

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Características clínico-moleculares del cáncer gástrico cardial asociado al virus Epstein Barr

Alejandro Corvalán R^{1,2}, Suminori Akiba³,
María Teresa Valenzuela B⁴, Miguel Angel Cumsille G^{4,a},
Chihaya Koriyama³, Jorge Argandoña C^{2,b},
Claudia Backhouse E^{2,c}, Matilde Bal C⁴,
Fernando Mena U⁵, Mariana Palma V^{2,c}, Yoshito Eizuru³.

Clinical and molecular features of cardial gastric cancer associated to Epstein Barr virus

Background: Mortality caused by cardial gastric cancer in Chile, is increasing. Previously we demonstrated an association between Epstein Barr virus and this specific location of gastric cancer. **Aim:** To perform a clinical and molecular characterization of cardial gastric cancer associated to Epstein Barr virus. **Material and methods:** Epstein Barr virus was identified in 93 cardial gastric tumors, by *in situ* hybridization. Clinical and pathological features, survival and expression of p53 and c-erbB2 were compared between tumors with or without the presence of the virus. **Results:** Twenty two (23.6%) tumors expressed Epstein Barr virus. No difference in sex or age of patients with tumors positive or negative for the virus was observed. Epstein Barr positive tumors had a tendency to have a higher frequency of Bormann III endoscopic appearance and a lower frequency of p53 accumulation ($p=0.06$). Five years survival was 67% and 42% of tumors positive and negative for the presence of the virus, respectively ($p=0.57$). **Conclusions:** Our results, although not significant, show a tendency towards unique characteristics of cardial gastric tumors associated to Epstein Barr virus (Rev Méd Chile 2005; 133: 753-60). **(Key Words:** Epstein-Barr virus infections; Herpes virus 4, human; Stomach neoplasms)

Recibido el 1 de septiembre, 2004. Aceptado en versión corregida el 30 de marzo, 2005.

Trabajo financiado por *Grants in Aid for Scientific Research* (12218231) e *International Scientific Research, Special Cancer Research* (09042007) Ministerio de Educación, Japón y Dirección Académica, Clínica Las Condes, Chile (Proyecto Her2/neu y Cáncer Gástrico de ubicación cardial).

¹Departamento de Anatomía Patológica, Pontificia Universidad Católica de Chile. ²Instituto Chileno Japonés de Enfermedades Digestivas, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile. ³Departamento de Salud Pública y Centro de Enfermedades Virales Crónicas, Facultad de Medicina, Universidad de Kagoshima, Kagoshima, Japón. ⁴Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago Chile. ⁵Departamento de Patología, Hospital Max Peralta, Cartago, Costa Rica.

^aMagíster en Bioestadística

^bLicenciado en Tecnología Médica

^cTecnóloga Médica

Correspondencia a: Dr. Alejandro Corvalán R. Laboratorio Biología Molecular, Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Lira 85, Santiago. Casilla 114-D. Teléfono: 56(2) 3543209. Fax: 56(2) 6395101. E-mail: corvalan@med.puc.cl

El cáncer gástrico (CG) representa la primera causa de muerte por enfermedades neoplásicas en Chile y aunque su tasa de mortalidad se ha estabilizado¹, la frecuencia del CG de ubicación cardinal se encuentra en aumento²⁻⁴. En efecto, autores chilenos^{2,3} han demostrado que los tumores cardiales han incrementado entre 12 y 15% en los últimos 30 años, llegando a representar el 42,3% de las localizaciones. De modo similar, investigadores americanos⁴ han reportado un incremento anual de 4,4% entre 1976 y 1987, sin observar modificaciones en la frecuencia del CG, en otras localizaciones. Se ha postulado que el CG cardinal, sería una forma particular de CG, dado que se comunica una peor sobrevida a 5 años en esta localización en comparación con CG de otras ubicaciones⁵. Por otra parte, se ha descrito que la frecuencia de mutaciones de los oncogenes p53 y Her2/neu sería diferente entre CG cardinal y antral^{6,7} y Hansen et al⁸ han señalado que *Helicobacter pylori* no tendría un rol tan relevante en la patogénesis del CG cardinal como el observado en la ubicación antral. Incluso se ha observado un probable rol protector de *Helicobacter pylori* en el desarrollo del CG cardinal⁹. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que el CG cardinal sería una forma emergente y particular de CG.

El virus de Epstein-Barr (VEB), tradicionalmente asociado a neoplasias linfoides¹⁰, también ha sido descrito en tumores epiteliales como carcinoma nasofaríngeo y linfoepiteliomas de distintos órganos, incluyendo el estómago^{11,12}. En esta ubicación, los linfoepiteliomas no representan más de 5% de los tumores gástricos¹³, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado una emergente asociación entre VEB y CG¹⁴. En efecto, diversas publicaciones señalan una asociación de 6,9% a 18% entre VEB y CG¹⁵⁻¹⁷ con características clínico-patológicas únicas, como predominio en hombres, localización alta (cardias y tercio medio del estómago) y una frecuencia similar de los subtipos "intestinal" y "difuso"¹⁸. Recientemente hemos analizado las características clínico-patológicas del CG asociado a VEB en Chile, encontrando una asociación de 16,8% (31/185), una de las más altas del mundo, y un perfil clínico-patológico único¹⁹.

Este perfil se caracteriza por una distribución similar entre ambos sexos, una fuerte asociación con ubicación cardinal y un predominio del patrón histológico "difuso"¹⁹. Dado que estas características han sido descritas en México²⁰ y en descendientes mexicanos en Estados Unidos²¹, hemos sugerido la presencia de un perfil único del CG asociado a VEB en Latinoamérica¹⁹.

Ya que el CG cardinal representa una entidad propia y emergente en Chile y que una de las principales características del CG asociado a VEB es la fuerte localización cardinal, el objetivo de nuestro estudio fue analizar características clínico-patológicas, moleculares y de sobrevida del CG cardinal en sus formas asociada y no asociada al VEB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes. El estudio se realizó sobre la base de 305 piezas quirúrgicas de pacientes operados por CG en el Servicio de Cirugía del Hospital San Borja Arriarán y archivados en el Instituto Chileno-Japonés de Enfermedades Digestivas del mismo hospital entre 1993 y 1999. De este material y utilizando la definición de Locke et al²² que definen como mucosa gástrica cardinal a la región entre la unión gastroesofágica y los primeros 5 cm de estómago, se identificaron 93 casos, que son la base del presente estudio. Las características clínicas de estos casos se obtuvieron de la revisión de fichas médicas y las características patológicas de informes anátomo-patológicos correspondientes. Se consignó edad, sexo, tamaño tumoral (<5 y >5 cm), infiltración de pared gástrica y compromiso ganglionar (sin consignar número de ganglios comprometidos) de acuerdo a la Unión Internacional contra el Cáncer²³ y tipo histológico de acuerdo a la clasificación de Lauren²⁴. En los tumores que infiltraban muscular propia o serosa, se consignó además la forma macroscópica según la clasificación de Borrmann²⁵.

Hibridación in situ para la identificación del virus de Epstein-Barr. La presencia de VEB se realizó determinando la expresión del ARN pequeño no poliadenilado intranuclear-1 (EBER-1),

el producto viral más abundante de la infección latente de VEB²⁶. La determinación se realizó con la sonda TTGCTAGGGAGGACGTGT complementaria a los nucleótidos 6653-6672 del gen EBER-1 de acuerdo al protocolo descrito por Chang et al²⁷.

Inmunohistoquímica para la identificación de p53 y Her2/neu. La determinación de p53 se realizó por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo DO-7 (Dako) de acuerdo a protocolos establecidos²⁸. Brevemente, se realizaron cortes de 4 µm que fueron montados en portaobjetos seguidos de desparafinación, rehidratación y digestión con Tripsina al 0,37%. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo DO-7 (1:10) a 4°C por 12 h seguidas de anticuerpo secundario conjugado con biotina (1:300) por 30 min a 37°C y complejo estreptavidina-peroxidasa (1:300) por 30 min a 37°C. Finalmente, las láminas fueron incubadas con diaminobenzidina (DAB) por 10 min a temperatura ambiente en presencia de H₂O₂ al 0,3% y contrateñidas con hematoxilina. La determinación de Her-2/neu se realizó con el anticuerpo policlonal pAB-1 (Dako) en condiciones similares a las descritas y considerando reacción positiva a la tinción específica en la membrana citoplasmática de células tumorales²⁹.

Estadística. Los resultados y las asociaciones con variables clínico-patológicas se estudiaron usando el método de chi-cuadrado (χ^2) y los análisis de supervivencia usando el método de Kaplan-Meier. Estos análisis estadísticos se hicieron en el paquete computacional Stata 6.0.

RESULTADOS

Hibridación in situ. La hibridación *in situ* se realizó en 93 casos, resultando 22 (23,6%) con tinción positiva. En los casos considerados con tinción positiva se observó la expresión de EBER-1 en forma uniforme y exclusiva en todos los núcleos de las células tumorales y no se observó expresión de EBER-1 en células epiteliales no tumorales ni linfocitos peritumorales (Figura 1).

Características clínicas y patológicas. Los resultados de la comparación de variables clínicas y anátomo-patológicas entre casos de CG cardinal VEB+ y VEB- se muestran en la Tabla 1. Se observa que con relación al sexo y edad no hay diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, la edad más frecuente en que ocurrió la enfermedad, o modo, fue menor en el subtipo VEB+ (52 años vs 67 años). Con relación a variables anátomo-patológicas se observa que no hay diferencias en el tamaño tumoral como tampoco la infiltración de la pared gástrica entre los tumores VEB+ y VEB-. Entre los tumores T2-T4 (avanzados) observamos que aunque la forma Bormann III fue la más frecuente para ambos grupos, esta presentación macroscópica fue más frecuente en los tumores VEB+ (p=0,06). Con relación a la presentación histológica y basándose en la clasificación de Lauren, no se observaron diferencias entre los tipos "intestinal" y "difuso". En esta serie observamos 4 casos con abundante infiltrado linfocitario, los que fueron clasificados como linfoepitelioma gástrico y todos ellos correspondieron al grupo VEB+.

Características moleculares. La determinación de p53 se realizó en 21 casos VEB+ y en 57 casos VEB-. Se consideró tinción positiva con 10% o más

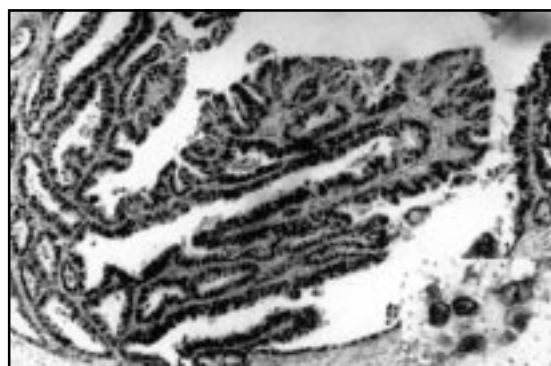


FIGURA 1. Hibridación *in situ* para EBER-1. Se observa expresión uniforme y exclusiva de EBER-1 en todos los núcleos de células tumorales de un cáncer gástrico cardinal de tipo intestinal bien diferenciado (papilo-tubular), indicando la presencia de VEB (40X). Inserto: detalle con mayor aumento de la tinción nuclear.

Tabla 1. Correlaciones clínico-patológicas del cáncer gástrico de ubicación cardinal asociado al virus de Epstein-Barr

	VEB positivo 22 casos		VEB negativo 71 casos		p
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
hombre	6	(27,3)	25	(35,2)	0,49
mujer	16	(72,7)	46	(64,8)	
Edad					
promedio	63,2a	(26-79a)	61,8a	(20-79a)	
Tamaño tumor					
<5 cm	4	(22,2)	26	(42,6)	0,12
>5 cm	14	(77,8)	35	(57,4)	
Pared gástrica					
T0-T1	3	(15,8)	9	(12,9)	0,71
T2-T4	16	(84,2)	61	(87,1)	
Bormann I	0	-	4	(6,6)	0,06 ^a
Bormann II	2	(12,5)	19	(31,1)	
Bormann III	11	(68,8)	26	(42,6)	
Bormann IV	2	(12,5)	9	(14,8)	
Bormann V	1	(6,2)	3	(4,9)	
Linfonodos					
negativo	8	(42,1)	19	(37,3)	0,71
positivo	11	(57,9)	32	(62,7)	
Histología					
intestinal	13	(59,1)	51	(71,8)	0,26
difuso	9	(40,9)	20	(28,2)	

^aBormann III vs Bormann I, II, IV y V.

de células tumorales positivas a nivel nuclear (Figura 2) y los resultados se muestran en la Tabla 2. Se observa que sólo 3 (14,2%) de 21 tumores VEB+ presentaron acumulación de p53. Por el contrario, entre los tumores VEB-, 21 (36,8%) de 57 casos VEB- acumularon p53 (p=0,06). La determinación de Her2/neu se realizó en 20 casos VEB+ y 61 casos VEB-. Se consideró tinción positiva la tinción de membrana citoplasmática exclusivamente en las células tumorales (Figura 3). Los resultados se muestran en la Tabla 2. No observamos expresión de Her2/neu en ningún caso de CG cardinal VEB+, y sólo en 3 (4,9%) casos VEB-.

Análisis de sobrevida. De 93 pacientes portadores de CG cardinal, los datos de sobrevida fueron

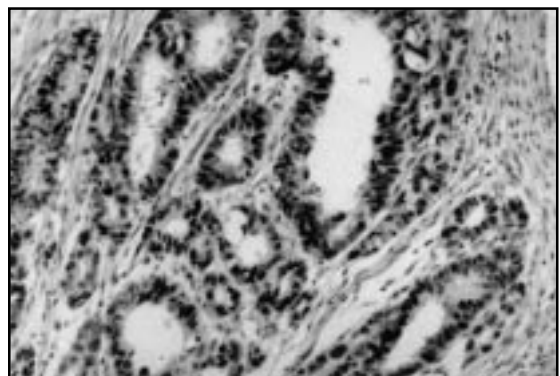


FIGURA 2. Inmunohistoquímica para proteína tumoral p53. Se observa tinción de p53 en el núcleo de células tumorales (40X).

Tabla 2. Correlaciones moleculares del cáncer gástrico cardinal asociado al virus de Epstein-Barr

	VEB positivo n (%)	VEB negativo n (%)	p
p53			
negativo	18 (85,7)	36 (63,2)	0,06
positivo	3 (14,3)	21 (36,8)	
Her2/neu			
negativo	20 (100)	58 (95,1)	0,17
positivo	0 0	3 (4,9)	

obtenidos en 77 casos, 18 VEB+ y 59 VEB-. Observamos una supervivencia global de 67% y 42% para los tumores VEB+ y VEB-, respectivamente. La tendencia en el riesgo relativo de morir fue 0,57 (95% IC=0,23 a 1,41; p=0,23) para los tumores VEB- con respecto a los tumores VEB+. Para comparar la probabilidad de supervivencia en tiempos específicos entre tumores EBV+ y EBV-, realizamos un análisis de función de supervivencia (Tabla 3), que nos muestra que los tumores EBV+ tienen una mejor supervivencia inicial, pero que estas diferencias tienden a desaparecer después de los 48 meses de seguimiento.

DISCUSIÓN

Varias líneas de evidencias apoyan la asociación entre VEB y CG. La demostración de monoclonalidad del genoma de VEB en casos de CG indica que la infección viral precede a la expansión neoplásica³⁰. Por otra parte, la presencia de anticuerpos anti-VEB elevados en pacientes con CG asociado a VEB respecto a pacientes con CG-VEB negativo o sujetos controles³⁰⁻³², y la presencia del patrón histológico denominado *lace pattern*³³, característico de esta forma tumoral, son otras evidencias que apoyan esta asociación.

Previamente hemos identificado una fuerte relación entre VEB y CG de ubicación cardinal¹⁹. Para caracterizar esta asociación, analizamos características clínico-patológicas, moleculares y de supervivencia en una serie de 93 casos de CG de

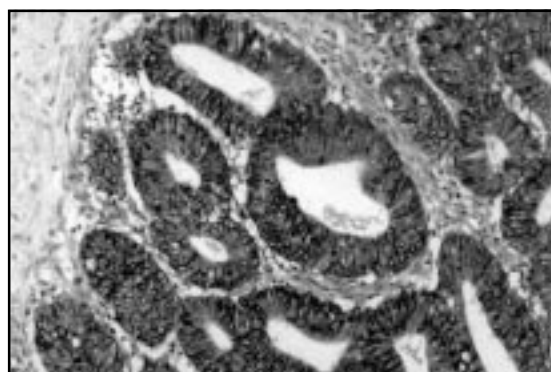


FIGURA 3. Inmunohistoquímica para oncogen c-erbB-2. Se observa tinción en la membrana citoplasmática de células tumorales (40X).

Tabla 3. Análisis de la función de supervivencia para el virus Epstein-Barr en cáncer gástrico cardinal

Tiempo	VEB-	VEB+
1 mes	100%	100%
12 meses	78,1%	94,4%
24 meses	63,7%	88,8%
36 meses	57,1%	76,1%
48 meses	52,4%	69,8%
60 meses	52,4%	62,8%
72 meses	52,4%	62,8%

ubicación cardinal de los cuales 22 (22,6%) correspondieron al tipo asociado a VEB. Al comparar las características anatómo-patológicas, llama la atención la mayor frecuencia de presentación Borrmann III en los tumores VEB+. Esta observación no ha sido descrita previamente, sólo Yanai et al³⁴ han señalado que la presentación endoscópica más frecuente del CG asociado a VEB sería la incipiente IIc. Por otra parte, ambos tipos histológicos de Lauren estuvieron representados en proporciones similares. Esta observación es contraria a la asociación descrita con el tipo "difuso"¹⁹ y probablemente indica que la localización y el tipo histológico serían variables independientes en el CG asociado a VEB.

La proteína p53 es una de las más importantes en carcinogénesis gástrica³⁵. Esta proteína es de ubicación nuclear, es activada en respuesta a daño celular y su inactivación se asocia al

desarrollo de neoplasias³⁶. La inactivación, por mutaciones puntuales o complejos con proteínas virales estabiliza a p53, con aumento de su vida media, característica que permite el uso de la inmunohistoquímica para su detección³⁷. Utilizando esta metodología, la frecuencia de acumulación de p53 varía entre 23% y 61%³⁷. Nuestros resultados muestran una tendencia a una baja frecuencia de acumulación de p53 en tumores asociados a VEB, los cuales son concordantes con la literatura^{38,39} aunque en estos trabajos no se hace referencia a la ubicación cardial. C-erbB2 es un oncogen que codifica para receptores de factores de crecimiento y está activado por amplificación génica²⁹. La amplificación de c-erbB2 es considerado el factor pronóstico molecular más importante en CG, ya que se correlaciona con invasión serosa y linfática, metástasis hepática y peritoneal y menor sobrevida a 5 años⁴⁰. Sin embargo, no hay estudios que analicen el rol de c-erbB2 en CG asociado a VEB y nuestros resultados no demuestran una relación entre ambos, al menos en ubicación cardial.

Con relación a sobrevida, aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas, en la sobrevida entre los tumores VEB+ y VEB-, sí observamos una tendencia a mejor pronóstico en los tumores EBV+. Esta información es concordante con la descrita por van Beek et al⁴¹, en población caucásica y por nuestro propio grupo en una serie de 192 CG japoneses⁴². Dado que la ubicación cardial se considera de peor pronóstico⁵, la observación de una tendencia a mejor pronóstico en los tumores EBV+, sería sugerente de un potencial rol específico de EBV+ en la historia natural del cáncer gástrico cardial. El análisis de la función de sobrevida, indica que la presencia de EBV sería particularmente relevante en los primeros 48 meses de seguimiento de estos pacientes.

En resumen, nuestros resultados, aunque no significativos, muestran tendencias de asociaciones clínico-moleculares y de sobrevida del CG cardial asociado a VEB. Estos resultados aportan información adicional a la caracterización del rol de VEB en CG cardial, un forma emergente de CG.

REFERENCIAS

1. SERRA I, BÁEZ S, SERRA J, CALVO A, DECINTI E. Evolución epidemiológica reciente del cáncer gástrico en Chile y el mundo. *Rev Chil Cir* 1997; 49: 54-63.
2. CSENDES A, SMOK G, MEDINA E, SALGADO I, RIVERA R, QUITRAL M. Características evolutivas del cáncer gástrico 1958-1990. *Rev Méd Chile* 1992; 120: 36-42.
3. DUARTE I, OHMKE J, CIANI S, VILLARROEL L. Patrones de carcinoma en gastrectomías de adultos chilenos: Estudio multivariado en un país de alto riesgo. *Gastr Latinoam* 2001; 12: 12-8.
4. BLOT WJ, DEVESA SS, KNELLER RW, FRAUMENI JF JR. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-9.
5. OHNO S, TOMISAKI S, OIWA H, SAKAGUCHI Y, ICHIIYOSHI Y, MAEHARA Y ET AL. Clinicopathologic characteristics and outcome of adenocarcinoma of the human gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 577-82.
6. FLEIOU JF, GRATIO V, MUZEAU F, HAMELIN R. p53 abnormalities in adenocarcinoma of the gastric cardia and antrum. *Mol Pathol* 1999; 52: 263-8.
7. ALBINO AP, JAEHNE J, ALTORKI N, BLUNDELL M, URMACHER C, LAUWERS G ET AL. Amplification of HER-2/neu gene in human gastric adenocarcinomas: correlation with primary site. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21: 56-60.
8. HANSEN S, MELBY KK, AASE S, JELUM E, VOLLSET SE. *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 353-60.
9. CHOW WH, BLASER MJ, BLOT WJ, GAMMON MD, VAUGHAN TL, RISCH HA ET AL. An inverse relation between cagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 588-90.

10. RICKINSON A, KIEFF E. Epstein-Barr virus. In: Fields B, Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 2397-445.
11. ODA K, TAMARU J, TAKENOUCHI T, MIKATA A, NUNOMURA M, SAITOH N ET AL. Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1063-71.
12. HAUSEN HZ. Epstein-Barr virus in human tumor cells. *Int Rev Exp Pathol* 1972; 11: 233-58.
13. WATANABE H, ENJOJI M, IMAI T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976; 38: 232-43.
14. SHIBATA D, WEISS LM. Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; 140: 769-74.
15. TOKUNAGA M, LAND CE, UEMURA Y, TOKUDOME T, TANAKA S, SATO E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1250-4.
16. GALETSKY SA, TSVETNOV VV, LAND CE, AFANASIEVA TA, PETROVICHEV NN, GURTSEVITCH VE ET AL. Epstein-Barr virus associated gastric cancer in Russia. *Int J Cancer* 1997; 73: 786-9.
17. OTT G, KIRCHNER T, MULLER-HERMELINK HK. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 323-9.
18. TAKADA K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 2000; 53: 255-61.
19. CORVALÁN A, KORIYAMA C, AKIBA S, EIZURU Y, BACHHOUSE C, PALMA M ET AL. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int J Cancer* 2001; 94: 527-30.
20. HERRERA-GOEPPERT R, REYES E, HERNÁNDEZ-ÁVILA M, MOHAR A, SHINKURA R, FUJIYAMA C ET AL. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Mexico: analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod Pathol* 1999; 12: 873-8.
21. GULLEY ML, PULITZER DR, EAGAN PA, SCHNEIDER BG. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol* 1996; 27: 20-7.
22. LOCKE G, TALLEY N, CARPENTER H, HARMSSEN W, ZINSMEISTER A, MELTON L. Changes in the site and histology specific incidence of gastric cancer during a 50 years period. *Gastroenterology* 1995; 109: 1750-6.
23. FENOGLIO-PREISER C, CARNEIRO F, CORREA P, GUILFORD P, LAMBERT B, MEGRAUD F ET AL. Gastric carcinoma. In: Hamilton HB, Aaltonen L, eds. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press, 2000.
24. LAUREN P. The two histological main types of gastric carcinoma, diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path Microbiol Scan* 1965; 64: 31-49.
25. BORMANN R. Geschwulste des magens und duodenums. In: Henske F, Lubarsch O, eds. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie und histologie*. Volume IV-L. Berlin: Julis Springerler, 1926; 864-71.
26. TAKADA K, NANBO A. The role of EBERS in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 461-7.
27. CHANG KL, CHEN YY, SHIBATA D, WEISS LM. Description of an *in situ* hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1992; 1: 246-55.
28. KASERER K, SCHMAUS J, BETHGE U, MIGSCHITZ B, FASCHING S, WALCH A ET AL. Staining patterns of p53 immunohistochemistry and their biological significance in colorectal cancer. *J Pathol* 2000; 190: 450-6.
29. ROSS JS, MCKENNA BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001; 19: 554-68.
30. IMAI S, KOIZUMI S, SUGIURA M, TOKUNAGA M, UEMURA Y, YAMAMOTO N ET AL. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9131-5.
31. LEVINE PH, STEMERMANN G, LENNETTE ET, HILDESHEIM A, SHIBATA D, NOMURA A. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1995; 60: 642-4.
32. SHINKURA R, YAMAMOTO N, KORIYAMA C, SHINMURA Y, EIZURU Y, TOKUNAGA M. Epstein-Barr virus specific antibodies in Epstein-Barr virus positive and negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol* 2000; 60: 411-6.
33. UEMURA Y, TOKUNAGA M, ARIKAWA J, YAMAMOTO N, HAMASAKI Y, TANAKA S ET AL. A unique morphology

- of Epstein-Barr virus related early gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 607-11.
34. YANAI H, NISHIKAWA J, MIZUGAKI Y, SHIMIZU N, TAKADA K, MATSUSAKI K ET AL. Endoscopic and pathologic features of Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma. *Gastrointest Endosc* 1997; 45: 236-42.
35. CORVALÁN A. Genética molecular del cáncer gástrico. In: Csendes A, ed. *Actualizaciones en cáncer gástrico*. Santiago: Editorial Mediterráneo (en prensa).
36. HAINAUT P, HOLLSTEIN M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 81-137.
37. GABBERT H, MULLER W, SCHNEIDER A, MEIER S, HOMMEL G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 720-6.
38. OJIMA H, FUKUDA T, NAKAJIMA T, NAGAMACHI Y. Infrequent overexpression of p53 protein in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 262-6.
39. LEUNG SY, CHAU KY, YUEN ST, CHU KM, BRANICKI FJ, CHUNG LP. p53 overexpression is different in Epstein-Barr virus associated and Epstein-Barr virus negative carcinoma. *Histopathology* 1998; 33: 311-7.
40. YONEMURA Y, NINOMIYA I, YAMAGUCHI A, FUSHIDA S, KIMURA H, OHYAMA S ET AL. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 1034-8.
41. VAN BEEK J, ZUR HAUSEN A, KLEIN KRANENBARG E, VAN DE VELDE CJH, MIDDELDORP JM, VAN DEN BRULE AJC ET AL. EBV-Positive Gastric Adenocarcinomas: A Distinct Clinicopathologic Entity With a Low Frequency of Lymph Node Involvement. *J Clin Oncol* 2004; 22: 664-70.
42. KORIYAMA C, AKIBA S, ITOH T, KIJIMA Y, SUEYOSHI K, CORVALÁN A ET AL. Prognostic significance of Epstein-Barr virus involvement in gastric carcinoma in Japan. *Int J Mol Med* 2002; 10: 635-9.