

Ekspresi *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* dan *Ki-67* pada Astroositoma

Fitriana, Dyah Fauziah

Departemen Patologi Anatomi^k, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
RSUD Dr. Soetomo
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Insiden astroositoma di RSUD Dr. Soetomo Surabaya meningkat dalam tiga tahun terakhir. Keterlibatan berbagai *growth factor* dan reseptornya serta penanda proliferasi dalam patogenesis molekuler neoplasma *astrocytic* banyak diteliti secara ekstensif. *Epidermal growth factor receptor (EGFR)* dan *Ki-67* terlibat dalam transduksi sinyal mitogenik dan jalur proliferasi sel. Tujuan penelitian ini menganalisis ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada astroositoma derajat II, III, dan IV, serta menganalisis korelasi antara ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada derajat histopatologi astroositoma.

Metode

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*. Sampel dibagi dalam; 6 astroositoma derajat II, 7 astroositoma derajat III, and 13 astroositoma derajat IV yang telah didiagnosis selama periode 2009-2013. Sampel dilakukan pulasan immunohistokimia dengan antibodi monoklonal EGFR dan *Ki-67*. Perbedaan ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada berbagai derajat astroositoma dianalisa menggunakan uji Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada astroositoma dianalisa menggunakan uji Spearman.

Hasil

Hasil analisa statistik ekspresi EGFR pada astroositoma derajat II, III, dan IV menunjukkan perbedaan bermakna (nilai $p \leq 0,05$). Hasil analisa statistik ekspresi *Ki-67* pada astroositoma derajat II, III, dan IV menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Hasil analisa statistik ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada astroositoma menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Kesimpulan

Ekspresi EGFR dan *Ki-67* dapat digunakan untuk membedakan diagnostik dan prediktif pada derajat histopatologi astroositoma. Ekspresi EGFR dan *Ki-67* pada astroositoma menunjukkan korelasi.

Kata kunci : astroositoma, EGFR dan *Ki-67*.

ABSTRACT

Background

The incident of astrocytoma in Dr. Soetomo General Hospital Surabaya have been increased for the last three years. The involvement of various growth factors, growth factor receptors and proliferative markers in the molecular pathogenesis of astrocytic neoplasms are being studied extensively. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and *Ki-67* is involved in mitogenic signal transduction and cell proliferation pathways. This study was to analyze expression of EGFR and *Ki-67* in grade II, III, and IV astrocytomas, as well as analyzing the correlation between EGFR and *Ki-67* expressions with histopathological grading in astrocytoma.

Methods

Study design was cross sectional. Sample were divided into: 6 grade II, 7 grade III, and 13 grade IV astrocytoma were diagnosed in period between 2009-2013. Sample were stained with immunohistochemistry using monoclonal antibody of EGFR and *Ki-67*. The differences of EGFR and *Ki-67* expression on astrocytoma were analyzed by Kruskall-Wallis test. The correlation between EGFR and *Ki-67* expression were analyzed by Spearman test.

Results

Statistic analyses of EGFR expression on astrocytoma grade II, III, and IV showed significant differences ($p < 0,05$). Statistic analyses of *Ki-67* expression on astrocytoma grade II, III, and IV showed significant differences ($p < 0,05$). Statistic analyses of EGFR and *Ki-67* expression in astrocytoma ($p < 0,05$).

Conclusion

EGFR and *Ki-67* expression may play a role in distinguishing in diagnostic and predictive grading astrocytomas. Expression of EGFR and *Ki-67* in grading astrocytomas showed correlation.

Key words : astrocytoma, EGFR and *Ki-67*.

PENDAHULUAN

Astrositoma adalah tumor yang sering terdapat pada sistem saraf pusat (SSP). Tumor astrositik ini berbeda-beda dalam hal lokasi, distribusi umur dan jenis kelamin, potensi pertumbuhan, tingkat invasi, gambaran morfologi, kecenderungan progresif dan perjalanan klinis. Perbedaan ini dapat mencerminkan jenis dan urutan perubahan genetik yang diperoleh selama proses transformasi.¹⁻³

Astrositoma diklasifikasikan dalam empat tipe histologi, yaitu: *pilocytic astrocytoma* (derajat I), *diffuse fibrillary astrocytoma* (derajat II), *anaplastic astrocytoma* (derajat III) dan *glioblastoma multiforme/GBM* (derajat IV). *Low grade* (derajat rendah) adalah derajat I, II, sedangkan *high grade* adalah derajat III dan IV. Derajat histopatologi menjadi salah satu indikator prognosis yang paling penting. Derajat II-IV dapat diamati sebagai rangkaian untuk mengukur peningkatan derajat keganasan.⁴

Salah satu perubahan dasar pada sel kanker adalah adanya proliferasi sel yang tidak terkendali. Adanya aktivasi reseptor faktor pertumbuhan (*growth factor receptor*) merupakan salah satu tahap dalam proliferasi sel.⁵ *Epidermal growth factor receptor* (EGFR) memegang peranan penting pada regulasi pertumbuhan sel, diferensiasi, siklus sel, dan tumorigenesis. Pada astrositoma terapi yang ada belum memuaskan. Pengetahuan tentang mekanisme tumorigenesis sangatlah diperlukan untuk memahami perilaku tumor ini. Peran EGFR pada astrositoma sebagai faktor prognostik dan prediktif masih dalam perdebatan.^{4,6,7}

Ki-67 sebagai *marker* proliferasi sel bisa digunakan untuk prognostik dan diagnostik. Nilai *cut-off* Ki-67 pada astrositoma bervariasi antara satu literatur dengan literatur lainnya, tetapi Ki-67>10% dapat merupakan petunjuk adanya indikasi potensial keganasan pada tumor astrositik.^{8,9}

Penelitian ini bertujuan menganalisis ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma derajat II, III dan IV, serta menganalisa korelasi ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma sehingga dapat digunakan sebagai *marker* prognostik, prediktif sekaligus pendukung diagnostik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini bersifat observasional analitik dengan desain *cross sectional*, dilakukan di Departemen/SMF/Instalasi Patologi Anatomik

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo dengan menggunakan blok parafin astrositoma derajat II, III dan IV mulai 1 Januari 2009-31 Juni 2013. Sediaan hematoksilin dan eosin dibaca ulang dan dari blok parafin yang mengandung cukup sel tumor dibuat sediaan dengan pulasan antibodi monoklonal EGFR untuk mouse klon E30 (Dako, Japan), serta antobodi monoklonal Ki-67 untuk rabbit klon SP6 (Biocare, USA).

Ekspresi EGFR dinilai secara visual dengan mikroskop cahaya binokular dan dibuat skor semikuantitatif berdasarkan jumlah sel yang terpulas dan intensitasnya pada membran sel dan sitoplasma: 0 (tidak terpulas), 1 (terpulas <20%, lemah-sedang), 2 (terpulas 20-50%, lemah-sedang atau <20%, kuat), 3 (>50%, lemah-sedang atau >20%, kuat). Sedangkan Ki-67 dinilai secara kuantitatif (persentase) berdasarkan jumlah inti sel yang terpulas pada area dengan intensitas tertinggi, paling sedikit 1000 inti sel tumor dengan menggunakan *ocular graticule*.

Perbedaan ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis. Hubungan antara ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma dianalisis menggunakan uji Spearman. Analisis statistik menggunakan perangkat lunak *statistical package for the social sciences* (SPSS).

HASIL

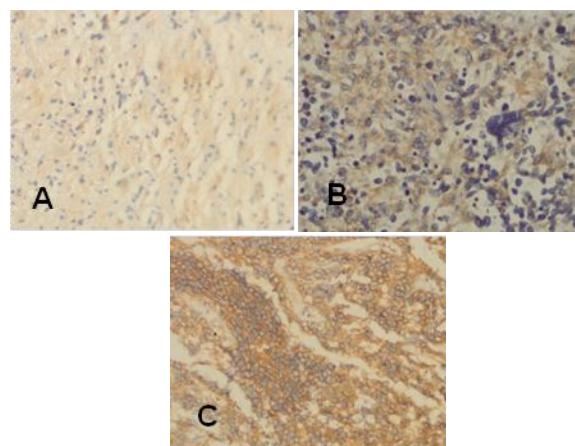
Selama periode 1 Januari 2009 sampai 31 Juni 2013 didapatkan 6 sampel astrositoma derajat II, 7 sampel astrositoma derajat III, dan 13 sampel astrositoma derajat IV. Karakteristik sampel penelitian tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian.

Karakteristik	Kategori	Frekuensi (%)
Usia	37,19±17,09	
	<20	4 (15,4%)
	21-40	12 (61,5%)
	41-60	8 (30,8%)
	>60	2 (7,7%)
Jenis kelamin	Laki-laki	14 (53,8%)
	Perempuan	12 (46,2%)
Lokasi tumor	Frontal	8 (30,8%)
	Temporal	3 (11,5%)
	Parietal	4 (15,4%)
	Frontotemporal	1 (3,8%)
	Temporoparietal	8 (30,8%)
	Parietooccipital	1 (3,8%)
	Frotoparietal	1 (3,8%)

Pada Tabel 1 dapat dilihat data usia yang diperoleh pada penelitian ini yang paling muda adalah 3 tahun dan yang paling tua 79 tahun, dengan rerata umur penderita pada kasus astrositoma $37,19 \pm 17,09$ tahun. Untuk memudahkan pengamatan, dilakukan pengelompokan umur menjadi 4 kelompok dengan rentang 20 tahunan. Usia penderita tumor astrositoma paling banyak berada pada rentang 21-40 tahun. Laki-laki sedikit mendominasi dibandingkan perempuan yaitu 14 sampel (53,8%). Lokasi tumor paling banyak pada regio frontal dan temporoparietal.

Pulasan EGFR dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Ekspresi EGFR terpulas positif pada membran dan atau sitoplasma sel tumor dengan menggunakan antibodi monoklonal EGFR. Skor 1 (A); Skor 2 (B); Skor 3 (C), pembesaran 200x.

Uji Kruskal-Wallis untuk menilai perbedaan ekspresi EGFR terhadap astrositoma mendapatkan perbedaan yang bermakna secara statistik (Tabel 2).

Tabel 2. Ekspresi EGFR pada astrositoma.

Derajat	n	Ekspresi EGFR (Skor)				p
		0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
II	6	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	0 (0)	
III	7	0 (0)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	0,015*
IV	13	1 (7,7)	1 (7,7)	3 (23,1)	8 (61,5)	

Keterangan: * bermakna pada $\alpha=0,05$

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat pada astrositoma derajat II skor EGFR terendah adalah 0 dan skor tertinggi adalah 2, sedangkan pada derajat III skor EGFR terendah adalah 1 dan skor tertinggi adalah skor 3. Sementara pada derajat IV skor EGFR terendah adalah 0

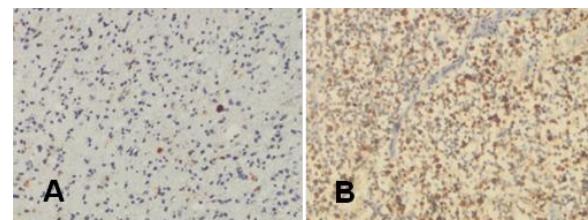
dan skor tertinggi adalah 3. Setelah dilakukan analisis statistik menggunakan Kruskal-Wallis, didapatkan hasil $p=0,015$, yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara ekspresi EGFR dengan derajat astrositoma, yaitu antara derajat II dan III serta II dan IV.

Tabel 3. Hasil statistik Mann-Whitney ekspresi EGFR pada tiap grade.

	Derajat II	Derajat III
Derajat II		
Derajat III	0,039	
Derajat IV	0,007	0,228

Analisis statistik dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui perbedaan ekspresi EGFR pada tiap derajat dapat dilihat pada Tabel 3. Didapatkan perbedaan yang bermakna antara astrositoma derajat II dan III serta antara astrositoma derajat II dan IV.

Ekspresi Ki-67 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Ekspresi Ki-67. Tampak terpulas positif pada inti sel tumor menggunakan antibodi monoklonal Ki-67. Ekspresi rendah (A); Ekspresi tinggi (B), pembesaran 200x.

Uji Kruskal-Wallis untuk menilai perbedaan ekspresi Ki-67 terhadap derajat astrositoma dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rerata, standar deviasi, nilai minimum dan maksimum serta nilai p dari ekspresi Ki-67 pada astrositoma.

Derajat	n	Ekspresi Ki-67 (%)		p
		$\bar{x} \pm SD$	Rentang	
II	6	$2,17 \pm 1,72$	0-5	
III	7	$20,71 \pm 13,67$	10-50	0,001*
IV	13	$30,08 \pm 21,14$	5-70	

Berdasarkan Tabel 4, didapatkan rerata ekspresi Ki-67 pada astrositoma derajat II adalah $2,17 \pm 1,72$, pada derajat III adalah $20,71 \pm 13,67$, sedangkan derajat IV $30,08 \pm 21,14$. Didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=0,001$) ekspresi Ki-67 pada derajat astrositoma.

Tabel 5. Hasil statistik Mann-Whitney ekspresi Ki-67 pada tiap grade.

	Derajat II	Derajat III
Derajat II		
Derajat III	0,002	
Derajat IV	0,001	0,277

Analisis statistik dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan ekspresi Ki-67 pada tiap derajat dapat dilihat pada tabel 5. Didapatkan perbedaan yang bermakna antara astrositoma derajat II dan III serta antara astrositoma derajat II dan IV.

Pada penelitian ini didapatkan nilai *cut off* Ki-67 untuk membedakan astrositoma derajat rendah dengan derajat tinggi, yaitu sebesar 7,5% dengan sensitivitas 95% dan spesifisitas 100%.

Korelasi Spearman, didapatkan hasil $r_s=0,629$ dengan nilai $p=0,001$, yang artinya terdapat korelasi positif yang bermakna antara ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma.

DISKUSI

Astrositoma termasuk dalam *glioma* dan terdiri dari beberapa derajat histopatologi. Astrositoma derajat I dan II disebut sebagai astrositoma derajat rendah, dan astrositoma derajat III dan IV disebut sebagai astrositoma derajat tinggi.¹⁰

EGFR adalah salah satu anggota keluarga *epidermal growth factor receptor* dari protein ligan ekstraseluler yang terletak pada membran sel yang berperan dalam jalur tirosin kinase. Puncak ekspresi EGFR berhubungan dengan gliogenesis pada embrio dan awal periode perinatal, menunjukkan peran penting perkembangan astrosit dan oligodendrosit. EGFR *signaling* berperan dalam mengontrol neurodegenerasi dengan meregulasi apoptosis *cortical astrocyte*.^{11,12}

EGFR mempunyai peranan penting dalam tumorigenesis dan biologi keganasan/kanker pada manusia. Pada beberapa tumor dapat ditemukan mutasi dan ekspresi berlebihan patologik reseptor faktor pertumbuhan. EGFR meningkat ekspresinya pada 80% karsinoma sel skuamos paru, 50% lebih pada glioblastoma, 80-100% tumor kepala leher, dan lebih sedikit pada karsinoma buli dan saluran pencernaan.⁴ Beberapa penelitian memperlihatkan overekspresi dari EGFR mempunyai hubungan bermakna terhadap derajat tumor yang tinggi. Meskipun menurut Hu *et al.* (2013), masih ada beberapa peneliti yang mengatakan bahwa

peran overekspresi EGFR pada glioma terhadap prognosis masih kontroversi. Ekspresi EGFR pada astrositoma telah menjadi perhatian ilmuwan dalam beberapa tahun ini karena berperan penting pada gliomagenesis dan potensial untuk aspek prognostik dan diagnostik.^{4,7}

Analisa statistik antara EGFR dan derajat astrositoma pada penelitian ini menunjukkan perbedaan yang bermakna. Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa antara astrositoma derajat II dan III serta antara derajat II dan IV terdapat perbedaan yang bermakna. Sedangkan antara astrositoma derajat III dan IV tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini serupa dengan penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa peningkatan frekuensi overekspresi EGFR seiring dengan peningkatan derajat tumor.^{3,4,7}

Pada astrositoma derajat rendah terdapat dua hal yang berperan dalam gliogenesis, yaitu adanya ligand PDGF dan ekspresi yang berlebihan serta hilangnya fungsi p53 oleh karena mutasi. PDGF memiliki peran yang penting pada gliogenesis, dengan efek utama pada perkembangan oligodendrosit. Mekanisme yang menyebabkan ekspresi berlebihan PDGF pada sebagian kasus masih belum terpecahkan. Salah satu kemungkinan bahwa aktivitas mutasi p53 pada overekspresi PDGF merangsang sel memasuki siklus premaligna. Overekspresi *growth factor* ini berhubungan dengan kemampuan proliferasi yang rendah pada glioma derajat rendah secara *in vivo*.^{11,13} Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang memperlihatkan ekspresi EGFR yang rendah pada astrositoma derajat rendah.

Mayoritas amplifikasi gen pada astrositoma derajat tinggi melibatkan EGFR. Amplifikasi ini melibatkan 50% GBM dan sedikit pada astrositoma anaplastik. Frekuensi amplifikasi yang rendah pada astrositoma anaplastik ini yang mendorong perubahan sel menjadi GBM.^{11,13}

Ki-67 merupakan metode imunohistokimia yang paling baik untuk mengukur proliferasi sel.^{8,14} Peneliti sebelumnya menunjukkan korelasi yang positif dengan peningkatan derajat dan prognosisnya buruk pada pasien glioma. Saat ini, Ki-67 sering digunakan untuk menentukan prognosis dan diagnosis tumor astrositik.^{8,14}

Pada penelitian ini rerata ekspresi Ki-67 lebih tinggi pada astrositoma derajat tinggi

dibandingkan dengan ekspresi Ki-67 pada astrositoma derajat rendah. Beberapa studi mengungkapkan adanya *overlap* nilai Ki-67 antara masing-masing derajat. Sebenarnya, nilai Ki-67 pada glioblastoma (derajat IV) dapat serendah derajat II. Hal ini mengindikasikan bahwa Ki-67 saja tidak dapat digunakan sendiri untuk menentukan diagnostik.^{8,14}

Uji analisis untuk ekspresi Ki-67 pada astrositoma menunjukkan hasil yang bermakna. Berdasarkan uji Mann-Whitney pada tabel 5 dapat dilihat bahwa antara astrositoma derajat II dan derajat III, serta antara derajat II dan IV terdapat perbedaan yang bermakna. Sedangkan antara astrositoma derajat III dan derajat IV tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu menunjukkan bahwa terjadi peningkatan Ki-67 seiring peningkatan derajat astrositoma.^{7,14}

Mayoritas *review* studi menunjukkan hubungan yang bermakna antara nilai Ki-67 dengan *survival* dan rekurensi, dengan merujuk pada nilai *cut off*. Pada penelitian ini didapatkan nilai *cut off* Ki-67 untuk membedakan astrositoma derajat rendah dan derajat tinggi yaitu sebesar 7,5% dengan sensitivitas 95% dan spesifisitas 100%. Nilai *cut off* besarnya bervariasi dari satu literatur dengan literatur yang lain, yaitu berkisar dari 1,5%-15,3%. Jadi, sulit untuk membandingkan literatur-literatur tersebut dan sulit untuk menarik kesimpulan yang jelas. Tetapi Ki-67 lebih dari 10% dapat menjadi nilai acuan yang mengindikasikan tumor astrositik meningkat potensi keganasannya.⁸ Namun pada penelitian ini diperoleh *cut off* yang lebih rendah dari yang pernah dilaporkan peneliti terdahulu.⁸

Nilai ekspresi Ki-67 yang bervariasi mungkin karena disebabkan oleh beberapa faktor, misalnya *tissue processing*, prosedur imunohistokimia, interpretasi dari imunostaining, heterogenitas tumor atau kesalahan pemilihan jaringan.⁸

Pada penelitian ini terbukti adanya korelasi positif ekspresi EGFR dengan Ki-67 pada derajat astrositoma. Peningkatan ekspresi EGFR seiring dengan peningkatan ekspresi Ki-67 dan seiring pula dengan peningkatan derajat. Hal yang sama ditunjukkan pada penelitian terdahulu (2013), di mana EGFR dan Ki-67 berkorelasi pada derajat histopatologi astrositoma.⁷

Proliferasi sel sendiri merupakan suatu proses yang kompleks, yang terdiri dari

beberapa tahap, mulai dari ikatan *growth factor* dengan reseptornya, aktivasi molekul sinyal transduksi di sitoplasma, aktivasi faktor transkripsi inti, sampai dengan masuknya sel dalam siklus sel dan diakhiri dengan pembelahan sel. Sehingga strategi sel kanker untuk mendapatkan *self-sufficiency* dalam sinyal pertumbuhan dapat dibagi berdasarkan, perannya dalam kaskade transduksi sinyal yang dimediasi oleh *growth factor*, dan regulasi siklus sel.¹⁵

KESIMPULAN

Ekspresi EGFR dan Ki-67 dapat digunakan untuk membedakan diagnostik dan prediktif pada derajat histopatologi astrositoma. Ekspresi EGFR dan Ki-67 pada astrositoma menunjukkan korelasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kajiwara Y, Fumiuki Y, Seiji H, Kaita Y, Hiroyuki Y, Kazuhiko S, et al. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer*. 2003; 97: 1077-83.
2. Mahzouni P, Fereshteh M, Kourosh M, Noushin AM, Ali C, Alireza M. Determining the relationship between microvessel density and different grades of astrocytoma based on immunohisto-chemistry for factor VIII-related antigen (von willebrand factor) expression in tumor microvessels. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010; 53: 606-10.
3. Maiti AK, Keya G, Uttara C, Sasanka C, Sandip C, Samik B. Epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in astrocytomas. *Neurol India* 2008; 56: 456-62.
4. Hagen KW, Sverre HT. Prognostic significance of EGFR gene amplification and overexpression in diffuse astrocytomas. *Open J Pathol*. 2012; 2: 71-80.
5. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Neoplasia. In Robbin and Cotran. *Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010.
6. Fukuoka M. Management of patient with locally advanced NSCLC. *CDK*. 2011;38(4).
7. Hu X, Wei M, Yuanjie Z, Wenbin Z, Yansong Z, Hongyi L. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. *Oncol Lett*. 2013; 6: 130-4.

8. Johannessen AN. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res.* 2006;12:143-7.
9. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, and Tan P. Immunohistochemical detection of Ki-67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol.* 2005; 18: 374-81.
10. Deimling AV, Burger PC, Nakazato Y, Ohgaki H, Kleihues P. Astrocytic tumours. In Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK ed. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC; 2007.
11. Makhin A, Islam S. Aspek biologi molekuler pada glioma. *Farmacia.* 2008; 7: 70-5.
12. Sibilia M, Renate K, Beate M, Lichtenberger, Anuradha N, manfred H, and Martin H. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *J Compil.* 2007; 75: 770-87.
13. Schiffer D. Astrocytic tumors 1. In: *Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls.* Netherland: Springer; 2006.
14. Chaloob MK, Hussam HA, Ban JQ, and Ahmed SM. Immunohistochemical expression of Ki-67, PCNA and CD34 in astrocytoma. *Oman Med J.* 2012;27:368-74.
15. Stricker TP, Kumar V. *Neoplasia. Robbin and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2010.