6).¹⁹

Tabela 6. Impacto do doseamento de pEBV no fim do tratamento

	OS (%)			DFS (%)			DMFS (%)			LRFS (%)		
	pEBV = 0*	pEBV > 0*	remissão de pEBV	pEBV = 0*	pEBV > 0*	remissão de pEBV	pEBV = 0*	pEBV > 0*	remissão de pEBV	pEBV = 0*	pEBV > 0*	remissão de pEBV
Zhang et al (2016)	97,3	65,5		93,5	16,7	—	92,5	38,1	—	94,4	62,2	—
Zhang et al (2019)	94,0	69,0	79,1	87,1	49,2	55,1	92,0	58,9	68,4	94,3	85,9	—

* Cópias/mL.

DFS: sobrevivência livre de doença; DMFS: sobrevivência livre de metastização à distância; LRFS: sobrevivência livre de doença locorregional; OS: sobrevivência global

Os doentes que entraram em remissão tardia de pEBV tiveram um prognóstico significativamente pior do que doentes com EBV indetetável.^{19,22} Desconhece-se qual o mecanismo subjacente à manutenção de valores de pEBV elevados; no entanto os autores sugerem que pode estar relacionado com uma menor sensibilidade à ChT e/ou à RT.¹⁹

Dos doentes que mantêm valores de pEBV persistentemente elevados, um grupo restrito destes doentes entra em remissão espontânea. Com recurso a uma base de dados, Zhang e colaboradores recolheram retrospectivamente dados clínicos de 3269 doentes com NPC, para perceber o prognóstico específico deste subgrupo de doentes.²² Analogamente ao referido previamente, o pEBV imediatamente após o tratamento mostrou ser fator de prognóstico independente para a DFS (49,2% vs. 87,1%), OS (69,0% vs. 94,0%), DMFS (58,9% vs. 92,0%) e LRFS (85,9% vs. 94,2%) a 3 anos. Verificou-se, como expresso na tabela 6, que, no grupo dos doentes com pEBV doseável após a terapêutica, os que entraram em remissão espontânea apresentaram melhores indicadores de prognóstico com DFS de 55,1%

(vs. 87,1%), OS de 79,1% (vs. 94,0%) e DMFS de 68,4% (vs. 92,0%).²² Por outro lado, nos doentes nos quais houve reemergência do pEBV, essa precedeu uma recidiva.¹⁹

Como referido anteriormente, o NPC é um tumor sensível à ChT e à RT. Dependendo do estágio do doente, é definido um esquema terapêutico que tem por base a RT e ao qual em estádios II-IV é adicionada ChT. Deste modo, em estudos futuros poderá ser útil caracterizar o valor prognóstico do pEBV de forma pormenorizada após a estratificação por estádios e por abordagem terapêutica nestes doentes.

Valor prognóstico do pEBV doseado após IMRT

Tal como nos outros intervalos temporais, também para a IMRT se tem estabelecido que a virémia associada ao EBV parece ser um fator de prognóstico independente.^{9,19,21}

Neste âmbito, Peng e colaboradores avaliaram os níveis de pEBV ao diagnóstico e no primeiro mês após IMRT em 584 doentes com diagnóstico inaugural de NPC localizado. Doentes com pEBV doseável após IMRT apresentaram taxas de DFS de 49,9% (vs. 88,5%), OS de 72,1% (vs. 97,5%), LRFS de 86,6% (vs. 94,3%) e DMFS de 60,5% (vs. 93,3%) a 3 anos, valores estes significativamente mais baixos do que os doentes sem pEBV doseável, o que estabelece que o pEBV no primeiro mês de seguimento é preditor de um pior prognóstico.¹¹

Dado que a virémia continua a mudar durante o primeiro trimestre¹⁹ é também importante caracterizar a evolução serológica durante esse período. Wang e colaboradores propuseram-se a caracterizar a evolução a longo prazo do NPC numa coorte de 125 doentes que, apesar de se encontrarem em remissão clínica, mantiveram níveis de pEBV persistentemente elevados. Verificou-se que doentes com ausência de pEBV persistentemente aumentado, ou seja, com níveis de pEBV < 100cópias/mL, apresentavam menor taxa de recidiva, à custa da redução das recidivas à distância, e uma sobrevivência mais prolongada. A diferença nos padrões de sobrevivência e de recidiva entre os dois grupos foi de 27,4% para a DMFS a 5 anos, de 7,9% para a LRFF e de 42,9% para a OS. Adicionalmente, para os autores, o *timing* que é mais informativo na caracterização do prognóstico com base no doseamento de pEBV é o doseamento ao fim da primeira semana após a IMRT.¹⁷

Complementando o estudo supracitado, Lee e colaboradores pretenderam avaliar o prognóstico de doentes não metastizados ao diagnóstico, com doseamentos plasmáticos de EBV consistentemente negativos após RT. Num grupo de 289 doentes foi avaliado o título de pEBV pré-tratamento, às 8 semanas e aos 6 meses após IMRT. Estabeleceu-se que doentes

com pEBV indetetável aquando destes dois *timings* de seguimento apresentavam diferenças significativas na sobrevivência, com LFFS, RFFS, DMFS, PFS, CSS e OS a 3 anos de 95,2%, 96,9%, 91,2%, 88,0%, 95,8% e 93,9% respetivamente. Por outro lado, os autores mencionam que a carga viral aos 6 meses determina o prognóstico com maior valor preditivo do que às 8 semanas.²⁰

Numa revisão narrativa, Kim e colaboradores reiteram a importância do pEBV na monitorização e na prevenção da recidiva, revelando que o pEBV pode prever a recidiva sistémica meses antes da clínica, embora seja de acautelar que há flutuações fisiológicas deste biomarcador.³⁷

Condensando os *endpoints* avaliados pelos diversos autores, concluiu-se que no momento que sucede a IMRT, o pEBV prediz piores DFS, OS, DMFS e LRFS a 3 anos^{19,22} e pior OS a 5 anos, e portanto um biomarcador de prognóstico preciso.¹²

Estes dados, reforçam a necessidade de realizar doseamento do pEBV no fim do tratamento e nos mais variados momentos durante o período de seguimento, já que a carga viral é inconstante e prediz o *outcome* clínico destes doente.

Valor prognóstico do pEBV doseado após ChT

Nos doentes com NPC localmente avançado está preconizada a associação de ChT ao esquema de RT. Esta pode ser de indução (iChT, do inglês *induction chemotherapy*), cChRT ou ChT adjuvante, consoante o momento em que é realizada relativamente à RT.

É premente identificar a população que é sensível à ChT o mais precocemente possível para otimizar o esquema terapêutico destes doentes, e o pEBV poderá ser um bom marcador de resposta ao tratamento.³⁷

Liu e colaboradores avaliaram o valor prognóstico do pEBV e da resposta tumoral após iChT, para perceber quais os doentes que beneficiariam de cChRT. Para tal foi estudada a carga viral em 185 doentes em estágio III e IV, tratados com inicialmente com iChT e depois com cChRT.¹⁵

Uma carga viral de pEBV > 0 cópias/mL após a iChT correlaciona-se de forma significativa com uma menor resposta à ChT. Neste doentes o nível de pEBV após iChT permitiu prever em 75% dos doentes o nível de pEBV após a cChRT, refletindo que em doentes com uma resposta insatisfatória à iChT há uma maior probabilidade de haver doença residual após a cChRT. Adicionalmente doentes com pEBV indetetável tiveram um risco reduzido de progressão da doença e de metastização, com PFS de 71,8% (vs. 85,2%) e

DMFS de 82,5% (vs. 92,3%). O pEBV após a iChT correlaciona-se também com a resposta tumoral após iChT, o que significa que estes dois fatores de risco se complementam na estratificação destes doentes.¹⁵

Mais recentemente, Huang e colaboradores reavaliaram o valor prognóstico do pEBV após a iChT numa coorte de 278 doentes, também estes com doença avançada. Os resultados reforçaram o que já tinha sido mencionado por Liu e colaboradores. O doseamento de pEBV elevado está associado a pior DFS a 3 anos (77,6% vs. 88,6%). Da mesma forma, doentes com pEBV detetável pós iChT têm prognóstico significativamente pior do que doentes com pEBV indoseável (86,4% vs. 93,4%), até porque a positividade deste biomarcador após QT pode traduzir a presença de doença residual.¹⁰

Estes estudos concluem que na fase de tratamento, nomeadamente imediatamente após a iChT, o pEBV é o fator de prognóstico que é mais relevante para o *outcome* clínico independentemente do seu doseamento inicial, da idade, do sexo e do estadiamento TNM,¹⁰ o que prevê que o doseamento deste nesta fase é crucial não só para ajustar a terapêutica como para prever o prognóstico. Comparativamente com pEBV após RT, que é mais específico na predição do prognóstico, o doseamento de pEBV após iChT surge como mais sensível.¹⁰

Impacto prognóstico de outros biomarcadores no NPC

Para além do pEBV, têm sido pesquisados outros biomarcadores que possam ter valor prognóstico. Dentro destes incluem-se o volume tumoral,^{16,21} as proteínas solúveis de *checkpoints* e de citocinas plasmáticas¹ e a contagem de linfócitos T.²³

Relação entre o volume tumoral e o EBV

Embora se atribua a presença de EBV no sangue ao extravasamento do vírus aquando da morte celular tumoral, a relação do pEBV com a carga tumoral permanece uma incógnita, já que nem sempre ocorre aumento do pEBV quando há um grande volume tumoral.¹⁶ O volume tumoral, delineado aquando do planeamento da RT,¹⁶ constitui um fator de prognóstico de extrema relevância, sendo inclusivamente referido por alguns autores como superior ao estadiamento TNM.^{38–40}

Perante estes dados, surgiu a necessidade de perceber qual o papel da carga tumoral enquanto fator prognóstico e se a associação desta com o pEBV traz vantagens relativamente à sua quantificação isoladamente. Em doentes submetidos a IMRT ou a cChT, aquando do planeamento da RT, Lu e colaboradores utilizaram os volumes tumorais macroscópicos (GTV; do inglês *gross tumor volume*) da nasofaringe (GTV_{nx}), das adenopatias (GTV_{nd}) e o total (GTV_{total}) para categorizar os doentes “baixo volume” vs. “alto volume” e “baixo pEBV” vs. “alto pEBV”, posteriormente dividindo-os em grupos de risco.¹⁶ Doentes com baixo nível de pEBV, independentemente da carga tumoral apresentaram OS a 5 anos de 100%, sendo assim classificados como doentes de baixo risco. Doentes com volumes tumorais reduzidos, mas com títulos de pEBV elevados foram identificados como doentes de risco intermédio. Para GTV_{nx} < 20cm³ apresentavam uma OS a 5 anos de 87,8% e para GTV_{nd} < 10cm³ de 72,0%. Por último, doentes com elevada carga tumoral e viral são tidos como doentes de alto risco, pelas OS a 5 anos reduzidas – 61,3% e 66,9% respetivamente. Os autores verificaram que a carga tumoral afeta o prognóstico em particular no subgrupo de doentes com elevada virémia. No entanto, nos doentes com NPC EBV-dependente, não parece existir uma relação direta entre o volume tumoral e a carga viral.¹⁶ Foi possível perceber que para além da relevância já conhecida de cada um destes fatores prognósticos de forma isolada, também a sua associação permite aumentar a precisão do prognóstico, alterando a definição de risco.¹⁶

Como referido anteriormente, dentro do estadiamento TNM, doentes com o mesmo estágio têm *outcomes* diferentes tanto pela evolução da doença como pela resposta à terapêutica. Um dos subgrupos com maior heterogeneidade de resposta ao tratamento é o estágio II que, segundo a 8ª edição da AJCC/IUC, inclui doentes T₂N₀M₀ ou T₀₋₂N₁M₀.

Numa avaliação prospetiva de uma coorte de 385 doentes em estágio II, Chen e colaboradores propuseram-se a avaliar neste grupo restrito qual o impacto do pEBV e do volume tumoral ao diagnóstico na PFS. Quanto ao volume tumoral, ficou estabelecido que doentes com maior carga tumoral apresentavam uma redução da PFS e da LRFS, comparativamente com doentes com GTV_{total} inferiores, concluindo-se que quanto maior o tumor primário antes da abordagem terapêutica maior o risco de recidiva loco-regional. No entanto, não se verificaram diferenças na DMFS e OS entre os dois grupos. Tanto o pEBV como a carga tumoral são fatores de prognóstico independentes para o PFS, LRFS e DMFS em doentes com NPC e ambas as variáveis estão intimamente relacionadas com invasão retrofaríngea, ganglionar e do espaço retrofaríngeo. Curiosamente, o doseamento positivo de pEBV está mais correlacionado com metastização à distância, enquanto que GTV_{total} > 30cm³ se correlaciona mais com a recidiva loco-regional.²¹

Relação entre checkpoints plasmáticos e citocinas e o EBV

Outros fatores de risco que foram avaliados em paralelo com impacto do pEBV no prognóstico incluem os *checkpoints* plasmáticos e citocinas.

Num estudo caso-controlo com doentes tratados com IMRT e pessoas saudáveis, foi avaliada a relação entre concentrações de proteínas de *checkpoint* solúveis, o pEBV e citocinas.¹ Foram estudados o efeito da IMRT em 32 *checkpoints* imunes e citocinas plasmáticas. Antes do tratamento 24 das 32 proteínas plasmáticas avaliadas eram significativamente diferentes no grupo de doentes relativamente ao controlo. Após IMRT, 18 das 24 proteínas alteradas permaneceram diferentes e cinco novas proteínas surgiram alteradas, de notar a IDO (do inglês *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*), TIM-3 (do inglês *T-cell immunoglobulin mucin-3*), IL-4, IL-21, IL-23. Comparando pré-IMRT e pós-IMRT, 13 das 32 proteínas analisadas sofreram alterações alteradas: nove marcadamente reduzidas, nomeadamente interferão gama (IFN- γ , do inglês *interferon gamma*), IL-12p70, IL-1 β , IL-5, IL-6, fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês *tumour necrosis factor*), IL-10, IL-17A e IL-22, e quatro aumentadas, incluindo LAG-3 (do inglês *lymphocyte-activation gene 3*), sPD-1 (do inglês *soluble membrane-bound molecules programmed death 1*), sPD-L1 (do inglês, *soluble programmed death ligand 1*) e TIM-3.¹

Um marcador particularmente elevado neste estudo é o sPD-1. Esta proteína, forma solúvel de PD1, é responsável pela inibição competitiva das proteínas de regulação do PD-1/PD-L1, aumentando assim o mecanismo de escape imune, encontrando-se em valores estáveis em indivíduos saudáveis. Neste estudo, revelou-se que perante o aumento sérico

deste marcador após IMRT, os doentes apresentavam uma sobrevivência aumentada, em concordância com o que já tinha sido demonstrado para outras neoplasias, como o carcinoma de pequenas células do pulmão e o adenocarcinoma do pâncreas, e em modelos murinos do NPC.^{1,41,42}

Chen e colaboradores, também avaliaram a relação entre o número de células CD8+PD+ e o número de linfócitos T reguladores (T_{reg} , do inglês *regulatory T cells*) em doentes com NPC tratados previamente com IMRT. Segundo este estudo caso-controlo, o número de células imunes e a concentração de pEBV estão claramente aumentadas no grupo pré-tratamento relativamente ao grupo controlo. Com a instituição da RT, o número de linfócitos, CD4+, CD8+ e CD9+PD-1+ teve uma redução marcada, com diferentes valores na contagem celular consoante o estadiamento - doentes com estádios III e IV apresentavam um número inferior de TCD4+ e de TCD8+PD1+, pelo que se identificou haver uma relação inversamente proporcional entre as contagens celulares e um pior prognóstico. Concluiu-se que após IMRT há uma redução da expressão de PD-1 e das células T_{reg} , o que sugere que a IMRT consegue reduzir a concentração plasmática de EBV e reverter o estado de anergia das células T, permitindo uma possível reativação do sistema imune.²³

Implicações na abordagem terapêutica da positividade para o pEBV

Valor do pEBV na estratificação dos doentes e na abordagem terapêutica

São vários os autores que já haviam proposto a estratificação de doentes consoante os níveis de pEBV, tendo alguns inclusivamente tecido considerações sobre a orientação destes doentes.

Zhang e colaboradores propõem uma abordagem terapêutica que difere do proposto pela NCCN com a utilização do pEBV associada ao estadiamento TNM: (1) para os doentes de baixo risco (estádios II-IV com níveis baixos de pEBV pré tratamento) está indicada IMRT associada a ChT concomitante; (2) para os doentes de risco intermédio (estádio II-III com níveis elevados de pEBV) recomenda-se uma estratégia terapêutica mais agressiva com cChRT; (3) para os doentes de alto risco (estádio IV com níveis elevados de pEBV) para além das terapêuticas supra mencionadas é sugerida a associação de imunoterapia ou terapêuticas-alvo, a ponderar caso a caso. Sendo o uso da ChT adjuvante controverso, os autores sugerem que a decisão do seu uso seja ponderada individualmente.¹⁸ Ainda, recorrendo ao doseamento de pEBV antes do tratamento, Chen e colaboradores sugerem uma classificação de risco que também tem em conta o volume tumoral avaliado com tomografia de emissão de positrões associada a tomografia computadorizada (PET/CT, do inglês *positron emission tomography integrated with computed tomography*) com ¹⁸F-Fluorodesoxiglucose (¹⁸F-FDG, do inglês *¹⁸F-fluorodeoxyglucose*) para os doentes em estágio II.²⁸

Nos doentes em estágio II a abordagem terapêutica não é consensual. Postula-se o uso de IMRT, no entanto é debatível se o uso de ChT adjuvante traz vantagens na sobrevivência destes doentes, já que de novo se levanta a problemática da tolerabilidade dos doentes a estes esquemas.²¹ Chen e colaboradores sugerem que nos doentes em estágio II com doseamentos elevados de pEBV e com um aumento do volume tumoral avaliado com PET/CT com ¹⁸F-FDG e, portanto, classificados como alto risco, deve ser feita intensificação de RT ao invés de adição de ChT concomitante ou adjuvante ao esquema terapêutico.²⁸

Em doentes com estádios avançados (III e IV) que tenham feito iChT e que mantenham pEBV doseável, que traduz risco aumentado de recidiva, geralmente por metastização, Liu e colaboradores e Huang e colaboradores sugerem que à IMRT se associe tratamento mais intensivo: (1) terapêuticas com agente alvo adicional (e.g. bevacizumab, fármaco anti-VEGF), (2) ChT adjuvante ou (3) imunoterapia.^{10,15}

Para os doentes que não atingem resposta completa após a iChT, estimada através do volume tumoral remanescente, que mais frequentemente experienciam recidiva loco-regional é proposto (1) um esquema de IMRT com doses mais elevadas; (2) o uso de um

segundo anti-tumoral durante a RT (e.g. paclitaxel que é um fármaco radiosensibilizador); (3) administração de inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) durante a cChRT. Nestes doentes, a ChT adjuvante traz uma melhor tolerabilidade e erradicação precoce de micrometástases. Não obstante a estes resultados, permanece para alguns autores²⁸ a dúvida quanto à utilidade da ChT adjuvante.¹⁵

Perante falta de consenso, Wang e colaboradores e Lee e colaboradores focaram-se na compreensão dos benefícios de ChT adjuvante.

Na primeira coorte, são seguidos doentes com pEBV persistentemente elevado após o plano terapêutico. Concluiu-se que tanto a cChRT como a associação cChRT com ChT adjuvante apresentam benefícios relativamente à IMRT isolada. Percebeu-se também que a adição de ChT adjuvante oral metronómica, com ou sem associação a ciclofosfamida, pode reduzir a falência à distância e melhorar o controlo do NPC após RT, pelo que na opinião dos autores, a ChT adjuvante deverá ser reconsiderada individualmente em todos os doentes em estágio III e IV.¹⁷

Por outro lado, Lee e colaboradores, estudaram um grupo de doentes que se mantiveram durante o *follow-up* com pEBV indetectável. Os autores perceberam que em doentes com pEBV elevado apenas na primeira semana após término da IMRT, o esquema de ChT adjuvante que inclui tegafur/uracilo durante 1 ano, acrescenta melhoria da OS e da DFS. Os autores acrescentam que nos doentes nos quais se relate tardiamente pEBV, às 8 semanas após IMRT, ainda será oportuno introduzir ChT adjuvante, no entanto mais estudos terão que ser realizados para poder confirmar esta hipótese.²⁰

Na doença recorrente a deteção precoce permite o sucesso terapêutica de resgate, em particular quando a doença é confinada à nasofaringe. Nestes casos poderá estar indicada a irradiação ou uma abordagem mais invasiva com recurso a cirurgia. A cirurgia pode ser transoral, transmaxilar ou endoscópica. Apesar das grandes desvantagens funcionais associadas à mesma, os doentes intervencionados apresentam melhor controlo local (LRFS de 71%) do que os doentes nos quais se opta pela abordagem conservadora com recurso à RT (LRFS de 38%). Apesar destas opções terapêuticas a maior parte dos doentes apenas vai ser elegível para ChT paliativa.⁵

Nos doentes em cuidados paliativos a caquexia (perda ponderal > 5% ou perda ponderal > 2% em indivíduos com índice de massa corporal < 20kg/m² ou sarcopenia) é um problema comum, em particular em doentes com tumores da cabeça e pescoço que acarretam sintomatologia local que condiciona odinofagia e disfagia. Esta síndrome está associada a uma diminuição da função, redução da tolerância à terapêutica e conseqüentemente uma menor sobrevivência. Dois fármacos que estão indicados na redução da anorexia e da perda

ponderal associada ao tratamento de neoplasias são acetato de megestrol e medroxiprogesterona, ambos análogos de progesterona de administração *per os*.²⁷

Hung e colaboradores apreciaram, num grupo de 41 doentes em cuidados paliativos por NPC avançado não submetidos a ChT paliativa, se a carga viral poderá ser um indicador de que doentes beneficiam desta terapêutica de suporte. Verificou-se um aumento de peso em 80,5% dos doentes após uma toma, uma melhoria do *Performance Status de Karnofsky* em 70% para 80% e uma redução do *score* de dor de forma significativa, com uma diminuição do recurso a opióides de 15%.²⁷

Com o uso de análogos de progesterona o pEBV diminui significativamente: para os doentes que responderam e apresentaram ganho ponderal, o pEBV diminuiu em 51,5% deles; já no grupo que não respondeu à terapêutica, verificou-se o aumento do pEBV em 50% dos doentes. Estes resultados destacam que o doseamento de pEBV pode ser um indicador de benefício do uso destes fármacos em doentes com caquexia e NPC, embora a modificação do pEBV possa estar associada à terapêutica paliativa instituída e não à de suporte.²⁷

Mecanismos de resistência e impacto do pEBV na avaliação da resposta à terapêutica

A proteína de membrana latente 1 (LMP1, do inglês *latent membrane protein 1*) é uma oncoproteína codificada pelo EBV, que tem um papel crucial na iniciação e progressão do NPC. Lu e colaboradores estudaram o papel desta proteína na modulação da resposta ao dano do DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*) e os mecanismos reguladores que originam radiorresistência. A LMP1 tem diversos papéis – (1) é responsável pela ativação de diversas vias de sinalização da oncogénese como a PI3-K/Akt, MAPK e JAK/STAT; (2) modula a resposta DDR ao iniciar a reparação do DNA por diferentes mecanismos (e.g. repressão da via PI3-K/Akt/FOXO3a; reparação mediada pelo p53); (3) altera a capacidade de reparação de *double-strand break* no NPC, o que causa instabilidade.²⁵

Das ações da LMP1, a supressão do DDR pela via da PK/AMPK é um mecanismo que confere radiorresistência no NPC e que foi descrito pela primeira vez pelos autores. Este ganha particular relevo dado que tem potencial para ser um alvo terapêutico nos doentes que desenvolvem resistência à RT, para o qual se indicaria o uso de ativadores da AMPK, como a metformina.²⁵

A resistência à terapêutica traduz-se na sobrevivência destes doentes. A OS a 5 anos para os doentes com remissão após RT ou RT associada a ChT ronda os 65%, pelo que é importante encontrar ferramentas que possam prever uma resposta clínica incompleta à terapêutica.²⁵

O pEBV pré-IMRT e PET/CT com ¹⁸F-FDG são fatores importantes na previsão do prognóstico e a sobrevivência de doentes com NPC. Apesar disso, têm sido utilizados essencialmente como ferramentas diagnósticas.

Dado que a sobrevivência no NPC não está apenas relacionada com fatores de prognóstico pré-tratamento, Chen e colaboradores propuseram-se a determinar a importância destas duas ferramentas na avaliação da resposta ao tratamento em doentes com NPC primário. Dos 60 doentes avaliados prospectivamente, 89,8% atingiram uma resposta completa no término do tratamento. Os fatores que significativamente se associaram a uma remissão incompleta foram a classificação clínica em cT4, uma redução da captação total de ¹⁸F-FDG pela lesão e doseamentos elevados de pEBV durante o tratamento. No entanto, apenas a redução da atividade glicolítica revelou ser um fator de prognóstico independente para obtenção de resposta clínica completa.²⁸

No mesmo âmbito, Ma e colaboradores dedicaram-se a perceber se a associação da depuração de pEBV com a resposta tumoral, avaliada por PET/CT com ¹⁸F-FDG, permitia determinar precocemente a resposta à ChT, especificamente em doentes com NPC avançado

ou recidivante. Verificou-se que os doentes com boa resposta analítica e imagiológica às 4 semanas após o início da ChT apresentavam melhor OS do que a restante amostra. Adicionalmente, evidenciaram que a associação destas duas variáveis tem mais especificidade (95%) para avaliação da resposta à ChT do que a depuração de pEBV (75%) ou a resposta avaliada pela PET/CT com ^{18}F -FDG (90%). No entanto, a PET/CT com ^{18}F -FDG é o método de avaliação de resposta à terapêutica mais sensível.²⁹

Num estudo retrospectivo com 6218 doentes com NPC recém diagnosticado em estágio III-IVa, a receber cChRT associada ou não a iChT, Zhang e colaboradores tentaram perceber com base no pEBV pré-tratamento qual a diferença na sobrevida entre o uso de cChRT ou cChRT com iChT e se o pEBV é um marcador útil para selecionar que doentes beneficiam de iChT. O pEBV revelou ser útil na seleção de doentes para a iChT, dado que apenas em doentes com doseamentos elevados deste biomarcador houve uma diferença significativa entre o esquema de cChRT ou cChRT com iChT – a DFS a 3 anos foi de 74,8% e 78,6%, a OS 87% e 91,4%, a DMFS 82,2% e 86,0% e a LRRFS 91,4% e 90,4%, para cada opção terapêutica respetivamente. Estes dados relevam o quão determinante é a estratificação de doentes com recurso ao doseamento de pEBV.³⁰

Também Huang e colaboradores se propuseram a avaliar o relevo do pEBV numa coorte de 278 doentes com NPC localmente avançado após iChT e após RT. Percebeu-se que o valor de pEBV imediatamente após iChT é preditor do nível pEBV após RT. Assim, o pEBV pós-iChT permite distinguir neste grupo de doentes quais os de baixo risco, ou seja, com pEBV indetetável pós-iChT, que são sensíveis à ChT, e os doentes de alto risco, que são menos sensíveis à ChT, podendo ajudar na escolha terapêutica.¹⁰

EBV como alvo terapêutico

A passagem de fase latente para a fase lítica oferece uma possibilidade para eliminar células com EBV, dado que com a reativação do EBV há produção de partículas imunogênicas que fazem com que o vírus seja mais facilmente detectado pelo sistema imune. As formas fosforiladas dos antivirais utilizados como arma terapêutica, como o ganciclovir podem ser inclusivamente transferidas através de *gap junctions* para células tumorais adjacentes e causar morte celular, num fenómeno denominado de *bystander killing*.²⁴

Esta estratégia, denominada *cytological viral activation therapy* (CVAT) já tinha sido testada em modelos experimentais *in vitro* com esquema triplo de gemcitabina associada a valproato e a ganciclovir, mostrando inibir o crescimento tumoral em NPC. Em estudos realizados em humanos, em que foi aplicado o mesmo esquema terapêutico, este mostrou ser seguro, tolerável e ter efeitos na estabilização da doença e na qualidade de vida, no entanto, com respostas clínicas muito variáveis.⁹

Em xenoenxertos derivados de doentes com NPC, Hsu e colaboradores compararam associações baseadas na gemcitabina, agente muito utilizado em regimes de CVAT. A associação de gemcitabina com ácido valpróico e ganciclovir mostrou superioridade relativamente à associação de gemcitabina com ácido valpróico. O ganciclovir não parece acarretar maior controlo tumoral a nível macroscópico, no entanto, diminui a carga tumoral histologicamente.²⁴

Num ensaio clínico de fase I-II com oito doentes com metastização ou doença localmente avançada, refractários à terapêutica convencional, Stoker e colaboradores testaram a segurança e a eficácia do esquema previamente mencionado. O protocolo inclui seis ciclos com duração de seis semanas cada: três semanas de tratamento seguidas de três semanas de repouso. No 1º e 8º dias foi administrada gemcitabina 1250 mg/kg² iv; adicionalmente foi prescrito do 1º ao 14º dia valproato 12,5 mg/kg id oral e do 8º ao 21º dia ganciclovir 3id 450 mg oral. Os resultados revelaram um tratamento seguro, com reações medicamentosas adversas reversíveis e controláveis, nomeadamente neutropenia. Apesar de ter uma amostra demasiado pequena para prever uma eficácia clínica, os autores descrevem uma OS mediana de 9 meses, com 2dois doentes a apresentar resposta parcial e três doentes com estabilização da evolução. Adicionalmente, tendo em conta que o alvo terapêutico era o EBV, foi avaliada no plasma e na mucosa a sua presença, durante o tratamento. Verificou-se que o aumento de EBV na mucosa precede uma recidiva.⁹ Apesar dos resultados, os autores não referem informação sobre eventual estudo futuro ou sobre uma possível fase III.

Outras armas terapêuticas em estudo pela sua potencial eficácia no NPC são os flavonóides, a luteolina e a baicaleína. O primeiro composto encontra-se presente na nossa

alimentação e é conhecida pela sua capacidade de resgatar radicais livres e induzir a apoptose das células tumorais. Pensa-se que também terá um papel na anti-angiogénese, no processo inflamatório, na regulação de estrogénios e na prevenção da metastização, no entanto a sua atividade anti-viral não está demonstrada. Foi nesse âmbito que Wu e colaboradores decidiram avaliar o papel da luteolina no NPC, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Foi identificado um efeito supressor de carcinogénese no NPC nos modelos animais. Esse efeito anti-carcinogénese deve-se à sua capacidade de não só interromper o ciclo lítico, mas também inibir a entrada do EBV nesse ciclo e por ser capaz de inibir a proliferação celular induzida pela reativação do EBV.²⁶

O outro flavonóide, a baicaleína, é um composto retirado da raiz de *Scutellariae Radix*. Em estudos prévios provou exercer efeitos *in vitro* e *in vivo*, inibindo a oncogénese, o crescimento tumoral e a metastização. O mais interessante deste extrato é ter esta atividade na carcinogénese sem que afete as células saudáveis circundantes, o que lhe confere baixa toxicidade e óptima tolerabilidade. Zhang e colaboradores investigaram também em modelos *in vivo* e *in vitro* o relevo deste composto na atividade do EBV. A baicaleína mostrou inibir a proliferação celular em células com EBV e induzir a apoptose das mesmas de uma forma dependente da dose, devido à diminuição da expressão de EBNA1. No entanto, não tem qualquer efeito na estabilidade desta proteína ou no seu tempo de vida. Posto isto os autores predizem que este composto poderá reduzir o volume tumoral em xenoenxertos de ratinhos com NPC.³¹

Outro fármaco que tem interesse potencial é o interferão. O interferão faz parte dos esquemas de tratamento de manutenção em adolescentes e crianças com NPC, juntamente com a iChT e cChRT. Neste grupo de doentes a adição de interferão- β como terapêutica de manutenção contribuiu para uma baixa taxa de recidiva sistémica e um aumento de mais de 10% nas taxas de sobrevivência a 5 anos, para doentes com doença localizada. Makowska e colaboradores tentaram perceber qual o mecanismo subjacente ao efeito na sobrevivência do IFN- β em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Notaram que o IFN- β induz a apoptose em linhas celulares de um xenoenxerto de um doente com NPC. Adicionalmente, quando expostas a esta terapêutica, as células *natural killer* (NK) isoladas de doentes tornam-se mais capazes de lisar células de NPC *in vitro*. Os autores concluíram que no modelo usado, a terapêutica com IFN- β , ao aumentar a expressão de ligando indutor de apoptose relacionado com o fator de necrose tumoral (TRAIL, do inglês *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) nas células NK, aumenta a citotoxicidade das células contra o NPC.³²

DISCUSSÃO

O presente trabalho veio a reforçar o papel do doseamento do pEBV na estratificação prognóstica do NPC, em particular no contexto de diagnóstico e no seguimento destes doentes. Adicionalmente, relevou a importância de reajustar a abordagem terapêutica consoante esta estratificação prognóstica.

Relativamente ao doseamento de pEBV ao diagnóstico, valores elevados do mesmo correlacionaram-se consistentemente com aumento do risco de recidiva e de recorrência e com a progressão da doença e metastização, de forma concordante com o descrito por outros autores, reforçando o valor prognóstico do mesmo.^{1,5,10,11,18,21,23,33} Por ser um fator de prognóstico independente, é inclusivamente sugerido que o seu doseamento seja feito como complemento ao estadiamento da AJCC, permitindo estratificar ainda mais os doentes.¹⁸ Este estadiamento pode ser ainda complementado com o recurso a nomogramas, como o proposto e validado por Yang e colaboradores para doentes com NPC não metastático que integra fatores clínicos e laboratoriais.¹²

No que concerne ao doseamento de pEBV durante o tratamento, seja ele RT e/ou ChT, são escassas as publicações que o mencionam e os resultados são incongruentes entre elas, pelo que será necessária investigação adicional para avaliar a sua relevância e, numa fase posterior, em que momento durante o tratamento este doseamento é mais informativo.^{36,37}

Estabeleceu-se também que o doseamento de pEBV é influenciado pela resposta ao tratamento, sendo que doentes com melhor resposta clínica e imagiológica apresentam títulos mais baixos deste biomarcador, que idealmente serão até indetetáveis.^{10,28,29} O doseamento de pEBV após o tratamento e ao longo do seguimento destes doentes durante os primeiros meses confere vantagens na previsão do *outcome* clínico.^{10,11,15,22} Doentes com doseamentos persistentemente elevados ou com remissão tardia, ao contrário de doentes com pEBV indoseável, têm maior taxa de recidiva e uma sobrevivência diminuída.^{10,15,19,20,22} De facto, a reemergência de pEBV pode até preceder a recidiva clínica por meses e revelar doença residual.^{10,15,19,37} O doseamento de pEBV em vários momentos parece ter valor prognóstico: primeira semana, primeiro mês, às oito semanas e aos três meses; no entanto serão necessários estudos adicionais para comparar estes *timings* e perceber a pertinência clínica de cada um deles.

Para além do pEBV, outros marcadores surgiram na literatura como extensão à capacidade prognóstica do pEBV no NPC. Estes incluem o volume tumoral,^{16,21} os *checkpoints* plasmáticos e citocinas, como o sPD-1, IL4, IL21, IL23, IDO e TIM-3, e a contagem de linfócitos T CD8+PD+.¹ Todos eles parecem ter um valor prognóstico no NPC, no entanto este terá que ser validado com investigação adicional.

Em relação à abordagem terapêutica destes doentes poderá ser relevante complementar o estadiamento da AJCC, que segundo as recomendações da NCCN guia o tratamento, com o doseamento de pEBV.^{12,18,28} Este passo torna-se essencialmente importante em doentes em estágio II, que constituem um grupo bastante heterogéneo no que toca a resposta à terapêutica e ao prognóstico.²¹ Por outro lado, os níveis de pEBV permitem ajustar a terapêutica e prever que doentes beneficiam de descalar ou aumentar a intensidade da ChT.^{18,21,28} Relativamente ao esquema de ChT utilizado nestes doentes, embora o uso de ChT adjuvante no NPC seja controverso, alguns autores defendem que em doentes de maior risco com doseamentos de pEBV elevado após RT ou cChRT, esta poderá trazer benefícios ao doente, mesmo que iniciada tardiamente.^{10,15,17,20} Outro grupo de doentes que poderá beneficiar do doseamento de pEBV são os doentes em cuidados paliativos que sofrem de caquexia, nos quais os níveis deste biomarcador poderão guiar o uso de fármacos anti-anorexiantes. No entanto, investigação adicional terá de ser realizada no sentido de perceber se, de facto, a redução da virémia se deve a estes fármacos de terapêutica de suporte ou à terapêutica paliativa com RT que possa estar a ser feita nestes doentes concomitantemente.²⁷

Essencialmente no contexto na doença avançada, têm surgido opções terapêuticas que têm como alvo a infeção pelo EBV. É de destacar a CVAT com gemcitabina, valproato e ganciclovir que, ao induzir a reativação do EBV, facilita a deteção das células tumorais pelo sistema imune. Apenas duas publicações incluídas nesta revisão investigaram a viabilidade desta estratégia,^{9,24} embora seja um tema recorrente na literatura.^{43,44} Nesta revisão foi ainda incluído o uso de flavonóides e de interferão. Ainda que apresentem resultados relevantes, por ainda se encontrarem numa fase pré-clínica, a sua relevância terá que ser reafirmada com novos estudos. Outra terapêutica que tem revelado resultados promissores no tratamento do NPC é a imunoterapia com linfócitos T citotóxicos específicos do EBV, direcionados às proteínas latentes EBNA1, LMP1 e LMP2. Quando estas proteínas são expressas é desencadeada uma resposta do sistema imune.^{43,44} Os anticorpos anti-CDLA-4 (*cytotoxic t-lymphocyte associated antigen-4*), como o ipilimumab, e anti-PD-1, como o nivolumab, pembrolizumab e cemiplimab, são outros exemplos de fármacos que são amplamente utilizados em diversos tumores sólidos pela sua capacidade de inibir o estado de anergia dos linfócitos T causado pela ação destas duas proteínas no sistema imune.⁴⁵ No entanto, o único fármaco sugerido nas orientações da NCCN para o NPC, apenas referido no subgrupo restrito de doentes com doença metastática ou com recorrência a realizar ChT, é o pemprolizumab.⁴⁶ Como tratamento adjuvante e na prevenção da recorrência têm sido desenvolvidas e testadas vacinas que parecem também ter alguma eficácia no *boosting* do sistema imunitário e na prevenção da recaída.^{47,48}

O presente trabalho está sujeito a algumas limitações, em grande parte inerentes à metodologia de pesquisa. A pesquisa realizada realçou diversas publicações recentes e relevantes sobre o valor prognóstico do pEBV. A única ressalva a fazer sobre os resultados dos diferentes autores é que estes carecem de metodologias uniformizadas, pelo que os valores de pEBV utilizados como *cut-off* para avaliação prognóstica são muito díspares, tal como os *endpoints* avaliados. Nos referidos estudos as amostras de doentes são representativas com doentes em vários estádios, no entanto seria útil no futuro perceber em que subgrupos prognósticos é que o doseamento de pEBV é mais útil. As publicações incluídas cujo âmbito reside na estratificação dos doentes com base neste biomarcador apresentam resultados relevantes e concordantes entre elas. Por outro lado, as publicações obtidas sobre as terapêuticas-alvo são escassas, desconexas e incluem essencialmente estudos de tipo experimental, o que permite apenas fazer uma menção às mesmas sem que se possam inferir conclusões robustas sobre a segurança ou eficácia das mesmas.

Assim sendo, torna-se crucial investigar estratégias que tenham o mecanismo do EBV em consideração, pelo benefício prognóstico que é conferido aos doentes que são tratados em função disso.

CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu realçar o valor prognóstico do doseamento plasmático do EBV em doentes com NPC associado ao EBV, nomeadamente no NPC endémico. Embora já se encontre bem estabelecido o valor prognóstico do pEBV ao diagnóstico e após o tratamento, este ainda não está incluído nas recomendações mais recentes de abordagem ao doente com NPC. Apesar disso, o doseamento de pEBV deverá ser ponderado na prática clínica para estratificação dos doentes e orientação terapêutica. Futuramente, ensaios clínicos serão necessários para individualizar a terapêutica com base no pEBV e para avaliar a eficácia e segurança dos alvos terapêuticos que têm surgido nos últimos anos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais. As palavras de incentivo e carinho.

À minha irmã. A minha confidente de longa data.

Aos avós, tios e primos. Os ensinamentos, o orgulho e a amizade.

Ao Zé. A espera incansável e paz de espírito.

Aos amigos. O companheirismo e as memórias.

Ao Mushu e à Clio. O ronron ternurento.

Ao Dr. João Casalta. A motivação, a disponibilidade e a exigência.

Ao Professor Doutor Nascimento Costa. O rigor científico.

REFERÊNCIAS

1. Ruan Y, Hu W, Li W, Lu H, Gu H, Zhang Y, et al. Analysis of Plasma EBV-DNA and Soluble Checkpoint Proteins in Nasopharyngeal Carcinoma Patients after Definitive Intensity-Modulated Radiotherapy. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3939720.
2. Kanda T, Yajima M, Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2019 Apr 21 [cited 2020 Jan 28];110(4):1132–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cas.13954>
3. Liu TB, Zheng ZH, Pan J, Pan LL, Chen LH. Prognostic role of plasma Epstein-Barr virus DNA load for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Clin Investig Med*. 2017;40(1):E1–12.
4. The Global Cancer Observatory. Portugal cancer fact sheet [Internet]. 2018 [cited 2020 May 3]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
5. Nakanishi Y, Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Sugimoto H, Hatano M, et al. Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017 Sep 1;36(3):435–47.
6. Nowalk A, Green M. Epstein-Barr Virus Background and Clinical Information. 2016 [cited 2020 Jan 28]; Available from: www.asmscience.org
7. Stephen N.J. Korsman WP. Epstein-Barr Virus - an overview | ScienceDirect Topics. In: *Virology* [Internet]. 2012 [cited 2020 Jan 23]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/epstein-barr-virus>
8. Hammerschmidt W. The Epigenetic Life Cycle of Epstein–Barr Virus. In: Münz C, editor. *Epstein Barr Virus Volume 1, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. p. 103–17.
9. Stoker SD, Novalić Z, Wildeman MA, Huitema ADR, Verkuijlen SAWM, Juwana H, et al. Epstein–Barr virus-targeted therapy in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Apr 29;141(10):1845–57.
10. Huang CL, Sun ZQ, Guo R, Liu X, Mao YP, Peng H, et al. Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load After Induction Chemotherapy Predicts Outcome in Locoregionally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2019 Jun 1;104(2):355–61.
11. Peng H, Guo R, Chen L, Zhang Y, Li WF, Mao YP, et al. Prognostic Impact of Plasma Epstein-Barr Virus DNA in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma Treated using Intensity-Modulated Radiation Therapy. *Sci Rep*. 2016;6(22000).
12. Yang L, Hong S, Wang Y, Chen H, Liang S, Peng P, et al. Development and External Validation of Nomograms for Predicting Survival in Nasopharyngeal Carcinoma Patients after Definitive Radiotherapy. *Sci Rep*. 2015 Oct 26;5(15638).
13. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK et al. AJCC Cancer Staging Form Supplement. In: *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. 8th editio. Springer International

Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017 [cited 2020 Feb 9]. p. 17–20. Available from: www.cancerstaging.orgajcc@facs.org

14. Chen MY, Jiang R, Guo L, Zou X, Liu Q, Sun R, et al. Locoregional radiotherapy in patients with distant metastases of nasopharyngeal carcinoma at diagnosis. *Chin J Cancer*. 2013;32(11):604–13.
15. Liu LT, Tang LQ, Chen QY, Lu Z, Guo SS, Guo L, et al. The Prognostic Value of Plasma Epstein-Barr Viral DNA and Tumor Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Advanced-Stage Nasopharyngeal Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;93(4):862–9.
16. Lu L, Li J, Zhao C, Xue W, Han F, Tao T, et al. Prognostic efficacy of combining tumor volume with Epstein-Barr virus DNA in patients treated with intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2016 Sep 1;60:18–24.
17. Wang WY, Lin TY, Twu CW, Tsou HH, Lin PJ, Liu YC, et al. Long-term clinical outcome in nasopharyngeal carcinoma patients with post-radiation persistently detectable plasma EBV DNA. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42608–16.
18. Zhang L, Tang LQ, Chen QY, Liu H, Guo SS, Liu LT, et al. Plasma Epstein-Barr viral DNA complements TNM classification of nasopharyngeal carcinoma in the era of intensity-modulated radiotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(5):6221–30.
19. Zhang Y, Li WF, Mao YP, Guo R, Tang LL, Peng H, et al. Risk stratification based on change in plasma Epstein-Barr virus DNA load after treatment in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(8):9576–85.
20. Lee VHF, Kwong DLW, Leung TW, Choi CW, Lai V, Ng L, et al. Prognostication of serial post-intensity-modulated radiation therapy undetectable plasma EBV DNA for nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(3):5292–308.
21. Chen QY, Guo SY, Tang LQ, Lu TY, Chen BL, Zhong QY, et al. Combination of tumor volume and epstein-barr virus dna improved prognostic stratification of stage II nasopharyngeal carcinoma in the intensity modulated radiotherapy era: A large-scale cohort study. *Cancer Res Treat*. 2018 Jul 1;50(3):861–71.
22. Zhang Y, Tang L long, Li YQ, Liu X, Liu Q, Ma J. Spontaneous remission of residual post-therapy plasma Epstein-Barr virus DNA and its prognostic implication in nasopharyngeal carcinoma: A large-scale, big-data intelligence platform-based analysis. *Int J Cancer*. 2019 May 1;144(9):2313–9.
23. Chen Q, Hu W, Xiong H, Ying S, Ruan Y, Wu B, et al. Changes in plasma EBV-DNA and immune status in patients with nasopharyngeal carcinoma after treatment with intensity-modulated radiotherapy. *Diagn Pathol*. 2019 Mar 14;14(1).
24. Hsu CL, Kuo YC, Huang Y, Huang YC, Lui KW, Chang KP, et al. Application of a patient-derived xenograft model in cytolytic viral activation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(31):31323–34.

25. Lu J, Tang M, Li H, Xu Z, Weng X, Li J, et al. EBV-LMP1 suppresses the DNA damage response through DNA-PK/AMPK signaling to promote radioresistance in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2016 Sep 28;380(1):191–200.
26. Wu CC, Fang CY, Hsu HY, Chuang HY, Cheng YJ, Chen YJ, et al. EBV reactivation as a target of luteolin to repress NPC tumorigenesis. *Oncotarget.* 2016;7(14):18999–9017.
27. Hung CY, Lin TL, Kuo YC, Hsieh CH, Wang HM, Hsu CL. Progesterone analogues reduce plasma Epstein–Barr virus DNA load and improve pain control in recurrent/metastatic nasopharyngeal carcinoma patients under supportive care. *Biomed J.* 2017 Aug 1;40(4):212–8.
28. Chen YH, Chang KP, Chu SC, Yen TC, Wang LY, Chang JTC, et al. Value of early evaluation of treatment response using 18 F-FDG PET/CT parameters and the Epstein-Barr virus DNA load for prediction of outcome in patients with primary nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2018 Mar 1;46(3):650–60.
29. Ma B, Hui EP, King A, Leung SF, Kam MKM, Mo F, et al. Prospective evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA clearance and fluorodeoxyglucose positron emission scan in assessing early response to chemotherapy in patients with advanced or recurrent nasopharyngeal carcinoma. In: *British Journal of Cancer.* Nature Publishing Group; 2018. p. 1051–5.
30. Zhang J, Peng H, Li W-F, Zhang Y, Liu L-Z, Tian L, et al. Individualized induction chemotherapy by pre-treatment plasma Epstein-Barr viral DNA in advanced nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Dec 19 [cited 2020 Feb 2];18(1):1276–86. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-018-5177-9>
31. Zhang Y, Wang H, Liu Y, Wang C, Wang J, Long C, et al. Baicalein inhibits growth of Epstein-Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma by repressing the activity of EBNA1 Q-promoter. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun 1;102:1003–14.
32. Makowska A, Franzen S, Braunschweig T, Denecke B, Shen L, Baloch V, et al. Interferon beta increases NK cell cytotoxicity against tumor cells in patients with nasopharyngeal carcinoma via tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Aug 1;68(8):1317–29.
33. Zhang W, Chen Y, Chen L, Guo R, Zhou G, Tang L, Mao Y, Li W, Liu X, Du X, Sun Y MJ. The clinical utility of plasma Epstein-Barr virus DNA assays in nasopharyngeal carcinoma: the dawn of a new era?: a systematic review and meta-analysis of 7836 cases. *Med.* 2015;94(20):845.
34. Mao YP, Xie FY, Liu LZ, Sun Y, Li L, Tang LL, et al. Re-Evaluation of 6th Edition of AJCC Staging System for Nasopharyngeal Carcinoma and Proposed Improvement Based on Magnetic Resonance Imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Apr 1;73(5):1326–34.
35. Wang HY, Sun BY, Zhu ZH, Chang ET, To KF, Hwang JSG, et al. Eight-signature classifier for prediction of nasopharyngeal carcinoma survival. *J Clin Oncol.* 2011 Dec 1;29(34):4516–25.
36. He SS, Wang Y, Bao Y, Cai XY, Yang XL, Chen DM, et al. Dynamic changes in plasma Epstein–Barr virus DNA load during treatment have prognostic value in nasopharyngeal carcinoma: a

- retrospective study. *Cancer Med.* 2018 Apr 1;7(4):1110–7.
37. Kim KY, Le Q-T, Yom SS, Ng RHW, Chan KCA, Bratman S V., et al. Clinical Utility of Epstein-Barr Virus DNA Testing in the Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma Patients. Vol. 98, *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*. Elsevier Inc.; 2017. p. 996–1001.
 38. Guo R, Sun Y, Yu XL, Yin WJ, Li WF, Chen YY, et al. Is primary tumor volume still a prognostic factor in intensity modulated radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma? *Radiother Oncol.* 2012 Sep 1;104(3):294–9.
 39. Wu Z, Su Y, Zeng RF, Gu MF, Huang SM. Prognostic value of tumor volume for patients with nasopharyngeal carcinoma treated with concurrent chemotherapy and intensity-modulated radiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Jan 31;140(1):69–76.
 40. Chua DTT, Sham JST, Kwong DLW, Tai KS, Wu PM, Lo M, et al. Volumetric analysis of tumor extent in nasopharyngeal carcinoma and correlation with treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Oct 1;39(3):711–9.
 41. Long L, Zhang X, Chen F, Pan Q, Phiphatwatchara P, Zeng Y, et al. The promising immune checkpoint LAG-3: From tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes and Cancer.* 2018 May 1;9(5–6):176–89.
 42. Kruger S, Legenstein ML, Rösgen V, Haas M, Modest DP, Westphalen CB, et al. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology.* 2017 May 4;6(5).
 43. Teow S-Y, Yap H-Y, Peh S-C. Epstein-Barr Virus as a Promising Immunotherapeutic Target for Nasopharyngeal Carcinoma Treatment. *J Pathog [Internet].* 2017 Dec [cited 2020 May 21];(7349268). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5804410/>
 44. Hau PM, Lung HL, Wu M, Tsang CM, Wong K-L, Mak NK, et al. Targeting Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Carcinoma. *Front Oncol [Internet].* 2020 May 14 [cited 2020 May 21];10:600. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00600/full>
 45. Perri F, Della Vittoria Scarpati G, Caponigro F, Ionna F, Longo F, Buonopane S, et al. Management of recurrent nasopharyngeal carcinoma: Current perspectives. Vol. 12, *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2019. p. 1583–91.
 46. Colevas AD, Yom SS, Pfister DG. NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018. 2018 May;16.
 47. Van Zyl DG, Mautner J, Delecluse HJ. Progress in EBV vaccines. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 104.
 48. Taylor GS, Steven NM. Therapeutic vaccination strategies to treat nasopharyngeal carcinoma. Vol. 5, *Chinese Clinical Oncology*. AME Publishing Company; 2016.

