

**Josiane Mourão Dias**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) E PD-L1 EM PORTADORES DE  
CARCINOMA DE NASOFARINGE EM REGIÃO NÃO ENDÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Lidia Maria Rebolho  
Batista Arantes

Barretos, SP

2022

**Josiane Mourão Dias**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) E PD-L1 EM PORTADORES DE  
CARCINOMA DE NASOFARINGE EM REGIÃO NÃO ENDÊMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Lidia Maria Rebolho  
Batista Arantes

Barretos, SP

2022

D541a Dias, Josiane Mourão.

Análise da expressão do vírus EPSTEIN-BARR (EBV) e PD-L1 em portadores de carcinoma de nasofaringe em região não endêmica/ Josiane Mourão Dias – Barretos, SP 2022.

63 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos – Barretos SP, 2022.

Orientador (a): Prof. Dra. Lídia Maria Rebolho Batista Arantes

1. Carcinoma de nasofaringe. 2. Ácidos ribonucleicos codificados pelo vírus Epstein-Barr (EBER). 3. Epstein-Barr vírus (EBV). 4. Ligante de morte celular programada-1 (PD-L1). I. Título.

CDD 616.99

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Ranulpho Prata

Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata

Bibliotecária: Daniele Muriel de Oliveira – CRB8/10634

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: **Josiane Mourão Dias**

Título: “ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) E PD-L1 EM PORTADORES DE CARCINOMA DE NASOFARINGE EM REGIÃO NÃO ENDÊMICA”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 08/02/2022

Banca Examinadora:

Dr. André Lopes Carvalho

Instituição: IARC

Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Instituição: UNESP

Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

Orientadora

Dra. Márcia Maria Silveira

Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

#### Potenciais conflitos de interesse:

Josiane Mourão Dias:

- Consultoria ou função consultiva: AstraZeneca.
- Apresentações técnico-científicas: AstraZeneca, Janssen, Novartis.
- Pesquisa Clínica: AbbVie, Amgen, AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Janssen, Lilly, Merck Serono, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi, Xcovery.
- Apoio financeiro para participação em eventos: Amgen, Boheringer Ingelheim, Janssen, Sanofi.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Emanuel e Laura, que me exemplificaram o valor  
do trabalho honesto;*

*aos meus irmãos, Eliane e Evandro, que foram e continuam sendo exemplos para minha  
vida;*

*ao meu esposo Marco pela paciência, incentivo e cumplicidade em todos estes anos;*

*à minha filha Isis que me possibilita a realização de um sonho todos os dias;*

*à minha orientadora Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes pelos valorosos  
conselhos profissionais e pessoais;*

*à Deus, aos amigos e aos pacientes deixo minha gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

À *Deus* pela oportunidade de evolução.

À *minha família* expresso minha gratidão infinita.

À *minha orientadora Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes*, pela paciência e ensinamentos.

À *patologista e amiga Dra. Iara Viana Vidigal Santana* pela dedicação ao projeto.

Aos *membros das bancas de acompanhamento e qualificação, Dr. André Lopes Carvalho e Dr. Vinicius Duval da Silva*, pelas sugestões que enaltecem o trabalho.

Aos *meus amigos da equipe de oncologia torácica e de cabeça/pescoço, Dr. Carlos Eduardo Baston, Dr. Flávio Augusto Ferreira da Silva e Dr. Gustavo Dix Junqueira Pinto*, pela amizade, companheirismo e espírito de equipe.

À *coordenadora do Registro Hospitalar, Raiany Carvalho Ricci*, por todo apoio ao projeto.

À *equipe técnica da patologia, em especial ao supervisor, Guilherme Gomes Ribeiro* pela imensa contribuição e disponibilidade.

Ao *Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Amor, em especial ao Marco Antônio Oliveira e Marcos Alves de Lima*, pela paciência e colaboração.

À *equipe da biblioteca do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Amor, Martins Fideles dos Santos Neto e Milene Girio Marques* pelo auxílio ao trabalho.

À *toda equipe da Pós-Graduação* pela colaboração irrestrita.

*Ó Deus, dai-me uma visão sem nuvens e livrai-me da pressa.*

*Dai-me a coragem de opor-me a toda vaidade e de perseguir, como puder e até o fim, cada uma de minhas tarefas.*

*Dai-me a vontade de não aceitar nunca o repouso ou a homenagem antes de ter podido verificar se meus resultados correspondem a meus cálculos.*

*Ou de poder descobrir e consertar meus erros.*

***Oração do homem de ciência - Dominique Lapierre***



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>9</b>
<b>3. ARTIGO</b>	<b>10</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>Anexo A – Formulário de coleta de dados</b>	<b>42</b>
<b>Anexo B – Carta de aprovação do CEP</b>	<b>45</b>
<b>Anexo C – Comprovante de submissão do artigo</b>	<b>46</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Detecção de pequenos ácidos ribonucleicos codificados pelo Epstein-Barr vírus (EBER) através de hibridização *in situ*. 33
- Figura 2 - Detecção do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) através de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo E1L3N. 34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Artigos que avaliaram expressão dos antígenos do vírus Epstein-Barr (EBV) e/ou expressão do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) e suas correlações com resposta ao tratamento.	6
Tabela 2 - Características do tratamento instituído e evolução.	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Anti-PD-L1	Anticorpo anti-ligante de morte celular programada-1
Anti-PD-1	Anticorpo anti-receptor da proteína de morte programada-1
CEC	Carcinoma de células escamosas
CNF	Carcinoma de nasofaringe
CPS	<i>Combined Positive Score</i>
CTLA-4	Antígeno de linfócito T citotóxico 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBER	Ácidos ribonucleicos codificados pelo vírus Epstein-Barr
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECOG PS	<i>Eastern Cooperative Group Performance Status</i>
EBNAs	Antígenos nucleares do vírus Epstein-Barr
HLA	Complexo de histocompatibilidade humano
HB	Hemoglobina
IC	Intervalo de confiança
ICI	Células imunes de infiltrado tumoral
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
LMP	Proteínas latentes de membrana
Mm	Milímetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD	Progressão de doença
PD-1	Proteína de morte programada-1
PD-L1	Ligante de morte celular programada-1
RNA	Ácido ribonucleico
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
SCC	Carcinoma de células escamosas não-queratinizante

SEER	Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLRLR	Sobrevida livre de recorrência locorregional
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TC	Células tumorais
TPS	<i>Tumor Proportion Score</i>
TR	Taxa de resposta

## LISTA DE SÍMBOLOS

=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
®	Marca registrada
+	Mais ou Positivo
<	Menor
%	Porcentagem

## RESUMO

Dias JM. *Análise da expressão do vírus Epstein-Barr (EBV) e PD-L1 em portadores de carcinoma de nasofaringe em região não endêmica. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Amor; 2022.

**JUSTIFICATIVA:** Dentre as várias neoplasias que podem surgir na nasofaringe, o carcinoma representa a maioria dos casos. Essa neoplasia possui uma distribuição geográfica distinta. O tratamento é baseado em radioterapia isolada ou em combinação com quimioterapia à base de platina. Com o advento dos inibidores de *checkpoint*, o papel de biomarcadores de resposta à imunoterapia vem sendo estudado.

**OBJETIVOS:** Avaliar o status da infecção pelo EBV e a expressão do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) em amostras tumorais de portadores de carcinoma de nasofaringe (CNF) tratados no Hospital de Amor – Unidade de Barretos.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram incluídos retrospectivamente pacientes com CNF. A avaliação da infecção pelo EBV foi realizada através da detecção de pequenos ácidos ribonucleicos codificados pelo EBV (EBER) por hibridização *in situ* e a expressão do PD-L1 foi realizada por imuno-histoquímica.

**RESULTADOS:** Cento e vinte e quatro amostras foram obtidas para avaliação de EBER e 120 para análise de PD-L1. O tipo histológico predominante foi o carcinoma espinocelular não queratinizante (96%). A análise dos biomarcadores mostrou que 86,3% dos casos foram positivos para EBER e 55,8% foram positivos para PD-L1. Houve correlação entre a positividade do EBER e a presença de carcinoma indiferenciado ( $p=0,007$ ), bem como a ausência de história de tabagismo ( $p=0,019$ ). Existiu correlação entre a expressão de PD-L1 e positividade do EBER ( $p=0,004$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a sobrevida global (SG) e a expressão de EBER ( $p=0,290$ ) ou PD-L1 ( $p=0,801$ ).

**CONCLUSÕES:** O presente estudo corresponde a uma das maiores coortes de CNF realizadas em uma região não endêmica. Estudos de fase III com inibidores de *checkpoint* podem fornecer mais dados sobre o papel da expressão de PD-L1 nesta doença.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma de nasofaringe; Ácidos ribonucleicos codificados pelo vírus Epstein-Barr (EBER); Epstein-Barr vírus (EBV); Ligante de morte celular programada-1 (PD-L1); região não endêmica.



## ABSTRACT

Dias JM. *Analysis of epstein-barr virus (EBV) and PD-L1 expression in nasopharyngeal carcinoma patients in a non-endemic region. Dissertation (Master's degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2022.

**BACKGROUND:** Among the various neoplasms that can arise in nasopharynx, carcinoma comprises the majority of cases. This neoplasm has a distinct geographical distribution. Treatment is based on radiotherapy alone or in combination with platinum-based chemotherapy. With the advent of checkpoint inhibitors, the role of biomarkers predicting response to immunotherapy has been studied.

**AIMS:** To evaluate the status of EBV infection and the expression of programmed cell death ligand-1 (PD-L1) in tumor samples from patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) treated at Hospital de Amor – Barretos Unit.

**MATERIALS AND METHODS:** Patients with NPC were retrospectively included. Evaluation of EBV infection was performed through the detection of EBV-encoded small ribonucleic acids (EBER) by *in situ* hybridization and PD-L1 expression was performed through immunohistochemistry.

**RESULTS:** One hundred and twenty-four samples were evaluated for EBER and 120 were analyzed for PD-L1. The predominant histological type was non-keratinizing squamous cell carcinoma (96%). The analysis of biomarkers showed that 86.3% of cases were positive for EBER and 55.8% were positive for PD-L1. There was a correlation between EBER positivity and presence of undifferentiated carcinoma histology ( $p=0.007$ ) as well as the absence of tobacco history ( $p=0.019$ ). There was a correlation between PD-L1 expression and EBER positivity ( $p=0.004$ ). There was no statistically significant difference between overall survival (OS) and EBER ( $p=0.290$ ) or PD-L1 ( $p=0.801$ ) expression.

**CONCLUSIONS:** The present study corresponds to one of the largest cohorts of NPC in a non-endemic region. Phase III studies with checkpoint inhibitors may provide more data about the role of PD-L1 expression in this disease.

**KEYWORDS:** Nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr virus-encoded small ribonucleic acids (EBER); Epstein-Barr virus (EBV); programmed cell death ligand-1 (PD-L1); non-endemic region.

## 1 INTRODUÇÃO

A nasofaringe corresponde ao segmento superior da faringe. Situa-se inferiormente à base do crânio, anteriormente ao clivo, continua-se com a cavidade nasal anteriormente e é separada da orofaringe por um plano horizontal que passa pelo palato duro e o músculo palatofaríngeo. Lateralmente é limitada pelo músculo constritor superior, pela fáscia faringobasilar e pelo espaço parafaríngeo<sup>1</sup>.

Diversas neoplasias podem surgir na nasofaringe, englobando desde origem epitelial até mesenquimal, linfóide ou neuroectodérmica. O carcinoma de nasofaringe (CNF) compreende a vasta maioria dos cânceres que atingem a nasofaringe tanto em populações de alta quanto baixa incidência da doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o CNF em 3 tipos histológicos: carcinoma de células escamosas (CEC) queratinizante, carcinoma de células escamosas não-queratinizante (inclui o carcinoma indiferenciado) e carcinoma de células escamosas basalóide<sup>2</sup>.

O CNF é raro em muitas partes do mundo entretanto é considerado endêmico em algumas áreas do Sudeste Asiático, Polinésia, Ásia Oriental e Norte da África<sup>3</sup>. Estima-se que em 2020 ocorreram 133.354 casos novos e 80.008 mortes relacionadas a esta neoplasia no mundo todo<sup>4</sup>. Nos Estados Unidos e Europa Ocidental a incidência é de 0,5 a 2 casos por 100.000 habitantes. Já no Sul da China a incidência chega a 25 casos por 100.000 habitantes ao ano<sup>5</sup>. No Brasil é uma neoplasia rara, porém ocasionou 374 mortes em 2019 (257 homens e 117 mulheres), sendo que 28% destes óbitos ocorreram em indivíduos menores de 50 anos, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)<sup>6</sup>.

A frequência de cada tipo histológico varia entre as regiões endêmicas e o Ocidente. Por exemplo, dados do Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER) dos Estados Unidos evidenciam que o carcinoma queratinizante corresponde a 39,4% dos casos enquanto o indiferenciado perfaz 25% do total<sup>7</sup>. Já no Sul da China, 95% dos CNF correspondem ao carcinoma indiferenciado, apenas 2% compreendem o queratinizante e 3% não-queratinizante<sup>8</sup>.

Em relação à incidência por gênero, tem-se que o CNF atinge 2 a 3 vezes mais homens do que mulheres<sup>5</sup>. Além disso, observa-se um aumento gradativo da incidência de acordo com o aumento da idade em populações de baixo risco. Em contrapartida, em populações de maior prevalência da doença, observa-se um pico de incidência entre 50 e 59 anos e outro pico menor entre adolescentes e adultos jovens<sup>3</sup>.

A distribuição geográfica distinta sugere uma etiologia multifatorial para a doença. Em áreas de baixa incidência como Estados Unidos e Europa, o CNF está associado ao consumo de álcool e tabagismo. Estudos caso-controle evidenciaram um risco de 2 a 6 vezes maior em tabagistas<sup>9, 10</sup> e de 2 vezes entre etilistas<sup>10, 11</sup>. Já em populações de alta incidência, o risco parece depender da interação de diversos fatores como infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), predisposição genética e hábitos de vida<sup>11</sup>.

Algumas evidências sugerem o efeito da herança genética na predisposição ao CNF. Estudos epidemiológicos identificaram um risco até 10 vezes maior do desenvolvimento da doença entre indivíduos com parentes de primeiro grau acometidos pela doença comparados a aqueles sem história familiar<sup>3</sup>. Estudos de migração também evidenciam que a incidência do CNF continua mais elevada na segunda e terceira gerações de chineses que migraram para a América<sup>12</sup>.

Determinados haplótipos do complexo de histocompatibilidade humano (HLA) têm sido associados ao aumento do risco de desenvolvimento do CNF tais como HLA-A2 e HLA-B46. As razões para estas associações ainda permanecem indefinidas e uma hipótese é que estes haplótipos podem estar envolvidos na modulação da resposta imune contra o EBV<sup>3</sup>.

Alguns hábitos de vida também têm sido associados ao CNF. O consumo de peixe preservado em sal tem sido apontado como um fator de risco relevante em áreas endêmicas. Estudos em populações chinesas têm observado um risco de até 7,5 vezes maior naqueles indivíduos com consumo diário do peixe preservado em sal<sup>3</sup>. Além disso, este tipo de peixe é um alimento tradicionalmente utilizado no desmame de lactentes de áreas de alta incidência da doença e esta exposição infantil parece estar fortemente relacionada ao risco de CNF<sup>13, 14</sup>. Postula-se que este processo de preservação em sal é ineficiente, ocasionando o acúmulo de nitrosaminas que são conhecidos carcinógenos<sup>15</sup>.

A infecção pelo EBV está presente na totalidade dos casos no carcinoma indiferenciado em áreas endêmicas, porém é menos frequente no carcinoma queratinizado. Algumas evidências suportam a associação do EBV na etiologia do CNF, como por exemplo, a detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA) viral nas células tumorais, assim como a expressão de antígenos virais na membrana das células neoplásicas<sup>16</sup>.

O EBV faz parte da família Herpes (tipo 4) e está amplamente disseminado na população mundial. A contaminação geralmente ocorre na infância através de contato com secreções orais de indivíduos infectados. Na maioria das vezes a infecção é assintomática, porém pode causar uma desordem proliferativa benigna autolimitada conhecida como mononucleose infecciosa<sup>17</sup>. A infecção primária induz tanto uma resposta imune humoral quanto celular, que controlam mas não eliminam completamente o vírus que então estabelece uma fase de latência, em que ocorre um equilíbrio entre a proliferação das células B, controlada pelo EBV, e a resposta imune do hospedeiro. Nesta fase há expressão de genes virais fundamentais para a imortalização das células B, mantendo-as em contínua proliferação celular<sup>18</sup>. As proteínas produzidas pelo EBV interagem com uma variedade de proteínas apoptóticas, citocinas e transdutores de sinais, promovendo a infecção, imortalização e transformação celular<sup>19, 20</sup>.

Nas células tumorais infectadas ocorre a expressão de múltiplos antígenos do EBV como os nucleares (EBNAs), proteínas latentes de membrana (LMP) e pequenos ácidos ribonucleicos codificados pelo EBV (EBERs). Estes últimos não codificam proteínas, mas podem bloquear a apoptose celular. São encontrados em altas concentrações nas células infectadas em fase de latência e tem a capacidade de formar complexos com outros antígenos celulares tornando-se mais resistentes a degradação que ocorre no preparo das amostras tumorais durante o processo de fixação em parafina<sup>21, 22</sup>. Assim, a detecção do EBER por hibridização *in situ* (ISH) tem sido o método mais prático para detectar a presença do EBV em células tumorais do CNF<sup>23</sup>.

O tratamento do CNF é definido através do estadió clínico da doença e condição clínica do paciente. Atualmente baseia-se em radioterapia isolada ou em associação a quimioterapia baseada em platina, seja em indução, concomitante, adjuvante ou de

caráter paliativo<sup>24</sup>. Desta forma, no estadio precoce até localmente avançado, a sobrevida em 5 anos pode alcançar 85%, porém em pacientes com doença avançada ou recidivada os resultados decaem, com uma mediana de sobrevida global da ordem de 20 meses<sup>25</sup>.

Com o advento da imunoterapia, tem-se estudado a ação de drogas inibidoras de *checkpoint* (pontos de checagem imune) como anti-PD-1 (anticorpo anti-receptor da proteína de morte celular programada-1) e anti-PD-L1 (anticorpo anti-ligante de morte celular programada-1) no CNF<sup>26</sup>. Estudos iniciais tais como o KEYNOTE-028 de fase Ib, que avaliou o uso de pembrolizumabe (anti-PD-1) em uma variedade de tumores sólidos que apresentavam expressão de PD-L1 (ligante de morte celular programada-1) maior que 1%. Entre os 27 pacientes portadores de CNF avançado que foram incluídos neste estudo houve uma taxa de resposta (TR) de 25,9%<sup>27</sup>. Em vista desta atividade promissora, estão em andamento estudos de fase III como Júpiter-02 e CAPTAIN-1st.

O CAPTAIN-1st é um estudo que compara a adição do camrelizumabe (anti-PD-1) a quimioterapia com cisplatina e gencitabina versus este *doublet* de platina associado a placebo em 263 portadores de CNF metastáticos ou recidivados em primeira linha de tratamento. O objetivo primário do estudo foi alcançado, com aumento da sobrevida livre de progressão (SLP) com a associação do camrelizumabe, demonstrado através da mediana de 9,7 meses versus 6,9 meses no grupo placebo (Hazard Ratio 0,54 com intervalo de confiança de 95% entre 0,39 a 0,76 e  $p=0,0002$ )<sup>28</sup>.

O estudo Júpiter-02 também compreende um estudo randomizado, controlado por placebo, da combinação de *doublet* de cisplatina e gencitabina com toripalimabe (anti-PD-1) no tratamento de primeira linha de 289 portadores de CNF metastático ou recidivado. O objetivo primário foi alcançado, com aumento da SLP no grupo da combinação com imunoterapia, com uma mediana de 11,7 meses versus 8,0 meses do grupo placebo (Hazard Ratio 0,52 com intervalo de confiança de 95% entre 0,36 a 0,74 e  $p=0,0003$ )<sup>29</sup>.

Em relação a imunogenicidade, sabe-se que a infecção pelo EBV gera a expressão de proteínas virais nas células tumorais tais como a LMP-1 (proteína latente de membrana 1) além da ativação do IFN- $\gamma$  (interferon-gama). Ambos podem induzir de

forma sinérgica a expressão do PD-L1 no CNF. Há relatos de que tumores da nasofaringe com alta expressão do PD-L1 foram associados com piores resultados clínicos, em pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia<sup>30</sup>.

O ponto de checagem imunológico compreende sinais regulatórios que equilibram a ativação imune e a autotolerância, sendo essencial para proteger os tecidos de danos imunomediados. Neste interim, os linfócitos T tem um papel vital já que podem eliminar as células neoplásicas pelo reconhecimento de antígenos associados ao tumor através dos linfócitos T citotóxicos (ou células T efectoras CD8<sup>+</sup>), além de orquestrar diversas respostas imunes pela ação dos linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (T helper)<sup>31</sup>.

Por sua vez, as células tumorais desenvolvem diversos mecanismos de escape do sistema imune, dentre estes, a expressão de ligantes e receptores inibitórios que coíbem a função dos linfócitos T. Exemplos destes receptores incluem o CTLA-4 (antígeno de linfócito T citotóxico 4) e PD-1 (proteína de morte programada-1). Este é expresso em uma variedade de células imunes como linfócitos T, monócitos, células dendríticas. Um de seus ligantes, o PD-L1, é expresso em células tumorais e nas células apresentadoras de antígeno. A interação do PD-1 no linfócito T e PD-L1 gera uma disfunção, exaustão e neutralização das células T, tornando-as inefetivas contra as células neoplásicas<sup>32</sup>.

A ação dos inibidores de *checkpoint* imunológico é bloquear esta interação PD-1/PD-L1 levando a uma otimização da apresentação antigênica e a reversão do estado de exaustão linfocitária, permitindo a retomada do combate imunológico ao tumor. O que se tem observado com o uso dos inibidores PD-1/PD-L1 é que somente uma parcela dos pacientes apresenta benefício com o seu uso e, desta forma, é necessário a identificação de biomarcadores preditivos de resposta a esta terapia. Um destes biomarcadores que vem sendo amplamente estudado é a expressão de PD-L1 nas células tumorais. Em CNF os estudos têm demonstrado expressão muito diversa de PD-L1 dos tumores, variando de 25% a até 100% das células neoplásicas. Isto pode ser decorrente da utilização de diferentes anticorpos anti-PD-L1 assim como diferentes pontos de corte para sua positividade além de diversos protocolos de coloração de lâminas e plataformas para sua leitura<sup>19</sup>. A Tabela 1 exemplifica os controversos resultados em diferentes populações.

**Tabela 1** - Artigos que avaliaram expressão dos antígenos do vírus Epstein-Barr (EBV) e/ou expressão do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) e suas correlações com resposta ao tratamento.

Artigo	Pctes	PD-1*	PD-L1*	EBV*	Obs.	País	Resultados	Conclusão
Cao et al., 2018 <sup>33</sup>	108	38% ICI	75,9% TC	Níveis de Ab	PD-1 pos = score > 0 PD-L1 pos = score > 140	China	Sem relação com parâmetros clínicos; PD-1 pos fator px independente de SLP (p=0,047); níveis Ab anti-EBV foram associados com positividade de PD-1.	Pctes PD-1 neg tiveram redução significativa de sobrevida; pctes PD-1 pos tiveram maiores níveis Ab anti-EBV.
Chan et al., 2017 <sup>19</sup>	161	-	24% TC 75% ICI	-	87,7%	China	Sem relação com parâmetros clínicos; sem correlação expressão PD-L1 com SG ou SLP.	Alta expressão PD-L1 em IC e menor em TC; nenhum valor px foi observado para expressão PD-L1 em pctes com CNF.
Jiang et al., 2019 <sup>20</sup>	60	56,7%	91,7%	-	Alta expressão: PD-1 >5% ICI  PD-L1 >1% TC	China	Sem relação com parâmetros clínicos; alta expressão PD-1 associada a menor SG em 5a (p=0,014); expressão PD-L1 foi fator px adverso em SG em 5a (p=0,023). Pctes com alta expressão PD-1 e PD-L1 tiveram pior controle local (p<0,001) e SG (p<0,001).	Alta expressão PD-1, especialmente associado a coexpressão de PD-L1, foi associado a recorrência local e resultados desfavoráveis em CNF.
Larbcharoensub et al., 2018 <sup>34</sup>	114	11%	69% TC 71% TC ou ICI	96% EBER+	≥1% TC ≥ 50% TC ≥ 5% TC ou ICI	Tailândia	Sem correlação entre expressão PD-L1, PD-1 e sobrevida.	70% CNF EBV+ expressava PD-L1 mas não houve correlação com sobrevida ou parâmetros clínicos.
Lee et al., 2016 <sup>35</sup>	104	-	21,2% +2 3,8% +1 75% 0	-	+2: ≥25% TC +1: 5-24% TC 0: <5% TC	Taiwan	pctes expressão PD-L1 +2 apresentaram maior SLRLC (p=0,042) comparado PD-L1 0 ou +1; PD-L1 +2 foi fator px independente para SLRLC (p=0,014) e SLP (p=0,045) em análise multivariada.	Expressão PD-L1 correlacionou-se com SLRLC e SLP em CNF não metastático.
Li et al., 2017 <sup>36</sup>	120	-	71% TC	-	H-score > 20%	China	Score alto PD-L1 foi associado a pior SG (p=0,023) e SLD (p=0,002); baixo score PD-L1 foi associado a melhor SLD (p=0,006); estadio T e expressão PD-L1 foram fatores px independentes para SLD.	Expressão PD-L1 foi um fator px significativo em CNF e alta expressão PD-L1 pode ser de valor px para recorrência e metástase.
Liu et al., 2018 <sup>37</sup>	208	-	4% TC 2% ICI	100%+	>4% alta exp em TC >2% alta exp em ICI	Taiwan	Houve correlação entre recorrência local e baixa expressão PD-L1 em IC (p=0,0012), TC (p=0,013) ou ambos (p=0,00); baixa expressão PD-L1 em ICI foi fator independente de pior px para SLD (p=0,008) e alta expressão em IC e TC foi de px favorável em SG (p=0,022).	Baixa expressão PD-L1 em TC e ICI correlacionou-se com recorrência local em CNF EBV+
Minichsdorfer et al., 2019 <sup>38</sup>	30	40% alta exp ≥1%	20% alta exp 17% neg 63% baixa exp	63% EBER+	PD-L1 neg <1%TC Baixa exp 1-49% TC Alta exp ≥50% TC	Áustria	Baixa expressão PD-L1 em TC foi associada a significativa maior SG (p=0,037) enquanto a baixa expressão PD-L1 em ICI foi correlacionado a pior SLD (p=0,005).	Alta expressão PD-L1 em TC foi associado a piores desfechos, enquanto PD-L1 ≥ 10% em ICI foi correlacionado com melhora em SLD.

continua na próxima página...

**Tabela 1 (continuação)** - Artigos que avaliaram expressão dos antígenos do vírus Epstein-Barr (EBV) e/ou expressão do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) e suas correlações com resposta e tratamento.

Artigo	Pctes	PD-1 <sup>+</sup>	PD-L1 <sup>+</sup>	EBV <sup>+</sup>	Obs.	País	Resultados	Conclusão
Ono et al., 2018 <sup>33</sup>	66	-	80% pos	73% EBER+	Pos: ≥5%	Japão	Idade (p<0,001), tipo histológico (p=0,039) e status EBV (p=0,014) foram correlacionados com SG enquanto expressão PD-L1 não se correlacionou.	Resultados sugerem que expressão de PD-L1 TC combinado com densidade CD8 IC pode ser um preditor para estratificação de risco em pctes com CNF.
Qu et al., 2018 <sup>39</sup>	96	-	29,2% pos	-	Pos: >10% Alta exp>25% Baixa exp<25%	China	Expressão PD-L1 foi associada com meta a distância (p=0,010), com estadio T (p=0,032) e com sobrevida livre de meta a distância (p=0,006). Tb uma associação entre expressão de PD-L1 e Acs anti-EBV (p=0,046).	PD-L1 pode ser um biomarcador px em pctes com CNF.
Wang et al., 2019 <sup>40</sup>	208	-	92% pos 11%>50%	Nível plasmático DNA EBV	Pos: >1%	China	Melhor SG em alta expressão PD-L1 tanto TC (p=0,004) quanto IC (p=0,023).	Necessidade de desenvolver score px relacionados aos pontos de checagem imune em CNF.
Zhang et al., 2015 <sup>41</sup>	139	37,4% pos	95% pos	-	Alta exp score >35	China	Alta expressão PD-L1 TC correlacionou-se com pior SLD (p=0,009); coexpressão de PD-1 e PD-L1 tb pior SLD (p=0,038).	Coexpressão PD-1/PD-L1 refletiu uma supressão de linfócitos citotóxicos no microambiente tumoral e prediz recorrência e metástase em CNF.
Zhao et al., 2019 <sup>42</sup>	102	-	75,5%TC 12,7%IC	Nível plasmático DNA EBV	Alta exp ≥50%TC ou ICI	China	Expressão PD-L1 TC foi positivamente correlacionada com estadio T (p=0,033); PD-L1 IC foi negativamente associada com nível DNA plasmático do EBV (p=0,021), estadio N (p=0,009), estadio M (p=0,014) e estadio clínico (p=0,001).	Alta expressão PD-L1 é comum em CNF e a importância de se distinguir expressão entre TC e ICI.
Zheng et al., 2017 <sup>43</sup>	85	-	73,3% pos	-	Baixa exp score 1 e 2 Alta exp score ≥3	China	Alta expressão PD-L1 foi correlacionada com pior SG (p=0,022) e foi considerado um fator px independente de pior SG (p=0,032).	Expressão PD-L1 correlacionou-se com SG em CNF localmente avançado.
Zhou et al., 2017 <sup>44</sup>	99	44,4% pos ICI	97% pos TC	Nível plasmático DNA EBV	Alta exp score ≥155 PD-1 ≥5%	China	Alta expressão PD-L1 foi associada a pior SG (p=0,015); baixo nível HB (p=0,029) e de IMC (p=0,048) foram associados a maior expressão PD-L1; sem relação com nível DNA plasmático.	PD-L1 pode ser um potencial biomarcador px em CNF.
Zhu et al., 2017 <sup>45</sup>	209	-	46% pos ICI 32% pos TC	-	Pos ≥5% TC correlacionado presença x ausência IC	China	Alta expressão PD-L1 foi associado a melhor SG (p=0,030).	a expressão PD-L1 nas TC foi fator px em pctes CNF com linfócitos intratumorais pré-existentes.

\*Pctes: pacientes; TC: células tumorais (tumor cells); ICI: células imunes de infiltrado tumoral (tumor-infiltrating immune cells); (+): positive; Ab: anticorpo; SG: sobrevida global; SLP: sobrevida livre de progressão, px: prognóstico; exp: expressão; CNF: carcinoma de nasofaringe; EBER: pequenos ácidos ribonucleicos codificados pelo EBV; SLRLR: sobrevida livre de recorrência locorregional; SLD: sobrevida livre de doença; HB: hemoglobina; IMC: índice de massa corpórea.



Na população brasileira existem poucos dados em relação a prevalência do EBV em CNF, assim como não há estudos quanto a expressão de PD-L1 nesta população. Piña et al.<sup>46</sup> analisaram a presença do EBV em amostras de 8 pacientes brasileiros com CNF. Destes, 5 correspondiam ao carcinoma indiferenciado e foram positivos para EBV. Os 3 casos restantes foram negativos para a presença do vírus.

Casco et al. revisaram amostras de CNF de pacientes europeus e sul-americanos. Dentre os 20 participantes brasileiros, 95% correspondiam a carcinoma indiferenciado e 69,2% apresentaram positividade em EBER<sup>47</sup>.

Desta forma, faz-se necessário uma melhor compreensão das características de nossa população para tentarmos aprimorar o tratamento dos portadores de CNF.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o status da infecção pelo EBV e a expressão de PD-L1 em amostras tumorais de portadores de CNF tratados no Hospital de Amor – Unidade de Barretos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar as expressões de EBER e PD-L1.

Correlacionar status EBV e PD-L1 com tipo histológico.

Correlacionar status EBV e PD-L1 com características clínico-demográficas e sobrevida.

### **3 ARTIGO**

Manuscrito segundo as normas do periódico *JCO Precision Oncology* (ISSN: 2473-4284),  
Fator de Impacto: 4,853.

## **ANALYSIS OF EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) AND PD-L1 EXPRESSION IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS IN A NON-ENDEMIC REGION**

Josiane M Dias<sup>1</sup>, Iara VV Santana<sup>2</sup>, Vinicius D da Silva<sup>2</sup>, André L Carvalho<sup>3,4</sup>, Lidia MRB Arantes<sup>3</sup>

1 Clinical Oncology Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos-SP, Brazil.

2 Pathology Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos-SP, Brazil.

3 Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos-SP, Brazil.

4 Early Detection, Prevention & Infections Branch, International Agency for Research on Cancer,  
Lyon, France.

### **Running head: EBV AND PD-L1 EXPRESSION IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA PATIENTS**

#### **Addresses for correspondence:**

Dr. Lidia MRB Arantes

Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital

Rua Antenor Duarte Villela, 1331, Bairro Dr. Paulo

Barretos-SP, Brazil,

Zip code: 14784-400

Phone: +55 17 3221-6600

E-mail: lirebolho@hotmail.com

#### **Acknowledgments of research support for the study**

This study was carried out with the financial support of the Researchers Assistance and Incentive Program (PAIP) at the Barretos Cancer Hospital.

### **Author's disclosures of potential conflicts of interest**

Josiane M Dias:

Consulting or Advisory Role: AstraZeneca.

Speakers' Bureau: AstraZeneca, Janssen, Novartis.

Research Funding: AbbVie, Amgen, AstraZeneca, Beigene; Bristol-Myers Squibb, Debiopharm; GlaxoSmithKline, Incyte Corporation; Ipsen; Janssen, Lilly, Merck KGaA, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Regeneron; Roche, Sanofi, Takeda; Xcovery.

Travel, Accommodations, Expenses: Amgen, Boheringer Ingelheim, Janssen, Sanofi.

No other potential conflicts of interest.

## ABSTRACT

**PURPOSE:** Carcinoma is the most common neoplasm that arise in nasopharynx and has a distinct geographical distribution. Clinical trials have evaluated immunotherapy in the treatment of this disease, as well as, biomarkers predicting response. Therefore, the aim of this study was to evaluate the status of EBV infection and the expression of programmed cell death ligand-1 (PD-L1) in tumor samples from patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC).

**PATIENTS AND METHODS:** We retrospectively selected 124 patients with NPC from January 2010 to December 2017. Evaluation of EBV infection was performed through the detection of EBV-encoded small ribonucleic acids (EBER) by *in situ* hybridization and PD-L1 expression was performed through immunohistochemistry.

**RESULTS:** One hundred and twenty-four samples were evaluated for EBER and 120 for PD-L1 expression. The predominant histological type was non-keratinizing squamous cell carcinoma (96%). The analysis of biomarkers showed that 86.3% of cases were positive for EBER and 55.8% were positive for PD-L1. There was a correlation between EBER positivity and presence of undifferentiated carcinoma histology ( $p=0.007$ ) as well as the absence of tobacco history ( $p=0.019$ ). There was a correlation between PD-L1 expression and EBER positivity ( $p=0.004$ ). There was no statistically significant difference between overall survival (OS) and EBER ( $p=0.290$ ) or PD-L1 ( $p=0.801$ ) expression.

**CONCLUSION:** The present study corresponds to one of the largest cohorts of NPC in a non-endemic region. Phase III studies with checkpoint inhibitors may provide more data about the role of PD-L1 expression in this disease.

**Keywords:** Nasopharyngeal carcinoma; Epstein-Barr virus (EBV); programmed cell death ligand-1 (PD-L1); non-endemic region.

## INTRODUCTION

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) comprises the majority of cancers that arise in the nasopharynx in populations with high and low incidence of the disease. The World Health Organization (WHO) classifies NPC in 3 histological types: keratinizing squamous cell carcinoma (KSCC), non-keratinizing squamous cell carcinoma (NKSCC - includes undifferentiated carcinoma) and basaloid squamous cell carcinoma (BSCC)<sup>1</sup>.

NPC is endemic in some areas of Southeast Asia, Polynesia, East Asia and North Africa, but it is rare in the Western world<sup>2</sup>. In the United States and Western Europe, the incidence is 0.5 to 2 cases per 100,000 persons. In southern China, the incidence reaches 25 cases per 100,000 inhabitants per year<sup>3</sup>. In Brazil, it is a rare neoplasm but it caused 374 deaths in 2019 and 28% of these deaths occurred in individuals under 50 years<sup>4</sup>.

The frequency of each histological type varies between endemic regions and the Western countries. Data from the United States Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) show that KSCC accounted for 39.4% of cases, while undifferentiated carcinoma (UC) accounted for 25% of the total<sup>5</sup>. In Southern China, 95% of the NPC related to UC while only 2% comprise KSCC and 3% NKSCC<sup>6</sup>.

The distinct geographic distribution suggests a multifactorial etiology for the disease. In low-incidence areas NPC is associated with alcohol consumption and smoking<sup>7</sup>. In high-incidence regions, the risk seems to depend on the interaction of several factors such as Epstein-Barr virus (EBV) infection, genetic predisposition and lifestyle habits<sup>8</sup>.

EBV infection is present in almost all cases of UC in endemic areas but it is less frequent in KSCC. Some evidences support the association of EBV in etiology of NPC such as the detection of viral deoxyribonucleic acid (DNA) in tumor cells, as well as the expression of viral antigens in the neoplastic cells membrane<sup>9</sup>.

In infected tumor cells there is expression of multiple EBV antigens like EBV-encoded small ribonucleic acids (EBERs) that can block cell apoptosis. Detection of EBER by *in situ* hybridization (ISH) is a practical method to detect the presence of EBV in NPC tumor cells<sup>10</sup>.

Treatment is defined according to the clinical stage and patient's clinical condition. It is based on radiotherapy alone or in association with platinum-based chemotherapy, whether induction, concomitant, adjuvant or palliative<sup>11</sup>. With the advent of immunotherapy, the action of checkpoint inhibitors such as anti-PD-1 (anti-programmed death-1) and anti-PD-L1 (anti-programmed death-ligand 1) has been increasingly studied in NPC<sup>12</sup>.

EBV infection causes expression of viral proteins in tumor cells such as latent membrane protein 1 (LMP-1) in addition to activation of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Both can synergistically induce PD-L1 expression in NPC and some reports have associated high PD-L1 expression with worse clinical outcomes<sup>13-15</sup>.

In the Brazilian population, there are few data regarding the prevalence of EBV in NPC, as well as no reports about the expression of PD-L1 in this population<sup>16,17</sup>. Therefore, this study evaluated the status of EBV infection and PD-L1 expression in tumor samples from patients with NPC treated in Brazil, in addition to the correlation with histological type and clinical-demographic and survival characteristics.



## **METHODS**

This was a retrospective and observational cohort study conducted at Barretos Cancer Hospital, Brazil. One hundred and thirty-nine patients had histologically confirmed NPC between January 2010 and December 2017 and were identified through institution's database. All samples were reviewed by an experienced pathologist to confirm the diagnosis and characterize the cellular components of the specimen. Samples that raised doubts were discussed together with a second pathologist and both defined the final result. Patient demographic, clinical characteristics, treatments and outcomes were recorded from medical records. Clinical stage was according to eight edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging of NPC.

### *Inclusion Criteria*

Patients with tumor located in nasopharynx, confirmed diagnosis of carcinoma, biopsy performed before starting the treatment and tumor samples available for analysis were included.

### *Exclusion Criteria*

Anatomopathological result consistent with a different histological type of carcinoma and previously treated patients were excluded.

### *EBER analysis*

Hematoxylin & eosin stained sections of 3-4 µm thickness were prepared after retrieving the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks from the histopathology laboratory. EBV status was assessed by EBER detection through *in situ* hybridization (ISH) using the Ventana® ISH iView Blue Detection Kit (Roche® Diagnostics GmbH, Germany) and automated BenchMarck® Ultra staining module according to manufacturer's instructions (Ventana® Medical Systems Inc., United States). EBER status was classified as positive or negative, as defined by the presence or absence of deep dark blue signal in nuclei of tumor cells seen under light microscopy.

### *PD-L1 expression*

The PD-L1 expression was determined by immunohistochemical reaction using the Benchmark® ULTRA platform and the anti-PD-L1 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling Technology®, United States, clone E1L3N and dilution 1:200) for detection of PD-L1 protein using the Optiview DAB® visualization system. This process was performed according to manufacturer's specifications and the samples were analyzed by two pathologists with specialized training to evaluate the expression of PD-L1. A minimum of 100 viable tumor cells must have been present for the specimen to be considered evaluable.

PD-L1 expression was determined through two scores: tumor proportion score (TPS) and combined positive score (CPS). TPS was determined by the percentage of viable tumor cells that showed partial or complete staining of the membrane in relation to all viable tumor cells present in the sample. It was graduated on a scale of 0% to 100% and was positive if detected in at least 1% of viable tumor cells.

The CPS was calculated using the number of positive PD-L1 stained cells (sum of tumor cells, lymphocytes and macrophages) divided by the total number of viable tumor cells in the slide, multiplied by 100. It was scored as negative if less than 1 and positive if greater than or equal to 1. Positive cases were graduated on a scale of 1 to 100.

#### *Vimentin analysis*

Analysis of vimentin expression in tumor tissue was performed by immunohistochemical reaction. The purpose of this analysis was to carry out an internal control of the fixation's quality and processing of the tissue to be analyzed. It is known that during the formaldehyde fixation process, irregular preservation of antigens in tumor sample may occur. This can generate false-negative results in immunohistochemical analysis such as PD-L1.

Vimentin is a molecule evenly distributed in tissue samples like vessels and stromal cells. Thus, an antibody that detects a vimentin epitope is suitable for controlling the sample fixation process.

The vimentin analysis was performed by immunohistochemical reaction. The automation platform BenchMark Ventana Ultra® and the mouse monoclonal anti-vimentin antibody (clone V9) from Ventana Roche® were used. The detection system used was the Ultraview DAB®. The entire process was carried out according to the manufacturer's specifications.

The reading of the reaction was performed using an optical microscope by the pathologist. The absence of expression was classified as negative. The reaction was evaluated as positive when there was any expression of vimentin, in cytoplasm or membrane, either in tumor cells or in the stroma of the sample. Thus, negative cases for vimentin expression were excluded from the analysis.

### *Statistical analysis*

The results of the EBER and PD-L1 analysis were correlated with the patients' clinical and pathological data, using the statistical program SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 23.0 for Windows. Analysis was performed using the chi-square and Fisher's exact tests to verify the association between anatomopathological variables and molecular results. Survival rates were assessed using the Kaplan-Meier method and the curves were compared using the log-rank test. Statistical significance was determined for a  $P$  value  $< 0.05$ .

### *Ethical approval*

This study was approved by the Institutional Review Board. Administrative permission was granted from the Barretos Cancer Hospital to conduct this study.

## **RESULTS**

Of the 139 patients with NPC who underwent screening, 124 were eligible for this study. Among these cases, all were evaluated for EBER and 120 samples were submitted to PD-L1 analysis (4 cases did not have enough material). All 124 samples were positive for vimentin.

Among the 124 cases analyzed, 77.4% were male and the median age was 51 years (ranging from 17 to 88 years), and 46.7% were 50 years or less at diagnosis. No age peaks were observed. Most cases were from the Southeast region of Brazil (65.3%), with no history of smoking (56.7%) or alcoholism (59.5%). The predominant histological type was non-keratinizing SCC (96%) and most cases (53.2%) had locally advanced disease (EC IVa) (**Table 1**).

**Table 1. Clinical-demographic characteristics**

Variable	N = 124
Median age, years (range)	51 (17 – 88)
<b>Gender</b>	
Female	28 (22.6%)
Male	96 (77.4%)
<b>Race/skin color</b>	
White	95 (78.5%)
Brown/Black	26 (21.5%)
<b>Naturalness</b>	
Southeast region	81 (65.3%)
Midwest region	20 (16.1%)
Other regions	23 (18.6%)
<b>Origin</b>	
Southeast region	81 (65.3%)
Midwest region	33 (26.6%)
Other regions	10 (8.1%)
<b>Smoking habits</b>	
Never	64 (56.7%)
Active	24 (21.2%)
Former smoker	25 (22.1%)
<b>Alcoholism habits</b>	
No	69 (59.5%)
Yes	47 (40.5%)
<b>Biopsy site</b>	
Primary tumor	87 (70.2%)
Cervical lymph node	37 (29.8%)
<b>Histology</b>	
Keratinizing SCC*	01 (0.8%)
Differentiated non-keratinizing SCC	47 (37.9%)
Undifferentiated non-keratinizing SCC	72 (58.1%)
Basaloid SCC	04 (3.2%)
<b>Clinical Stage**</b>	
I	02 (1.6%)
II	08 (6.5%)
III	31 (25.2%)
IVa	66 (53.7%)
IVb	16 (13.0%)
<b>ECOG PS***</b>	
0	15 (12.1%)
1	95 (76.6%)
2	12 (9.7%)
3	02 (1.6%)

\*squamous cell carcinoma;\*\*AJCC: American Joint Committee on Cancer (8<sup>th</sup> edition); \*\*\*ECOG PS: Eastern Cooperative Group Performance Status.

About EBER analysis, 86.3% of the cases were positive. Among the 72 undifferentiated carcinoma samples, 98.6% were positive for EBER. There was

a statistical significant correlation between EBER positivity and the following variables: positive expression of PD-L1 ( $p=0.004$ ), absence of alcoholism ( $p=0.028$ ), absence of tobacco history ( $p=0.001$ ), absence of comorbidity ( $p=0.022$ ) and UC histology ( $p<0.001$ ) (**Table 2**). After adjusting model through multivariate analysis, only undifferentiated carcinoma histology maintained the correlation with EBER positivity (Odds ratio = 18.72; 95% CI 2.25 – 155.86;  $p=0.007$ ) as well as absence of smoking history (Odds ratio = 7.15; 95% CI 1.38 – 36.92;  $p=0.019$ ).

**Table 2. Univariate analysis for EBER\* positivity**

Variable	EBER positive	EBER negative	<i>p</i> value
Gender	n (%)	n (%)	
Male	83 (77.6%)	13 (76.5%)	0.920
Female	24 (22.4%)	4 (23.5%)	
Race/Skin color			
White	83 (79.0%)	12 (75.0%)	0.746
Brown/Black	22 (21.0%)	4 (25.0%)	
Clinical Stage			
I	2 (1.9%)	0 (0%)	0.976
II	7 (6.6%)	1 (5.9%)	
III	27 (25.5%)	4 (23.5%)	
IVa	56 (52.8%)	10 (58.8%)	
IVb	14 (13.2%)	2 (11.8%)	
PD-L1**			
Positive	63 (61.2%)	4 (23.5%)	<b>0.004</b>
Negative	40 (38.8%)	13 (76.5%)	
Alcoholism Habits			
No	63 (63.6%)	6 (35.3%)	<b>0.028</b>
Yes	36 (36.4%)	11 (64.7%)	
Smoking Habits			
Never	61 (62.9%)	3 (18.7%)	<b>0.001</b>
Active/Former smoker	36 (37.1%)	13 (81.3%)	
Comorbidity			
Absent	69 (64.5%)	6 (35.3%)	<b>0.022</b>
Present	38 (35.5%)	11 (64.7%)	
Non-keratinizing SCC <sup>1</sup>			
Undifferentiated	71 (67.0%)	1 (7.7%)	<b>&lt;0.001</b>
Differentiated	35 (33.0%)	12 (92.3%)	

\*EBER: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs; \*\*PD-L1: programmed cell death ligand-1; <sup>1</sup>SCC: squamous cell carcinoma.

Among the 120 samples analyzed for PD-L1 expression, 55.8% were positive. In 25.8% of these samples there was high expression of TPS (value  $\geq 50\%$ ) and in 34.2% of cases the CPS was  $\geq 20$  (**Table 3**). There was a statistically significant correlation between PD-L1 expression and positivity for EBER ( $p=0.004$ ) (**Table 4**). After adjusting model through multivariate analysis, this significant correlation was maintained (Odds ratio = 5.11; 95% CI 1.55 – 16.80;  $p=0.007$ ). There was no correlation between PD-L1 expression and any clinical-demographic variable.

**Table 3.** Analysis of EBER\* and PD-L1\*\*

EBER (n = 124)	n (%)
Positive	107 (86.3)
Negative	17 (13.7)
PD-L1 (n = 120)	n (%)
Positive	67 (55.8)
Negative	53 (44.2)
PD-L1 – analysis of TPS <sup>1</sup>	n (%)
Negative	58 (48.4)
Positive 1 – 49%	31 (25.8)
Positive $\geq 50\%$	31 (25.8)
PD-L1 – analysis of CPS <sup>2</sup>	n (%)
Negative	53 (44.2)
Positive 1 – 19	26 (21.6)
Positive $\geq 20$	41 (34.2)

\*EBER: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs; \*\*PD-L1: programmed cell death ligand-1; <sup>1</sup>TPS: Tumor Proportion Score; <sup>2</sup>CPS: Combined Positive Score.

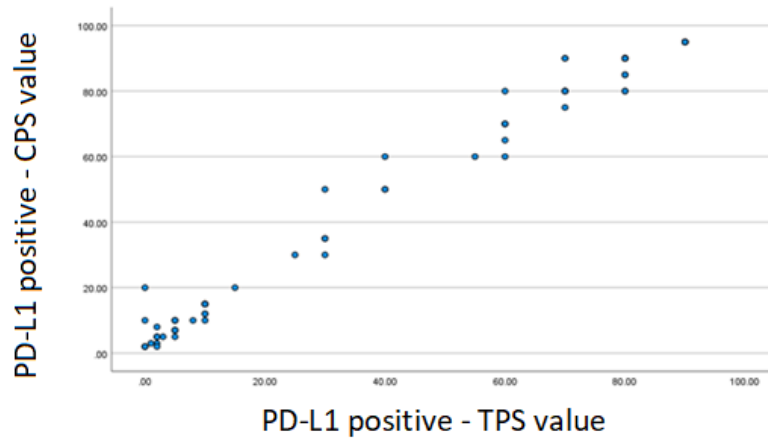
**Table 4. Univariate analysis for PD-L1\* positivity**

Variable	PD-L1 positive	PD-L1 negative	<i>p</i> value
Gender	n (%)	n (%)	
Male	50 (74.6%)	43 (81.1%)	0.397
Female	17 (26.4%)	10 (18.9%)	
Race/Skin color			
White	50 (76.9%)	41 (78.8%)	0.804
Brown/Black	15 (23.1%)	11 (21.2%)	
Clinical Stage			
I	1 (1.5%)	1 (1.9%)	
II	5 (7.5%)	2 (3.8%)	
III	18 (26.9%)	13 (25.0%)	0.930
IVa	34 (50.7%)	29 (55.8%)	
IVb	9 (13.4%)	7 (13.5%)	
EBER**			
Positive	63 (61.2%)	4 (23.5%)	<b>0.004</b>
Negative	40 (38.8%)	13 (76.5%)	
Alcoholism Habits			
No	39 (61.9%)	27 (55.1%)	0.468
Yes	24 (38.1%)	22 (44.9%)	
Smoking Habits			
Never	40 (63.5%)	21 (45.7%)	0.064
Active/Former smoker	23 (36.5%)	25 (54.3%)	
Comorbidity			
Absent	44 (65.7%)	29 (54.7%)	0.222
Present	23 (34.3%)	24 (45.3%)	
Non-keratinizing SCC <sup>1</sup>			
Undifferentiated	45 (67.2%)	26 (54.2%)	0.157
Differentiated	22 (32.8%)	22 (45.8%)	

\*PD-L1: programmed cell death ligand-1; \*\*EBER: Epstein-Barr virus-encoded small RNAs; <sup>1</sup>SCC: squamous cell carcinoma.

Spearman's correlation was performed between the positive TPS and CPS variables. There was a strong correlation demonstrated through the coefficient value of 0.969 (**Figure 1**).

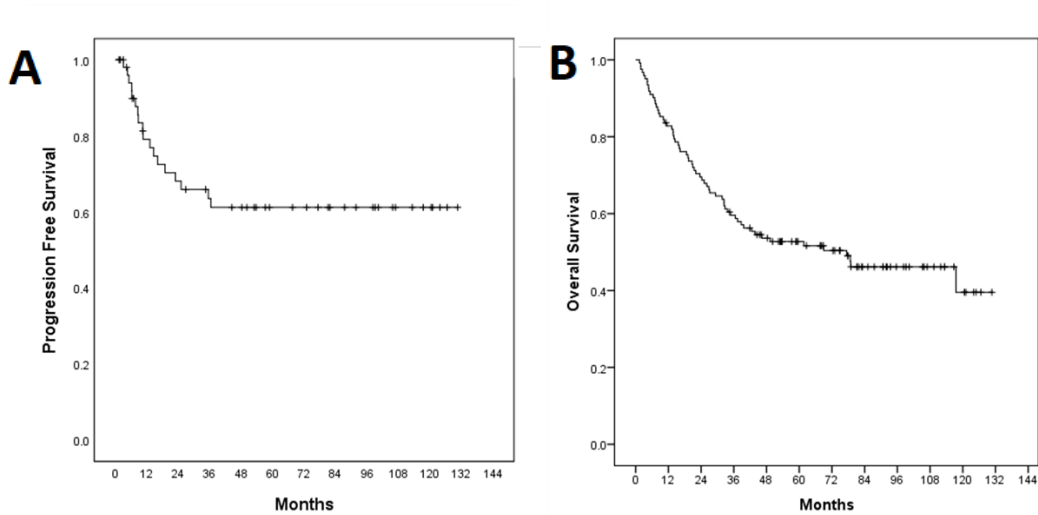




**Figure 1.** Scatter plot - Spearman correlation. PD-L1: programmed cell death ligand-1; TPS: tumor proportion score; CPS: combined positive score.

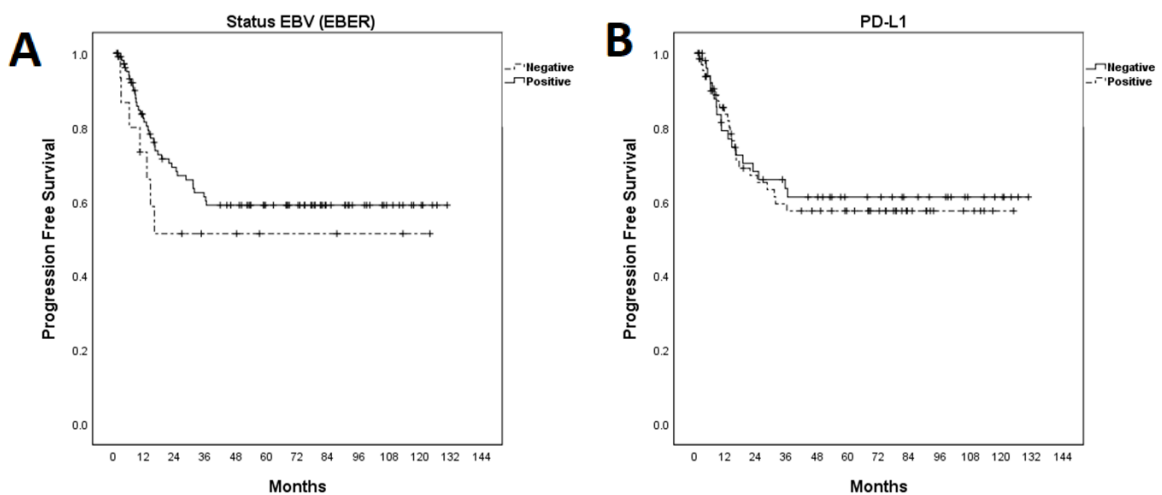
Survival analyzes were performed in 122 cases (1 case was excluded due to loss of follow-up during the initial treatment and 1 case was discarded due to the patient's death before start of treatment). The median follow-up time was 46.15 months (ranging from 1.38 to 130.69 months).

Median progression-free survival (PFS) had not yet been achieved at the time of analysis and was estimated to be 59.9% at 3 years. The median overall survival (OS) was 77.4 months (95% CI 33.57 – 121.22 months) and estimated 5-year OS was 52.7% (**Figure 2**).



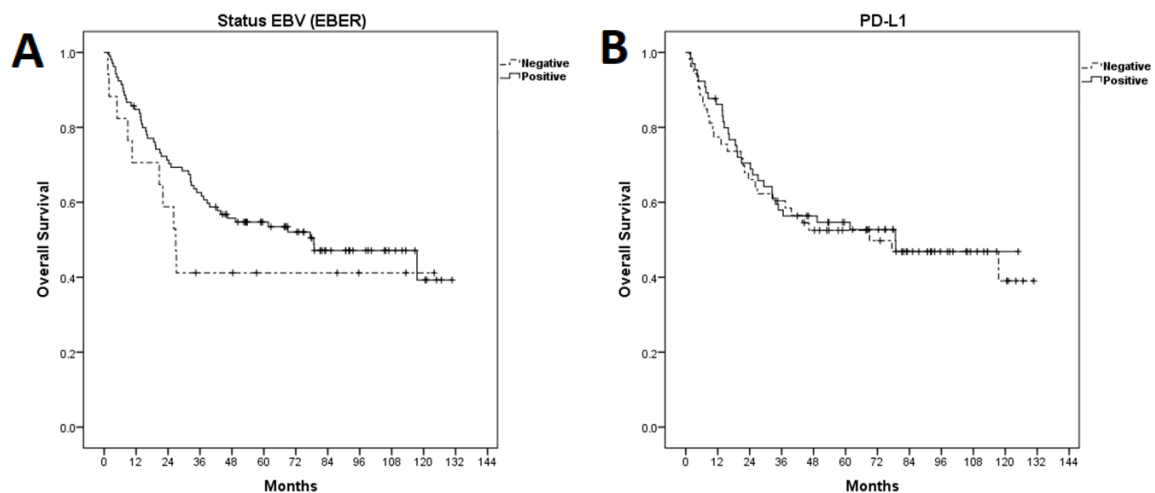
**Figure 2.** Kaplan-Meier curves in 122 cases. A: Progression-free survival (PFS); B: Overall survival (OS).

There was no statistically significant difference between PFS and EBER expression ( $p=0.336$ ) or PD-L1 ( $p=0.772$ ) (**Figure 3**).



**Figure 3.** Kaplan-Meier curves for progression-free survival (PFS). A: PFS according to EBER (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs); B: PFS according to programmed cell death ligand-1 expression.

There was no statistically significant difference between OS and EBER expression ( $p=0.290$ ) or PD-L1 ( $p=0.801$ ) (**Figure 4**).



**Figure 4.** Kaplan-Meier curves for overall survival (OS). A: OS according to EBER (Epstein-Barr virus-encoded small RNAs); B: OS according to programmed cell death ligand-1 expression.

Additionally, there was no significant difference regarding OS when comparing patients with high PD-L1 expression (TPS  $\geq 50\%$ ) versus low expression (TPS  $< 50\%$ ) or negative TPS ( $p=0.750$ ) or when compared in relation to high CPS expression ( $\geq 20$ ) versus low CPS expression ( $< 20$ ) or negative CPS ( $p=0.846$ ).

## DISCUSSION

This is one of the largest series with NPC carriers in a non-endemic region and the first study that described the analysis of PD-L1 in NPC in the Brazilian population.

In this study was observed a high prevalence of the non-keratinizing SCC subtype, reported in 96% of the sample. The keratinizing subtype was rare, only seen in 0.8% of the cases. These results differ from other series from non-endemic regions. Ruuskanen and colleagues reported in a Finnish population that 78% of the cases corresponded to non-keratinizing SCC and 22% to keratinizing SCC<sup>18</sup>. Also, Ou and colleagues reviewed data from 2640 patients from the United States using the SEER database and found that the keratinizing subtype accounted for 39.4% of the cases<sup>5</sup>.

It is interesting to note that Breda and colleagues, when reviewing data from 320 patients with NPC in Portugal, found that 95.75% of the cases corresponded to the non-keratinizing SCC, similar to our serie<sup>19</sup>. Brazil was colonized by Portugal and one hypothesis is that this colonization may be related to the similar results with the Portuguese population.

Another relevant fact from our study was the high positivity for EBER among the undifferentiated carcinoma samples, which corresponded to 98.6%. This high prevalence is seen in populations from endemic region, where studies demonstrate up to 100% EBV expression in undifferentiated NPC<sup>20,21</sup>.

Regarding the expression of PD-L1 this study found 55.8% positivity. The analysis was performed for both TPS and CPS. A strong correlation was observed between them when we performed Spearman's correlation. Thus, when PD-L1 was positive, there was an association between the value of TPS and CPS. Note that the higher the TPS value, the higher the CPS value.

In other tumor sites related to head and neck cancer such as oropharynx, larynx, hypopharynx and oral cavity, the decision regarding the use of immunotherapy for the treatment of advanced disease takes into account the value of CPS<sup>22</sup>. This

analysis evidenced this strong correlation between CPS and TPS and it is hypothesized that in NPC only the TPS assessment can be carried out. The TPS analysis is simpler than the CPS and the pathologist's analysis time could be optimized.

A positive point of this study was the analysis of vimentin through immunohistochemistry prior to PD-L1 analysis. All samples were positive for vimentin. The purpose of this evaluation was to try to assess the immunoantigenicity of the samples to avoid false-negative cases for PD-L1, since some cases originated from biopsies performed in an external service. The vimentin is uniformly distributed in tissues and it is ideally to serve as an internal quality control of tissue fixation<sup>23</sup>.

In a multivariate analysis, a positive correlation was observed between EBER expression and PD-L1 positivity. Some studies have reported the occurrence of PD-L1 overexpression in EBV-related NPC. Fang and colleagues proposed two possible mechanisms for this overexpression: the first would be related to the innate immune system, in which the activation of the constitutive oncogenic pathway mediated by LMP1 generates the overexpression of PD-L1. The second mechanism would be involved with the adaptive immune system, in which PD-L1 would be induced in response to inflammatory signals such as IFN- $\gamma$  that would be produced in an antiviral immune response<sup>14</sup>.

This study showed no difference in OS or PFS according to EBER or PD-L1 expression. Literature data show that EBER positivity is associated with a better prognosis, with better survival rates. Kengjian and colleagues analyzed overall survival in 908 NPC patients and showed that EBER expression was an independent risk factor for overall survival<sup>24</sup>.

The literature data are controversial about PD-L1 expression and prognostic factors. Some series show a better prognosis for high PD-L1 expression while other studies show worse survival rates<sup>25-28</sup>. Ma and colleagues reported in a phase II trial using nivolumab in metastatic and/or refractory NPC, that 33% of PD-L1 positive patients responded to nivolumab while only 13% of those with PD-L1 negative tumors responded, however this did not reach statistical significance. This lack of statistical correlation could be due to the limited sample size<sup>29</sup>. On the other hand, the randomized phase III trial JUPITER-02 that evaluated toripalimab or placebo in combination with cisplatin and gemcitabine in recurrent or metastatic NPC did not observe any difference in PFS between subgroups with different PD-L1 expression<sup>30</sup>.

One of the limitations of the current study is that it is a retrospective analysis and was carried out in a single institution. Most of the patients were born and came from the Southeast and Midwest regions of Brazil and the other country regions were poorly represented in this cohort.

In conclusion, this study corresponds to the largest series of NPC in the Brazilian population and one of the largest in a non-endemic region. The predominant histological profile was non-keratinizing squamous cell carcinoma, showing similarity with endemic regions.

There was a correlation between EBER positivity and presence of undifferentiated carcinoma histology as well as the absence of tobacco history. PD-L1 expression was positive in just over half of the cases. There was a correlation between PD-L1 expression and EBER positivity.

Phase III studies with checkpoint inhibitors are currently underway in NPC patients and may provide more data about the role of PD-L1 expression in this disease.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Marco Antonio Oliveira and Marcos Alves de Lima for the statistical analysis performed in this study.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conception and design: Josiane M Dias, André L Carvalho, Lidia MRB Arantes

Provision of study materials or patients: Josiane M Dias

Collection and assembly of data: Josiane M Dias, Iara VV Santana; Vinicius D da Silva

Data analysis and interpretation: Josiane M Dias, Lidia MRB Arantes

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

## **REFERENCES**

1. Petersson BF, BD, El-Mofty SK, Gillison M, Lewis JS, Nadal A, Nicolai P, Wenig BM: Tumors of the nasopharynx, in El-Naggar AK, CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (ed): *Who Classification of Head and Neck Tumors* (ed 4). Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2017, pp 63-70

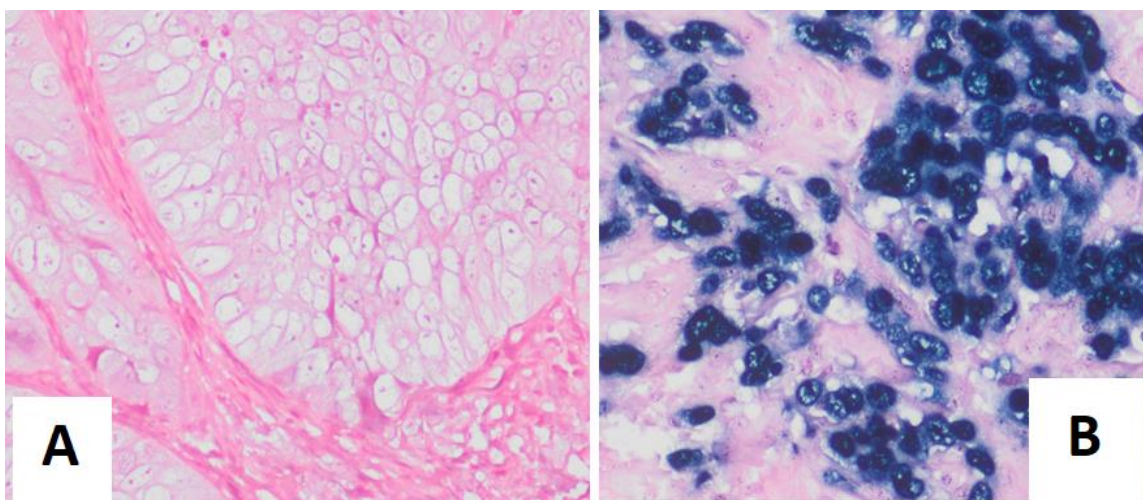
2. Chang ET, Adami H-OJCE, Biomarkers P: The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. 15:1765-1777, 2006
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. 136:E359-E386, 2015
4. Saúde Md. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.
5. Ou S-H, Zell J, Ziogas A, et al: Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology. 18:29-35, 2007
6. Wei WI, Sham JSJTL: Nasopharyngeal carcinoma. 365:2041-2054, 2005
7. Nam J-m, McLaughlin JK, Blot WJJJotNCI: Cigarette smoking, alcohol, and nasopharyngeal carcinoma: a case-control study among US whites. 84:619-622, 1992
8. Vaughan TL, Shapiro JA, Burt RD, et al: Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type. 5:587-593, 1996
9. Perri F, Scarpati GDV, Giuliano M, et al: Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma: the other side of the coin. 26:1017-1025, 2015
10. Tsao SW, Tsang CM, Lo KWJPTotRSBBS: Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. 372:20160270, 2017
11. Xu C, Chen Y-P, Ma JJCCO: Clinical trials in nasopharyngeal carcinoma-past, present and future. 5:20, 2016
12. Tan W-L, Tan E-H, Lim D, et al: Advances in systemic treatment for nasopharyngeal carcinoma. 5:21, 2016
13. Jiang F, Yu W, Zeng F, et al: PD-1 high expression predicts lower local disease control in stage IV M0 nasopharyngeal carcinoma. 19:1-11, 2019
14. Fang W, Zhang J, Hong S, et al: EBV-driven LMP1 and IFN- $\gamma$  up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. 5:12189, 2014
15. Zhang J, Fang W, Qin T, et al: Co-expression of PD-1 and PD-L1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma. 32:86, 2015
16. Rumayor Piña A, Dos Santos HT, Carlos R, et al: Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Guatemalan and Brazilian patients. 25:304-309, 2017
17. Casco F, Ríos M, de Miguel M, et al: Head and neck cancer. An aetiopathogenetic study of non-endemic lymphoepithelioma. 33:9, 2013



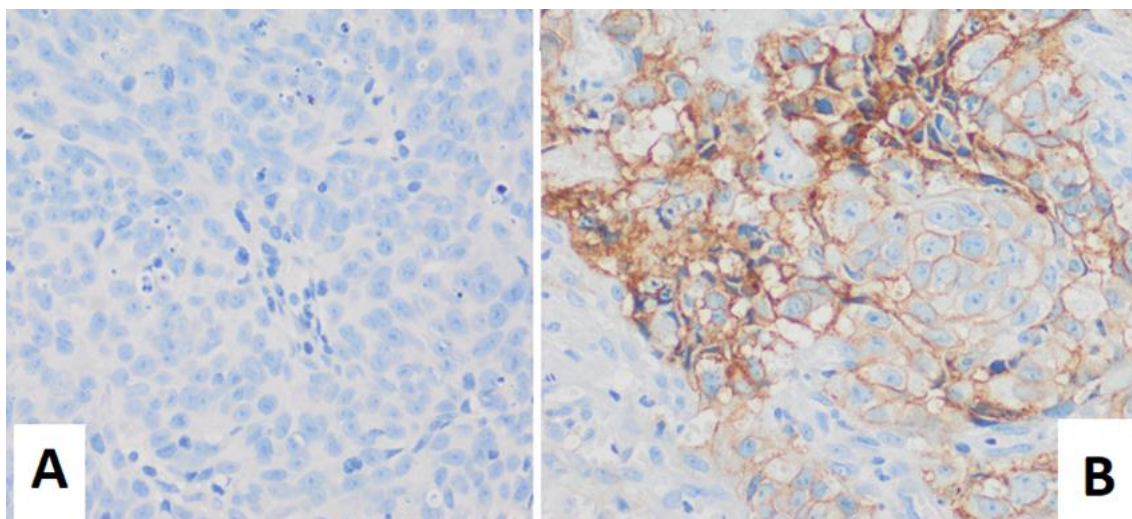
18. Ruuskanen M, Irjala H, Minn H, et al: Epstein-Barr virus and human papillomaviruses as favorable prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma: a nationwide study in Finland. 41:349-357, 2019
19. Eduardo B, Raquel C, Rui MJEaoo-r-l: Nasopharyngeal carcinoma in a south European population: epidemiological data and clinical aspects in Portugal. 267:1607-1612, 2010
20. Pathmanathan R, Prasad U, Chandrika G, et al: Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia. 146:1355, 1995
21. Niedobitek G, Hansmann ML, Herbst H, et al: Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. 165:17-24, 1991
22. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, et al: Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. 394:1915-1928, 2019
23. Battifora HJAjocp: Assessment of antigen damage in immunohistochemistry: the vimentin internal control. 96:669-671, 1991
24. Ke K, Wang H, Fu S, et al: Epstein-Barr virus-encoded RNAs as a survival predictor in nasopharyngeal carcinoma. 127:294-299, 2014
25. Zhu Q, Cai M-Y, Chen C-L, et al: Tumor cells PD-L1 expression as a favorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma patients with pre-existing intratumor-infiltrating lymphocytes. 6:e1312240, 2017
26. Wang Y-Q, Zhang Y, Jiang W, et al: Development and validation of an immune checkpoint-based signature to predict prognosis in nasopharyngeal carcinoma using computational pathology analysis. 7:1-11, 2019
27. Li YF, Ding JW, Liao LM, et al: Expression of programmed death ligand-1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma. 7:378-382, 2017
28. Zheng L, Cao C, Cheng G, et al: Cytomembranic PD-L1 expression in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. 10:5483, 2017
29. Ma BB, Lim W-T, Goh B-C, et al: Antitumor activity of nivolumab in recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma: an international, multicenter study of the mayo clinic phase 2 consortium (NCI-9742). 36:1412, 2018
30. Xu R-h, Mai H-Q, Chen Q-Y, et al: JUPITER-02: Randomized, double-blind, phase III study of toripalimab or placebo plus gemcitabine and cisplatin as first-line treatment for recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma (NPC), American Society of Clinical Oncology, 2021

#### 4 RESULTADOS

Foram revisados prontuários de 139 pacientes. Destes, 4 foram excluídos por se tratarem de histologia diferente de carcinoma nasofaríngeo (1 plasmocitoma, 1 adenocarcinoma e 2 carcinomas mucoepidermóides) e 11 foram excluídos por não possuírem material tumoral disponível. Dentre os 124 casos restantes, todos foram avaliados para EBER (**Figura 1**) e 120 amostras foram submetidas a análise de PD-L1 (**Figura 2**).



**Figura 1** – Detecção de pequenos ácidos ribonucleicos codificados pelo vírus Epstein-Barr (EBER) através de hibridização *in situ*, visualização ao microscópio óptico, magnificação original de 400 vezes. A) EBER negativo; B) EBER positivo = detecção do precipitado azul.



**Figura 2** - Detecção do ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) através de imunohistoquímica utilizando o anticorpo E1L3N, visualização ao microscópio óptico, magnificação original de 400 vezes. A) PD-L1 negativo; B) PD-L1 positivo = coloração marrom na membrana celular das células tumorais.

Dentre os 124 casos analisados, 16 pacientes apresentavam metástase a distância ao diagnóstico e os sítios mais frequentes de doença foram ossos (56,3%), pulmão (43,8%) e fígado (25%).

O tratamento inicial mais utilizado foi quimioterapia de indução seguida de concomitância (59,7%). O esquema mais utilizado na indução foi *Al Sarraf* (cisplatina 100 mg/m<sup>2</sup> D1 + 5-fluorouracil 1000 mg/m<sup>2</sup> D1-4) que correspondeu a 58,1% dos casos. Houve resposta ao tratamento inicial em 89,4% dos casos (**Tabela 2**). Logo após o tratamento inicial 11,3% dos casos evoluíram a óbito. Destes, 28% ocorreram devido a toxicidade ao tratamento e 50% estavam relacionados a progressão tumoral (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Características do tratamento instituído e evolução.

Variável	N* = 124
<b>Tratamento inicial</b>	
Indução seguida de concomitância	74 (59,7%)
Concomitância seguida QT adjuv.*	18 (14,5%)
Concomitância exclusiva	15 (12,1%)
Radioterapia exclusiva	03 (2,4%)
Quimioterapia paliativa	07 (5,7%)
Paliativo exclusivo	02 (1,6%)
Outro	05 (4,0%)
<b>Resposta ao tratamento inicial*</b>	
Completa	74 (65,5%)
Parcial	27 (23,9%)
Progressão de doença	12 (10,6%)
<b>Evolução após tratamento inicial</b>	
Ausência de recidiva ou PD**	58 (46,8%)
Recidiva/PD locorregional	13 (10,5%)
Recidiva/PD a distância	26 (21,0%)
Recidiva/PD locorregional+ distância	06 (4,8%)
Óbito	14 (11,3%)
Perda de seguimento	07 (5,6%)
<b>Status atual</b>	
Vivo sem doença	53 (42,8%)
Vivo com doença	02 (1,6%)
Óbito	64 (51,6%)
Perda de seguimento	05 (4,0%)

\*QT adjuv. = quimioterapia adjuvante; \*\* PD: progressão de doença.

\*casos com valores ignorados foram excluídos da análise.

## 5 CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo corresponde à maior série já realizada em portadores de carcinoma de nasofaringe na população brasileira e uma das maiores em uma região não endêmica. O perfil histológico predominante foi o carcinoma espinocelular não-queratinizante, apresentando semelhança com regiões endêmicas.

Existiu correlação entre a positividade do EBER e a presença de carcinoma indiferenciado, assim como com ausência de história de tabagismo. A expressão de PD-L1 foi positiva em pouco mais da metade dos casos. Houve uma correlação direta entre a expressão de PD-L1 e a positividade de EBER.

Não houveram correlações entre status de EBV e expressão de PD-L1 com sobrevida livre de progressão ou sobrevida global.

Estudos de fase III com inibidores de *checkpoint* estão atualmente em andamento em portadores de carcinoma de nasofaringe e poderão fornecer mais dados sobre o papel da expressão de PD-L1 nesta doença.

## REFERÊNCIAS

1. Yamashiro I, Souza RPD. *Imaging diagnosis of nasopharyngeal tumors*. **Brazilian Radiology**. 2007;40(1):45-52.
2. Petersson BF BD, El-Mofty SK, Gillison M, Lewis JS, Nadal A, Nicolai P, Wenig BM. *Tumors of the nasopharynx*. In: El-Naggar AK CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editor. *Who Classification of Head and Neck Tumors*. 4 ed. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**; 2017. p. 63-70.
3. Chang ET, Adami H-O. *The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma*. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**. 2006;15(10):1765-77.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. 2021;71(3):209-49.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. **International journal of cancer**. 2015;136(5):E359-E86.
6. Saúde Md. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2019.
7. Ou S-H, Zell J, Ziogas A, Anton-Culver HJAoo. *Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology*. 2007;18(1):29-35.
8. Wei WI, Sham JS. *Nasopharyngeal carcinoma*. **Lancet**. 2005;365(9476):2041-54.
9. Mabuchi K, Bross DS, Kessler II. *Cigarette smoking and nasopharyngeal carcinoma*. **Cancer**. 1985;55(12):2874-6.
10. Nam J-m, McLaughlin JK, Blot WJJJotNCl. *Cigarette smoking, alcohol, and nasopharyngeal carcinoma: a case-control study among US whites*. 1992;84(8):619-22.
11. Vaughan TL, Shapiro JA, Burt RD, Swanson GM, Berwick M, Lynch CF, et al. *Nasopharyngeal cancer in a low-risk population: defining risk factors by histological type*. 1996;5(8):587-93.

12. Buell P. *The effect of migration on the risk of nasopharyngeal cancer among Chinese*. **Cancer research**. 1974;34(5):1189-91.
13. Mimi CY, Ho JH, Lai S-H, Henderson BE. *Cantonese-style salted fish as a cause of nasopharyngeal carcinoma: report of a case-control study in Hong Kong*. **Cancer research**. 1986;46(2):956-61.
14. Yu MC, Huang TB, Henderson BE. *Diet and nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Guangzhou, China*. **International journal of cancer**. 1989;43(6):1077-82.
15. Zou XN, Lu SH, Liu B. *Volatile N-nitrosamines and their precursors in chinese salted fish—a possible etological factor for NPC in China*. **International journal of cancer**. 1994;59(2):155-8.
16. Perri F, Scarpato GDV, Giuliano M, D’Aniello C, Gnoni A, Cavaliere C, et al. *Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma: the other side of the coin*. **Anti-cancer drugs**. 2015;26(10):1017-25.
17. Crawford DH. *Biology and disease associations of Epstein–Barr virus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**. 2001;356(1408):461-73.
18. Kieff E, Rickinson A. *Epstein-Barr virus and its replication, p 2603–2654*. **Fields virology**. 2007;2.
19. Chan OSH, Kwanetz M, Ng WT, Koeppen H, Chan LK, Yeung RMW, et al. *Characterization of PD-L1 expression and immune cell infiltration in nasopharyngeal cancer*. **Oral oncology**. 2017;67:52-60.
20. Jiang F, Yu W, Zeng F, Cheng G, Xu J, Yang S, et al. *PD-1 high expression predicts lower local disease control in stage IV M0 nasopharyngeal carcinoma*. **BMC Cancer**. 2019;19(1):503.
21. Inoue H, Sato Y, Tsuchiya B, Nagai H, Takahashi H, Kameya T. *Expression of Epstein-Barr virus-encoded small nuclear RNA 1 in Japanese nasopharyngeal carcinomas*. **Acta Oto-Laryngologica**. 2002;122(4):113-7.
22. Tsao SW, Tsang CM, Lo KW. *Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma*. **Phil Trans R Soc B**. 2017;372(1732):20160270.
23. Gulley ML. *Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases*. **The Journal of molecular diagnostics**. 2001;3(1):1-10.

24. Xu C, Chen Y-P, Ma J. *Clinical trials in nasopharyngeal carcinoma—past, present and future*. **Chinese clinical oncology**. 2016;5(2).
  
25. Zhang L, Huang Y, Hong S, Yang Y, Yu G, Jia J, et al. *Gemcitabine plus cisplatin versus fluorouracil plus cisplatin in recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial*. **The Lancet**. 2016;388(10054):1883-92.
  
26. Tan W-L, Tan E-H, Lim DW-T, Ng Q-S, Tan DS-W, Jain A, et al. *Advances in systemic treatment for nasopharyngeal carcinoma*. **Chinese clinical oncology**. 2016;5(2).
  
27. Hsu C, Lee S-H, Ejadi S, Even C, Cohen RB, Le Tourneau C, et al. *Safety and antitumor activity of pembrolizumab in patients with programmed death-ligand 1–positive nasopharyngeal carcinoma: Results of the KEYNOTE-028 study*. **Journal of Clinical Oncology**. 2017;35(36):4050-6.
  
28. Yang Y, Qu S, Li J, Hu C, Xu M, Li W, et al. *Camrelizumab versus placebo in combination with gemcitabine and cisplatin as first-line treatment for recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma (CAPTAIN-1st): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial*. **The Lancet Oncology**, 2021.
  
29. Xu R-h, Mai H-Q, Chen Q-Y, Chen D, Hu C, Yang K, et al. *JUPITER-02: Randomized, double-blind, phase III study of toripalimab or placebo plus gemcitabine and cisplatin as first-line treatment for recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma (NPC)*. **American Society of Clinical Oncology**; 2021.
  
30. Fang W, Zhang J, Hong S, Zhan J, Chen N, Qin T, et al. *EBV-driven LMP1 and IFN- $\gamma$  up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy*. **Oncotarget**. 2014;5(23):12189.
  
31. Chen Q, Wang C, Chen G, Hu Q, Gu Z. *Delivery Strategies for Immune Checkpoint Blockade*. **Advanced healthcare materials**. 2018:1800424.
  
32. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. *PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome*. **Frontiers in pharmacology**. 2017;8:561.
  
33. Cao C, Wei Q, Tang X, Jia Y, Sun X, Li W, et al. *PD-1 and PD-L1 in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Substudy of a randomized phase III trial*. **Head Neck**. 2019;41(5):1427-33.
  
34. Larbcharoensub N, Mahaprom K, Jiarpinitnun C, Trachu N, Tubthong N, Pattaranutaporn P, et al. *Characterization of PD-L1 and PD-1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocyte in Epstein-Barr Virus-associated Nasopharyngeal Carcinoma*. **Am J Clin Oncol**. 2018;41(12):1204-10.



35. Lee VH, Lo AW, Leung CY, Shek WH, Kwong DL, Lam KO, et al. *Correlation of PD-L1 Expression of Tumor Cells with Survival Outcomes after Radical Intensity-Modulated Radiation Therapy for Non-Metastatic Nasopharyngeal Carcinoma*. **PLoS One**. 2016;11(6):e0157969.
36. Li YF, Ding JW, Liao LM, Zhang ZL, Liao SS, Wu Y, et al. *Expression of programmed death ligand-1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma*. **Mol Clin Oncol**. 2017;7(3):378-82.
37. Liu YJ, Tsang NM, Hsueh C, Yeh CJ, Ueng SH, Wang TH, et al. *Low PD-L1 Expression Strongly Correlates with Local Recurrence in Epstein-Barr Virus-Positive Nasopharyngeal Carcinoma after Radiation-Based Therapy*. **Cancers (Basel)**. 2018;10(10).
38. Minichsdorfer C, Oberndorfer F, Krall C, Kornek G, Mullauer L, Wagner C, et al. *PD-L1 Expression on Tumor Cells Is Associated With a Poor Outcome in a Cohort of Caucasian Nasopharyngeal Carcinoma Patients*. **Front Oncol**. 2019;9:1334.
39. Qu Y, Wang D, Yang L, Liu HY, Cui W, Che YQ. *Expression and clinical significance of programmed death ligand 1 in nasopharyngeal carcinoma*. **Mol Clin Oncol**. 2018;9(1):75-81.
40. Wang Y-Q, Zhang Y, Jiang W, Chen Y-P, Xu S-Y, Liu N, et al. *Development and validation of an immune checkpoint-based signature to predict prognosis in nasopharyngeal carcinoma using computational pathology analysis*. 2019;7(1):1-11.
41. Zhang J, Fang W, Qin T, Yang Y, Hong S, Liang W, et al. *Co-expression of PD-1 and PD-L1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma*. **Med Oncol**. 2015;32(3):86.
42. Zhao L, Liao X, Hong G, Zhuang Y, Fu K, Chen P, et al. *Mismatch repair status and high expression of PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma*. **Cancer Manag Res**. 2019;11:1631-40.
43. Zheng L, Cao C, Cheng G, Hu Q, Chen X. *Cytoplasmic PD-L1 expression in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma*. **Onco Targets Ther**. 2017;10:5483-7.
44. Zhou Y, Shi D, Miao J, Wu H, Chen J, Zhou X, et al. *PD-L1 predicts poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma irrespective of PD-1 and EBV-DNA load*. **Sci Rep**. 2017;7:43627.
45. Zhu Q, Cai MY, Chen CL, Hu H, Lin HX, Li M, et al. *Tumor cells PD-L1 expression as a favorable prognosis factor in nasopharyngeal carcinoma patients with pre-existing intratumor-infiltrating lymphocytes*. **Oncoimmunology**. 2017;6(5):e1312240.
46. Rumayor Piña A, dos Santos HT, Carlos R, Altemani A, de Almeida OP. *Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Guatemalan and Brazilian patients*. **International Journal of Surgical Pathology**. 2017;25(4):304-9.

47. Casco F, Ríos M, de Miguel M, González T, Fernández AM, Galera-Ruiz H, et al. *Head and neck cancer. An aetiopathogenetic study of non-endemic lymphoepithelioma.* 2013;33(1):9.

## ANEXOS

## Anexo A – Formulário de coleta de dados

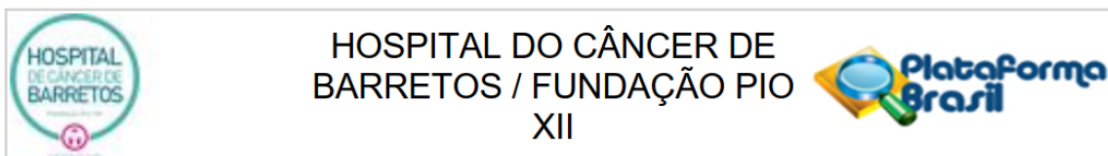
## FICHA DE COLETA DE DADOS

ETIQUETA

<b>Josiane Mourão Dias</b>			
Análise da expressão do vírus epstein-barr (ebv) e pd-l1 em portadores de carcinoma de nasofaringe em região não endêmica			
<b>IDENTIFICAÇÃO</b>			
1	Número de Identificação	1	
2	Data do preenchimento da ficha DD/MM/AAAA	2	___/___/_____
3	Iniciais do Nome	3	
4	Registro Hospitalar	4	
5	Data de nascimento DD/MM/AAAA	5	___/___/_____
6	Gênero 1 – Masculino; 2 – Feminino; 99-ignorado	6	
7	Cor/Raça (IBGE) 1- Branca; 2- Parda; 3- Negra; 4- Amarela; 5-Indígena; 99- Ignorado	7	
8	Naturalidade 1, Acre; 2, Alagoas; 3, Amapá; 4, Amazonas; 5, Bahia; 6, Ceará; 7, Distrito Federal; 8, Espírito Santo; 9, Goiás; 10, Maranhão; 11, Mato Grosso; 12, Mato Grosso do Sul; 13, Minas Gerais; 14, Pará; 15, Paraíba; 16, Paraná; 17, Pernambuco; 18, Piauí; 19, Rio de Janeiro; 20, Rio Grande do Norte; 21, Rio Grande do Sul; 22, Rondônia; 23, Roraima; 24, Santa Catarina; 25, São Paulo; 26, Sergipe; 27, Tocantins; 99, ignorado	8	
9	Procedência 1, Acre; 2, Alagoas; 3, Amapá; 4, Amazonas; 5, Bahia; 6, Ceará; 7, Distrito Federal; 8, Espírito Santo; 9, Goiás; 10, Maranhão; 11, Mato Grosso; 12, Mato Grosso do Sul; 13, Minas Gerais; 14, Pará; 15, Paraíba; 16, Paraná; 17, Pernambuco; 18, Piauí; 19, Rio de Janeiro; 20, Rio Grande do Norte; 21, Rio Grande do Sul; 22, Rondônia; 23, Roraima; 24, Santa Catarina; 25, São Paulo; 26, Sergipe; 27, Tocantins; 99, ignorado	9	
10	Profissão (descrever) _____ ; 99-ignorado	10	_____
11	Data de admissão DD/MM/AAAA	11	___/___/_____
<b>EXAME FÍSICO E COMORBIDADES</b>			
12	PS ECOG início tratamento 0 - 4; 99 – Ignorado	12	
13	Sintoma – dor 0-ausente; 1-leve; 2-moderada; 3-grave; 4-incapacitante; 99-ignorado	13	
14	Sintoma – obstrução nasal 0-ausente; 1-presente; 99-ignorado	14	
15	Sintoma – epistaxe 0-ausente; 1-presente; 99-ignorado	15	

16	Se outros sintomas, descrever:		16	_____
17	Tabagismo	<b>0- Nunca; 1- Ativo; 2- Passado; 99 – Ignorado</b>	17	
18	Se tabagismo, qual tipo de cigarro	<b>0- papel 1- palha; 2- ambos; 99 – Ignorado</b>	18	
19	Se tabagismo, quantos cigarros por dia	número; 99 – ignorado	19	_____
20	Se tabagismo, quantos anos de tabagismo	número; 99 – ignorado	20	_____
21	Se tabagismo, qual carga tabágica em anos-maço	número; 99 – ignorado	21	_____
22	Etilismo	<b>0- Não; 1- sim; 99 – Ignorado</b>	22	
23	Se etilismo, qual quantidade	<b>0- Social; 1- Fim de semana; 2- Diário; 99 – Ignorado</b>	23	
24	Comorbidades 0-Nenhuma; 1-Tuberculose; 2-Diabete; 3-Cardiopatia; 4-Hepatopatia; 5-Coagulopatia; 6-HAS; 7-DPOC; 8-outra		24	
25	Se outra comorbidade, descrever:		25	
<b>DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO E ESTADIAMENTO</b>				
26	Data anátomo-patológico	<b>DD/MM/AAAA</b>	26	___/___/_____
27	Número E	_____		
28	Idade ao diagnóstico		27	
29	Histologia	<b>1-CEC queratinizante; 2-CEC não-queratinizante bem diferenciado); 3- CEC não-queratinizante indiferenciado); 4- CEC basalóide; 5- Outras histologias; 99-ignorado</b>	28	
30	Se outra histologia, descrever		29	
31	Status EBV – EBER	<b>0-negativo; 1-positivo; 99-ignorado</b>	30	
32	Status PD-L1	<b>0-negativo; 1-positivo; 99-ignorado</b>	31	
33	Se PD-L1 positivo, qual valor: - TPS - CPS		32	_____
34	Estadiamento T	<b>0-Tx; 1- T0; 2- Tis; 3- T1; 4- T2; 5- T3; 6-T4; 99-ignorado</b>	33	
35	Estadiamento N	<b>0-Nx; 1-N0; 2-N1; 3-N2; 4-N3; 99-ignorado</b>	34	
36	Estadiamento M	<b>0- Mx; 1- M0; 2- M1; 99-ignorado</b>	35	
37	Estadiamento Clínico (AJCC 2017 – 8ª edição)	<b>0- 0; 1- I; 2- II; 3- III; 4- IVa; 5- IVb; 99-ignorado</b>	36	
38	Se EC IVb, qual o sítio de metástase	<b>1-pulmão; 2-fígado; 3-osso; 4-outro; 99- Ignorado</b>	37	
39	Se outro sítio de metástase, descrever		38	
<b>TRATAMENTO</b>				
40	Tratamento inicial 1-QT indução seguida por concomitância; 2-concomitância seguida por QT adjuvante; 3-concomitância apenas; 4-radioterapia exclusiva; 5-QT paliativa; 6-outro; 99-ignorado		39	
41	Data de início da QT	<b>DD/MM/AAAA</b>		___/___/_____
42	Data de término da QT	<b>DD/MM/AAAA</b>		___/___/_____
43	Se QT indução seguida por concomitância, qual esquema de QT indução 1-cddp e docetaxel; 2-cddp/docetaxel/5FU; 3-AI Sarraf; 4-outro; 99-ignorado		40	
44	Se QT indução seguida por concomitância, quantos ciclos de QT		41	

45	Se QT adjuvante, qual esquema 1-cddp e docetaxel; 2-cddp/docetaxel/5FU; 3-AI Sarraf; 4-outro; 99-ignorado	42	
46	Se QT adjuvante, quantos ciclos	43	
47	Se QT paliativa, qual esquema 1-cddp e gemzar; 2-carbo e gemzar; 3-cddp e taxol; 4-carbo e taxol; 5-AI Sarraf; 6-cddp e docetaxel; 7-carbo e docetaxel; 8-outro; 9-ignorado	44	
48	Completo esquema QT proposto 0-não; 1-sim; 99-ignorado	45	
49	Se não, qual justificativa 1-toxicidade QT; 2-perda de seguimento; 3-outro; 99-ignorado	46	
50	Se toxicidade, qual 1-hematológica; 2-renal; 3-GTI; 4-outra; 99-ignorado	47	
51	Se concomitância, qual esquema QT 1-cddp pleno; 2-cddp semanal; 3-outro; 99-ignorado	48	
52	Se radioterapia, qual modalidade de RT 1-2D; 2-3D; 3-IMRT; 4-SBRT; 99-ignorado	49	
53	Se radioterapia, qual dose de RT	50	
54	Data de início da RT DD/MM/AAAA		___/___/_____
55	Data de término da RT DD/MM/AAAA		___/___/_____
56	Melhor resposta RECIST ao tratamento inicial 0- RC; 1- RP; 2- DE; 3- PD; 99- Não avaliado/Ignorado	51	
57	Necessitou resgate cirúrgico 0-não; 1-sim	52	
58	Se cirurgia, qual procedimento	53	
<b>EVOLUÇÃO</b>			
59	Evolução após tto inicial 0-ausência de recidiva ou PD; 1-recidiva ou PD locorregional; 2-recidiva ou PD sistêmica; 3-recidiva ou PD locorregional e sistêmica; 4-óbito; 5-perda de seguimento	54	
60	Data da recidiva ou PD DD/MM/AAAA	55	___/___/_____
61	Se recidiva ou PD sistêmica, em qual sítio 1-pulmão; 2-osso; 3-fígado; 4-outro; 99-ignorado	56	
62	Número de linhas de QT paliativa	57	
63	Segunda neoplasia 0-não; 1-sim		
64	Data diagnóstico da segunda neoplasia DD/MM/AAAA		___/___/_____
65	Sítio da segunda neoplasia _____		
66	Data do óbito ou última informação no prontuário DD/MM/AAAA	58	___/___/_____
67	Se óbito, qual motivo 1-pelo tumor; 2-toxicidade ao tto; 3-comorbidade; 4-outro; 99-ignorado	59	
68	Status atual 0- Vivo sem doença; 1- Vivo com doença; 2-Óbito; 3-Perda de seguimento	60	

**Anexo B – Carta de aprovação do CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE RETROSPECTIVA DA EXPRESSÃO DE EBV E PD-L1 EM CARCINOMA DE NASOFARINGE EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA E CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICO-DEMOGRÁFICOS

**Pesquisador:** Josiane Mourão Dias

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 05500918.4.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.125.135

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1733/2019.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 29 de Janeiro de 2019

Assinado por:

**Maicon Fernando Zanon da Silva**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

**Bairro:** Dr. Paulo Prata

**CEP:** 14.784-400

**UF:** SP **Município:** BARRETOS

**Telefone:** (17)3321-0347

**Fax:** (17)3321-6600

**E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

## Anexo C – Comprovante de submissão do artigo

**PO.22.00190 - Submission Confirmation - [EMID:f54cf540a7996481]**

josimourao@yaho.../Entrada



**JCO Precision Oncology** <em@editorialmanager.com>  
Para: Josiane M Dias <josimourao@yahoo.com.br>

31 de mar. às 13:12

You are being carbon copied ("cc:d") on an e-mail "To" "Lidia MRB Arantes" [lirebolho@hotmail.com](mailto:lirebolho@hotmail.com)

CC: "Josiane M Dias" [josimourao@yahoo.com.br](mailto:josimourao@yahoo.com.br), "lara VV Santana" [jarasantana.hcb@gmail.com](mailto:jarasantana.hcb@gmail.com), "Vinicius D da Silva" [vds.hcb@vds pathology.com](mailto:vds.hcb@vds pathology.com), "André L Carvalho" [carvalhoal@gmail.com](mailto:carvalhoal@gmail.com)

TITLE: Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV) and PD-L1 expression in nasopharyngeal carcinoma patients in a non-endemic region

Dear Dr. Arantes,

The above submission has been received by JCO Precision Oncology and has been assigned the manuscript tracking number PO.22.00190.

Thank you for submitting your work to JCO Precision Oncology.

Sincerely,

Editorial Office  
JCO Precision Oncology