

Does Epstein-Barr virus infection have an influence on the development of laryngeal carcinoma? Detection of EBV by Real-Time Polymerase Chain Reaction in tumour tissues of patients with laryngeal carcinoma

Infecção pelo vírus Epstein-Barr tem influência sobre o desenvolvimento do carcinoma de laringe? Detecção de EBV pelo Real-Time Polymerase Chain Reaction em tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de laringe

Tuba Muderris¹, Seyyal Rota², Togay Muderris³, Erdogan İnal⁴, Isıl Fidan⁵

Keywords:

Epstein-Barr virus infections;
laryngeal neoplasms;
polymerase chain reaction.

Palavras-chave:

infecções por vírus Epstein-Barr;
neoplasias laríngeas;
reação em cadeia da polimerase.

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is a well-known carcinogenic virus, and the association of EBV with some tumours suggests that there may also be an association between laryngeal carcinoma and EBV. **Objective:** The aim of this study is to determine the role of EBV in the aetiology of laryngeal carcinoma. **Method:** Prospective investigation the EBV with real time polymerase chain reaction in tumour tissues of 25 patients with laryngeal carcinoma and 17 patients with benign laryngeal lesions, and investigation of the relationship between the presence of viral DNA and patients' smoking habits, alcohol consumption, localization and differentiation of the tumour. **Results:** There was no significant difference between the control group and patient group in terms of EBV polymerase chain reaction positivity ($p > 0.05$). Also we couldn't find a statistically significant relationship between EBV positivity and differentiation of the tumour, localization of the tumour, smoking and alcohol consumption habits ($p > 0.05$). **Conclusion:** Our results suggest that, although EBV is present in some of the squamous cell laryngeal carcinomas, its presence has no effect on the pathogenesis of laryngeal carcinomas.

Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um conhecido vírus carcinogênico. A associação entre EBV e alguns tumores sugere que também pode haver correlação entre carcinoma de laringe e EBV. **Objetivo:** O presente estudo pretende determinar o papel do EBV na etiologia do carcinoma de laringe. **Método:** Estudo prospectivo sobre EBV por reação em cadeia da polimerase em tempo real em tecidos tumorais de 25 pacientes com carcinoma de laringe e 17 pacientes com lesões benignas de laringe; análise da relação entre presença de DNA viral e tabagismo, etilismo, localização e diferenciação tumoral. **Resultados:** Não houve diferenças significativas entre os grupos de controle e de estudo para positividade da PCR para EBV ($p > 0,05$). Não foi identificada relação estatisticamente significativa entre positividade para EBV e diferenciação tumoral, localização da neoplasia, tabagismo ou etilismo ($p > 0,05$). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que, a despeito de sua identificação em alguns carcinomas espinocelulares de laringe, a presença de EBV não teve qualquer influência na patogénia do carcinoma de laringe.

¹ Microbiólogo.

² Professor (Chefe, Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina da Universidade Gazi, Ankara, Turquia).

³ Especialista (Otorrinolaringologista).

⁴ Professor (Departamento de Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina da Universidade Gazi, Ankara, Turquia).

⁵ Professor Associado (Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina da Universidade Gazi, Ankara, Turquia).

Endereço para correspondência: Togay Muderris. Ataturk Education and Research Hospital, Department of Otolaryngology. 06800 Bilkent, Ankara, Turquia.

Tel: 00905323076476. E-mail: togaymuderris@yahoo.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) do BJORL em 21 de outubro de 2012. cod. 10534.

Artigo aceito em 27 de março de 2013.

INTRODUÇÃO

Doenças malignas de cabeça e pescoço são responsáveis por 4% de todos os tipos de câncer. Os carcinomas de laringe representam de 25% a 40% dos tumores malignos de cabeça e pescoço¹. O papel de vários fatores, especialmente do tabagismo e do etilismo, foi claramente demonstrado no desenvolvimento do carcinoma de laringe. Sabe-se, ainda, que certos vírus têm potencial oncogênico. Há vários anos, a relação entre carcinoma de laringe e vírus se tornou um popular tópico pesquisa²⁻⁴.

O vírus Epstein-Barr (EBV) está presente em todas as populações e infecta mais de 95% dos seres humanos durante a primeira década de vida⁵. O alcance do gênero dos linfocitovírus, que também inclui o EBV, é geralmente restrito a linfócitos B de primatas, o sítio das infecções *in vivo* por vírus latente. A infecção de linfócitos B de primatas por linfocitovírus tipicamente resulta em infecção latente caracterizada pela persistência do genoma viral com expressão de produtos genéticos latentes que contribuem com o processo de transformação e proliferação celular⁶. A íntima relação entre infecção por EBV e carcinoma nasofaríngeo é amplamente reconhecida⁷. Carcinomas que compartilham as características fisiológicas dos carcinomas nasofaríngeos indiferenciados foram identificados em outras partes do corpo, incluindo timo, laringe, amígdalas, glândulas salivares, pulmões, pele, colo uterino, bexiga e estômago^{2,7-23}. Recentemente, estudos descreveram a detecção de EBV por PCR em percentual significativo de tumores de mama e carcinomas hepatocelulares^{5,7,8,23}. Outros estudos demonstraram um possível papel para o EBV no desenvolvimento de carcinoma espinocelular de laringe⁸.

Objetivo

O DNA do EBV foi investigado com o uso de um método molecular sensível e específico, a reação da cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), a partir de tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de laringe para determinar o papel do EBV na etiologia do carcinoma de laringe. Foi também analisada a relação entre a presença de DNA viral e tabagismo, etilismo, localização (glótica, supraglótica ou subglótica) e diferenciação do tumor (bem, moderado ou pouco diferenciado).

MÉTODO

Foram incluídas no estudo amostras frescas de tecido tumoral retiradas de 25 pacientes aleatoriamente escolhidos, atendidos no Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço entre novembro de 2007 e novembro de 2008 com queixas de rouquidão, dispneia, tosse, garganta inflamada e diagnóstico de carcinoma de laringe com base nos resultados de exame patológico feitos após laringectomia ou biópsia.

O grupo de controle foi composto por amostras frescas de tecido retiradas de pacientes operados por lesões laringeas benignas como pólipos, nódulos, cistos ou granulomas. Também foram incluídas biópsias de pacientes diagnosticados com câncer de laringe que subsequentemente tiveram desmentida a malignidade de suas lesões por meio de exames de anatomia patológica. Dezesete amostras obtidas de pacientes com lesões benignas formaram o grupo de controle. Biópsias de lesões pré-malignas como leucoplasia ou displasia não foram incluídas no estudo. O presente estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (protocolo nº 09-230). Todos os pacientes foram informados sobre o estudo no pré-operatório e assinaram termos de consentimento informado.

Todas as amostras foram colhidas na sala de cirurgia a partir de biópsias de tecido fresco pouco antes da fixação do tecido em formalina em procedimento estéril para evitar contaminação.

Os pacientes foram submetidos a meticuloso exame de cabeça e pescoço, incluindo laringoscopia indireta, e foram avaliados para localização do tumor, tabagismo, etilismo, tempo de tabagismo e etilismo e tipo histopatológico do tumor. Os dados sobre tabagismo e etilismo foram colhidos no pré-operatório com a ajuda de um questionário específico que contemplava questões sobre a duração do hábito e quantidades consumidas. Os estudos de imagem necessários foram feitos nos pacientes em que havia suspeita de câncer antes da biópsia por laringoscopia direta.

A presença de DNA de EBV nas amostras de tecido foi investigada por PCR qualitativo com o uso da técnica RT-PCR.

Obtenção do DNA

O DNA de EBV foi obtido a partir das amostras com o QIA Amp DNA Minikit (Qiagen, Alemanha), segundo o procedimento apresentado no manual do kit.

Multiplicação do DNA

O DNA obtido das amostras de tecido foi multiplicado com o equipamento Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Austrália) e o kit Qiagen Artus EBV RT PCR (número de catálogo 4501263) (lote número 130162115) (sensibilidade 3,8 cópias/ μ l). Em todos os estudos foi usado um controle negativo para evitar risco de contaminação.

Avaliação dos Dados

A análise dos dados foi executada com o *software* Rotor-Gene 1.7.75. O kit de quantificação de EBV incluía dois corantes fluorescentes, JOE e FAM. Enquanto JOE garante controle interno visível, FAM indica positividade para DNA de EBV. JOE é verificado no canal amarelo com comprimento de onda de 530-555 e FAM é verificado no canal verde com comprimento de onda de 470-510.

Os resultados foram assim interpretados:

1. Canal FAM positivo: positivo para DNA de EBV na amostra. Se a positividade for muito alta, o canal JOE pode ser negativo.
2. Canal FAM negativo e canal JOE positivo: negativo para DNA de EBV na amostra. Se o canal JOE também for negativo, a reação provavelmente sofreu inibição e a análise foi repetida.

Análise Estatística

O teste do Qui-quadrado foi usado para comparar a positividade do PCR para EBV dos grupos de estudo e controle e determinar a associação entre positividade do PCR para EBV e tabagismo, etilismo, localização do tumor (glótica, supraglótica, subglótica) e diferenciação do tecido tumoral (bem, moderadamente, pouco diferenciado). Todos os cálculos estatísticos foram executados com o *software* SPSS versão 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois) e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Amostras de 25 pacientes do sexo masculino (idades entre 42 e 67 anos, média de 54,6 anos) atendidos na clínica de Otorrinolaringologia e diagnosticados com carcinoma de laringe após biópsia por laringoscopia direta foram incluídas no estudo. As amostras foram colhidas durante laringectomia parcial ou total de 13 pacientes e durante biópsia por laringoscopia de 12 pacientes. O grupo de controle foi composto por amostras de tecido de 17 pacientes (idade média de 48,8 anos, 13 homens (76,5%) e quatro mulheres (23,5%)) atendidos na clínica por rouquidão e diagnosticados com lesões laringeas benignas (pólipos, granulomas, cistos) por exame laringoscópico e biópsia. Após exame de cabeça e pescoço e laringoscopia direta, os pacientes com carcinoma de laringe foram divididos em três grupos (glótico, supraglótico e subglótico) em função da localização da lesão. Tumores glóticos foram encontrados em 64% (16/25) dos pacientes, enquanto carcinomas de laringe supraglóticos foram detectados em 36% (9/25) dos indivíduos. Nenhuma lesão subglótica foi detectada em nosso grupo de estudo.

As amostras de tecido retiradas dos pacientes foram estudadas por PCR quantitativo com a técnica RT-PCR para a detecção de DNA de EBV. Controle interno foi positivo para todos os pacientes.

PCR positivo para EBV foi identificado em 40% (10/25) dos casos de carcinoma de laringe. A carga viral de EBV foi inferior a 10^3 cópias/ml em três pacientes, variou entre 10^3 e 10^5 cópias/ml em seis pacientes e foi superior a 10^5 cópias/ml em um paciente. O PCR foi positivo em 66,7% (6/9) dos tumores supraglóticos e em 25% (4/16) das lesões glóticas. No grupo de controle, 52,9% (9/17) dos pacientes tiveram PCR negativo para EBV e os restantes

47,1% (8/17) foram positivos para EBV no PCR. Em cinco destes pacientes, a carga viral foi inferior a 10^3 cópias/ml; nos três restantes a carga viral ficou entre 10^3 e 10^5 cópias/ml. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de controle e estudo em termos de positividade para EBV no PCR. Não foi identificada correlação direta entre EBV e patogenia de carcinoma espinocelular (CEC) de laringe ($p > 0,05$) (Tabela 1). Também não houve relação significativa entre positividade para DNA de EBV e localização do tumor ($p > 0,05$).

Tabela 1. Percentuais de positividade para EBV dos pacientes e do grupo de controle e associação entre positividade para EBV, localização e diferenciação do tumor.

		EBV negativo	EBV positivo	p
Pacientes com câncer (N: 25)		15 (60%)	10 (40%)	0,892
Grupo de Controle (N: 17)		9 (52,9%)	8 (47,1%)	
Localização do tumor	Glótico	12 (75%)	4 (25%)	0,087
	Supraglótico	3 (33,3%)	9 (66,7%)	
Diferenciação do tumor	Pouco diferenciado	2 (40%)	3 (60%)	0,328
	Moderadamente diferenciado	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
	Bem diferenciado	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
	Tipo basaloide	0 (0%)	1 (100%)	

A investigação patológica das amostras colhidas dos pacientes revelou que 44% (11/25) dos indivíduos tinha CEC bem diferenciado, 32% (8/25) tinham CEC moderadamente diferenciado, 20% (5/25) tinham CEC pouco diferenciado e 4% (1/25) tinham CEC basaloide. Positividade para DNA de EBV foi identificada em 27,3% (3/11) dos pacientes com CEC bem diferenciado, em 37,5% (3/8) dos indivíduos com CEC moderadamente diferenciado, em 60% (3/5) dos pacientes com CEC pouco diferenciado e em um indivíduo com CEC basaloide (Tabela 1). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre positividade para EBV e grau de diferenciação do tumor ($p > 0,05$).

Pacientes com câncer e componentes do grupo de controle foram entrevistados para identificar presença de tabagismo e consumo de álcool. Noventa e seis por cento (24/25) dos pacientes do grupo com carcinoma de laringe eram tabagistas. O período de tabagismo variou entre 15 e 43 anos (média $30 \pm 4,5$ anos), com 20 a 40 cigarros por dia (média $24,5 \pm 8,25$ cigarros). Sessenta por cento (15/25) dos pacientes consumiam álcool regularmente (pelo menos duas vezes por semana) por um período de 10 a 30 anos (média 22,5 anos). No grupo de controle, 76,5% (13/17) dos pacientes eram tabagistas. O período de tabagismo variou entre 14 e 39 anos (média $27,3 \pm 3,8$ anos), com 20 a 40 cigarros por dia (média $23,5 \pm 7,5$ cigarros). Destes

indivíduos, 17,6% (3/17) consumiam álcool regularmente há uma média de 28,3 anos (20 a 35 anos). A positividade para DNA de EBV foi de 37,5% (9/24) nas amostras de tecido de pacientes tabagistas com câncer. No grupo de controle, positividade para DNA de EBV foi encontrada em 46,2% (6/13) dos tabagistas. No grupo com câncer, as amostras colhidas de pacientes que consumiam álcool revelaram positividade para DNA de EBV em 40% (6/15) dos casos. DNA de EBV não foi encontrado em amostras colhidas de pacientes no grupo de controle que consumiam álcool. Não houve associação estatisticamente significativa entre positividade para DNA de EBV, tabagismo e consumo de álcool ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Características do tabagismo e consumo de álcool e positividade para EBV.

	Tabagismo	EBV negativo	EBV positivo	<i>p</i>
Grupo de controle (N: 17)	(-)	2 (50%)	2 (50%)	1,000
	(+)	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
Pacientes com câncer (N: 25)	(-)	0 (0%)	1 (100%)	0,400
	(+)	15 (62,5%)	9 (37,5%)	
	Álcool	EBV negativo	EBV positivo	<i>p</i>
Grupo de controle (N: 17)	(-)	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0,206
	(+)	3 (100%)	0 (0%)	
Pacientes com câncer (N: 25)	(-)	6 (60%)	4 (40%)	1,000
	(+)	9 (60%)	6 (40%)	

DISCUSSÃO

O EBV está presente em todas as populações, infectando mais de 95% dos seres humanos durante as primeiras décadas de vida⁷. Nos países em desenvolvimento, certas práticas culturais levam à exposição ao EBV na infância. A infecção primária por EBV em crianças está tipicamente associada a síndromes agudas não diagnosticadas. Em países mais desenvolvidos, contudo, a infecção primária por EBV é frequentemente postergada, vindo a ocorrer na adolescência ou idade adulta, podendo resultar em um distúrbio linfoproliferativo autolimitante chamado mononucleose infecciosa (MI)⁶.

Dados de vários estudos sugerem que o EBV está relacionado ao desenvolvimento ou progressão do carcinoma espinocelular da nasofaringe, cavidade oral, laringe e esôfago, além de estar associado a epiteloma gástrico e linfoma de Hodgkin^{8-16,23-25}. Além disso, o EBV já foi correlacionado às etiologias de linfoma de Burkitt, carcinoma tímico e síndrome de Sjögren^{17,19}.

O fator ambiental mais contundente da patogenia do carcinoma de laringe é o tabagismo. Refluxo gastroesofágico, radiação, consumo de frutas ricas em carotenoides e exposição a pó de madeira, metais pesados e pó de carvão são fatores etiológicos suspeitos²⁶. Além disso, já

se pensou que fatores virais tivessem papel na etiologia do carcinoma de laringe. Alguns estudos, com diferentes resultados, foram conduzidos sobre o papel de fatores virais, principalmente sobre o efeito do papilomavírus humano (HPV) e do EBV, na etiologia do carcinoma de laringe²⁷. Apesar da presença de vários tipos de HPV nas amostras de pacientes com carcinoma de laringe em alguns estudos, o HPV não foi considerado como tendo forte efeito carcinogênico sobre o desenvolvimento de carcinomas de laringe, já que tais observações foram excepcionais^{28,29}. Recentemente, foram publicados relatos sobre associação entre EBV e carcinoma de laringe⁸ e artigos refutando tal correlação^{19,30}.

Gök et al.²⁰ pesquisaram a presença de DNA de EBV por PCR em amostras de tecido fixadas em formalina incluídas em parafina de 22 pacientes com carcinoma espinocelular de laringe e de 17 pacientes com nódulos nas pregas vocais. O PCR identificou DNA de EBV em 11 pacientes (50%) com carcinoma de laringe e em sete pacientes (41,2%) com nódulos nas pregas vocais. Não foi identificada diferença significativa entre os grupos em termos de positividade para DNA de EBV e duração do tabagismo, número de cigarros consumidos por dia, localização da doença e estadiamento do tumor, como também observado em nossos resultados.

Goldenberg et al.²¹ não identificaram relação significativa entre EBV e desenvolvimento do tumor em estudo conduzido com 300 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, incluindo tumores de laringe, hipofaringe, orofaringe e cavidade oral²¹. Os autores também não encontraram correlação entre positividade para EBV e exposição ao fumo, consumo de álcool ou grau do tumor. Foram detectadas baixas quantidades de EBV na minoria dos tumores de cabeça e pescoço, associadas à presença de genoma de EBV em raras células linfóides ou epiteliais adjacentes ao tumor primário de cabeça e pescoço.

No estudo de Oliveira et al.², o EBV foi estudado com técnicas de biologia molecular em tecidos de tumor incluídos em parafina retirados de 110 pacientes com CEC de laringe, sem ser detectado em nenhum dos pacientes. Semelhantemente, Atula et al.¹⁹ sugeriram que o EBV não estaria associado ao carcinoma de laringe após a análise para DNA de EBV de 79 amostras congeladas de biópsias de pacientes com câncer de cabeça e pescoço por hibridização Southern blot e PCR.

Em seu estudo, Vlachtsis et al.²² demonstraram positividade para DNA de EBV em 39 (43,3%) de 90 pacientes com CEC de laringe e positividade para HPV e EBV em 19 (21,1%) destes indivíduos. Foi impossível determinar o efeito do EBV sobre o carcinoma de laringe e seus resultados, já que os autores não dispunham de um grupo de controle, mas a taxa relatada de positividade para DNA de EBV em CEC de laringe foi semelhante à que encontramos no presente estudo.

Kiaris et al.⁸ também estudaram a incidência de EBV em CEC de laringe. Os autores analisaram a presença de DNA de EBV por PCR sensível e utilizaram RFLP (polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) para confirmar a especificidade da reação de amplificação do PCR. Nove dos 27 tecidos tumorais foram positivos para DNA de EBV e apenas quatro (15%) peças de tecido normal adjacente exibiram evidências de infecção por EBV. Três amostras foram positivas para EBV tanto em tecidos normais como tumorais. Os pesquisadores encontraram uma incidência relativamente elevada de EBV em tecidos tumorais (33%) de pacientes com câncer de laringe, comparada à baixa incidência (15%) de detecção do genoma do vírus em tecido normal adjacente, o que indica um provável papel do EBV no desenvolvimento da doença. Contudo, não houve associação entre positividade para EBV e estadiamento da doença ou diferenciação patológica.

Nosso estudo não identificou relação significativa entre os grupos de controle e estudo em termos de positividade para EBV no PCR e carga viral de EBV. Da mesma forma, não houve associação direta entre EBV e patogenia do carcinoma espinocelular de laringe. A maioria dos estudos conduzidos anteriormente corroboram nossos resultados, mas alguns artigos relatam associação entre EBV e CEC de laringe. Acreditamos que tal contradição se deva a tamanhos reduzidos de amostra e variedade da sensibilidade e especificidade dos métodos usados para determinação de EBV.

Também não identificamos associação significativa entre positividade para EBV e localização ou diferenciação do tumor ($p > 0,05$). Além disso, dado que tabagismo e consumo de álcool são fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento de carcinoma de laringe, investigamos a associação entre positividade para EBV e esses fatores sem conseguirmos demonstrar relações entre os mesmos e positividade para EBV ou carga viral ($p > 0,05$). Estes resultados sugerem que o EBV não apresenta sinergia com o desenvolvimento de carcinomas de laringe com fatores de irritação como tabagismo e álcool.

A principal vantagem de nosso estudo foi o uso de amostras frescas de tecido para a determinação do DNA de EBV. A maioria dos estudos anteriores sobre a presença de EBV foram baseados em amostras fixadas em formalina incluídas em parafina, apesar de formalina ser um conhecido inibidor de PCR³¹. Assim, alguns resultados falsos negativos podem ter sido obtidos nos estudos anteriores.

No presente estudo, as peças cirúrgicas de pacientes com lesões laríngeas benignas foram aceitas como controles, já que não seria razoável retirar amostras de tecido de voluntários saudáveis. Curiosamente, o DNA de EBV foi encontrado em 47,1% dos indivíduos deste grupo, percentual mais elevado que o do grupo de estudo. Portanto, sugere-se que o EBV seja um vírus muito comum que

pode permanecer latente nas células da mucosa das vias respiratórias superiores de uma proporção considerável da população.

CONCLUSÃO

O recente estabelecimento da associação entre EBV e carcinoma nasofaríngeo não diferenciado em especial levou à consideração de que talvez também haja relação entre carcinoma de laringe e EBV. Mas os nossos resultados e os relatos da maioria dos estudos anteriores indicam que o EBV é um vírus bastante comum, que pode ser encontrado nas células da mucosa das vias aéreas superiores de uma proporção considerável da população. Ainda que o EBV esteja presente em tecidos tumorais de alguns dos carcinomas espinocelulares de laringe, sua presença não surte efeito sobre a patogenia dos carcinomas de laringe. Mais estudos multicêntricos com amostras maiores precisam ser conduzidos para demonstrar com maior clareza a relação entre EBV e carcinoma espinocelular de laringe. Desta forma, a partir das possíveis associações identificadas, passos positivos poderão ser tomados rumo à prevenção e manejo dos carcinomas de laringe.

REFERÊNCIAS

1. Bilgel N. Epidemiology of head and neck cancers. In: Engin K, Erişen L, editors. Head and neck cancers. Ankara: Nobel; 2003. p.33-6.
2. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(2):284-93. <http://dx.doi.org/10.1309/UU2JADUEHDWATVM9>
3. Morshed K. Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol.* 2010;82(6):1017-23. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21749>
4. Oksüzler O, Tuna EE, Soyaliç H, Ozbek C, Ozdem C. Investigation of the synergism between alcohol consumption and herpes simplex virus in patients with laryngeal squamous cell cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266(12):1977-82. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-009-0965-0>
5. Beaulieu BL, Sullivan JL. Epstein-Barr virus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical Virology.* Herndon: ASM; 2009. p.479-95.
6. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:375-404. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209>
7. Chu JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett.* 1998;124(1):53-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00449-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00449-7)
8. Kiaris H, Ergazaki M, Segas J, Spandidos DA. Detection of Epstein-Barr virus genome in squamous cell carcinomas of the larynx. *Int J Biol Markers.* 1995;10(4):211-5.
9. Murono S, Yoshizaki T, Tanaka S, Takeshita H, Park CS, Furukawa M. Detection of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 1997;107(4):523-6. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-199704000-00017>
10. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol.* 2002;33(6):608-14. <http://dx.doi.org/10.1053/hupa.2002.129786>

11. Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1999;189(1):34-9. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199909\)189:1<34::AID-PATH391>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<34::AID-PATH391>3.0.CO;2-4)
12. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta AR. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from India. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(2):78-82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.1998.tb02098.x>
13. Tsuchiko K, Nakazato I, Miyagi J, Iwamasa T, Arasaki A, Hiratsuka H, et al. Comparative study of oral squamous cell carcinoma in Okinawa, Southern Japan and Sapporo in Hokkaido, Northern Japan; with special reference to human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(2):70-9. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0714.2000.290204.x>
14. Cruz I, Van den Brule AJ, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa--a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol.* 1997;33(3):182-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-1955\(96\)00054-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-1955(96)00054-1)
15. Gonzalez-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112(3):482-7. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-200203000-00014>
16. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(5):586-92. <http://dx.doi.org/10.1067/moe.2002.124462>
17. Mariette X, Gozlan J, Clerc D, Bisson M, Morinet F. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med.* 1991;90(3):286-94. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)80007-9](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(91)80007-9)
18. Leyvraz S, Henle W, Chahinian AP, Perlmann C, Klein G, Gordon RE, et al. Association of Epstein-Barr virus with thymic carcinoma. *N Engl J Med.* 1985;312(20):1296-9. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198505163122006>
19. Atula S, Auvinen E, Grenman R, Syrjänen S. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in epithelial carcinomas of the head and neck region. *Anticancer Res.* 1997;17(6D):4427-33.
20. Gök U, Ozdarendeli A, Keleş E, Bulut Y, Cobanoğlu B. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in surgical specimens of patients with squamous cell carcinoma of the larynx and vocal cord nodules. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2003;11(5):134-8.
21. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 2004;114(6):1027-31. <http://dx.doi.org/10.1097/00005537-200406000-00013>
22. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(11):890-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-005-0916-3>
23. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):803-21. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0670-3>
24. Callaghan DJ, Conner BR, Strauss M. Epstein-Barr virus antibody titers in cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol.* 1983;109(12):781-4. <http://dx.doi.org/10.1001/archotol.1983.00800260003001>
25. van Heerden WE, van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Raubenheimer EJ. Prevalence of EBV in oral squamous cell carcinomas in young patients. *Anticancer Res.* 1995;15(5B):2335-9.
26. Engin K, Ozkan L. Etiology and risk factors of head and neck cancers. In: Engin K, Erişen L, editors. *Head and neck cancers.* Ankara: Nobel; 2003. p.39-42.
27. Demireller A. Larenks kanserleri. In: Koç C, editor. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve baş-boyun cerrahisi.* Ankara: Güneş; 2004. p.1183-8.
28. Brandwein MS, Nuovo GJ, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993;102(4 Pt 1):309-13.
29. Taxy JB. Upper respiratory tract. In: Damjanow I, Linder J, editors. *Anderson's pathology.* St Louis: Mosby; 1996. p.1463-6.
30. Szkaradkiewicz A, Kruk-Zagajewska A, Wal M, Jopek A, Wierzbicka M, Kuch A. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med.* 2002;2(3):137-41. <http://dx.doi.org/10.1007/s102380200019>
31. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):745-7.