



ARTIGO ORIGINAL

Estudo da mutação do *recetor do fator de crescimento epidérmico*, durante 5 anos, numa população de doentes com cancro do pulmão de não pequenas células

A.S. Castro^{a,*}, B. Parente^{a,**}, I. Gonçalves^a, A. Antunes^a, A. Barroso^a, S. Conde^a, S. Neves^a e J.C. Machado^b

^a Unidade de Pneumologia Oncológica, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia-Espinho, Vila Nova de Gaia, Portugal

^b Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Recebido a 12 de janeiro de 2012; aceite a 30 de agosto de 2012

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma pulmonar não pequenas células;
Recetor do fator de crescimento epidérmico;
Inibidores da tirosina quinase;
Sobrevida

Resumo

Introdução: Em 2006, a Unidade de Pneumologia Oncológica do Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho iniciou a sequenciação da mutação do *recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)* em doentes com CPNPC selecionados e desde 2010 realiza a sequenciação sistematicamente em todos os doentes, independentemente da histologia, hábitos tabágicos, idade ou sexo. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o grupo de doentes que efetuou a sequenciação entre 2006-2010, determinar a frequência da mutação *EGFR*, avaliar as sobrevidas globais e após uso de inibidores da tirosina quinase (ITK), nos doentes que efetuaram esta terapêutica em 2.^a e 3.^a linha com conhecimento do estado da mutação do *EGFR*.

Métodos: Análise estatística descritiva dos doentes que efetuaram sequenciação *EGFR* em 2006-2010 e sobrevida mediana global nos doentes que efetuaram ITK em 2.^a e 3.^a linha. Registo do material disponível para análise e demora média de resultado do exame, de acordo com o material enviado.

Resultados: A sequenciação foi efetuada em 374 doentes, 71,1% sexo masculino, 67,1% não/ex-fumadores, 32,9% fumadores; 57,8% adenocarcinoma e 23,5% carcinoma epidermoide (CE). A mutação foi detetada em 49 doentes (13,1%). No total dos doentes estudados, a taxa de mutação foi de 9% no sexo masculino e 23% no sexo feminino. A sobrevida mediana global após o uso de erlotinib foi de 14 meses para os doentes com mutação positiva do *EGFR* versus 6 meses nos doentes não mutados ($p = 0,003$).

* Autor para correspondência.

** Autor para correspondência.

Correios eletrónicos: anascastro@gmail.com (A.S. Castro), barbaraparente@gmail.com (B. Parente).

Conclusão: O nosso grupo teve uma taxa de mutação global de 13,1%, com predomínio no sexo feminino, não fumadores, histologia adenocarcinoma. Em doentes selecionados (2006/2009), a taxa de mutação foi de 16%; nos doentes não selecionados (2010) foi de 10,4%. Este estudo tem vindo a permitir um melhor conhecimento da taxa de mutação do *EGFR* na população portuguesa, bem como avaliar os resultados das sobrevidas dos doentes após uso de inibidores da tirosina quinase (ITK), efetuada em 2.^a e 3.^a linha com conhecimento prévio do estado da mutação do *EGFR*, tendo sido encontradas diferenças nas sobrevidas nos 2 grupos de doentes (mutados e não mutados) com significado estatístico.

A pesquisa mutação do *EGFR* deve ser efetuada em todos os doentes com CPNPC, dando possibilidade a um número considerável de doentes de poder efetuar um tratamento de 1.^a linha com ITK (doentes mutados), bem como de poder usufruir de outros esquemas de quimioterapia, quando progredirem.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

KEYWORDS

Non Small Cell Lung Cancer;
Epidermal Growth Factor Receptor;
Tyrosine kinase inhibitor;
Survival

Epidermal Growth Factor Recetor mutation study for 5 years, in a population of patients with non-small cell lung cancer

Abstract

Introduction: In 2006, the Vila Nova de Gaia/Espinho Hospital Centre Pulmonary Oncology Unit started performing EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mutation sequencing in selected patients with NSCLC and systematically in all patients since 2010, regardless of histology, smoking habits, age or sex. The aim of this study was to characterize the group of patients that carried out the sequencing between 2006-2010, to determine EGFR mutation frequency, to evaluate the overall survival and the survival after the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI), in patients who performed this therapy in second and third line, knowing the EGFR mutation status.

Methods: Descriptive statistical analysis of patients who did EGFR sequencing in 2006-2010 and of overall survival in patients treated with TKI as 2nd and 3rd line therapy. Record of the material available for analysis and average delay of exam results, according to the material submitted.

Results: The sequencing was performed in 374 patients, 71,1% males, 67,1% non/ex-smokers, 32,9% smokers, 57,8% adenocarcinoma and 23,5% squamous cell carcinoma (SCC). The mutation was detected in 49 patients (13,1%). In all studied patients, the mutation rate was 9% in males and 23% in females. Median overall survival after erlotinib use of was 14 months for patients with positive EGFR mutation versus 6 months in not mutated patients ($p = 0.003$).

Conclusion: Our group had an overall mutation rate of 13.1% with female, non-smokers, adenocarcinoma histology predominance. In selected patients (2006/2009), the mutation rate was 16%, in not selected patients (2010) the mutation rate was 10.4%. This study has permitted a better understanding of the EGFR mutation rate in the Portuguese population as well as an evaluation of the patients survival after the use of tyrosine kinase inhibitors, in second and third line therapy with previous knowledge of the EGFR mutational status. Statistical significant differences in survival were found in the two patient groups (EGFR mutated and non mutated).

The EGFR mutation research should be performed in all patients with NSCLC, giving the possibility to a considerable number of patients to perform a first line treatment with TKI (EGFR mutated patients) and the advantage of performing other chemotherapy schemes, when progression occurs.

© 2012 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introdução

Os fatores preditivos e de prognóstico no cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC) são importantes quer para o doente quer para o médico, porque podem fornecer um prognóstico mais preciso (em termos de recorrência ou progressão da doença e sobrevivência) e ajudam a estabelecer o melhor tratamento.

Os fatores de prognóstico clássicos incluem história tabágica, estado geral e as comorbilidades do doente. Atualmente, existem marcadores moleculares que se tornaram fatores de prognóstico, sendo atualmente os mais estudados: o *receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)* e a mutação do *KRAS* que, em associação com a histologia, são considerados potenciais fatores preditivos.

Identificar precocemente a subpopulação de doentes que mais provavelmente responderá a uma terapêutica particular aumentando não só a probabilidade de resposta mas evitando também tratamentos desnecessários àqueles doentes que têm poucas hipóteses de beneficiar com o tratamento, é o objetivo principal do tratamento oncológico pulmonar.

Portugal não possui um registo de cancro do pulmão fiável e, por isso, é muito difícil traçar quer o perfil epidemiológico no nosso país, quer a real taxa de incidência do CPNPC, assim como a avaliação clínica no que diz respeito ao seu potencial tratamento.

A Comissão de Pneumologia Oncológica da Sociedade Portuguesa de Pneumologia¹ efetuou, no triénio de 2000 e 2002, um estudo em que participaram 22 hospitais portugueses, tendo-se registado 4 396 novos casos de cancro do pulmão; o adenocarcinoma foi o subtipo histológico mais frequente e, em 76,9% dos casos os doentes, encontravam-se em estadios avançados ou metastático de doença.

Embora sendo do nosso conhecimento que, destes indivíduos com doença avançada, apenas 10-12% poderão beneficiar dos inibidores da tirosina quinase (ITK) em 1.^a linha, o aparecimento destes fármacos (*EGFR*-ITK) foi uma mais-valia no tratamento do CPNPC avançado ou metastático quer em 1.^a linha, nos doentes com a mutação do *EGFR*, quer em 2.^a e 3.^a linha.

Existem vários parâmetros clínicos e moleculares que preveem quais os doentes com CPNPC doença avançada mais suscetíveis de beneficiar do tratamento com inibidores de TK, quer para a terapêutica inicial quer para 2.^a linha. Estes indicadores de estudos de fase II²⁻⁵ e III⁶ que identificaram parâmetros clínicos associados a melhor resposta clínica, são adenocarcinoma, sexo feminino, não fumadores e etnia asiática⁷⁻⁹.

Mutações ativadoras específicas no domínio TK do *EGFR* (exão 18-21) estão associadas habitualmente a aumento da resposta aos ITK, erlotinib ou gefitinib, ocorrendo, de acordo com a literatura, na Europa em 10-15% dos doentes com CPNPC e com efeitos laterais facilmente manuseáveis.

O método «gold-standard» para análise da mutação do *EGFR* é a sequenciação direta do ADN, dos exões 18 ao 21. A percentagem de mutações em cada exão é algo ainda controverso; a grande maioria dos trabalhos, incluindo o grupo espanhol¹⁰, só estudaram os exões 19 e 21 (e, neste, só a mutação *Leu858Arg*). Já foi referido anteriormente que ocorriam mutações nos exões 18 e 20 e que algumas tinham valor preditivo de resposta¹¹. Apontava-se para valores de 5% exão 18; 49% exão 19; 1% exão 20; 45% exão 21. O valor preditivo positivo da mutação *Gly719* no exão 18 está bem estabelecido e o valor preditivo negativo das inserções do exão 20¹². Penzel et al.¹³, em 1047 casos analisados, encontraram uma taxa de mutação de 15,6% (exão 18 – 10,4%; exão 19 – 49,7%; exão 20 – 5,5%; exão 21 – 34,4%).

Não tem sido também consensual a que grupo de doentes deve ser pedida a mutação do *EGFR* e os estudos efetuados têm excluído habitualmente os doentes com tumores epidermóides e grandes fumadores.

Ainda sem definição clara sobre qual o valor da biópsia (em tumor primário vs. metástases) para o estudo da mutação, no entanto, sempre que possível, o primeiro estudo da mutação do *EGFR* tem sido efetuado no tumor

primário e não nas metástases. Também sem grande tradição entre nós, efetuou-se nova punção aos doentes que progridem a efetuaefetuar ITK. Em cerca de 50% dos casos de progressão ocorre a mutação *Thr790Met* (exão 20). Esta mutação confere resistência ao tratamento com ITK, sendo uma mutação secundária que aparece após tratamento e aquisição de resistência e só muito raramente uma mutação primária (alguns autores defendem que pode já estar presente em subclones residuais de células tumorais antes do tratamento com ITK)¹⁴.

As melhores respostas ao tratamento com ITK e mutações obtêm-se em doentes com deleções no exão 19 e na mutação *Leu858Arg* do exão 21, embora tendencialmente com resultados um pouco inferiores à deleção do exão 19; as mutações *Gly719* (exão 18) e *Leu 861* (exão 21) estão associadas a boa resposta. A evidência é clínica e experimental (*in vitro*)¹⁴.

A Unidade de Pneumologia Oncológica (UPO) do Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar Gaia-Espinho (CHGE) iniciou a pesquisa da mutação do gene do *EGFR* em 2006 em colaboração com o IPATIMUP (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto) em doentes selecionados e já com o uso aprovado em Portugal de erlotinib em 2.^a e 3.^a linhas. Em 2010, com a aprovação do gefitinib em 1.^a linha passou a efetuar esta sequenciação em todos os doentes com CPNPC, independentemente da histologia, estadios, hábitos tabágicos ou sexo, e a tratar com gefitinib em 1.^a linha todos os doentes com mutação *EGFR* positiva¹⁵. Pretendia-se, assim, a recolha de dados epidemiológicos de forma prospetiva.

Material e métodos

Apresentamos os resultados de um registo contínuo, para pesquisa de mutações do *EGFR* em doentes com CPNPC, realizado no Serviço de Pneumologia do Centro Hospitalar de 2006 a 2010.

Foram avaliados os resultados obtidos após tratamento em 2.^a e 3.^a linha com ITK em doentes com CPNPC doença avançada que efetuaefetuaram a pesquisa de mutação do *EGFR*. Os resultados em 1.^a linha nos doentes mutados não são alvo de apresentação, dado ainda o pequeno n.º de casos.

No período entre 2006-2009, os critérios de inclusão para o estudo da mutação do *EGFR* foram histologia adenocarcinoma, não fumadores ou ex-fumadores, independentemente do sexo; no ano de 2010, os critérios de inclusão foram diagnóstico de CPNPC, independentemente do sexo ou do estadios ou hábitos tabágicos. Os doentes foram classificados de acordo com hábitos tabágicos, em fumadores, ex-fumadores (doentes que deixaram de fumar há mais de 12 meses) e não fumadores. Registo do material disponível para análise e demora média de resultado do exame, de acordo com o material enviado.

Nos doentes em estadios avançados que efetuaram erlotinib em 2.^a e 3.^a linha entre 2006 e 2010, os parâmetros avaliados incluíram idade, sexo, hábitos tabágicos, histologia, estadios TNM na apresentação, regimes prévios de quimioterapia, estado mutacional do *EGFR* e sobrevida global de acordo com o estado mutacional, sobrevida mediana global após erlotinib.

Todos os cálculos estatísticos foram efetuados com o software *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 17.0.

Resultados

No período entre 1 de janeiro de 2006 a 31 dezembro de 2010, foi efetuada a sequenciação do *EGFR* em 374 doentes com CPNPC (248 doentes entre 2006-2009 e 126 doentes em 2010). No total de doentes analisados, 266 (71,1%) do sexo masculino e 108 (28,9%) do sexo feminino. Média de idades de $64,5 \pm 11,3$ anos. Em relação aos hábitos tabágicos, 35,8% ex-fumadores, 31,3% não fumadores e 32,9% fumadores. O tipo histológico predominante – adenocarcinoma (57,8%), seguido do carcinoma epidermoide – 23,5% (tabela 1).

10,1% dos doentes encontravam-se no estadio I; no estadio II em 2,4% dos casos; estadio IIIA em 5,8% e os estadios IIIB/IV em 81,6% dos casos.

As mutações no gene *EGFR* foram detetadas em 49 de 374 doentes, correspondendo a uma taxa de mutação de 13,1% (a taxa de mutação foi de 9% no sexo masculino e 23% no sexo feminino). No total de doentes mutados, 46,9% eram não fumadores e 59,2% correspondiam a adenocarcinoma (tabela 1).

Quando considerados separadamente, a taxa de mutação nos doentes selecionados entre 2006 e 2009 foi de 16,3 vs. 10,4% no ano de 2010 em que o estudo da mutação começou a ser efetuado a todos os doentes com CPNPC.

A distribuição por exões foi a seguinte: 10,2% no exão 18; 38,8% no exão 19; 18,4% no exão 20 (6,2% foram de resistência); 32,7% no exão 21.

Tabela 1 Caracterização da amostra e frequência de mutações *EGFR*. (* 6,2% foram mutações de resistência)

Variáveis	Todos doentes (n = 374) n/%	Doentes mutados (n = 49) n/%
Sexo		
Masculino	266/71,1	24/9,0
Feminino	108/28,9	25/23,1
Idade		
Média±dp	64,52 ± 11,3	69 ± 9,5
Mínimo/máximo	20/87	56/77
Hábitos tabágicos		
Ex-fumador	134/35,8	15/30,6
Fumador	123/32,9	11/22,4
Não fumador	117/31,3	23/46,9
Tipo histológico		
Adenocarcinoma	216/57,8	29/59,2
epidermoide	88/23,5	12/24,5
Ca grandes células	2/0,5	-
bronquíolo-alveolar	7/1,9	-
CPNPC	61/16,3	7/14,3
Exão		
18		5/10,2
19		19/38,8
20		9/18,4*
21		16/32,6

Doentes mutados (n = 49)

Tabela 2 Caracterização dos doentes mutados por sexo

Variáveis	Sexo feminino (n = 25)	Sexo masculino (n = 24)
Hábitos tabágicos		
Não fumador	22/88%	2/8,3%
Ex-fumador	—	7/29,2%
Fumador	3/12%	15/62,5%
Tipo histológico		
Adenocarcinoma	20/80%	9/37,5%
Ca epidermoide	1/4%	11/45,8%
CPNPC	4/6%	4/16,7%
Exão mutado		
18	3/12%	2/8,3%
19	11/44%	7/29,2%
20	3/12%	6/25%
21	7/28%	9/37,5%

Os doentes do sexo feminino com mutação positiva (n = 25), a maioria não fumadores (22/88,0%) e com predomínio do adenocarcinoma (20/80,0%). Neste subgrupo, 44% das mutações ocorreram no exão 19; 28% no exão 21; 12% no exão 18 e 12% no exão 20 (tabela 2).

Nos homens mutados (n = 24), 91,7% eram fumadores ou ex-fumadores e o tipo histológico predominante foi o carcinoma epidermoide em 45,8% dos doentes. As mutações ocorreram em 37,5% no exão 21; 29,2% no exão 19; 25% exão 20 e 8,3% no exão 18 (tabela 2).

Os doentes mutados não fumadores (23), são na sua maioria do sexo feminino (21/91,3%), 78,3% adenocarcinomas, 17,4% CPNPC e 4,3% carcinomas epidermóides. A mutação, na maioria dos não fumadores, ocorreu no exão 19 (43,5%) e exão 21 (34,8%), seguidos do exão 18 (13,0%) e exão 20 (4,3%).

No tempo médio de demora até ao resultado da sequenciação¹⁶, verificou-se, de acordo com o tipo de material disponível para estudo que, as lâminas demoram em média 20 dias; o bloco de parafina 8,32 dias e os detritos celulares (com produtos a fresco – EBUS, BAT e outras punções, na presença de anatomia patológica) 6,5 dias (tabela 3).

Do total de doentes sequenciados, 71 em estadio avançado ou metastizado efetuaram tratamento de 2.^a e 3.^a linha com erlotinib 150mg/dia, até à morte, progressão da doença ou toxicidade inaceitável. Neste subgrupo de doentes, verificou-se predomínio do sexo feminino (43/60,6%), não fumadores (31/43,7%) e histologia

Tabela 3 Tempo médio de demora até ao resultado da sequenciação do *EGFR*

Amostra utilizada	Tempo médio de demora (dias)	Diferença de tempo (dias)	p
Bloco de parafina	8,32	-	
Lâmina de citologia	14	5,6721	0,0255
Lâmina de histologia	20,42	12,0888	7,1108
Detritos celulares	6,5556	-1,7723	0,1789

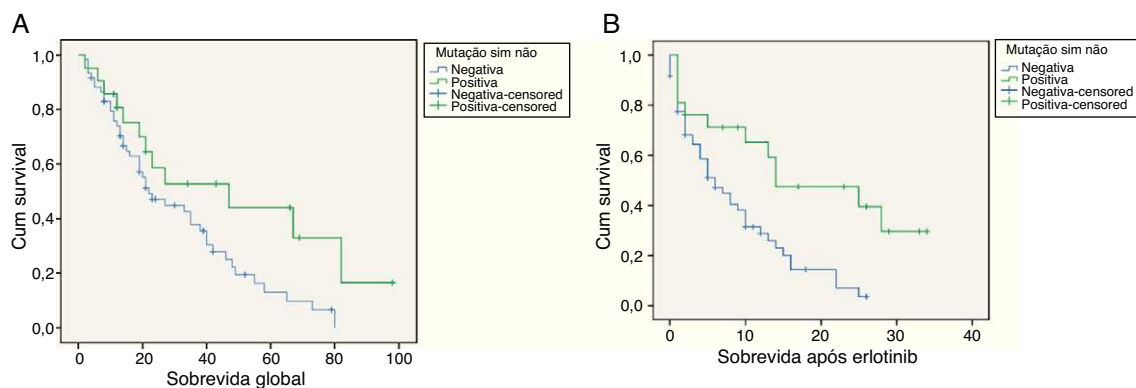


Figura 1 A. Curva de sobrevivência global dos doentes mutados versus não mutados (47 vs. 22 meses, $p=0,038$). B. Curva de sobrevivência após tratamento com erlotinib em doentes mutados e WT (14 vs. 6 meses, $p=0,003$).

adenocarcinoma (43/60,6%). A mutação do *EGFR* positiva em 20 doentes (19,2%), 55% homens e 45% mulheres, na maioria não fumadores (12/60,0%) e histologia adenocarcinoma (14/70%) (tabela 3). Na resposta global ao tratamento com erlotinib, nos doentes com mutação do *EGFR* negativa ($n=51$), verificou-se 47,9% (24) doença progressiva, 45,1% (23) doença estacionária e 7,8% (4) remissão parcial. No subgrupo de doentes tratados com erlotinib com mutação do *EGFR* positiva ($n=20$), 35,0% (7) apresentaram doença progressiva, 50,0% (10) doença estacionária e 15,0% (3) remissão parcial, ou seja, como era de esperar, melhor controlo da doença em doentes com mutação *EGFR* positiva quando comparado com os doentes com mutação negativa (65,0 vs. 52,9%) (tabela 4).

Tabela 4 Características demográficas e resposta ao tratamento dos doentes com estudo do *EGFR* que efetuaram terapêutica com erlotinib em 2.ª linha

	Total doentes ($n=71$) n/%	Doentes mutados $n=20$ n/%
Estudo do <i>EGFR</i> e terapêutica com erlotinib		
<i>Sexo</i>		
Masculino	28/39,4	11/55,0
Feminino	43/60,6	9/45,0
<i>Idade</i>	68 ± 8,46	
<i>Hábitos tabágicos</i>		
Ex-fumador	24/33,8	7/35
Fumador	16/22,5	3/15,0
Não fumador	31/43,7	12/60,0
<i>Tipo histológico</i>		
Adenocarcinoma	43/60,6	14/70,0
Outro tipo	28/39,4	6/30,0
Resposta ao erlotinib		
	<i>EGFR</i> – = 51	<i>EGFR</i> + = 20
Remissão parcial	4/7,8	3/15,0
Doença estacionária	23/45,1	10/50,0
Doença progressiva	24/47,1	7/35,0
Sobrevivência global média	22 meses	47 meses
Sobrevivência após uso erlotinib	6 meses	14 meses

A sobrevivência global dos doentes que efetuaram erlotinib com mutação do *EGFR* positiva vs. doentes não mutados foi de 47 e 22 meses ($p=0,038$), respetivamente (fig. 1). A sobrevivência média após o tratamento com erlotinib no grupo com mutação *EGFR* positiva também foi superior neste subgrupo quando comparada com os doentes com mutação negativa (14 vs. 6 meses, respetivamente $p=0,003$) (fig. 1).

Discussão

A nossa amostra revelou uma taxa de mutação do *EGFR* global (2006-2010) de 13,1%. Uma vez que de 2006 a 2009 houve seleção de doentes, a taxa de mutação foi de 16% vs. 10,4% no ano de 2010 em que o estudo da mutação foi efetuado a todos os doentes com CPNPC independentemente do sexo e estadió. Estes números parecem-nos uma mais-valia para o conhecimento da taxa de mutação do *EGFR* na população portuguesa; os estudos de prevalência da mutação do *EGFR* no cancro do pulmão na Europa revelaram, em doentes não selecionados, taxas de mutação de 10%; em Espanha, Rosell et al., obtiveram uma taxa de mutação de 16,6%¹⁰, num grupo selecionado de doentes com CPNPC em estadios avançados. A continuação deste nosso trabalho (que nos anos de 2011 e 2012 se tem mantido igualmente numa população não selecionada) vai permitir traçar com segurança o perfil da mutação do *EGFR* na população portuguesa e poder confirmar estes dados agora apresentados, que mostram a presença da mutação do *EGFR* na subpopulação de doentes do sexo masculino, carcinomas epidermóides e alguns fumadores. A diferença é, contudo, muito significativa na taxa de mutação em relação aos 2 sexos, sendo o adenocarcinoma responsável pela grande maioria dos casos.

Foi possível efetuar a sequenciação do gene do *EGFR* em variados tipos de amostras diagnósticas. A sequenciação de DNA a partir de detritos celulares (a fresco ou após *cell blok*) foi mais rápida comparativamente a lâminas ou bloco de parafina, diferença essa estatisticamente significativa e com impacto no início do tratamento. Isto só foi possível com a colaboração estreita entre os vários elementos envolvidos no diagnóstico do cancro de pulmão (pneumologia oncológica, broncologia, radiologia de intervenção e anatomia patológica). Nos tumores periféricos, ou sempre que seja possível efetuar punções aspirativas, deve-se dar prioridade

ao envio deste material a fresco, com obtenção mais rápida dos resultados (6,5 dias após o envio dos produtos).

O estudo da mutação do *EGFR* deve ser efetuado por rotina em todos os doentes com o diagnóstico de CPNPC e devem ser criadas as condições ao seu uso em todos os hospitais que tratam cancro do pulmão, tendo em conta o seu correto tratamento, pela possibilidade de uso dos ITK em 1.ª linha em doentes mutados, com melhor controlo da doença do que com os protocolos de quimioterapia convencional. Todos estes pressupostos assentam na resposta ao tratamento e na sobrevida global no grupo de doentes tratados com ITK¹⁶⁻¹⁸.

Os resultados da nossa amostra em 2.ª e 3.ª linha mostram significado estatístico no grupo de doentes com mutação positiva para o *EGFR*, comparativamente aos doentes com mutação negativa, apesar de a presença da mutação do *EGFR* não ser condição obrigatória para o início de tratamento. Ainda não temos número suficiente de doentes para apresentação dos resultados de 1.ª linha dos doentes mutados tratados com ITK.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Bibliografia

- Parente B, Queiroga H, Teixeira E, Sotto-Mayor R, Barata F, Sousa A, et al. Estudo epidemiológico do cancro do pulmão em Portugal nos anos de 2000/2002. *Rev Port Pneumol*. 2007 Mar;13:255-65.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto R, Brannigan B, et al. 3 Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-39.
- Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-500.
- Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Yatabe Y, Kuwano H, Takahashi T, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol*. 2005;23:2513-20.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13306-11.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba I, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Nat Cancer Inst*. 2005;97:339-46.
- Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5878-85.
- Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeon YK, Oh DY, Lee SH, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol*. 2005;23:2493-501.
- Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23:857-65.
- Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:958.
- Riely G, Politi A, Miller V, Pao W. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7232.
- Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne P, Alvarez J, Zappaterra M, et al. Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *PLOS Medicine*. 2005;2:e313.
- Penzel R, Sers C, Chen Y, Lehmann-Mühlenhoff U, Merkelbach-Bruse S, Jung A, et al. EGFR mutation detection in NSCLC—assessment of diagnostic application and recommendations of the German Panel for Mutation Testing in NSCLC. *Virchows Arch*. 2011;458:95.
- Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in EGFR-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6494-501.
- Antunes A, Castro A, Campainha S, Gomes J, Barroso A, Conde S, et al. Novos métodos de abordagem no estudo do EGFR no CPNPC. *Rev Port Pneumol*. 2011;17:9-10.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-57.
- Caicun Z, Yi-Long W, Gongyan C, Jifeng F, Xiao-Qing L, Changli W, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8 August):735-42.
- Rosell R, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Cardenal F, et al. Erlotinib versus chemotherapy (CT) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations: Interim results of the European Erlotinib Versus Chemotherapy (EURTAC) phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2011;29.