

Implementação da técnica *Silver In Situ Hybridization* para avaliação do status do gene *EGFR* em doentes com CPNPC

S Reis¹, H Scigliano², P Teixeira³ & R A Silva⁴

^{1,2,4} Centro de Investigação em Saúde e Ambiente; Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto (CISA-ESTSP), Instituto Politécnico do Porto, Vila Nova de Gaia, Portugal

^{1,3} Serviço de Anatomia Patológica; Centro Hospitalar de Coimbra-Hospital dos Covões, Coimbra, Portugal

¹ sandra.14.06@hotmail.com, ² hms@estsp.ipp.pt, ³ paulocmiranda239@clix.pt, ⁴ ras@eu.ipp.pt

RESUMO

Avaliação do estado do gene Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), por Silver In Situ Hybridization (SISH), tem-se destacado como biomarcador preditivo na resposta à terapêutica. O principal objectivo foi otimizar a etapa de recuperação por calor da metodologia automatizada SISH Dual-Colour, em carcinomas pulmonares fixados em formol durante 24 e 72 horas. A optimização levou a um aumento da preservação do contorno nuclear e da intensidade e contraste dos sinais para os dois tempos de fixação, permitindo avaliar o estado do EGFR em 83,3% dos casos em estudo. A SISH Dual-Colour é uma alternativa para avaliar o estado do EGFR.

Palavras-Chave: Carcinoma Pulmonar de não pequenas células (CPNPC), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Silver In Situ Hybridization (SISH), amplificação, fixação.

ABSTRACT

Assessment of the status of the gene Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), by Silver in Situ Hybridization (SISH) has been highlighted as a predictive biomarker in the response to therapy. The main objective was to optimize the recovery stage of heat-automated methodology SISH Dual-Colour in lung carcinoma with 24 and 72 hours of formaldehyde fixation. The optimization led to an increase in the preservation of the nuclear contour, intensity and contrast of the signals for both fixation times, allowing evaluation of EGFR state in 83.3% of studied cases. The SISH Dual-Colour is an alternative to assess the status of EGFR.

Keywords: Non-small-cell Lung carcinoma (NSCLC), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Silver In Situ Hybridization (SISH), amplification, fixation.

1. INTRODUÇÃO

O cancro do Pulmão é a principal causa de morbilidade e mortalidade por neoplasia em todo o Mundo (Varela-Garcia 2009). Os doentes com Carcinoma Pulmonar de não pequenas células (CPNPC) apresentam um prognóstico reservado que está associado a uma baixa taxa de resposta à terapia *standard* (Yamamoto 2009), verificando-se, que somente 10 a 20% doentes apresentam uma resposta com um aumento da sobrevida média de 8 a 10 meses (Bonomi, 2010).

O desenvolvimento de estratégias para a selecção de pacientes, particularmente de técnicas de diagnóstico molecular, têm permitido otimizar o tratamento de pacientes com CPNPC e a aumentar a eficácia da terapia dirigida, particularmente para o gene Epidermal Growth factor Receptor (EGFR) (Varela-Garcia 2009). Uma revisão da literatura indica que a presença de mutações no gene EGFR pode aumentar a resposta ao tratamento (11% vs 4%), mas a amplificação deste gene confere uma resposta ainda maior (20% vs 2%), sendo um importante preditor da resposta à terapêutica (Chintala, 2010).

A *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) está descrita como a metodologia *gold standard* para o estudo da amplificação genómica, por ser uma técnica muito sensível (García-Caballero, 2010). Contudo, a FISH apresenta alguns inconvenientes no âmbito da anatomia patológica, principalmente, por não ser possível visualizar os achados genómicos no contexto morfológico (Nitta, 2008, Tubbs, 2002). Outras limitações, tal como, o elevado custo do equipamento utilizado (Nitta, 2008, Tubbs, 2002), a perda do sinal fluorescente ao longo do tempo, que inviabiliza o arquivo dos casos (Nitta, 2008, Gallegos, 2007), a dificuldade de estandardização dos sistemas de interpretação, tornando difícil o intercâmbio de resultados entre vários laboratórios (Gallegos, 2007), levaram ao desenvolvimento de novas metodologias para o estudo do estado genómico.

Um dos métodos alternativos ao FISH, que permite a avaliação do número de cópias genómicas com visualização simultânea da morfologia é a Silver *in situ* Hybridization (SISH). Esta técnica baseia-se no princípio da hibridação do DNA alvo com um sonda marcada (Nitta, 2008), sendo a detecção da hibridação realizada por um sistema enzimático metalográfico, que leva à produção de pontos pretos de prata metálica discretos que são visualizados ao microscópio de luz (Nitta, 2008). Este sinal/depósito preto (prata metálica) é gerado no sítio da reacção pela enzima Horseradish Peroxidase (HRP) na presença de acetato de prata, hidroquinona e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Nitta, 2008). Uma das principais desvantagens desta técnica, quando realizada em cortes histológicos, é a dificuldade na interpretação dos sinais, devido aos núcleos das células não estarem intactos e todos no mesmo plano. O desenvolvimento de um sistema Dual-Colour SISH red ISH, com uma sonda dirigida para o gene alvo e outra sonda dirigida para sequência específica da região centromérica do cromossoma onde está localizado o gene alvo, ajudou a ultrapassar a limitação da SISH. Através do sistema Dual-Color SISH red ISH é possível discriminar, microscopicamente, as células tumorais que estão em aneuploidia das células tumorais com núcleos não intactos ou sobrepostos, assim como diferenciar uma amplificação de uma pseudoamplificação génica, o que facilita a interpretação e, conseqüentemente, a rapidez de resultados mais precisos (García-Caballero, 2010, Nitta, 2008).

A automatização do sistema Dual-Color SISH red ISH para o gene EGFR e o cromossoma 7 (CHR 7) permite a avaliação do estado genómico do EGFR de uma forma reprodutível, isto é, garante que o teste seja realizado sempre da mesma maneira, reduzindo a variabilidade na execução da técnica (Nitta, 2008).

O sucesso desta técnica de hibridação deve ser garantido através do estabelecimento de critérios rigorosos principalmente no que concerne à fixação dos tecidos, preparação das sondas e reagentes e optimização da própria técnica (Powell, 2007).

O tempo de fixação dos tecidos em formol tamponado a 10% influencia fortemente a hibridação *in situ*; um tempo de fixação excessivo pode levar a uma alteração da conformação dos ácidos nucleicos, bem como a estes ficarem inacessíveis às sondas (Powell, 2007) devido à formação de pontes metilénicas inter- e intra-proteínas (Bancroft and Gamble, 2008).

O principal objectivo do presente trabalho foi optimizar um sistema automatizado de SISH Dual-Colour, para a detecção simultânea do gene EGFR e do CHR 7, em carcinomas pulmonares fixado em formol com tempos de fixação diferentes e avaliar o estado genómico do EFGR nos casos em estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Neste estudo foram utilizadas 30 amostras de neoplasias pulmonares provenientes de peças cirúrgicas pulmonares e de biópsia de doentes, do Centro Hospitalar de Coimbra (CHC), EPE, com diagnóstico prévio de CPNPC. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e divididas em dois grupos equitativos segundo o tempo de fixação: 15 amostras foram fixadas durante 24 horas, sendo as restantes fixadas durante 72 horas. Após o processamento automático (Leica TP 1050) e inclusão das amostras em parafina, foram realizados três cortes histológicos com 3µm de espessura de cada bloco: dois cortes foram estendidos em lâminas carregadas electrostaticamente (Superfrost Plus; Thermo Scientific, Braunschweig) para efectuar a técnica de hibridação *in situ*, e o outro foi estendido numa lâmina normal para realizar a coloração Hematoxilina-Eosina (HE), para confirmação histológica do diagnóstico.

As colheitas de tecidos realizadas para este estudo não interferiram com a realização do diagnóstico final.

2.2 Dual-Color Silver *In situ* Hybridization (SISH) red *In situ* Hybridization (ISH)

A técnica de hibridação *in situ* dupla foi realizada automaticamente (BenchMark® Ultra; Arizona), utilizando o kit Dual-Color SISH red ISH, segundo o protocolo do fornecedor (Ventana Medical System, Inc., Tucson, Arizona), excepto a etapa de permeabilização, nomeadamente o tratamento por calor, que foi o alvo de optimização.

Após desparafinação numa solução comercial previamente diluída (EZPrep™ 10x; Ventana, Arizona), durante 4 minutos a 72° C, os cortes histológicos foram lavados em água destilada e foram permeabilizados por tratamento por calor, seguido de digestão proteica (ISH-Protease 3; Ventana), durante 8 minutos a 36°C.

Para a optimização do tratamento por calor foram testadas duas soluções diferentes em cortes de uma linha celular que foi previamente fixada em formol tamponado a 10% e incluída em parafina (Ventana/Roche) (controlo positivo), para averiguar qual o melhor método. As soluções a testar para o tratamento por calor foram Cell Conditioning Solution (CC2 Pre-dilute; Ventana; Arizona) e o Reaction Buffer Concentrate 10X (Ventana; Arizona). O tratamento por calor consistiu em três ciclos, a 86°C, com uma duração de 12 minutos cada ciclo.

Após a permeabilização, foi realizada a detecção sequencial do gene EGFR e da região centromérica do cromossoma 7 (CHR 7) com sondas específicas (INFORM® DNA probe; Ventana), segundo as instruções do fabricante. A revelação dos híbridos relativos ao EGFR foi efectuada com o kit UltraView SISH Detection (Ventana; Arizona), enquanto a dos híbridos relativos à região centromérica do cromossoma 7 foi efectuada com o kit UltraView Red ISH Detection (Ventana; Arizona).

Após cada incubação com a sonda foram realizadas três lavagens de estrigência a 72°C, durante 4 minutos, para retirar a sonda que não ligou especificamente à sequência alvo.

Os cortes histológicos foram contrastados com Hematoxilina II (4 minutos) (Ventana; Arizona) e diferenciados no Bluing reagent (Ventana; Arizona) (4 minutos). Após lavagem em água destilada com sabão comercial, seguida de lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados a 37°C, durante 20 minutos, para se proceder à sua montagem (Mounting Medium, Richard-Allan Scientific).

2.3 Análise e interpretação dos resultados

Os casos foram observados e avaliados, por um anátomo-patologista experiente, com um microscópio de luz convencional (Nikon Eclipse E200) acoplado a uma câmara fotográfica Nikon Digital Sight DS-L1 (Nikon Corporation).

Antes de atribuir um score a cada caso, foi avaliada a preservação da morfologia nuclear através da análise da membrana nuclear, nomeadamente da visualização do contorno do núcleo. O gene EGFR foi detectado pela visualização nuclear de um ponto preto, enquanto o cromossoma 7 foi detectado por um ponto vermelho.

A interpretação dos sinais relativos ao EGFR foi realizada segundo os critérios registados na tabela 1, os quais são baseados no número de cópias encontrado para o gene EGFR e para o cromossoma 7 por núcleo e na frequência de células tumorais com um número específico de cópias do gene EGFR e do CHR7 (tabela 1).

Tabela 1- Esquematisação dos critérios para atribuição do score para o status genómico do gene EGFR, segundo Cappuzzo et al. (Sasaki, 2009).

<i>Sem ganho genómico</i>		<i>Com ganho genómico</i>	
Dissomia	≤ 2 cópias em > 90% das células	Alta polissomia	≥ 4 cópias em > 40% das células
Trissomia	≤ 2 ou 3 cópias em $\geq 40\%$ das células	Amplificação	≥ 15 cópias em > 10% das células
Baixa Polissomia	≥ 4 cópias em 10-40% das células	Clusters	

3. RESULTADOS

3.1 Optimização da técnica de SISH

Antes da implementação do método automatizado da SISH red ISH para a avaliação do status genómico do gene EGFR, foi necessário avaliar os resultados obtidos pelo protocolo fornecido pelo fabricante para averiguar a necessidade de proceder ou não a uma optimização.

A observação microscópica do SISH red ISH, na linha celular, realizado segundo o protocolo do fabricante, revela uma ligeira perda da definição nuclear e, sobretudo, uma baixa sensibilidade dos sinais, traduzida por um baixo contraste entre os sinais para o gene EGFR e para o CHR7 (Figura 1A). Este método quando aplicado em cortes histológicos, levou a alterações na morfologia dos tecidos e do núcleo, e a uma intensidade das marcações alvo fracas. A baixa sensibilidade, bem como a perda da morfologia tecidular e nuclear podem ser devido ao tipo de pré-tratamento efectuado, particularmente pelo tratamento pelo calor que foi realizado com uma solução tampão comercial de pH6, à base de citrato.

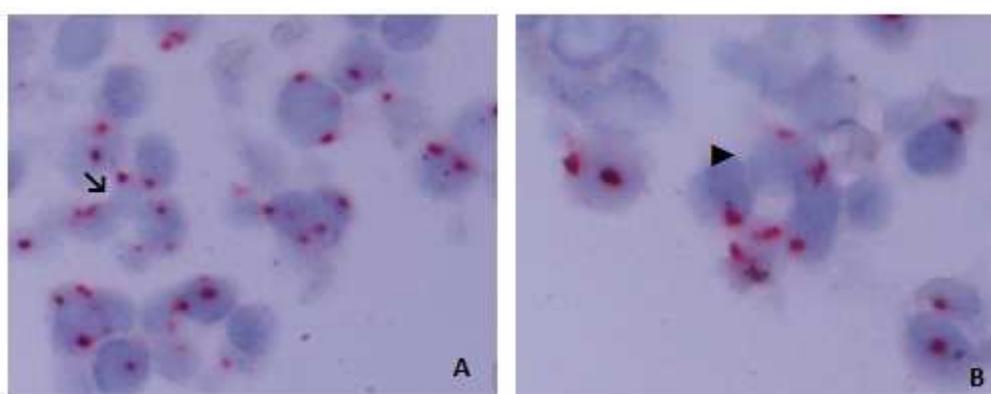


Figura 1 - SISH Dual-Color para EGFR e CHR7 realizada no controlo positivo, antes (A) e após (B) optimização do protocolo. **A** – Baixa definição do limite nuclear e intensidade fraca dos sinais; **B** – Melhor contorno nuclear e melhor contraste dos sinais para o EGFR e CHR7. Seta assinala limite nuclear. (Amp. 1000x).

Assim, foi testada uma solução tampão pH 7,6 à base de TRIS na tentativa de minimizar as alterações morfológicas e de aumentar o sinal. Esta pequena alteração no protocolo original permitiu uma melhor observação e avaliação microscópica (Figura 1B).

Com esta alteração, foi possível discriminar facilmente os sinais relativos ao EGFR e ao cromossoma 7, bem como identificar os núcleos intactos das células tumorais para proceder a contagem dos pontos pretos e vermelhos que correspondem à detecção do gene EGFR e do cromossoma 7, respectivamente.

3.2 Avaliação e interpretação do estado genómico para o gene EGFR e CHR7

Na análise geral dos casos, foram excluídas cinco casos (16,7%) por não ser possível avaliar o estado genómico do EGFR devido à presença de depósitos inespecíficos em áreas de necrose ou de hemorragia e/ou por não ser possível visualizar o contorno nuclear das células tumorais (tabela 2). Nos restantes casos (83,3%) foi possível avaliar o estado genómico (tabela 2).

A análise da tabela 2 permite verificar que dos casos excluídos para a avaliação do estado genómico do gene EGFR, três (10%) correspondem a tecidos fixados durante 24 horas e dois (6,7%) a tecidos com um tempo de fixação de 72 horas.

Tabela 2 - Avaliação da preservação da morfologia nuclear encontrada nos tecidos fixados em formol tamponado a 10% durante 24 e 72 horas.

Tempo de Fixação (horas)	Morfologia Nuclear		Total
	Preservada N (%)	Não preservada N (%)	
24	17 (56,7)	3 (10)	20 (66,7)
72	8 (26,7)	2 (6,7)	10 (33,3)
Total	25 (83,3)	5 (16,7)	30 (100)

A aplicação dos critérios de Cappuzzo *et al*, na avaliação e interpretação dos achados microscópicos permitiu verificar que 80% dos casos em estudo não apresentam ganho genómico (dissomias, monossomias, trissomias e baixa polissomias), dos quais 80% correspondem a dissomias.

Dos 20% de casos em que se verificou haver ganho genómico, 80% são altas polissomias e os restantes são clusters, não se tendo registado qualquer caso de amplificação do gene EGFR.

Tabela 3 – Estado genómico do EGFR em tecidos pulmonares tumorais fixados em Formol.

Sem ganho Genómico				Com ganho Genómico		Total
N (%)				N (%)		N (%)
Dissomia	Monossomia	Trissomia	Baixa polissomia	Alta Polissomia	Clusters	
16 (64%)	2 (8%)	1(4%)	1(4%)	4(16%)	1(4%)	25 (100%)

Durante a avaliação das células com ganho foram encontrados dois padrões distintos. Um dos padrões é caracterizado pelo aparecimento de uma região com marcação homogénea, correspondendo a um ponto preto de grandes dimensões no núcleo (*clusters*), que indica a existência de múltiplas cópias do gene

EGFR, e um ou dois pontos discretos vermelhos relativos ao CHR7. O outro padrão (alta polissomia) é caracterizado por uma dispersão das células tumorais, implicando a contagem individual do sinal. Este padrão é indicativo de uma amplificação aleatória (Powell, 2007).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo foi otimizado o protocolo recomendado pelo fabricante para a técnica automatizada do SISH red ISH em neoplasias pulmonares fixados durante 24 e 72 horas, tendo sido possível avaliar o estado genómico do gene EGFR na maioria dos casos em estudo.

O desenvolvimento de um método rápido e reprodutível para a determinação da amplificação do EGFR em doentes com CPNPC, é, actualmente, uma necessidade para a orientação uma vez que a avaliação do estado genómico do gene EGFR é importante para identificar os doentes que poderão beneficiar do tratamento com Erlotiniba ou Gefitiniba (Sholl, 2007).

A utilização de uma metodologia automatizada permite reduzir a variabilidade entre os ensaios, tornando o método reprodutível, possibilitando, ainda, diminuir o tempo de cada ensaio. Contudo, a implementação de uma metodologia de SISH Dual Color automatizada num serviço de anatomia patológica numa unidade hospitalar deve ser precedida de uma avaliação rigorosa para averiguar a necessidade de optimização. No presente trabalho verificou-se que o protocolo sugerido pelo fabricante leva a uma perda da definição da membrana do núcleo, parâmetro importante para identificar os núcleos intactos das células tumorais para proceder à contagem dos sinais relativos à gene EGFR e à região centromérica do cromossoma 7. Adicionalmente, a intensidade dos sinais obtidos foi escassa para permitir um bom contraste entre os sinais pretos e vermelhos. Estes resultados sugerem que o tratamento dos cortes histológicos, realizado para efectuar a hibridação, não é adequado para as amostras em estudo. Através do uso de uma solução tampão comercial à base de TRIS, para realizar o tratamento dos cortes histológicos pelo calor, foi possível preservar a morfologia nuclear de forma a se identificar os núcleos intactos avaliáveis, bem como aumentar a intensidade dos sinais. Assim, a identificação do gene EGFR e do cromossoma 7, nos casos em estudo, foi efectuada pelo protocolo SISH red ISH optimizado na etapa pelo tratamento pelo calor.

Cinco dos casos avaliados microscopicamente foram excluídos devido à presença de necrose ou de hemorragia, factores que provocam uma marcação inespecífica (fundo) no tecido. Até ao momento não existem métodos para contornar estas variáveis indesejadas, pelo que se pode concluir que, por este método e na amostra em estudo, apenas 83,3% dos casos podem ser avaliados.

No que concerne à influência do tempo de fixação na qualidade dos resultados obtidos, o número de casos em estudo é muito pequeno para formular conclusões. O efeito da fixação na qualidade das técnicas de hibridação *in situ* não está totalmente esclarecido (Selvarajan, 2002; Varella-Garcia, 2009). Um estudo mostra que a fixação não influencia a detecção do sinal na técnica de FISH quando o tempo de fixação é de seis até 48 horas (Varella-Garcia, 2009), enquanto um outro estudo indica que a fixação durante um duas horas até uma semana não altera a qualidade do sinal obtido (Selvarajan, 2002).

Para a avaliação do número de cópias do gene EGFR, foram utilizados os critérios de Cappuzzo *et al*, que se baseiam no número de cópias detectadas para o gene EGFR e para o cromossoma 7 e a frequência de células tumorais com, um número específico de cópias do gene EGFR e CHR7. A utilização destes critérios permitiu identificar, no presente estudo, casos de monossomia, dissomia, trissomia, baixa polissomia, alta polissomia e *cluster*, não se tendo detectado qualquer caso de amplificação propriamente dita.

No presente trabalho foram detectadas 16% de altas polissomias e 4% de *clusters*. Alguns estudos têm descrito a amplificação do gene EGFR em um terço ou um quarto dos casos com ganho genómico (El-Zammar 2009). A ausência de casos com amplificação do gene EGFR, no presente trabalho, pode ser explicada, entre outros factores, pelo pequeno tamanho da amostra, sendo portanto necessário aumentar a amostragem.

A frequência de casos com ganho genómico para o EGFR, encontrados neste estudo (20%), é ligeiramente inferior aos valores descritos na literatura (Dziadziuszko, 2006), ainda na provável dependência do tamanho da amostra.

Concluindo, neste trabalho foi optimizada a metodologia automatizada de SISH Dual-Colour para a detecção do gene EGFR e do CHR7 em carcinomas de não pequenas células pulmonares fixados em

formol tamponado a 10%, tendo sido possível, desta forma, uma melhor avaliação do status do gene EGFR. Contudo será necessário aumentar a amostragem de forma a esclarecer o efeito do tempo de fixação, bem como a frequência encontrada de casos com aumento de número de cópias e amplificação do gene EGFR.

AGRADECIMENTOS

Um sincero obrigado à Doutora Lígia Castro, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar de Coimbra, por me ter permitido a realização deste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bancroft, J.D., & Gamble, M. (2008). Theory and practice of histological techniques: Fixation of tissues (6th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone.

Bonomi PD (2010). Implications of key trials in advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 116:1155-64.

Chintala L, Kurzrock R (2010). Epidermal growth factor receptor mutation and diverse tumors: Case report and concise literature review. *Mol Oncol*, 4: 306-8.

Dziadziuszko R, Hirsch FR, Varela-Garcia M, Bunn PA Jr (2006). Selecting lung cancer patients for treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization--why, when, and how?. *Clin Cancer Res*. 12:4409-4415.

El-Zammar OA, Zhang S, Katzenstein AL (2009). Comparison of FISH, PCR, and immunohistochemistry in assessing EGFR status in lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic features. *Diagn Mol Pathol*, 18:133-7.

Gallegos Ruiz MI, Floor K, Vos W, Grunberg K, Meijer GA, Rodriguez JA, et al (2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number detection in non-small-cell lung cancer; a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization. *Histopathology*. 51:631-7.

García-Caballero T, Grabau D, Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis IO, Watts S, Mollerup J (2010). Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology*. 56:472-80.

Nitta H, Hauss-Wegrzyniak B, Lehrkamp M, Murillo AE, Gaire F, Farrell M, et al (2008). Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH). *Diagn Pathol*. 3:41.

Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, et al (2007). Metallographic in situ hybridization. *Hum Pathol*. 38:1145-59.

Sasaki H, Shimizu S, Okuda K, Kawano O, Yukiue H, Yano M, et al (2009). Epidermal growth factor receptor gene amplification in surgical resected Japanese lung cancer. *Lung Cancer*. 64:295-300.

Selvarajan S, Bay BH, Choo A, Chuah KL, Sivaswaren CR, Tien SL, et al (2002). Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 50:1693-6.

Sholl LM, John Iafrate A, Chou YP, Wu MT, Goan YG, Su L, et al (2007). Validation of chromogenic in situ hybridization for detection of EGFR copy number amplification in nonsmall cell lung carcinoma. *Mod Pathol*. 20:1028-35.

Tubbs R, Pettay J, Skacel M, Powell R, Stoler M, Roche P, et al (2002). Gold-facilitated in situ hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *Am J Pathol*. 160:1589-95.

Varela-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, Geenen K, Hirschmann A, Kockx M, et al. (2009). EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 62:970-7.

Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T (2009). Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 63: 315-21.