

## INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA: IDENTIFICACIÓN IN SITU DE LAS CELULAS INFLAMATORIAS DE LA MUCOSA RECTAL POR TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

Dres. Dimas E Hernández\*, Margarita Oliver-Llul\*\*, Carlos J Azuaje\*,  
María F De Abreu\*, Félix J Tapia\*\*\*, Loida V Ponce\*\*\*

### RESUMEN

Actualmente, existen pocos estudios inmunofenotípicos que caracterizan los leucocitos en la mucosa rectal de pacientes infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Treinta y tres biopsias rectales provenientes de pacientes VIH positivo y 7 biopsias controles de pacientes VIH negativo, fueron analizadas utilizando la técnica de avidinainmunoperoxidasa y los siguientes anticuerpos monoclonales: S-100, Ki-1 (CD30), LCA, p21, p53, PCNA, CD4 y HLA-DR. Los resultados mostraron una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) en el número de células de la mucosa rectal de los pacientes VIH positivo y controles que expresan las siguientes moléculas: S-100, Ki-1(CD30), LCA, p21, p53, PCNA, y CD4. Numerosos leucocitos de la mucosa rectal de los pacientes VIH positivo estaban activados y expresaban moléculas HLA-DW mientras que

ningún leucocito de las biopsias controles mostró alguna expresión. Además, observamos una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) en la expresión de las siguientes moléculas: LCA, PCNA, S-100 y CD4 al comparar las biopsias rectales de pacientes VIH positivo con y sin folículos linfoides. Nuestro estudio muestra la primera evidencia de un incremento de las células dendríticas S-100 + en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo. Los marcadores de activación y proliferación también se presentaron elevados. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad del desarrollo de una proliferación monoclonal en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo. *Arch Hosp Vargas* 2003; 45(1-2): 7-14.

**Palabras Claves:** Virus de inmunodeficiencia humana, mucosa rectal, células inflamatorias, técnicas inmunocitoquímicas.

### ABSTRACT

At present, there are few studies on the in situ characterization of leukocyte immunophenotypes in the rectal mucosa of Human Immunodeficiency Virus (HIV) positive patients. Rectal biopsies from HIV positive patients (n=33) and HIV negative control individuals (n=7) were analyzed using an avidin-immunoperoxidase technique and monoclonal antibodies to the following molecules: S-100, Ki-1 (CD30), LCA, P21,

---

\* Servicio de Medicina 2, Hospital Vargas y Cátedra de Clínica y Terapéutica Médica "B", Escuela José María Vargas, Universidad Central de Venezuela.

\*\* Laboratorio de Dermopatología y Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela.

P53, PCNA, CD4, and HLA-DR. The leukocyte characterization in the rectal mucosa of HIV positive patients and control individuals showed significant differences, ( $p \leq 0.05$ ) among the cell group expressing: S-100, CD30, LCA, P21, p53, PCNA, and CD4 molecules. Numerous activated leukocytes expressed the HLA-DR molecules; in contrast, none of the rectal mucosa from control individuals showed any expression. In addition, there were significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between HIV positive patients containing follicles and those HIV positive patients lacking them for LCA, PCNA, S-100 and CD4 positive cells. Our study is the first evidence that S-100 + dendritic cells are increased in the rectal mucosa of HIV positive patients. In addition, the cell activation and proliferation markers are also increased. The study points out to a conditional state for the development of monoclonal proliferation in the rectal mucosa of HIV positive patients.

**Key Words:** Human Immunodeficiency Virus, Rectal mucosa, Immunohistochemistry techniques.

## INTRODUCCIÓN

La mucosa rectal es la puerta de entrada más importante para el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), y representa la vía de penetración en el 70% a 80% de los casos<sup>1</sup>. En condiciones normales, los linfocitos localizados en la lámina propia son linfocitos T cooperadores (CD4<sup>+</sup>), los cuales expresan moléculas clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-II). En contraste, los linfocitos intraepiteliales (LIE) son predominantemente supresores citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)<sup>2</sup>. En pacientes infectados por el VIH, las células epiteliales en la base de las criptas muestran degeneración con muchos cuerpos apoptóticos; además se observa un infiltrado constituido predominantemente por leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos, hipertrofia de la muscularis mucosa y perivasculitis de la submucosa. Los linfocitos de la lámina propia están disminuidos; y existen datos contradictorios referente a los LIE, los cuales han sido reportados en

número normal, alto y bajo<sup>3,4</sup>. Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno las cuales expresan el CMH-II, y éstas en conjunto con los macrófagos, representan las primeras células con las cuales se pone en contacto el VIH. Las células dendríticas interactúan con los linfocitos T-CD4<sup>+</sup>, los cuales se infectan e inician la replicación viral; además, la presentación de antígenos del VIH realizada por estas células es capaz de iniciar una respuesta citotóxica que destruye las células infectadas; sin embargo, algunas células dendríticas son capaces de convenirse en reservorios del virus<sup>5-7</sup>.

En el presente trabajo se caracterizó, por técnicas inmunocitoquímicas, el infiltrado inflamatorio de la mucosa rectal de pacientes VIH positivo; además, se correlacionaron estos datos con la información clínica.

## MÉTODOS

### Pacientes

En el presente estudio se incluyeron 33 pacientes VIH positivo diagnosticados por el método de ELISA y confinados por el Western-blot<sup>8</sup>. Los enfermos fueron incluidos en el grupo C3 (n=31) y B2 (n=2), basados en los criterios establecidos por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, USA<sup>9</sup>. Treinta pacientes eran del sexo masculino, y de ellos 24 eran homosexuales. La edad promedio fue 32 años (rango, 21-62). Tres pacientes eran del sexo femenino y tenían un compañero VIH positivo. Su promedio de edad fue 33 años (rango, 22-47). El promedio de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en sangre periférica fue 161 células/ml (rango, 8-490). Todos los pacientes fueron referidos a biopsia rectal previo a la firma de un consentimiento informado. El grupo control lo constituyó 7 biopsias de mucosa provenientes de hemorroidectomías realizadas en pacientes VIH negativo, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vargas.

### Biopsias Rectales

El tejido fue fijado en formalina al 10%,

deshidratado en alcohol y colocado en parafina. Las secciones histológicas se obtuvieron por medio de un microtomo rotatorio, y tres secciones de ellas se colocaron en cada lámina. Por cada espécimen, una lámina se coloreó con hematoxilina-eosina y 12 secciones no seriadas se utilizaron para la inmunocitoquímica empleando la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa<sup>10</sup>.

### Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados reconocen las siguientes moléculas: proteína S-100 (células dendríticas y elementos mesodérmicos: Dako, Denmark; diluido 1:100), Ki-1 (CD30, células Th2; Dako, Denmark; diluido 1:100), LCA (Leukocyte Common Antigen, linfocitos T activados; Dako, Denmark; diluido 1:100), p21 (proliferación celular en asociación con células proliferativas con mutación H-ras; Dako, Denmark diluido 1:100), p53 (proliferación celular y células apoptóticas; Dako, Denmark; diluido 1:100), PCNA (antígeno nuclear de proliferación, Dako, Denmark diluido 1:100), HLA-DR (CMH-II, B33.1.1; diluido 1:500) donado por el Dr. Trinchieri G (The Wistar Institute, Philadelphia, USA); y OPD4 (CD4<sup>+</sup>, célula T-cooperadoras-inductoras; Dako, Denmark; diluido 1:100).

### Coloración mediante la técnica de inmunoperoxidasa

El procedimiento fué realizado utilizando la modificación de Gross y col<sup>10</sup> de la siguiente manera: las muestras fueron hidratadas en PBS (phosphate buffer saline) y posteriormente incubadas durante 60 minutos con el anticuerpo monoclonal primado de ratón el cual contiene 1% de Tritón X-100, luego durante 30 minutos se incubaron con anticuerpo IgG proveniente de caballo contra ratón a la concentración de 50 mg/ml (vector Laboratorios Inc., Burlingame, USA), y durante 30 minutos con el conjugado avidinabiotina-peroxidasa a la dilución 1:100. Se realizó un lavado con PBS durante 5 minutos entre cada incubación. La reacción se desarrolló utilizando el

sustrato Vector SG, el cual produce una coloración gris-azulada. Las secciones se lavaron, y se les coloreó de fondo con eosina; posteriormente se colocaron en medio permanente DPX. En los controles se omitió el anticuerpo primario y se empleó un anticuerpo de especificidad irrelevante a la misma concentración.

### Contaje de células

El contaje celular se llevó a cabo con un microscopio de luz que lleva incorporado una escala milimetrada (Carl Zeiss, Alemania), calibrado para determinar el número de células/mm<sup>2</sup> en granulomas epidérmicos y dérmicos. Solamente aquellas células con un núcleo visible y que mostraron una coloración gris-azulada se contaron como positivas.

Con la finalidad de obtener muestras representativas de las lesiones, se colorearon 4 secciones no seriadas por cada marcador, y se contaron las células positivas. Todos los campos de interés se contaron en cada sección con un aumento de 1000x, dando como resultado de 2-4 x 10 células por sección. Los porcentajes de cada fenotipo se calcularon. Se encontró aproximadamente 4500 células (mm<sup>2</sup> en el infiltrado, de acuerdo al contaje previo de células nucleadas coloreadas con hematoxilina-eosina.

### Análisis estadístico

El contaje celular se expresó como el promedio de células positivas de cada marcador proveniente de cada uno de los pacientes  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos se realizó utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney y el test de Student para muestras no pareadas. Valores de  $p=0,05$  se consideraron con significancia estadística<sup>11</sup>.

### RESULTADOS

Este estudio mostró alteraciones morfológicas en la mucosa rectal de todos los pacientes. Veintiséis presentaron rectitis crónica, 3 amibiasis, 1 bisto plasmosis, 1 candidiasis, 1 leishmania-



sis y 1 sarcoma de Kaposi. Los siguientes cambios también se observaron en la mucosa rectal:

1. Engrosamiento de la membrana basal (8 pacientes).
2. Invasión de la mucosa por un infiltrado inflamatorio predominantemente de células plasmáticas (7 pacientes).
3. Proliferación endotelial (7 pacientes).
4. Necrosis focal no asociada con signos indirectos de apoptosis (2 pacientes).
5. Presencia de folículos linfoides (16 pacientes) (Figura 1).

Los estudios inmunocitoquímicos mostraron que el 44% (1752 células/mm<sup>2</sup>) de las células inflamatorias, expresaban moléculas LCA y HLA-DR asociadas con activación leucocitaria. El valor promedio de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en el infiltrado fue de 186 células/mm<sup>2</sup> (rango, 82-281), lo cual representa el 5,4% de las células inflamatorias. Estos resultados contrastan con los individuos control, en quienes el 60% de las células inflamatorias eran linfocitos T-CD4<sup>+</sup>. Las células inflamatorias de la mucosa rectal de pacientes VIH positivo, mostraron una expresión

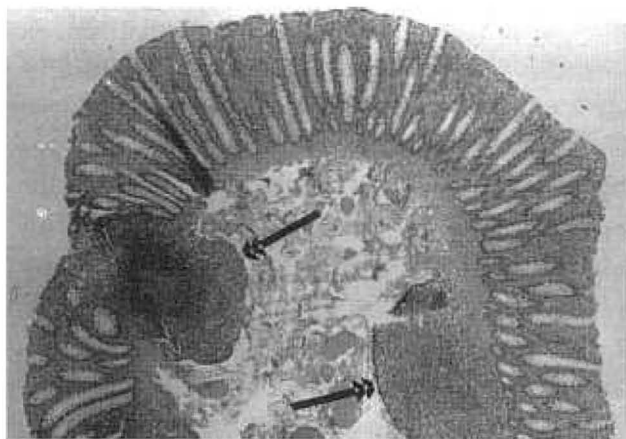


Figura 1. Mucosa rectal de un paciente infectado por el VIH. Numerosas criptas orientadas verticalmente, y prominente infiltrado de la lámina propia constituido por linfocitos, células plasmáticas, y agregados linfoides. Hematoxilina y eosina, X150.

marcada de moléculas asociadas con proliferación celular; tales como p53, PCNA y p21. Además, el infiltrado mostró un número significativo de linfocitos T-CD30 + (Figura 2), asociado con respuesta T cooperadora (Th2). La densidad de las células dendríticas S-100 + (Figura 3), también se encontró elevada en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo. La comparación del inmuno-

Tabla 1. Células inflamatorias en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo y controles.

Antígeno	Pacientes VIH positivo* (n=33)	Controles* (n=7)	p
LCA	1889±36	495±18	≤ 005
OPD4	186±4	291±11	≤ 005
CD30	263±8	168±7	≤ 005
S-100	455±7	204 ±4	≤ 005
p53	371±15	108±5	≤ 005
PCNA	671±12	142±19	≤ 005
p21	614±9	219±6	≤ 005

\* Los valores se expresan como el promedio de células positivas para cada antígeno ± desviación estándar; p: significancia estadística.

Tabla 2. Células inflamatorias en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo con o sin folículos linfoides.

Antígeno	Con folículo* (n=16)	Sin folículo* (n=17)	p
LCA	2182±87	1686±28	≤ 005
OPD4	186±15	206±12	≤ 005
CD30	281±14	246±7	NS
S-100	471±9	411±11	≤ 005
p53	360±14	350±9	NS
PCNA	675±23	985±303	≤ 005
p21	587±15	637±10	NS

\* Los valores se expresan como el promedio de células positivas para cada antígeno ± desviación estándar; p: significancia estadística; NS: no significativa.

fenotipo leucocitario de la mucosa rectal de pacientes VIH positivo y controles demostró una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) con respecto a cada una de las moléculas identificadas: LCA, CD4, CD30, PCNA, p53, p21 y S-100 (Tabla 1). Además, hubo una diferencia significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre células positivas para LCA, PCNA, CD4 y S-100 en pacientes VIH positivo con o sin la formación de folículos linfoides en la mucosa rectal (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

La mucosa rectal de pacientes VIH positivo se caracterizó por algunas anormalidades, sin embargo la mayoría mostró una mucosa, submucosa y muscularis mucosa bien definida. En 2 pacientes hubo necrosis del epitelio, sin evidencia clara de apoptosis. Esta observación contrasta con estudios previos que describen cuerpos apoptóticos en el epitelio<sup>12</sup>. En general la mucosa se encontró delgada con un infiltrado inflamatorio, las criptas intestinales conservaron su arquitectura normal excepto en algunos casos donde se evidenció una alteración basal debida a la invasión del infiltrado. Estudios previos<sup>12,13</sup>, han mostrado una degeneración celular mas intensa en la base de las criptas. Los enterocitos basales son delgados y coincide con lo reportado en la literatura<sup>13</sup>; esto podría ser el resultado de la infección directa de

estas células por parte del VIH a través de una vía independiente, lo cual conduciría a la formación de enterocitos inmaduros, sin borde en cepillo, produciendo un síndrome de mal absorción<sup>13</sup>. La lámina propia mostró un infiltrado inflamatorio marcado predominantemente constituido por células plasmáticas; seguido por linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. Esta observación contrasta con la descripción de infiltrados previos, en los cuales predominaron los mastocitos, linfocitos y macrófagos<sup>3,13</sup>. Un infiltrado inflamatorio muy escaso se encontró en 2 pacientes VIH positivo, quienes fueron co-infectados por *Leishmania braziliensis* e *Histoplasma casulatum* respectivamente. El conteo de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en sangre periférica fue 9 y 99 células/ml respectivamente. Ambos patógenos son parásitos intracelulares que son destruidos por los macrófagos mediante el interferon  $\gamma^4$ , previamente estimulados por los linfocitos T-CD4<sup>+</sup>, por lo tanto, el número tan bajo de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> es responsable de la pobre respuesta inflamatoria *in situ* de estos pacientes. Un tercer paciente, perteneciente al grupo B2, con un conteo de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> de 200/ $\mu$ l en sangre periférica, mostró una adecuada respuesta inflamatoria a *Entamoeba histolytica* compuesta por linfocitos T, macrófagos y células plasmáticas. Los resultados descritos previamente, nos han permitido desarrollar la siguiente hipótesis mostrando la dinámica celular de lo que podría



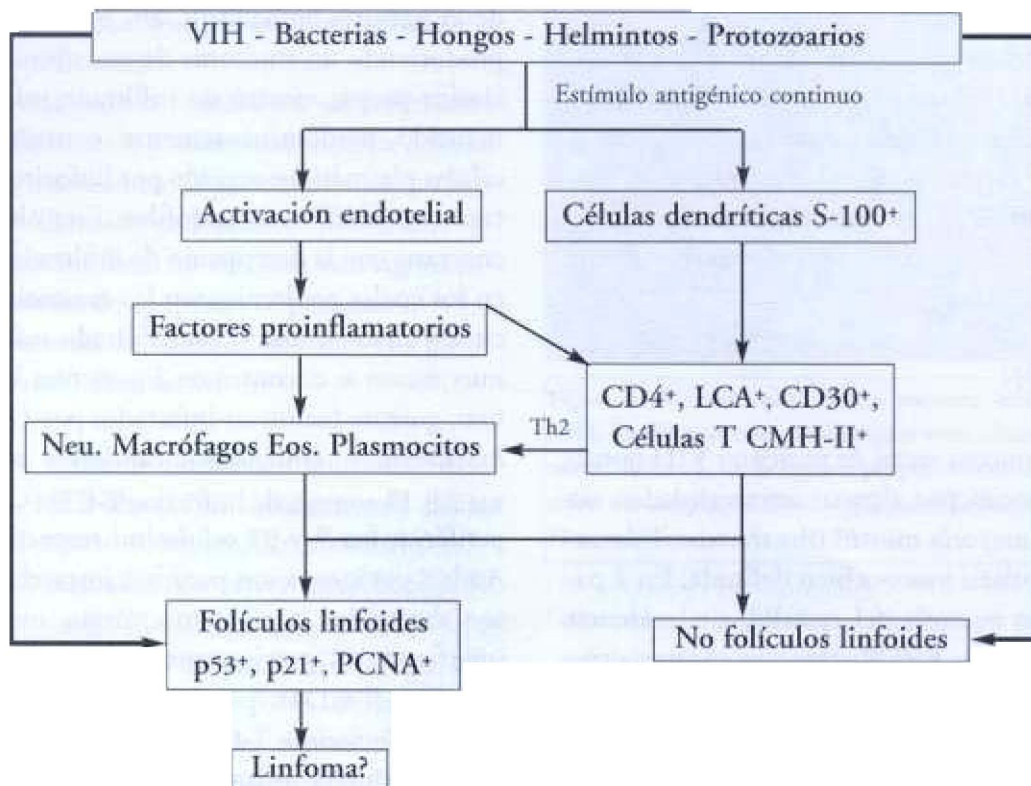
Figura 2. Infiltración por células CD30 + en la lámina propia de un paciente infectado por el VIH. Avidina-biotina inmunoperoxidasa, X1000.



Figura 3. Células dendríticas S-100 + en la lámina propia de un paciente infectado por el VIH. Avidina-biotina inmunoperoxidasa, x 1000.



Figura 4. Dinámica celular en la mucosa rectal de pacientes infectados por el VIH.



estar ocurriendo en la mucosa rectal de los pacientes VIH positivo (Figura 4). El infiltrado de la mucosa rectal es el resultado de múltiples estímulos antigénicos (VIH, bacterias, hongos, helmintos y protozoarios). Estos antígenos producen activación endotelial, caracterizada por proliferación de las células endoteliales y engrosamiento de la pared endotelial. La activación endotelial genera factores pro-inflamatorios necesarios para la formación del infiltrado.

Las células dendríticas S-100<sup>+</sup> se encontraron aumentadas en la mucosa rectal de los pacientes VIH positivo independientemente del estado avanzado de la enfermedad (C3). Trabajos previos han encontrado que las células dendríticas se encuentran disminuidas en la sangre periférica de individuos VIH positivo asintomáticos<sup>5</sup>, y en los ganglios linfáticos de pacientes en estado avanzado (C3)<sup>15</sup>. Nuestro estudio es el primero en demostrar que las células dendríticas S-100<sup>+</sup> están aumentadas en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo, sugiriendo la importancia del estudio de

la dinámica rectal de estas células. Nosotros observamos un número aún mayor de células dendríticas S-100<sup>+</sup> en la mucosa rectal de pacientes VIH positivo con la presencia de folículos linfoides. Este número elevado de células dendríticas S-100<sup>+</sup> puede deberse a los múltiples y continuos estímulos antigénicos, ya que estas células son importantes en el proceso de presentación de antígenos a las células T-CD4<sup>+</sup>, así como a las células T-CD30<sup>+</sup>(Th2). La inmunocitoquímica mostró numerosos linfocitos activados (HLA-DR<sup>+</sup>, LCA<sup>+</sup>); a diferencia, la mucosa rectal de los controles no mostró células HLA-DR<sup>+</sup> que expresan el CMH-II. La densidad de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en el infiltrado de los paciente VIH positivo fue menor que en los controles; sin embargo, estas cifras son mayores que aquellas previamente descritas<sup>12</sup>. Muchas células expresaron la molécula CD30, esta última se ha asociado a una respuesta Th2 productora de interleuquina-4, inductora de la producción de anticuerpos y procesos alérgicos<sup>16</sup>. La identificación de las células CD30<sup>+</sup> en la

mucosa rectal, indica la presencia de respuesta inmune local en los pacientes VIH positivo. Las células inflamatorias se encontraban con un alto índice de proliferación, como lo indican la elevada expresión de PCNA, p53 y p21; además, como la expresión de la proteína p53 se ha asociado también con apoptosis y neoplasias<sup>17</sup>, la muerte celular programada podría estar ocurriendo como un evento común en el infiltrado. Los pacientes VIH positivo están predisuestos al desarrollo de neoplasias, tales como sarcoma de Kaposi y linfomas noHodgkin esta predisposición de debe principalmente a una gran depresión de la inmunidad celular asociada con agentes virales (Epstein Barr, virus herpes humano-8)<sup>18,19</sup>. Ha sido demostrado previamente, que la constante estimulación antigénica por virus o parásitos, puede inducir el desarrollo de linfomas intestinales difusos, predominantemente en pacientes VIH negativo de los países subdesarrollados<sup>20</sup>. En el presente trabajo, la observación de 16 pacientes VIH positivo, con un infiltrado inflamatorio altamente proliferativo dominado por células plasmáticas, folículos linfoides, y una alta expresión de la proteína p53, podría crear las condiciones apropiadas para el desarrollo posible de una proliferación monoclonal y como consecuencia un linfoma difuso intestinal. El desarrollo de la terapia antiretroviral altamente efectiva, lo que conlleva a una mayor sobrevivencia, podría permitir que linfomas rectales se desarrollen en este grupo de enfermos.

**Agradecimientos:** Se agradece a la Dra. Eugenia Gallegos, Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vargas, quien nos facilitó las biopsias de hemorroidectomías; Dra. Gloria Urquiola, Cátedra de Gastroenterología, Escuela José María Vargas UCV, quien tomó las biopsias rectales; Dra. María Elena Ruiz, Instituto de Anatomía Patológica UCV, quien revisó las biopsias rectales iniciales. Finalmente, un profundo agradecimiento a los pacientes que participaron en el estudio.

Dirección: Para solicitud de separatas y correspondencia: Dr. Dimas E. Hernández, Unidad de

Investigación Clínica, Escuela José M. Vargas de la Universidad Central de Venezuela, Esquina de San Lorenzo, San José, Caracas 1010-A, Venezuela.

Telefax: 58-2-5629928, E-mail:dimas@CancerMD.com

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caussy D and Goedert JJ. The epidemiology of human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome. *Sem Oncol* 1990; 17: 244-50.
2. Kagnoff M. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 1993; 105: 1275-80.
3. Clayton F, Reka S, Cronin WJ, Torlakovic E, Sigal SH, Kotler DP. Rectal pathology varies with human immunodeficiency virus antigen content and disease stage. *Gastroenterology* 1992; 103: 919-33.
4. Clayton F, Snow G, Reka S, Kotler DP. Selective depletion of rectal lamina propria rather than lymphoid aggregate CD4 lymphocytes in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 288-92.
5. Macatonia SE, Lau R, Patterson S, Pinchin AJ, Knight SC. Dendritic cell infection depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 1990; 71: 38-45.
6. Zambrano G, Gianetti A, Bertazzoni U, Girolomoni G. Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 1995; 16: 520-24.
7. Patterson S, Gross J, English N, Stackpoole A, Bedfoed P, Knight SC. CD4 expression on dendritic cells and their infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1995; 76: 1155-63.
8. Martínez C, Arteaga R, Hernández D, Urquiola G. Biopsias rectales en pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana. *GEN* 1995; 49:268-72.



9. Center for Disease Control. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR*.
10. Gross A, Weiss E, Tapia FJ, Aranzazu N, Gallinoto ME, Convit J. Leukocyte subsets in the granulomatous response produced after inoculation with *Mycobacterium leprae*-BCG in lepromatous patients. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 608-12.
- Zar JH. *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall; 1974.
12. Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, Klein EB, Holt PR. Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Int Med* 1984; 101: 421-8.
13. Bjarnason I, Sharpstone DR, Francis N, Marker A, Taylor C, Barthe M, et al. Intestinal inflammation, ileal structure and function in HIV. *AIDS* 1996; 10: 1385-91.
4. Murray HW, Rubin BY, Masur H, Roberts RB. Impaired production of lymphokines and immune gamma interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1982; 310: 883-9.
15. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 327-35.
16. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone: 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.
17. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1009-22.
18. Guarner J, Rio C, Carr D, Hendrix LE, Eley JW, Unger ER. Non-Hodgkin's lymphomas in patients with human immunodeficiency virus infection: presence of Epstein-Barr virus by in situ hybridization, clinical presentation, and follow up.
19. Huang YQ, Li JJ, Kaplan MH, Poiesz B, Katabira E, Zhang WC, et al. Human herpesvirus-like nucleic acid in various forms of Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995; 345: 759-61.
20. Khojasteh A. Immunoproliferative small intestinal disease. Portrait of potentially preventable cancer from the third world. *Am J Med* 1990; 89: 483-90.