

QUAL É O NÍVEL DE CONCORDÂNCIA ENTRE BIOPSIA LÍQUIDA E BIOPSIA TECIDUAL COMO FONTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE EGFR EM PACIENTES COM CÂNCER DE PULMÃO?

What is the level of agreement between liquid biopsy and tissue biopsy as a source of biological material for the detection of mutations in the EGFR gene in patients with lung cancer?

Ricardo Tavares Borges¹, Rayanne Garrido Monteiro de Andrade², Juliana da Luz Araújo³, Maisa da Silva Dulci Medeiros⁴, Gabriella Maria Lucena Viana⁵, Roberto José Bittencourt⁶, Rinaldo Wellerson Pereira⁷

RESUMO

Introdução: A biopsia tecidual é o padrão-ouro para detectar mutações no DNA do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no câncer de pulmão, mas a proximidade do câncer com uma artéria ou órgão importante acaba tornando-a inviável. Assim, uma abordagem alternativa não invasiva segundo estudos é a biopsia líquida. **Objetivo:** Avaliar a concordância na detecção de mutações no EGFR em câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) com base em biopsia líquida e tecidual. **Metodologia:** Revisão sistemática da literatura com referências publicadas na língua inglesa entre os anos de 2010 a 2017. **Resultados:** A taxa de concordância entre os resultados obtidos a partir de biopsias teciduais e líquidas foi bastante variável (17,17 para 97,9%), assim como a variabilidade dos métodos utilizados para a detecção da mutação e o tempo para se obter as amostras. Ademais, as amostras de biopsia líquida e tecidual foram coletadas em vários estágios de progressão da doença. Ao avaliar a doença em estágio avançado, o Scorpion-ARMS mostrou ser a mais eficaz entre os métodos de detecção, com uma taxa de concordância de cerca de 97,9%. **Conclusão:** As mutações somáticas no EGFR são um dos principais determinantes da resposta clínica ao tratamento com inibidores de tirosina quinase em pacientes com NSCLC. O uso de ctDNA baseado sobretudo no sangue para análise da mutação EGFR provou ser viável, mas

¹ Graduação em Medicina - Universidade Católica de Brasília.

² Graduação em Medicina - Universidade Católica de Brasília.

³ Graduação em Medicina - Universidade Católica de Brasília.

⁴ Graduação em Medicina - Universidade Católica de Brasília.

⁵ Graduação em Medicina - Universidade Católica de Brasília.

⁶ Professor doutor e Coordenador do Internato de Clínica Médica do Curso de Medicina na Universidade Católica de Brasília.

⁷ Professor doutor em Medicina Genômica e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.

enquanto não haver um consenso quanto ao método de detecção a ser utilizado, a biopsia líquida não pode ser utilizada na prática clínica rotineira. **Palavras-chave:** circulação de DNA, circulação de DNA tumoral, DNA livre de células, biopsia líquida, câncer de pulmão, EGFR

ABSTRACT

Introduction: Tissue biopsy is the gold standard for detecting mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) DNA in lung cancer, but the proximity of the cancer to an important artery or organ eventually makes it unfeasible. Thus, a non-invasive alternative approach according to studies is the liquid biopsy. **Objective:** To assess concordance in the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC) based on tissue and biopsy. **Methodology:** Systematic review of the literature with references published in the English language between the years 2010 to 2017. **Results:** The agreement between the results obtained from tissue and liquid biopsies was quite variable (17,17 to 97,9%), as well as the variability of the methods used to detect the mutation and the time to obtain the samples. In addition, tissue and fluid biopsy specimens were collected at various stages of disease progression. When evaluating the disease at an advanced stage, Scorpion-ARMS was shown to be the most effective among detection methods, with a concordance rate of about 97,9%. **Conclusion:** Somatic mutations in EGFR are a major determinant of the clinical response to treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer. The use of ctDNA based primarily on blood for analysis of the EGFR mutation has proven to be feasible, but as long as there is no consensus as to the detection method to be used, the liquid biopsy can not be used in routine clinical practice. **Key words:** circulation DNA, circulation tumor DNA, cell free DNA, liquid biopsy, lung cancer, EGFR

INTRODUÇÃO

Atualmente, a biopsia de tecido é o teste padrão-ouro para detectar no ácido desoxirribonucleico (DNA) mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) – que é um receptor de tirosina-quinase da membrana celular - presente no câncer de pulmão.^{1,2} As principais mutações detectadas no gene do EGFR são deleções no éxon 19 e mutação L858R no

éxon 21,² as quais levam à proliferação celular descontrolada, ao aumento da angiogênese celular e à elevada invasão celular.³ Apesar de mais informativa, a biopsia tecidual é um procedimento invasivo, e às vezes iatrogênico.⁴ Em certos casos, prefere-se não realizar devido à heterogeneidade (já que são neoplasias formadas por diferentes populações de células), à variabilidade (visto que são células que sofrem mutações com o passar do tempo),

à proximidade do câncer com uma artéria ou órgão importante e à limitação da quantidade e da qualidade das amostras.^{1,4,5}

Estudos recentes apresentaram uma abordagem alternativa não-invasiva conhecida como biópsia líquida,^{5,6} assim chamada por requerer apenas a coleta de sangue ou outros fluidos corporais: saliva, urina ou líquido pleural.^{6,7} Esse teste não-invasivo detecta no sangue células que se desprenderam da neoplasia,^{7,8} pequenas vesículas repletas de células neoplásicas conhecidas como exossomos⁸ ou fragmentos de DNA⁸ contendo uma mutação no gene do EGFR, conhecida como T790M, que informa que a neoplasia tornou-se resistente ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase de primeira e segunda gerações.⁷

Diante do exposto, este artigo objetivou avaliar se os dados publicados na literatura científica apontam para uma concordância na detecção da mutação no gene do EGFR do câncer de pulmão pela biópsia líquida àquela realizada em amostras de biópsia tecidual.

MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, na qual se realizou - por meio de uma análise na base de dados eletrônica Pubmed, Scielo, Health Systems Evidence e Cochrane Clinical Answers - uma busca ativa de artigos na língua inglesa publicados entre

os anos de 2010 a 2017. Inicialmente, 447 artigos foram encontrados a partir dos seguintes descritores e operadores booleanos: "circulation DNA" or "circulation tumor DNA" or "cell free DNA" or "liquid biopsy" and "lung cancer" and "EGFR"; porém, os artigos de revisão da literatura, de relato de caso e os artigos que não correlacionaram a mutação do EGFR da biópsia líquida com a biópsia tecidual foram excluídos. Com base nestes critérios, obteve-se um total de 25 artigos, dos quais avaliados individualmente e com agregação dos seus dados pôde-se chegar nas conclusões apresentadas neste trabalho. Não há conflito de interesses entre os autores.

RESULTADOS

A partir da análise dos dados obtidos (Tabela 1) foi possível observar uma grande variação na taxa de concordância (de 17,17 a 97,9%), a qual dependia do método escolhido.

A técnica com melhor taxa de concordância (97,9%), com mais resultados equivalentes segundo a análise, foi a Scorpion-ARMS. O Scorpion-ARMS é um método altamente específico e sensível e que apresenta uma alta relação de detecção em comparação com as outras técnicas estudadas, tais como as de PCR como ddPCR, análise de derretimento de alta resolução (HRM) e espectrometria de massa combinada.

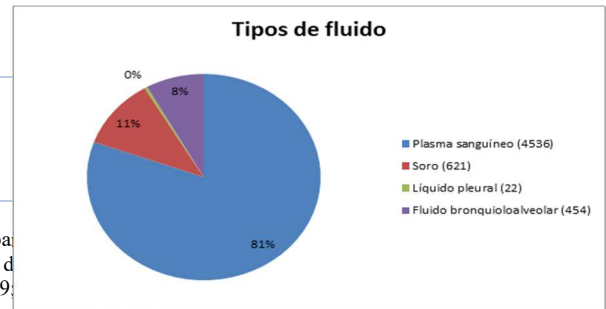
Tabela 1: Análise dos estudos avaliados

Referência	Técnica utilizada para obter DNA tumoral em fluidos	Número de amostras totais	Tipo de fluido	Taxa de concordância entre biopsia líquida e tecido	Referência	Técnica utilizada para obter DNA tumoral em fluidos	Número de amostras totais	Tipo de fluido	Taxa de concordância entre biopsia líquida e tecido
Zhu et al 2015 ⁹	ddPCR	86	Plasma sanguíneo	94,19% para o éxon 19 e 93,02% para L858R	Mok et al 2015 ¹⁹	PCR cobas 4800 FFPET	238	Plasma Sanguíneo	88%
Ishii et al 2015 ¹⁰	ddPCR	17	Plasma Sanguíneo	83,3%	Wu et al 2010 ²⁰	Cromatografia líquida de alta performance desnatitante	79	Plasma Sanguíneo	79,7%
Lin et al 2014 ¹¹	HRM	22	Líquido Pleural	95,5%	Brevet et al 2011 ²¹	Espectrometria de massa combinado com me-PCR	31	Plasma Sanguíneo	61% (36% para deleção no éxon 19 e 75% para mutação L858R no éxon 21).
Lee et al 2016 ¹²	ddPCR	365	Plasma Sanguíneo	87,9% para L858R e 86,2% para deleção no éxon 19	Zhu et al 2017 ²²	ddPCR	113	Plasma Sanguíneo	Mutação no L858R: Sensibilidade: 75,61%
Guo et al 2015 ¹³	Scorpion-ARMS, PCR, espectrometria ultravioleta	198	Plasma Sanguíneo	17,17%	Xu et al 2015 ¹⁴	NGS	42	Plasma Sanguíneo	76% Deleção no éxon 19: sensibilidade: 82,61%
Seki et al 2017 ¹⁵	Picolitro-ddPCR	35	Plasma Sanguíneo	80%	Li et al 2017 ²³	ddPCR	160	Plasma	DNA plasmático: estágios iniciais: 32% Estágios avançados 93%
Duan et al 2015 ¹⁶	Scorpion-ARMS	94	Plasma Sanguíneo	80%	Park et al 2017 ²⁴	PNAmatediated PCR clamping method	20	Fluido broncoalveolar	91,7%
Wu et al 2014 ¹⁷	Sistema de Mutação Refractora de Amplificação ADX (ADX-ARMS) e PCR	434	Lavagem broncoalveolar, escarro, derrame pleural	92,08%	Iwama et al 2016 ²⁵	ddPCR e NGS	32	Plasma Sanguíneo	ddPCR: 81,3% e NGS: 71,9%
Que et al 2016 ¹⁸	PCR mutante enriquecido (me-	121	Plasma Sanguíneo	85,1%	He et al 2017 ²⁶	ddPCR	120	Plasma Sanguíneo	95%

Author	Method	Number of Samples	Fluid Type	Findings
Wu et al 2016 ²⁷	PCR quantitativo em tempo real	621 (287 para soro e 334 para plasma)	Plasma e Soro Sanguíneo	No soro: 28,6% (82/287) No Plasma: 60,5% (202/334)
Wan et al 2017 ²⁸	PCR ARMS	644	Plasma Sanguíneo	84,9%
Douillard et al 2014 ²⁹	PCR ARMS	652	Plasma Sanguíneo	94,3%
Chae et al 2016 ³⁰	ddPCR	170	Plasma Sanguíneo	91,9 - 93,9%
Ma et al 2016 ³¹	EGMS do ARMS	219	Plasma Sanguíneo	82%
Douillard et al 2014 ³²	QiagenQIAamp circulation nucleic acid e Scorpion ARMS	652	Plasma Sanguíneo	96,5% para deleção do éxon 19; 97,9% para mutações pontuais em L858R do éxon 21
Wang et al 2013 ³³	QiagenQIAamp circulation nucleic acid e PCR	134	Plasma Sanguíneo	59%

Dentre os fluidos avaliados, dos 25 artigos, 21 deles utilizaram o plasma sanguíneo como escolha, o que correspondem a um total de 84% dos estudos analisados. O plasma sanguíneo também foi utilizado em outro estudo, como técnica complementar ao soro, o qual elevou o plasma sanguíneo como fluido de eleição para realização de biopsia líquida em 88% dos casos. O número total de amostras utilizadas no estudo foi de 5633, das quais 4536 - o que correspondem a um total de 80,52% - são referentes ao plasma sanguíneo. Apenas 1097 (19,47%) das amostras utilizaram como fluidos de eleição o líquido pleural, fluido bronquioalveolar e soro (Gráfico 1).

Gráfico 1
 Deleção no éxon 19 e L858R



A mutação T790M presente no éxon 20 do gene EGFR no câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) está presente em mais de 60% dos pacientes resistentes ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase, tais como gefitinib, erlotinib e afatinib.⁹⁻¹¹ Na

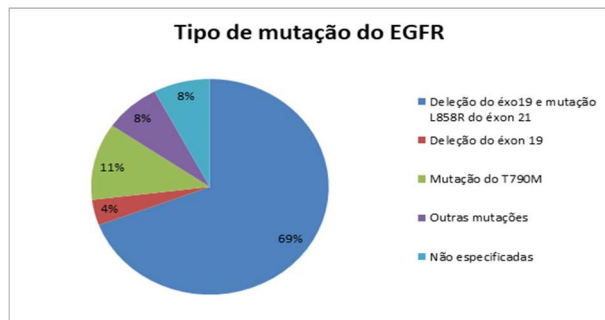
Abreviações: ME-PCR: Mutant-Enriched PCR; ddPCR: digital droplet Polymerase Chain Reaction; PNA: Peptide Nucleic Acid; NGS: Next-Generation Sequencing; ARMS: Amplification-Refractory Mutation System.

presente análise observa-se uma prevalência de 69% de estudos detectando deleção do éxon 19 e mutação no L858R do éxon 21, 4%

detectando apenas deleção de partes do éxon 19, 11% de mutação T790M, 8% não especificaram as mutações e 8% detectaram outras mutações, tais como Tp53, KRAS, APC e CDKNA. (Gráfico 2).

Gráfico

2



No número total de amostras avaliadas em todos os artigos, as porcentagens de detecção de mutações mudam, revelando que apenas 2,51% detectaram mutação no T790M, 3,8% detectaram outras mutações (Tp53, KRAS, APC, CDKN2a), 5,3% não especificaram, 88,2% das amostras detectaram deleção do éxon 19 e 80,2% detectaram mutação no L858R do éxon 21, sendo que todas as amostras que detectaram mutação do éxon 21 também detectaram mutação do éxon 19. Isso mostra que uma está intimamente atrelada a outra. (Gráfico 3).

Gráfico 3



DISCUSSÃO

O tratamento tradicional de primeira linha de NSCLC avançado geralmente envolve combinação de tratamento cirúrgico com quimioterapia a base de platina. Porém, nos últimos anos, os inibidores de tirosina-quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR-TKI) foram amplamente utilizados na terapia de pacientes com NSCLC, com mutação em EGFR, apresentando menos efeitos adversos e mostrando-se capazes de interromper o desenvolvimento de NSCLC e de prolongar a vida de pacientes em estágios avançados da doença. Contudo, o efeito curativo do EGFR-TKI foi amplamente associado ao estado do receptor de EGFR e ao espectro de mutação. Os tumores que abrigam essas mutações sensíveis ao TKI, quase sempre adquirem resistência às TKIs dentro de dois anos. O mecanismo de resistência que representa 60% dos casos é a ocorrência da mutação secundária T790M. Posto isto, sua detecção tornou-se um evento importante no rastreamento e

na decisão de o paciente se beneficiar ou não da terapia direta com EGFR-TKI.^{9,11-13,15,16}

Antigamente, a única forma de se realizar a detecção dessas mutações era por meio de biopsia tecidual obtida por broncoscopia ou toracoscopia. Entretanto, esses métodos invasivos - muitas vezes associados a complicações - não podiam ser realizados no paciente devido ao seu baixo status performance. Em razão disso, cada vez mais tem-se difundido a ideia de identificar essas mutações por intermédio da biopsia líquida. As vantagens do uso de ctDNA para detecção de mutação tumoral incluem i) coleta não invasiva, ii) disponibilidade a qualquer momento durante o curso da doença, iii) detecção e monitoramento em tempo real da dinâmica dos biomarcadores e iv) problemas de heterogeneidade potencialmente menores do que os testes de tecido tumoral.^{9,11,18}

Apesar disso, existem muitos desafios técnicos no teste de ctDNA para detecção de mutações no EGFR em NSCLC. Não há consenso sobre qual método deve ser utilizado e nem se biopsia líquida é equivalente a tecidual. No presente estudo pôde-se concluir que um dos métodos com melhor taxa de concordância - com essa girando em torno de 87,6% - foi o ddPCR. Droplet Digital PCR (ddPCR) é um método para executar PCR digital que se baseia na tecnologia de gotas de emulsão água-óleo.

Uma amostra é fracionada em 20000 gotículas e a amplificação por PCR das moléculas de molde ocorre em cada gota individual.¹⁸ A partição de amostra maciça é um aspecto chave da técnica ddPCR. Utilizando esse método altamente preciso de análise de PCR digital, este estudo demonstrou concordância relativamente alta com estudos anteriores que já haviam investigado o estado de mutação EGFR em amostras de pré-tratamento por meio do ddPCR.^{9,18} Esses resultados sugerem que a PCR digital pode ser um método viável e clinicamente aplicável para a detecção da mutação T790M no ctDNA plasmático.

Também foi avaliada a taxa de concordância entre diversas técnicas de detecção de ctDNA em variados fluidos corporais. De acordo com os resultados obtidos, percebeu-se que há um predomínio da utilização do plasma sanguíneo como líquido biológico. Em 25 estudos analisados, 22 utilizaram o plasma sanguíneo como fonte para captação de ctDNA. A explicação para isso é que o plasma sanguíneo é verificado através do sangue periférico - material de fácil obtenção -, e a sensibilidade de detecção de mutações é dependente da quantidade de DNA tumoral circulante presente no plasma, o que torna o método mais fidedigno. Esta quantidade é variável e inerente a cada paciente. O exame por biopsia líquida para pesquisa de mutação EGFR em plasma é especialmente indicado para

pacientes em pré-tratamento e que possuem alguma restrição em realizar o diagnóstico molecular em material de tumor. Ele também pode ser indicado para pacientes que estão em acompanhamento da resposta terapêutica ao tratamento com inibidores de tirosina-quinase.^{9,11,19}

A detecção de amostras de plasma pode fornecer uma maneira não invasiva de obter informações genóticas e, portanto, tem perspectivas de aplicação amplas no futuro. Como o tamanho da amostra foi significativa utilizando esse fluido, é considerável que este deva ser usado para os métodos de isolamento e medição de ctDNA - principalmente por meio do Scorpion-ARMS -, na esperança de melhorar a sensibilidade da detecção de EGFR e de todo impacto que isso pode trazer para a avaliação e prognóstico do paciente com NSCLC.

CONCLUSÃO

Da perspectiva de saúde pública, é vantajoso tornar a biopsia líquida um instrumento de diagnóstico e principalmente de manejo terapêutico nos casos de câncer de pulmão (NSCLC), uma vez que apresenta vantagens em relação à biopsia tradicional: é um procedimento menos invasivo, de fácil execução e que pode ser repetido com mais frequência.

A detecção de mutações no EGFR é indispensável para tomar decisões terapêuticas quanto à utilização de EGFR-TKIs no câncer de pulmão. Aliás, a biopsia líquida é um método relativamente sensível e altamente específico quando avalia a detecção de mutações no EGFR. No entanto, o estado de mutação no EGFR no plasma não pode substituir uma biopsia de tecido tumoral. Os resultados positivos da mutação de EGFR detectados no plasma são razoavelmente confiáveis, mas os resultados negativos são dificultados por uma alta taxa de falsos negativos.

Além disso, apesar do presente estudo ter mostrado que a detecção das mutações no EGFR na biopsia líquida ser mais eficaz por meio do Scorpion-ARMS, ainda não existe padronização entre as equipes sobre qual método deve ser utilizado. Conseqüentemente há uma significativa diferença na taxa de concordância entre os métodos, a qual inviabiliza sua utilização na prática clínica rotineira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bernabé R, Hickson N, Wallace A, Blackhall FH. What do we need to make circulating tumour DNA (ctDNA) a routine diagnostic test in lung cancer? *Eur J Cancer*. 2017 Aug;81:66-73.
2. Ruppert AM, Wislez M, Poulot V, Lacave R, Antoine M, Cadranet J. A simple view on lung cancer biology:

- The EGFR pathway. *Rev Mal Respir.* 2011 Apr;28(4):565-77.
- Lopes GL, Vattimo EF, Castro Junior Gd. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J BrasPneumol.* 2015 Jul-Aug;41(4):365-75.
 - Pietrasz D, Pécuchet N, Fabre E, Blons H, Chevalier L, Taly V, et al. What future for circulating tumor DNA? Current data and prospects in colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancers. *Bull Cancer.* 2016 Jan;103(1):55-65.
 - Santarpia M, Karachaliou N, González-Cao M, Altavilla G, Giovannetti E, Rosell R. Feasibility of cell-free circulating tumor DNA testing for lung cancer. *BiomarkMed.* 2016;10(4):417-30.
 - Lin CC, Huang WL, Wei F, Su WC, Wong DT. Emerging platforms using liquid biopsy to detect EGFR mutations in lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(11):1427-40.
 - Huang WL, Chen YL, Yang SC, Ho CL, Wei F, Wong DT, et al. Liquid biopsy genotyping in lung cancer: ready for clinical utility? *Oncotarget.* 2017 Mar 14;8(11):18590-18608.
 - Reclusa P, Sirera R, Araujo A, Giallombardo M, Valentino A, Sorber L, et al. Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res.* 2016 Oct;5(5):483-491.
 - Zhu G, Ye X, Dong Z, Lu YC, Sun Y, Liu Y, McCormack R, Gu Y, Liu X. Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced None Small Cell Lung Cancer. *J Mol Diagn.* 2015 May;17(3):265-72
 - Ishi H, Azuma k, Sakai K, Kawahara A, Yamada K, Tokito T, et al. Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: Correlation with paired tumor samples. *Oncotarget.* 2015 Oct 13; 6 (31).
 - Lin J, Gu Y, Du R, Deng M, Lu Y, Ding Y. Detection of EGFR Mutation in supernatant, cell pellets of pleural effusion and tumor tissues from non-small cell lung cancer patients by high resolution melting analysis and sequencing. *Int J Clin Pathol.* 2014 Dec 1;7(12):8813-22
 - Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, et al. Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget.* 2016 Feb 9;7(6):6984-93
 - Guo K, Zhang Z, Han L, Han J, Wang J, Zhou Y, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in Chinese patients with early-stage non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2015; 8: 3289-3296
 - Xu S, Lou F, Wu Y, Sun DQ, Zhang JB, Chen W, et al. Circulating tumor DNA identified by targeted sequencing in advanced-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett.* 2016 Jan 28;370(2):324-31
 - Seki Y, Fujiwara Y, Kohno T, Takai E, Sunami K, Goto Y, et al. Picoliter-Droplet Digital Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cell-Free Plasma DNA to Assess EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma That Confer Resistance to Tyrosine-Kinase Inhibitors. *Oncologist.* 2016 Feb;21(2):156-64.
 - Duan H, Lu J, Lu T, Gao J, Zhang J, Xu Y, et al. Comparison of EGFR

- mutation status between plasma and tumor tissue in non-small cell lung cancer using the Scorpion ARMS method and the possible prognostic significance of plasma EGFR mutation status. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Oct 1;8(10):13136-45
17. Wu CY, Hou LK, Ren SX, Su B, Chen G. High Feasibility of Liquid-Based Cytological Samples for Detection of EGFR Mutations in Chinese Patients with NSCLC. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(18):7885-9.
 18. Que D, Xiao H, Zhao B, Zhang X, Wang Q, Xiao H, et al. EGFR mutation status in plasma and tumor tissues in non-small cell lung cancer serves as a predictor of response to EGFR-TKI treatment. *Cancer Biol Ther.* 2016;17(3):320-7
 19. Mok T, Wu YL, Lee JS, Yu CJ, Sriuranpong V, Sandoval-Tan J, et al. Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Personalized Medicine and Imaging.* 2015 March 31;7(3)
 20. Wu M, Zhao J, Song SW, Zhuo M, Wang X, Bai H, et al. EGFR mutations are associated with prognosis but not with the response to front-line chemotherapy in the Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010 Mar;67(3):343-7.
 21. Brevet M, Johnson ML, Azzoli CG, Ladanyi M. Detection of *EGFR* mutations in plasma DNA from lung cancer patients by mass spectrometry genotyping is predictive of tumor *EGFR* status and response to EGFR inhibitors. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2011;73(1):96-102.
 22. Zhu YJ, Zhang HB, Liu YH, Zhang FL, Zhu YZ, Li Y, et al. Quantitative Cell-free Circulating EGFR Mutation Concentration is Correlated with Tumor Burden in Advanced NSCLC Patients. *Lung Cancer.* 2017 Jul;109:124-127.
 23. Li F, Huang J, Ji D, Meng Q, Wang C, Chen S, et al. Utility of urinary circulating tumor DNA for EGFR mutation detection in different stages of non-small cell lung cancer patients. *Clin Transl Oncol.* 2017 May 11.
 24. Park S, Hur JY, Lee KY, Lee JC, Rho JK, Shin SH, et al. Assessment of *EGFR* mutation status using cell-free DNA from bronchoalveolar lavage fluid. *ClinChem Lab Med.* 2017 Feb 14.
 25. Iwama E, Sakai K, Azuma K, Harada T, Harada D, Nosaki K, et al. Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for *EGFR* activating mutations. *Ann Oncol.* 2017 Jan 1;28(1):136-141.
 26. He J, Tan W, Ma J. Circulating tumor cells and DNA for real-time EGFR detection and monitoring of non-small-cell lung cancer. *Future Oncol.* 2017 Apr;13(9):787-797.
 27. Wu YL, Sequist LV, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. EGFR mutation detection in circulating cell-free DNA of lung adenocarcinoma patients: analysis of LUX-Lung 3 and 6. *Br J Cancer.* 2017 Jan 17;116(2):175-185.
 28. Wan R, Wang Z, Lee JJ, Wang S, Li Q, Tang F, et al. Comprehensive analysis of the discordance of *EGFR* mutation status between tumor tissues and matched circulating tumor DNA in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2017 May 26.
 29. Chae YK, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Mohindra N, Kalyan A, et al. Concordance between genomic alterations assessed by next-generation sequencing in tumor tissue or

- circulating cell-free DNA. *Oncotarget*. 2016 Oct 4;7(40):65364-65373.
30. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*. 2014 Sep;9(9):1345-53.
31. Ma M, Shi C, Qian J, Teng J, Zhong H, Han B. Comparison of plasma and tissue samples in epidermal growth factor receptor mutation by ARMS in advanced non-small cell lung cancer. *Gene*. 2016 Oct 10;591(1):58-64.
32. Douillard J, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, et al. Gefitinib Treatment in EGFR Mutated Caucasian NSCLC: Circulating-Free Tumor DNA as a Surrogate for Determination of EGFR Status. *J Thorac Oncol*. 2014 Sep; 9(9): 1345–1353.
33. Wang S, Han X, Hu X, Wang X, Zhao L, Tang L, et al. Clinical significance of pretreatment plasma biomarkers in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2014 Mar 20;430:63-70