

Hubungan Imunoekspresi *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) dengan Stadium Dukes pada Karsinoma Kolorektal

Fenny Ariyanni, Sri Suryanti, Abdul Hadi Hassan, Bethy S. Hernowo

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran
Bandung

ABSTRAK

Latar belakang

Epidermal growth factor receptor (EGFR) berperan dalam patogenesis dan progresivitas karsinoma kolorektal. Stadium Dukes menunjukkan luas penyebaran tumor dan digunakan sebagai pedoman terapi. Pada stadium Dukes A tumor masih terbatas pada tunika submukosa, stadium Dukes B tumor sudah menembus tunika muskularis dan stadium Dukes C sudah bermetastasis ke kelenjar getah bening. Penggunaan kemoterapi adjuvan pada stadium Dukes B masih kontroversi sehingga hanya diberikan pada stadium Dukes B yang *high risk*. Diperlukan penanda molekuler yang dapat menunjukkan tumor yang agresif. Pada penelitian ini akan diteliti hubungan imunoekspresi EGFR dengan stadium Dukes pada karsinoma kolorektal. EGFR diharapkan dapat digunakan menjadi penanda karsinoma kolorektal yang agresif.

Metode

Pewarnaan imunohistokimia EGFR dilakukan terhadap 45 blok parafin karsinoma kolorektal yang dilakukan kolektomi (masing-masing stadium Dukes A, B, C 15 kasus). Hasilnya dihubungkan dengan stadium Dukes.

Hasil

Pada stadium Dukes A sebanyak 2 kasus (13%) menunjukkan imunoekspresi positif dan stadium Dukes B sebanyak 8 kasus (53%) menunjukkan imunoekspresi positif dan pada stadium Dukes C sebanyak 11 kasus (73%) menunjukkan imunoekspresi positif. Imunoekspresi EGFR secara statistik ($p=0.004$, uji Chi-Square) lebih sering ditemukan pada stadium Dukes C. EGFR berperan penting dalam diferensiasi dan proliferasi sel. Pada sel normal pengaktifan sinyal EGFR menyebabkan proliferasi sel, migrasi, metastasis, penghindaran apoptosis dan angiogenesis.

Kesimpulan

Imunoekspresi EGFR lebih sering ditemukan pada stadium Dukes C dibanding Dukes A dan B.

Kata kunci: EGFR, imunoekspresi, karsinoma kolorektal, stadium Dukes.

ABSTRACT

Background

Epidermal growth factor receptor immunoexpression may clarify the effects of the pathogenesis and determine the prognosis of colorectal carcinoma (CRC). Dukes' stage explained the extension of the tumor. Dukes' stage A was defined as malignant tumour in which growth extends into the submucosa, but not into the muscle coat; Dukes' stage B was defined as the tumour growth extends into the muscle coat; and Dukes' stage C was defined as the presence of lymph node metastases. Adjuvant chemotherapy in Dukes' stage B is controversial, which only given to high-risk Dukes' stage B. Hence, we need to identify high-risk Dukes' stage B. This research will study association EGFR clone H11 and CRC Dukes' stage.

Methods

Immunohistochemistry was performed in paraffin-embedded specimens of 45 cases colorectal carcinoma (each Dukes' stage A, B, C was 15 cases) for the assesment of clone H11 EGFR expression. The results were correlated with colorectal carcinoma Dukes' stage.

Results

At Dukes' stage A there were 2 cases (13%) showed positive immunoexpression and Dukes' stage B there were 8 cases (53%) showed positive immunoexpression and Dukes' stage C there were 11 cases (73%) showed positive immunoexpression. clone H11. EGFR clone H11 immunoexpression ($p=0.004$, Chi-Square test) was significantly more frequent in Dukes' stage C. EGFR play an important role in cell differentiation and proliferation. The activation of EGFR signaling would lead to cell proliferation, migration, metastasis, evasion of apoptosis or angiogenesis.

Conclusion

EGFR immunoexpression was more frequent in colorectal carcinoma Dukes' stage C explain clearly that EGFR play important role in pathogenesis colorectal carcinoma.

Key words: colorectal carcinoma, Dukes' stage, EGFR, immunoexpression.

PENDAHULUAN

Karsinoma kolorektal adalah tumor ganas epitel kolon atau rektum.¹ Karsinoma kolorektal merupakan keganasan tersering urutan ketiga pada pria dan urutan kedua pada wanita.² Konsensus Asia Pasifik melaporkan adanya peningkatan insidensi karsinoma kolorektal di Asia selama 2 dekade ini.³

Stadium karsinoma kolorektal memberikan informasi tentang luasnya penyebaran tumor, menentukan prognosis dan dapat dipergunakan sebagai panduan penatalaksanaan serta menilai respon terapi.^{4,5} Pada stadium Dukes A tumor masih terbatas pada tunika submukosa, stadium Dukes B tumor sudah menembus tunika muskularis dan stadium Dukes C sudah bermetastasis ke kelenjar getah bening.⁶ Karsinoma kolorektal stadium Dukes B meliputi berbagai macam tumor. Sebagian hanya mengenai tunika muskularis dan sementara yang lain sudah menunjukkan penyebaran yang luas tetapi belum bermetastasis ke kelenjar getah bening. Hal ini akan memiliki efek yang besar terhadap prognosis dan sebagian dari karsinoma kolorektal stadium Dukes B tersebut perlu diberikan kemoterapi adjuvan.⁵ Selain itu tingkat kesintasan pada sebagian karsinoma kolorektal stadium Dukes B mencapai 70-80% setelah 5 tahun pemembedahan, pada karsinoma kolorektal stadium Dukes B yang berisiko tinggi memiliki *clinical outcome* yang sama dengan penderita karsinoma kolorektal stadium III (Dukes C).⁷ Penanda molekuler diharapkan dapat menjadi parameter yang lebih baik sebagai panduan penatalaksanaan penderita karsinoma kolorektal dibandingkan dengan kriteria klinis dan histopatologi.^{8,9} *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) diharapkan dapat digunakan sebagai penanda molekular karsinoma kolorektal yang agresif khususnya pada stadium Dukes B dapat EGFR diharapkan dapat dipakai menjadi panduan untuk pemberian kemoterapi adjuvan.

EGFR merupakan reseptor tirosin kinase transmembran seberat 170-kDa masuk dalam famili reseptor membran sel ErbB. Pada sel normal, sinyal EGFR dimulai dengan adanya pengaktifan ligan dan akan mengaktifkan jalur sinyal transduksi multiple; yaitu: jalur MAPK dan jalur *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) protein kinase B (AKT). Jalur-jalur tersebut menyebabkan pengaktifan berbagai faktor transkripsi yang akan berdampak pada respon selular seperti

proliferasi, migrasi, apoptosis.¹⁰⁻¹² Ekspresi protein EGFR dapat dideteksi melalui pemeriksaan imunohistokimia, berhubungan dengan progresivitas tumor dan tingkat *survival* yang buruk pada berbagai keganasan.¹³ EGFR dilaporkan dapat memberikan ekspresi berlebih pada 25-82% karsinoma kolorektal, beberapa laporan penelitian melaporkan ekspresi protein berlebih (didefinisikan sebagai 2+ dan/atau 3+ atau pada >50% sel tumor) terjadi pada 35-49% kasus, tetapi signifikasi klinis ekspresi berlebih EGFR pada karsinoma kolon belum jelas.^{11,14} Berbagai macam ekspresi EGFR pada karsinoma kolorektal telah dilaporkan pada literatur baik dalam interpretasi pulasan dan standar metode pulasan pelaporan EGFR dan antibodi yang dipakai masih kontroversi.^{11,15-17} Penelitian ini bertujuan meneliti hubungan antara imunoekspresi EGFR *clone* H11 dengan stadium Dukes pada karsinoma kolorektal.

METODE PENELITIAN**Sampel penelitian**

Empat puluh lima buah blok parafin dari penderita karsinoma kolon atau rektum stadium Dukes A, B, dan C masing-masing 15 kasus, berasal dari operasi kolektomi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran tahun 2011-2012 dipilih sebagai sampel penelitian ini. *Informed consent* didapatkan dari penderita diwakili (oleh Kepala Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung).

Pewarnaan Imunohistokimia EGFR

Seluruh sediaan *Hematoxylin Eosin* diperiksa kembali dan dilakukan penilaian stadium Dukes dan dipilih blok parafin massa tumor yang representatif, dilakukan pemotongan serial blok parafin 4 µm dan ditempel pada kaca objek yang sudah dilakukan *coating* dan dipulas dengan antibodi EGFR *clone* H11 (Dako) dengan teknik pulasan imunohistokimia *labeled streptavidin/streptavidin-biotin* (LSAB).

Antibodi monoklonal EGFR *clone* H11 dapat mendeteksi EGFR dengan berat molekul 170-kDa.^{16,18} Antibodi tersebut dipakai dalam laboratorium untuk mengidentifikasi EGFR baik pada sel normal maupun sel neoplasma.¹⁸ Setelah dilakukan deparafinasi dan dehidrasi, dilakukan proses *antigen retrieval* menggunakan enzim *carezyme III pronase kit* (PRT 957 Kh)

dengan pengenceran 1:4 diinkubasi selama 15 menit, kemudian dibilas PBS secara sekuenzial, ditetesi *blocking serum* dibilas PBS dan diteteskan *mouse monoclonal antihuman EGFR (clone H11)* dari DAKO dengan pengenceran 1:200 dilakukan inkubasi selama 1 jam, dibilas PBS diberi antibodi sekunder *Trekkie universal link (Biocare Medical)*, dibilas PBS, dilabel *TrekAvidin HRP*, ditetes larutan kromogen Betazoid DAB, dicuci air mengalir, dilakukan *counterstain* dengan *hematoxylin Mayer*.

Penilaian Imunoekspresso EGFR

Sediaan imunohistokimia diperiksa menggunakan mikroskop cahaya oleh 4 peneliti. Variasi penilaian diatas dengan menilai ulang secara bersama. Imunoekspresso EGFR dilihat berdasarkan terpulasnya membran sel dan sedikit sitoplasma di daerah dekat membran sel menjadi berwarna coklat. Tumor dikatakan positif bila membran sel tumor dan sedikit sitoplasma di daerah membran sel berwarna coklat. Kontrol positif adalah karsinoma sel skuamous paru. Kontrol negatif yang digunakan adalah sentrum germinal tonsil.¹⁹

Imunoekspresso dinilai menggunakan analisis semikuantitatif berdasarkan kriteria Splinder dkk. Penilaian intensitas pewarnaan diberi skor 0=negatif, 1=lemah, 2=sedang dan 3=kuat; (Gambar 1). Distribusi sel yang positif dinilai dengan pembagian skor 0=0% dari massa tumor, 1=1-10%, 2=11-25%, 3=26-50% dan 4=>50%. Untuk penilaian akhir berupa skor yang dinilai skor distribusi dikalikan dengan skor intensitas.²⁰ Skor tersebut dikelompokkan menjadi: kelompok negatif untuk skor 0, dan kelompok positif untuk skor 1-12.

Analisis Statistik

Data penelitian berupa data kategorik tidak berpasangan, analisis bivariabel yang digunakan uji *Chi-square* dengan $p=0,05$ menggunakan program SPSS versi 20.

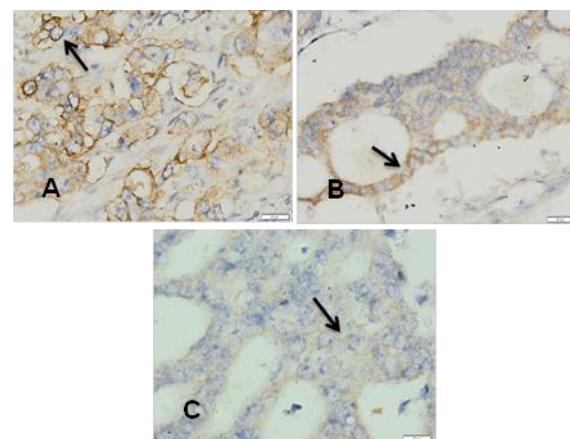
HASIL

Selama periode 1 Januari 2011-31 Desember 2012 didapatkan sebanyak 63 kasus karsinoma kolorektal dan dipilih 45 kasus yang memenuhi kriteria inklusi sehingga masing-masing terdiri dari 15 kasus stadium Dukes A, B, dan C. Karakteristik pasien yang kasus karsinoma kolorektal disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kasus karsinoma kolorektal selama 1 Januari 2011 sampai 31 Desember 2012 di Laboratorium Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-RSUP. Dr. Hasan Sadikin, Bandung.

Karakteristik	n	%
Usia		
Rerata ± SD : 52,7 ± 12,8 tahun		
Jenis Kelamin		
Laki-laki	25	56
Perempuan	20	44
Varian histopatologi		
Adenokarsinoma	34	76
Adenokarsinoma berdegenerasi musin	1	2
Musinosis adenokarsinoma	9	20
Signet-ring cell carcinoma	1	2
Derajat diferensiasi histopatologi		
Baik	24	53
Sedang	9	20
Buruk	1	2
Tidak dinilai	11	25
Total subjek penelitian (Σ)	45	100

Dari tabel tersebut ditunjukkan bahwa usia rerata adalah 52,7 tahun (Standar Deviasi (SD)=12,8 tahun). Jenis kelamin laki-laki sebanyak 25 kasus (56%) dan perempuan 20 kasus (44%). Variasi histopatologi *adenocarcinoma* menempati frekuensi terbanyak sebanyak 34 kasus (76%). Derajat diferensiasi histopatologi baik merupakan kasus yang paling banyak yaitu sebanyak 24 kasus (53%).



Gambar 1. Pulasan imunoekspresso EGFR clone H11. A. Intensitas kuat; B. Intensitas sedang; C. Intensitas lemah. Tanda panah menunjukkan membran sel tumor yang berwarna coklat sesuai intensitas pewarnaan (pembesaran 400x).

Imunoekspresso EGFR *clone H11* pada penelitian ini dinilai dari terpulasnya membran sel menjadi berwarna coklat setelah diberikan

antibodi primernya. Hasil pulasan imunohistokimia EGFR *clone* H11 pada penelitian ini 21 kasus (47%) memberikan imunoekspresi EGFR *clone* H11 positif (imunoreaktif) dan 24 kasus (53%) tidak reaktif seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil imunoekspresi EGFR *clone* H11 berdasarkan Stadium Dukes karsinoma kolorektal.

Imunoeks- presi	Stadium			Total (%)
	Dukes A n (%)	Dukes B n (%)	Dukes C n (%)	
EGFR <i>clone</i> H11				
Positif	2 (13)	8 (53)	11 (73)	21 (47)
Negatif	13 (87)	7 (47)	4 (27)	24 (53)
Total	15 (100)	15 (100)	15 (100)	45 (100)

p=0,004*

Keterangan: *signifikan ($p<0,05$) dengan uji Chi-Square
OR Dukes C = 17,88 (2,15-196,97) → bermakna.

Stadium Dukes A dan stadium Dukes B paling banyak memberikan hasil tidak reaktif terhadap antibodi EGFR *clone* H11 yaitu sebanyak 13 kasus (87%) dan 7 kasus (47%). Pada stadium Dukes C sebanyak 11 kasus (73%) memberikan hasil positif lemah sampai positif kuat terhadap antibodi EGFR *clone* H11.

Hasil analisis statistik menggunakan uji Chi-Square menunjukkan terdapat hubungan antara hasil imunoekspresi EGFR *clone* H11 dengan stadium Dukes pada karsinoma kolorektal $p=0,004$ yang artinya hasil imunoekspresi EGFR *clone* H11 positif lemah sampai positif kuat lebih banyak ditemukan pada stadium Dukes C.

DISKUSI

Karsinoma kolorektal merupakan keganasan pada pria dan wanita urutan ketiga terbanyak di dunia dan penyebab kematian kedua terbanyak di Amerika Serikat.^{2,21} Di Indonesia dari berbagai laporan terdapat kenaikan jumlah kasus tetapi belum ada angka yang pasti berapa insiden karsinoma kolorektal.³ Kasus karsinoma kolorektal berjenis kelamin laki-laki (25 kasus/56%) lebih banyak dibandingkan kasus karsinoma kolorektal berjenis kelamin perempuan (20 kasus/44%). Hal ini sesuai dengan angka insiden karsinoma kolorektal per 100.000 penduduk di Indonesia yang lebih banyak mengenai laki-laki, dengan insiden sebagai berikut: 19,1 untuk laki-laki dan 15,6 untuk perempuan seperti penelitian epidemiologi karsinoma kolorektal di Indonesia yang dilakukan oleh Abdullah dkk. pada tahun 2012.²²

Hasil pemeriksaan imunohistokimia EGFR *clone* H11 pada penelitian ini menunjukkan frekuensi imunoekspresi EGFR *clone* H11 sebanyak 21 kasus (47%). Frekuensi ekspresi berlebih EGFR ini mirip dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hans dkk yang menggunakan pemeriksaan imunohistokimia EGFR dengan antibodi monoklonal *clone* H11 dan antibodi PharmDx (*clone* 2-18C9) pada 52 kasus penderita yang telah diterapi dengan usia median 53,5 tahun. Hasil penelitian Hans dkk. adalah sebagai berikut: dari 27 penderita dengan hasil pemeriksaan imunohistokimia EGFR yang dapat dievaluasi; 12 penderita (44,4%) yang menggunakan antibodi *clone* H11 memberikan hasil positif dan 26 penderita 96,3% memberikan hasil positif menggunakan *the PharmDx kit*.²³

EGFR merupakan *biomarker* kanker yang paling banyak diteliti dan sudah tersedia terapi targetnya pada terapi kanker.¹⁶ Ekspresi EGFR ditentukan melalui pemeriksaan imunohistokimia dan sangat bergantung pada tipe antibodi, protokol dan sistem skor dan *cutoffs* yang digunakan.^{11,16}

Hasil pemeriksaan imunohistokimia EGFR penelitian ini menunjukkan adanya hubungan antara imunoekspresi EGFR dengan stadium Dukes pada karsinoma kolorektal dengan $p=0,004$. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mokhtari dkk. yang meneliti hubungan imunoekspresi EGFR dengan status metastasis ke kelenjar getah bening dan gradasi histopatologi pada karsinoma kolorektal.²⁴

Pada beberapa laporan yang dikutip oleh Spano dkk. disebutkan bahwa imunoekspresi EGFR berhubungan dengan penyakit bersifat lebih agresif, meningkatkan risiko metastasis, stadium tumor yang tinggi dan tingkat metastasis ke kelenjar getah bening mesenterium yang lebih tinggi.²⁵ Spano dkk dalam penelitiannya tentang dampak imunoekspresi EGFR terhadap prognosis dan kesintasan penderita karsinoma kolorektal mendapatkan adanya hubungan antara imunoekspresi EGFR dengan stadium tumor berdasarkan sistem *Tumor Node and Metastasis* (TNM) tetapi tidak mendapatkan hubungan antara imunoekspresi EGFR dengan prognosis yang lebih buruk atau *overall survival* yang lebih pendek, sehingga walaupun EGFR masih merupakan faktor prognosis yang kontroversial

tetapi imunoekspresi EGFR tetap berperan penting dalam memutuskan pemberian terapi adjuvan.²⁵ Terdapat beberapa perbedaan penelitian Spano dkk. dengan penelitian ini yaitu: antibodi yang digunakan adalah antibodi monoklonal EGFR/113 dari Novocastra dan skor interpretasi yang berbeda pula.

Prognosis karsinoma kolorektal sangat bergantung pada stadium. Pengelompokan stadium dapat memprediksi prognosis dan membantu dalam pemilihan terapi. Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa imunoekspresi EGFR *clone* H11 banyak ditemukan pada karsinoma kolorektal stadium Dukes C dan dari analisis statistik didapatkan hubungan yang bermakna antara imunoekspresi EGFR *clone* H11 dengan stadium Dukes C karsinoma kolorektal ($p=0,04$); sehingga berdasarkan hasil penelitian ini pada karsinoma kolorektal khususnya dengan stadium Dukes B dan memiliki hasil pemeriksaan imunoekspresi EGFR *clone* H11 yang positif dianjurkan diberikan kemoterapi.

Hasil penelitian ini sesuai dengan teori patogenesis, sebagai berikut: pada sel normal, rangkaian sinyal EGFR akan dimulai dengan adanya pengaktifan ligan EGFR, ligan tersebut akan membentuk homodimer dan heterodimer yang menyebabkan pengaktifan tirozin kinase. Residu tirozin kinase intraseluler tersebut akan mengalami otofotifikasi dan menginduksi jalur-jalur sinyal transduksi. Jalur sinyal transduksi utama yang diaktifkan oleh EGFR adalah jalur MAPK dan jalur PI3K (AKT). Jalur tersebut akan berdampak pada respon selular yaitu proliferasi, migrasi, dan apoptosis.¹¹ Imunoekspresi EGFR positif menunjukkan adanya reseptor EGFR yang berlebih yang akan mengaktifkan jalur di bawahnya dan berdampak pada respon seluler. Imunoekspresi EGFR positif ditemukan lebih banyak pada stadium Dukes B dan Dukes C adanya menunjukkan respon seluler berupa migrasi sel yang tinggi.

Pada awalnya pemberian terapi anti-EGFR didasarkan pada pemeriksaan imuno-histokimia EGFR, tetapi hanya beberapa kelompok kecil karsinoma kolorektal bermetastasis yang berespon terhadap terapi anti-EGFR. Mutasi KRAS, BRAF dan PIK3CA merupakan faktor prediksi terhadap pemberian terapi target EGFR dengan respon yang rendah/tidak berespon.²⁶

KESIMPULAN

Imunoekspresi EGFR lebih sering ditemukan pada stadium Dukes C dibanding Dukes A dan B.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hamilton SR, Bosman F, Boffeta P. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N, editors. World Health Organization classification of tumours pathology and genetics of tumours of the digestive system. 4 ed. Lyon: IARC Press; 2010.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010; 127: 2893-917.
3. Sung JJ, Lau JY, Young GP, Sano Y, Chiu HM, Byeon JS, et al. Asia Pacific consensus recommendations for colorectal cancer screening. Gut. 2008; 57: 1166-76.
4. Haq AI, Schneeweiss J, Kalsi V, Arya M. The Dukes staging system: a cornerstone in the clinical management of colorectal cancer. Lancet Oncol. 2009;10:1128.
5. Morris EJ, Maughan NJ, Forman D, Quirke P. Who to treat with adjuvant therapy in Dukes B/stage II colorectal cancer? The need for high quality pathology. Gut. 2007; 56: 1419-25.
6. Wu JS. Rectal cancer staging. Clin Colon Rectal Surg. 2007; 20: 148-57.
7. Johnston PG. Stage II colorectal cancer: to treat or not to treat. Oncologist. 2005; 10: 332-4.
8. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyri A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, et al. Clinicopathologic significance of EGFR and HER-2/neu in colorectal adenocarcinomas. Cancer J. 2006; 12: 229-36.
9. De Hertogh G, Geboes KP. Practical and molecular evaluation of colorectal cancer: new roles for the pathologist in the era of targeted therapy. Arch Pathol Lab Med. 2010; 134: 853-63.
10. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006; 7: 505-16.
11. Krasinskas AM. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. Pathol Res Int. 2011; 2011: 1-6.

12. Bibeau F, Boissiere-Michot F, Sabourin JC, Gourgou-Bourgade S, Radal M, Penault-Llorca F, et al. Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray. *Virch Arch Int J Path.* 2006; 449: 281-7.
13. Chang SS, Califano J. Current status of biomarkers in head and neck cancer. *J Surg Oncol.* 2008; 97: 640-3.
14. Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol.* 2005; 16: 189-94.
15. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *JNCI.* 2009; 101: 1308-24.
16. Anagnostou VK, Welsh AW, Giltnane JM, Siddiqui S, Liceaga C, Gustavson M, et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research. Am Soc Prev Oncol.* 2010; 19: 982-91.
17. Penault-Llorca F, Cayre A, Arnould L, Bibeau F, Bralet MP, Rochaix P, et al. Is there an immunohistochemical technique definitively valid in epidermal growth factor receptor assessment? *Oncol reports.* 2006; 16: 1173-9.
18. Monoclonal Mouse Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Clone H11. In: Dako, editor.
19. Azevedo MA, Souza BD, Mader AMAA, Martins LC, Waisberg J. Immunohistochemical expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal carcinoma: relation with clinicopathological parameters. *Rev Bras Coloproct.* 2011; 31: 5-232.
20. Spindler KL, Pallisgaard N, Lindebjerg J, Frifeldt SK, Jakobsen A. EGFR related mutational status and association to clinical outcome of third-line cetuximab-irinotecan in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2011; 11: 107.
21. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013; 63: 11-30.
22. Abdullah M, Sudoyo AW, Utomo AR, Fauzi A, Rani AA. Molecular profile of colorectal cancer in Indonesia: is there another pathway? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2012; 5 : 71-8.
23. Han HS, Chang HJ, Hong YS, Kim SY, Lee KS, Jung KH. Epidermal growth factor receptor expression discrepancies in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan-based chemotherapy refractory to irinotecan and oxaliplatin. *Dis Colon Rectum.* 2009;52:1144-51; discussion 52-3.
24. Mokhtari M, Ardestani MM, Movahedipour M. An immunohistochemical study of EGFR expression in colorectal cancer and its correlation with lymph nodes status and tumor grade. *JRMS.* 2012: 741-4.
25. Spano JP, Lagorce C, Atlan D, Milano G, Domont J, Benamouzig R, et al. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann Oncol.* 2005; 16: 102-8.
26. Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Disc Med.* 2012; 14: 207-14.