

IDENTIFICACION DEL VIRUS EPSTEIN-BARR EN CARCINOMAS NASOFARINGEOS EN ARGENTINA

SU RELACION CON P53 Y DETERMINACION DE INDICES DE PROLIFERACION

PATRICIA VERGANI, BEATRIZ CARBALLER, FRANCISCO PROPATO, LUCIA CALANDRIA,
HECTOR TARGOVNIK, ALEJANDRO TERZIAN, BORIS ELSNER

Departamento de Patología, División Otorrinolaringología y Laboratorio de Biología Molecular, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

Resumen Se estudiaron 37 casos de carcinomas nasofaringeos (CNF) a partir de biopsias de cavum incluidas en parafina. Los pacientes fueron argentinos, 23 hombres y 14 mujeres cuyo promedio de edad fue de 50 años. Los tumores se clasificaron en carcinoma escamoso queratinizante, 1 caso (2%), carcinomas escamosos no queratinizantes, 15 casos (41%) y carcinomas indiferenciados, 21 casos (57%). Se determinó el índice de proliferación (PI) con anticuerpos monoclonales para PCNA y Ki-67 (MIB-1) que fue del 26% y 17% respectivamente, no hallándose aparentemente diferencias de acuerdo a las variantes histológicas, estadios clínicos III o IV de presentación. El IP fue del 2% para estadio II aunque los casos en la serie fueron escasos ($n = 3$). Se observó positividad para p53 en 30 de los 37 casos, similar para los carcinomas indiferenciados y no queratinizantes, mientras que el carcinoma queratinizante fue negativo. Se establecieron dos grupos de pacientes con sobrevida media de 35 y 12 meses a partir de un valor de corte en el porcentaje de positividad por inmunomarcación para p53 ($< y > 7\%$), si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa. Se demostró la presencia del virus Epstein-Barr por PCR en 31 de 37 de los CNF: 19 fueron carcinomas indiferenciados y 12 fueron carcinomas escamosos no queratinizantes, siendo negativo el carcinoma escamoso queratinizante. Estos resultados, obtenidos por primera vez en Argentina, son semejantes a los hallados en países con alta y baja frecuencia de CNF y pueden ser de valor para establecer el origen nasofaringeo de una adenopatía cervical metastásica de origen desconocido.

Palabras clave: EBV, carcinoma nasofaringeo, PCR, p53, índices de proliferación

El carcinoma nasofaringeo (CNF) es un tumor con una distribución geográfica bien definida y relativamente infrecuente en nuestro país. El mismo se halla en directa relación con la infección primaria por el virus Epstein Barr (EB)¹. Dicho agente está vinculado a un creciente espectro de lesiones como la mononucleosis infecciosa, el

linfoma de Burkitt y el CNF. Su vinculación con las diversas enfermedades depende de varias condiciones; entre ellas, su clonalidad, el tipo de células que infecta y el estado inmunológico del huésped. La relación etiológica del virus EB en el CNF ha sido postulada a partir de la identificación de genomas virales utilizando diferentes métodos de hibridización², amplificación del genoma viral³ y el análisis de los fragmentos terminales de restricción del ADN del virus EB⁴.

La proteína p53 es un activador de la transcripción y se halla involucrada en los controles de

Recibido: 24-IV-1996

Aceptado: 30-VIII-1996

Dirección postal: Dr. Boris Elsner, Billingham 2343, 1425
Buenos Aires, Argentina

diferenciación y proliferación celular⁵. Su detección por métodos inmunohistoquímicos expresan una prolongación de su vida media. Dicho fenómeno podría ser resultado de alteraciones del gen que la codifica. Ello implica una pérdida de la función del gen supresor p53 que interviene en el complejo proceso de carcinogénesis. La expresión aumentada de la proteína p53 se halla asociada a numerosas neoplasias y en algunas de ellas ha sido considerada como factor pronóstico independiente^{6, 7}.

Existe una directa correlación entre la actividad proliferativa de un tumor y su pronóstico clínico⁸. Es posible evaluar dicha proliferación a través de la detección de proteínas nucleares presentes en las células durante su fase proliferativa. Las mismas reaccionan con los antisueros Ki-67 (MIB-1) y PCNA (proliferating cell nuclear antigen)^{9, 10}.

Materiales y métodos

Casos

Fueron analizados 37 CNF a partir del material incluido en parafina de los archivos del Departamento de Patología del Hospital de Clínicas «José de San Martín» diagnosticados en el período comprendido entre enero de 1985 y octubre de 1995. Dichos casos correspondían a pacientes argentinos y fueron estadificados de acuerdo a la clasificación TNM¹¹.

Histopatología e Inmunohistoquímica

Todos los preparados histológicos de cada caso fueron revisados y se seleccionó un corte representativo a partir del cual se realizaron estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares. Para inmunohistoquímica se utilizaron secciones de 6 µm a los que se aplicó la técnica de recuperación antigénica utilizando un horno a microondas en buffer citrato y el sistema de detección avidina-biotina descriptos por Hsu y col. y Shi y col. respectivamente^{12, 13}. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en solución de buffer fosfato (PBS) pH 7,4 e incubados 16 horas a temperatura ambiente. Previamente, los cortes fueron incubados con H₂O₂ al 3% en metanol absoluto, a fin de inhibir la actividad de peroxidasas endógenas y luego con suero normal de caballo (dilución 1:30) para minimizar el fondo. El sistema de detección fue con inmunoglobulinas (Igs) biotiniladas de caballo anti-ratón y el complejo avidina-biotina (Vectastain Elite, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA). Todos los cortes fueron lavados con PBS y dichas reacciones fueron

visualizadas con 3-3' tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (1mg/ml)/PBS y H₂O₂ al 3%. Finalmente la tinción nuclear fue intensificada con un baño de SO₄Cu/PBS al 4% y los preparados fueron contrastados con verde de metilo. Para los controles negativos los anticuerpos primarios fueron reemplazados con suero normal de conejo y para los positivos se utilizaron neoplasias mamarias de inmuo-reactividad conocida.

Los anticuerpos utilizados fueron monoclonales que reaccionan con el material incluido en parafina. Los mismos fueron: MIB-1 (Immunotech, France), dilución de 1:40, que reacciona con la proteína nuclear Ki-67 asociada con el ciclo de proliferación celular; el anticuerpo PCNA (clon PC10, Dakopatts, Copenhagen, Denmark), dilución de 1:200, detecta una polimerasa δ accesoria esencial para la síntesis de ADN, y el anticuerpo p53 (clon Do7, Dakopatts, Copenhagen, Denmark), dilución 1:80, descripto para detectar los tipos mutados y no mutados de la proteína p53. Los anticuerpos secundarios correspondientes a Igs biotiniladas de caballo anti-ratón (diluidas 1:80) y el suero normal de caballo fueron provistos por Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA).

Determinación del índice de proliferación

El índice de proliferación (IP) fue definido como el número de células positivas para los anticuerpos MIB-1 y PCNA dividido por el total de células tumorales positivas contadas (mínimo = 500 células).

Extracción del ADN y reacción en cadena de la polimerasa

Fueron analizados los 37 CNF a fin de amplificar el gen repetitivo BamH-W del genoma del virus EB y el gen de la tiroperoxidasa. Para amplificar el ADN en cada uno de los casos descriptos, se utilizaron 4 cortes de 5 µm a partir del tejido incluido en parafina. Cada caso fue cortado con diferentes navajas para evitar contaminación. Las muestras fueron deparafinadas en 400 µl de xilol y deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol. El material precipitado fue secado y lavado cuatro veces en PBS. Finalmente, fue resuspendido en 200 µl de buffer TE (Tris-EDTA) y colocado en un baño de 90°C durante 15 minutos. Alícuotas de 5µl de cada muestra fueron utilizadas para la amplificación del ADN por medio de PCR. Los primers identifican la región repetitiva BamH-W del gen del virus EB flanqueando un fragmento de 120 pb. Con el propósito de evaluar las condiciones del ADN extraído del material incluido en parafina, se realizó en paralelo la amplificación de secuencias de un polimorfismo repetitivo (VNTR = variable number tandem repeat) de 4 pares de bases (pb) del gen de la enzima tiroperoxidasa. Como control positivo de la amplificación se utilizó una construcción químérica constituida por un plásmido

PBR322 que contiene una copia del fragmento completo BamH-W de 3072 pb. El control negativo correspondiente a la amplificación del virus EB fue un melanoma maligno nasal y el control de la reacción de amplificación fue un tubo en el que se incluyeron todos los reactivos, excepto el ADN. Las secuencias de los primers así como de la sonda de detección fueron previamente publicadas¹⁴. Se utilizaron 5 µl de ADN purificado de cada muestra en un volumen total de 50 µl para cada par de primers. A fin de amplificar el virus EB se utilizó el buffer PCR constituido por 40 pmol de cada primer, 20 nmol de cada uno de los cuatro nucleótidos, 1,5 mMol de Cl₂Mg y 2 U de Taq Poli-merasa en un ciclador térmico de ADN (Perkin Elmer 4200). Las condiciones de amplificación fueron: 48 segundos de denaturalización a 93°C; 48 segundos de reconstitución a 53°C; 1 min 30 segundos de extensión a 72°C durante 35 ciclos. Un tercio del volumen del producto amplificado fue separado por electroforesis en un gel de 2% de agarosa y transferido a una membrana de nylon (Schleicher & Schuell). A fin de aumentar la sensibilidad de la PCR, el producto amplificado fue hibridizado con una sonda de oligonucleótidos marcada con P³². La membrana fue lavada 2 veces a temperatura ambiente con SSPEX5 (SSPEX1: 0,18 mol/L CINa, 10 mmol/l NaH₂PO₄, 1 mmol/l EDTA, pH 7,4) y luego a 42°C dos veces durante 10 min. Finalmente se realizó autoradiografía con film Kodak X-O Max a -70° durante 1 hora.

Resultados

Hallazgos clínicos

Treinta y siete pacientes fueron incluidos en este estudio, 23 hombres y 14 mujeres con un promedio de edad de 50 años (rango entre 15 y 75 años). A partir de los datos recopilados de las historias clínicas de 22 pacientes, los síntomas de presentación inicial fueron nasales o acústicos (88%), compromiso de nervios craneales (65%), cefaleas (23%), pérdida de peso (12%) y síntomas oculares (4%). De acuerdo a la clasificación TNM dichos pacientes se agruparon en estadio II (14%), estadio III (41%) y estadio IV (45%) no observándose pacientes en estadio I. El tratamiento consistió en radioterapia y en algunos casos fue combinado con cirugía. Se obtuvo seguimiento sólo en 12 pacientes del total de 37. El mismo fue de un tiempo medio de 2,16 años (rango entre 0,25 y 6,8 años), reveló que 2 casos se hallan sin evidencias de enfermedad y 10 han fallecido por su tumor.

Histopatología, análisis del índice de proliferación e inmunotinción con p53

De acuerdo a la clasificación de la OMS¹⁵ los 37 CNF fueron divididos en: carcinoma escamoso queratinizante, que correspondía a lesiones con diferenciación escamosa definida, manifestada por puentes intercelulares y queratinización (Fig. 1a); 1 caso. Carcinomas escamosos no queratinizantes, tumores que remedaban epitelio estratificado, con márgenes celulares netos y sin evidencias de queratinización (Fig. 1b); 15 casos; los restantes 21 casos correspondían a carcinomas indiferenciados los que presentaban un patrón sincicial y estaban constituidos por células ovales con核úlo prominentes y una cantidad variable de linfocitos maduros entre las células tumorales (Fig. 1c).

La inmunotinción para PCNA y MIB-1 fue evidente a nivel de los núcleos celulares y utilizando este último anticuerpo, se observó positividad también en figuras mitóticas. El IP en todos los casos de la serie, (% de positividad/500 células contadas) para PCNA y MIB-1 fue de 26% (rango 0%-85%) y 17% (rango 0%-50%) respectivamente. Con dichos anticuerpos, los resultados fueron semejantes en los distintos tipos histológicos descriptos. No se hallaron diferencias entre los estadios clínicos avanzados, los que presentaron un IP de 22% para PCNA y 14% para MIB-1; mientras que en los 3 casos con estadio II el IP fue de 2% con ambos marcadores.

La expresión de la proteína p53 se observó en 30 de 37 CNF: 12 de los 15 casos clasificados como carcinomas no queratinizantes y 18 de los 21 carcinomas indiferenciados; el carcinoma escamoso fue negativo. La inmunotinción se encontró confinada en el núcleo de las células tumorales y no se observó positividad en las células necróticas, tejido normal peritumoral, o figuras mitóticas (Fig. 2). Excepto en el carcinoma escamoso queratinizante que fue negativo, la proporción de células positivas para p53 osciló entre 1% y 75% (media 17%) sin diferencias entre las variantes histológicas.

A partir del seguimiento clínico durante 2,16 años en 12 pacientes, se intentó determinar la utilidad de la expresión de la proteína p53 como factor pronóstico. Utilizando un valor de corte con una positividad de 7% surgen dos grupos definidos de pacientes. A los 26 meses los 5 pacien-

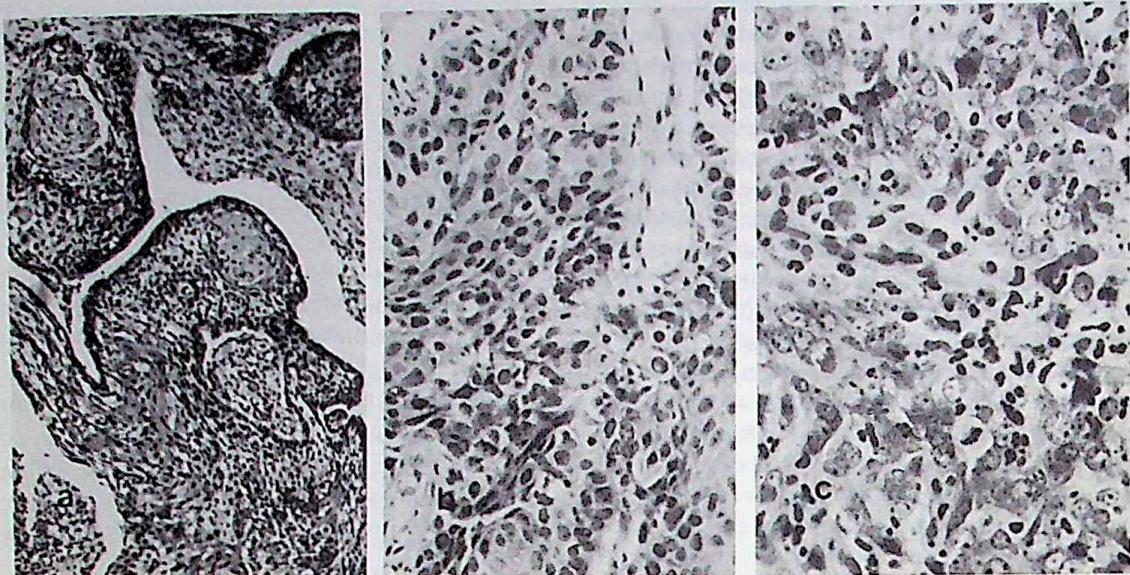


Fig. 1.— Caracteres microscópicos de los CNF de acuerdo a la clasificación de la OMS. (a) Carcinoma escamoso queratinizante, cuya apariencia bien diferenciada es evidente por la queratinización (H-E, 250X); (b) carcinoma escamoso no queratinizante, las células tienen diferenciación escamosa y se disponen en nidos; (H-E, 400X); (c) carcinoma indiferenciado, de aspecto difuso constituido por células grandes, ovales con nucléolos prominentes y un infiltrado linfocitario (H-E, 400X).

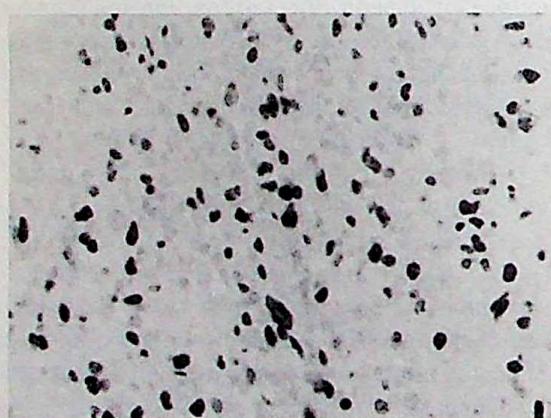


Fig. 2.— Inmunomarcación para proteína p53 en un caso de carcinoma indiferenciado. Es distintiva la tinción positiva localizada en el núcleo de las células neoplásicas (p53, 400X).

tes que expresaron proteína p53 mayor de 7% habían fallecido y presentaron una sobrevida media de 12 meses, mientras que en los casos con valores de p53 inferiores, la sobrevida media fue de 35 meses. Estos resultados sin embargo no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al número limitado de pacientes con seguimiento.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fueron analizados 37 CNF y se observó la amplificación del genoma del virus EB en 31. Dichos resultados incluyeron 19 de 21 carcinomas indiferenciados y 12 de 15 carcinomas escamosos no queratinizantes. La intensidad de señal post-hibridización que evidencia la cantidad de copias virales fue mayor en los carcinomas indiferenciados (19-21) que en los escamosos no queratinizantes (12-15). No se observó hibridización en el carcinoma escamoso queratinizante ni en el melanoma maligno nasal utilizado como control negativo (Fig. 3). El ADN extraído de las biopsias incluidas en parafina fue adecuado para la amplificación ya que en todos los casos se detectó el polimorfismo del gen de tiroperoxidasa.

Discusión

Si bien el CNF es una neoplasia relativamente infrecuente, es el tumor más común de cavum en todos los países, siendo especialmente elevado el número de casos en Oriente. Se ha utilizado en este trabajo la clasificación de la OMS, a



Fig. 3.— Hibridización con sondas radioactivas para virus EB. Los productos amplificados fueron: carcinomas indiferenciados (a,e, f); carcinomas escamosos no queratinizantes (b,d,g,i); carcinoma escamoso queratinizante (c); melanoma maligno (j); diferentes concentraciones de la construcción química del plásmido PBR322/BamH-W (h,k).

partir de la cual se observó en los pacientes de Argentina una distribución semejante entre los carcinomas indiferenciados (57%) y escamosos no queratinizantes (41%), mientras que fue notoriamente baja la frecuencia de carcinomas escamosos queratinizantes (2%)¹⁵. Estos resultados pueden compararse a los hallados en países con una alta incidencia de CNF como Singapur donde en el clásico artículo de Shanmugaratnam y col. se observó también una incidencia semejante de carcinomas indiferenciados y no queratinizantes pero llegando los queratinizantes al 20,1%¹⁶. En muchas de las series que provienen de países con una baja incidencia de CNF los carcinomas queratinizantes que reconocen como agentes etiológicos probables al alcohol y al tabaco eran más frecuentes, lo que no ocurrió en nuestros casos¹⁶.

Se han estudiado los IP en numerosas neoplasias, pero hasta el presente estudio, dichas determinaciones no se han realizado en CNF. No se hallaron diferencias entre los anticuerpos PCNA y MIB-1 para la determinación del IP, ni tampoco los resultados se modificaron de acuerdo a las variantes histológicas. El IP fue mayor en los estadios avanzados, pero, los casos con estadio II fueron muy escasos. Serían necesarios estudios adicionales para validar estos resultados.

La identificación de dos grupos de pacientes con marcadas diferencias en su sobrevida luego de un seguimiento de promedio de 2,16 años, surge a partir de valores de positividad para p53 (menores o mayores de 7%), evaluados indepen-

dientemente de su estadio clínico, histopatología e IP. Si bien los resultados no fueron estadísticamente significativos, las diferencias mencionadas son lo suficientemente considerables como para incluir dicho valor de p53 dentro de los potenciales factores pronósticos de este tumor.

Entre los diferentes métodos para determinar la presencia del virus EB, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa es la más sensible, relativamente sencilla e independiente del ciclo en que se encuentre el virus EB. Requiere escaso material y permite la obtención de resultados rápidos, además de ser aplicable a tejido fijado en formol e incluido en parafina archivado durante años como en nuestros casos¹⁷. Esto la convierte en la metodología de elección comparándola con otras técnicas como inmunohistoquímica, hibridización *in situ*, cocultivación o crecimiento espontáneo en células infectadas^{18, 19}.

Los resultados presentados demuestran la presencia del virus EB en una elevada proporción de carcinomas indiferenciados y escamosos no queratinizantes provenientes de pacientes argentinos, a semejanza de los CNF documentados en otros continentes¹⁹. En la mayoría de los estudios publicados los carcinomas escamosos fueron negativos (así como nuestro único caso). Casi todos los carcinomas de tipo linfoepitelial no originados en el cavum son también negativos²⁰. Esta asociación es de tal importancia que ha sido usada clínicamente para sugerir un origen nasofaringeo en casos de metástasis cervicales de primitivo desconocido a partir del hallazgo del virus EB en una metástasis cervical^{17, 21}.

Creemos que los casos negativos son verdaderos y no debidos a defectos técnicos, ya que se logró la amplificación del VNTR del gen de tiroperoxidasa en todas las muestras analizadas, indicando que no se hallaban inhibidores de la PCR.

La inmunotinción de la proteína p53 no siempre es consecuencia de modificaciones estructurales del gen que la codifica^{22, 23}. Podrían existir también alteraciones de p53 que a pesar de ser normal, presenta un funcionamiento anómalo debido a errores genéticos que ocurren en células neoplásicas o a la presencia de otras proteínas que interfieren en su proceso de degradación normal. Ello resulta en una estabilización directa de p53 que favorece su acumulación como las interacciones con la homóloga humana de mdm2

(mouse double minute 2)²⁴ y también la EBNA-LP (EBV nuclear antigen-latent protein)²⁵. A pesar que se han hallado mutaciones del gen p53 en CNF, las mismas son consideradas infrecuentes, probablemente menos del 10% del total de casos²⁶. Intentando homologar los casos de Argentina con los estudiados en Oriente, es factible la hipótesis de una interacción entre p53 y proteínas codificadas por el virus EB. Esta idea surge de haberse observado que no existen mutaciones en CNF provenientes de poblaciones chinas, como tampoco en líneas celulares derivadas de dichos tumores^{23, 27}. Si bien dichos resultados surgieron del análisis del gen p53, no se realizó en los trabajos citados determinación inmunohistoquímica en paralelo tratando de analizar el «estado funcional» en que se encuentra la proteína.

Los resultados presentados indican que existe un aumento de la expresión de p53 en CNF y se ha detectado el virus EB en los carcinomas indiferenciados y escamosos no queratinizantes. El número de casos positivos para virus EB y la intensidad de señal post-hibridización fueron mayores en los carcinomas indiferenciados que en los escamosos no queratinizantes y fue negativo el carcinoma escamoso queratinizante. Probablemente reflejen un espectro de lesiones diferentes en los que el virus EB estaría implicado con relativa frecuencia en relación a su número de copias y producción de proteínas que interactúan con p53. Estudios *in vitro* y desarrollo de modelos animales (transgénicos) podrían aportar un conocimiento más profundo en la regulación de este interesante gen supresor de tumor y su interacción con proteínas virales.

Summary

Identification of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinomas in Argentina. Its relation with p53 and the determination of proliferation indices

Thirty-seven nasopharyngeal carcinomas were studied obtaining the tissue from nasopharyngeal biopsies that were formalin fixed and paraffin embedded. The patients were born in Argentina, 23 men and 14 women with a mean age of 50 years. Histologically the tumors were classified as queratinizing squamous cell carcinomas, 1 case (2%); non-queratinizing squamous cell carcinomas, 15 cases (41%) and undifferentiated carci-

nomas, 21 cases (57%). The proliferating index (PI) was determined using monoclonal antibodies against PCNA and Ki-67 (MIB-1), resulting in 26% for PCNA and 17% for Ki-67 while no differences were found comparing PI with histological type and cases with clinical stage III and IV. The PI was of 2% in the 3 cases with clinical stage II.

Immunostains for p53 were positive in 30 out of the 37 cases with no differences between the histological types, exception made for the queratinizing carcinoma which was negative. With a cut off point of 7% in the 12 cases with follow up, two groups were found with a mean survival of 35 and 12 months, a finding that was not statistically significant.

Epstein-Barr virus was detected by PCR using the paraffin embedded material in 31 out of the 37 cases: 21 were undifferentiated carcinomas and 15 non-queratinizing squamous cell carcinomas; the queratinizing squamous cell carcinoma was negative. These results, published for the first time in samples from Argentinian patients are similar to those found in areas of high and low incidence of nasopharyngeal carcinomas and can be of clinical use in determining the nasopharyngeal origin of a cervical metastatic lymph node of an unknown primary.

Bibliografía

- Desgranges C, Wolf H, de-Thé G, et al: Nasopharyngeal carcinoma. Presence of Epstein-Barr genomes in separated epithelial cells of tumors in patients from Singapore, Tunisia and Kenya. *Int J Cancer* 1975; 16: 7-15.
- Chan JKC, Hip TTC, Tsang WYW, et al: Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 938-46.
- Della Torre G, Pilotti S, Donghi R, et al: Epstein-Barr virus genomes in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas in Italian patients. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 32-7.
- Katz BZ, Raab-Traub N, Miller G: Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 1989; 160: 589-98.
- Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B, et al: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Soussi T, Legros Y, Rubin R, et al: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994; 57: 1-9.
- Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, et al: Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-55.
- Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; 17: 489-503.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al: Cell cycle

- analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.
10. Lee SA, Hurwitz I. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5672-6.
 11. Hsu MM, Huang SC, Lynn TC, et al: The survival of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 1982; 90: 289-95.
 12. Hsu SH, Raine L, Fanger M: A comparative study of the Pap method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 734-8.
 13. Shi SR, Key M, Karla KL. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating on tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-8.
 14. Saito I, Servenius B, Compton T, et al: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J Exp Med* 1989; 169: 2191-8.
 15. Shanmugaratnam K, Sabin L. The World Health Organization histological classification of tumors of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer* 1993; 71: 2689-97.
 16. Shanmugaratnam K, Chan SH, de-Thé G, et al. Histopathology of nasopharyngeal carcinoma: Correlations with epidemiology, survival rates and other biological characteristics. *Cancer* 1979; 44: 1029-44.
 17. Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, et al. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. *N Engl J Med* 1992; 326: 17-21.
 18. Sixbey J, Nedrud N, Raab-Traub N, et al: Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984; 310: 1225-8.
 19. Stewart J, Arrand J. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma biopsy specimens. *Hum Pathol* 1993; 24: 239-42.
 20. Iezzoni JC, Gaffey MJ, Weiss LM: The role of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 308-15.
 21. Dector M, Silven M, Tennvall J, Rambeck E: Determination of nonendemic nasopharyngeal carcinoma by *in situ* hybridization for Epstein-Barr virus EBER1 RNA: sensitivity and specificity for cervical node metastases. *Laryngoscope* 1995; 105: 407-12.
 22. Sheu L, Chen A, Tseng H, et al. Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 380-6.
 23. Spruck CH, Tsai YC, Huang DP, et al. Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res* 1992; 52: 4787-90.
 24. Reifenberger G, Lui L, Ikimura K, et al. Amplification and overexpression of the mdm-2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 1993; 53: 2736-9.
 25. Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, et al. EBVNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5455-9.
 26. Sun Y, Hegamyer G, Cheng YJ, et al. An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6516-20.
 27. Lo KW, Mok CH, Huang DP, et al. p53 mutation in human nasopharyngeal carcinomas. *Anticancer Res* 1992; 12: 1957-63.

LA PORTADA

Julio Barragán. **Figura.** Oleo sobre tela; 1,30 x 0,80 m.
 Primer Premio, Salón Anual Manuel Belgrano, 1970.
 Cortesía del Museo de Artes Plásticas Eduardo Sívori,
 Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires.