



Continguts: <http://www.acclc.cat/volumen/vol-19/>

In vitro veritas

Pàgina web de la revista: <http://www.acclc.cat/invitro/>



Revisió

DNA lliure circulant: un nou concepte de marcador tumoral

Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

Secció de Biomarcadors Oncològics¹

Jaume Trapé Pujol^a, Marina Carbonell Prat^b, Catrina Colomé Mallolas^c, Josep Maria Augé Fradera^d, Xavier Filella Pla^d, Laura Foj Capell^e, María Luisa Granada Ybern^f, Sílvia Miró Cañís^b, Marta de Ramon Amat^g.

^a Departament de Diagnòstic Biològic, Servei d'Anàlisis Clíniques, Althaia Xarxa Assistencial Universitària de Manresa F.P. Manresa.

^b Laboratori d'Anàlisis Clíniques, Consorci del Laboratori Intercomarcal de l'Alt Penedès, Anoia i Garraf (CLI), Vilafranca del Penedès.

^c Laboratori d'Anàlisis Clíniques CATLAB, Viladecavalls, Barcelona.

^d Servei de Bioquímica i Genètica Molecular (CDB), Hospital Clínic, Barcelona.

^e Labco diagnostics, Synlab group, Barcelona.

^f Servei de Bioquímica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

^g Laboratori de Referència de Catalunya, El Prat de Llobregat.

¹ Membres de la Secció de Biomarcadors Oncològics durant la preparació d'aquest document: Josep Maria Augé Fradera, Marina Carbonell Prat, Catrina Colomé Mallolas, Xavier Filella Pla (coordinador), Laura Foj Capell, María Luisa Granada Ybern, Sílvia Miró Cañís, Marta de Ramon Amat, Jaume Trapé Pujol.

Adreça de correu electrònic per l'autor de la correspondència: jtrape@althaia.cat

2018 © Publicat per l'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

1. Què és el DNA lliure de cèl·lules?

El terme DNA lliure de cèl·lules, DNA extracel·lular o DNA circulat (a partir d'ara *cfDNA*) agrupa tant el DNA d'origen nuclear com el mitocondrial. Com indica el seu nom, es troba en el medi extracel·lular: sang, saliva, líquid cefaloraquídi, bilis, orina, llet i altres.

Els primers a descriure la presència de DNA en la fracció lliure de cèl·lules de la sang van ser Madel i Metais (1) el 1948. L'any 1966 Tan *et al.* (2) van demostrar la presència de *cfDNA* en pacients amb lupus eritematos sistèmic, en els quals s'observava la formació d'anticossos dirigits contra el DNA de doble cadena. En el camp de l'oncologia, Leon *et al.* (3) van descriure el 1977 una major concentració de *cfDNA* en pacients amb càncer que en individus sans.

Respecte a l'origen del *cfDNA* existeixen diferents teories no necessàriament excloents:

- Mecanisme passiu: durant els processos de destrucció cel·lular d'apoptosi i necrosi les cèl·lules alliberen DNA nuclear i mitocondrial al torrent circulatori. En condicions fisiològiques els fagòcits eliminen les restes d'aquests processos de manera que la concentració de *cfDNA* en individus sans és baixa. En determinades condicions, com ara l'existència d'un tumor, una inflamació o un exercici extenuant, aquesta depuració cel·lular no és prou eficient, la qual cosa condueix a l'acumulació de restes cel·lulars incloent el *cfDNA*.

- Mecanisme actiu: les cèl·lules poden alliberar activament *cfDNA* a través de diferents tipus de partícules que veurem a l'apartat següent.

Quan l'alliberament es produeix des de cèl·lules tumorals circulants (CTC), la concentració de *cfDNA* aportat per aquest tipus de cèl·lules és molt baixa, de 100 a 1000 vegades inferior a la del *cfDNA* alliberat pels mecanismes comentats anteriorment.

Les funcions fisiològiques exactes del *cfDNA* es desconeixen, però s'ha vist que pot presentar mutacions amb capacitat oncogènica, podent transformar cèl·lules susceptibles localitzades a llocs distants (4, 5) i capacitat proinflamàtoria, interaccionant amb diferents receptors com l'anomenat en anglès *toll like receptor 9* (TLR9) de neutròfils, activant la secreció de citocines per l'acció del factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF-KB), entre altres.

2. Quins són els orígens del *cfDNA*?

Els àcids nucleics es troben associats a altres molècules o bé formant partícules. Les principals estructures on podem trobar els àcids nucleics circulants són les següents (6):

Nucleosomes

Estructures formades per DNA de doble cadena (180-200 pb) unit a un octàmer d'histones. La repetició d'aquestes estructures, connectades entre si per DNA de doble cadena dona lloc als oligonucleosomes.

Recentment s'ha trobat que els nucleosomes procedents de cèl·lules tumorals són més petits (145 pb) que els procedents de cèl·lules sanes (180 pb) (7, 8).

Microvesícules

Estructures formades per membranes lipídiques que encapsulen un compartiment aquós que conté constituents cel·lulars, incloent-hi àcids nucleics. Aquestes poden ser exosomes, ectosomes i cossos apoptòtics, secretats en majors quantitats per les cèl·lules tumorals que per les cèl·lules sanes. També s'ha vist que contenen DNA procedent del tumor i tenen capacitat transformant (9, 10).

Exosomes

Microvesícules que mesuren de 30 fins a 200 nm de diàmetre, amb diferents propietats funcionals i biològiques, entre les quals destaquen la capacitat de transferir material d'una cèl·lula a una altra. Estan formades per una coberta lipídica, proteïnes, microRNA, RNA missatger i petites quantitats de DNA (11). Concretament, de DNA als exosomes se n'han caracteritzat dos tipus: un d'extern unit a la capa lipídica i de mida gran (2,5 kpb) i un d'intern de mida inferior (entre 0,1 i 2,5 kpb).

Ectosomes

Estructures constituïdes per fragments de membrana cel·lular, d'un diàmetre entre 200 i 1000 nm, majors que els exosomes (12). Es creu que la seva formació prové del remodelat de les membranes citoplasmàtiques durant els processos d'activació o d'apoptosi cel·lular. Contenen tant DNA com RNA (13).

Cossos apoptòtics

Durant el procés de mort cel·lular programada es formen vesícules en la membrana d'una mida entre 1 i 5 µm que s'alliberen de la cèl·lula. Aquests cossos contenen DNA degradat que correspon al de la cèl·lula que s'està morint. L'estructura de la membrana manté els àcids nucleics fora de l'abast de DNAases i RNAases. També s'ha descrit el seu alliberament per part de cèl·lules no apoptòtiques.

Virtosomes

Partícules sintetitzades *de novo* formades per proteïnes, fosfolípids, RNA i DNA. Es creu que la lipoproteïna que contenen té la funció de protegir els àcids nucleics de la seva degradació. S'ha suggerit que podrien actuar com un missatger intercel·lular.

Trampa extracel·lular de DNA de neutròfils (*neutrophils extracellular DNA, Trap NET*)

Quan els neutròfils entren en contacte amb un microorganisme patògen, o altres estímuls, experimenten un procés anomenat netosi (de l'anglès NETosis, acrònim de *neutrophils extracellular trap*) en el qual es produeix la descondensació de la cromatina, la lisi cel·lular i la formació de trampes extracel·lulars de DNA. L'origen d'aquest DNA és nuclear i mitocondrial. Aquestes estructures tenen com a funció atrapar i destruir patògens i cèl·lules que puguin estimular aquest procés. L'activació de la netosi, a part d'en les infeccions, es produeix també en les malalties autoimmunes, càncer, sèpsia, malaltia trombòtica i en la resposta inflamatòria. En tots aquests casos s'ha descrit una concentració molt elevada de DNA circulant.

Trampa extracel·lular de DNA d'eosinòfils (*eosinophils extracellular DNA, Trap EET*)

Els eosinòfils es troben entre les cèl·lules inflamatòries que infiltren el tumor, i són capaços d'alliberar DNA mitocondrial. A diferència dels neutròfils, la secreció de DNA és un procés actiu.

Complexos DNA-proteïnes

El DNA és una molècula amb una gran càrrega negativa, per tant es trobarà unida a proteïnes formant complexos. La variació en la concentració de les proteïnes, especialment les immunoglobulines, pot fer variar molt la concentració de DNA en el plasma.

DNA unit a la superfície de cèl·lules

S'han trobat fragments petits (20 kpb) de DNA i RNA units a la superfície de leucòcits i eritròcits.

A la figura 1 es mostren de forma esquematitzada les principals estructures dels àcids nucleics circulants.

3. Mida del *cfDNA*

La majoria de *cfDNA* presenta una mida d'unes 180 kpb, que conforma l'estructura del nucleosoma.

Hi ha discrepàncies entre els diferents autors sobre la mida del *cfDNA* en els pacients amb càncer. Alguns autors han trobat un augment de la integritat en presència de neoplàsia, és a dir,

fragments de DNA més grans (al voltant de 188 kpb) que en individus sans (14, 15, 16). Altres autors, en canvi, estudiant models de ratolí xenoinjertat amb SW620 amb KRAS humà mutat (17, 18), han trobat que el DNA procedent del tumor presenta una mida més petita (al voltant de 145 kpb o inferior).

A més a més, quan s'estudiava la distribució del DNA mutat en funció de la mida dels fragments, es va trobar que els més petits tenien una gran proporció de DNA mutat, mentre que aquesta proporció era molt petita en els més grans.

S'especula que la fracció de *cfDNA* de mida més gran derivaria de les cèl·lules que envolten el tumor, originant-se durant els processos de necrosi d'aquestes, mentre que el *cfDNA* de menor mida seria el derivat de cèl·lules tumorals.

Diferenciació entre *cfDNA*, *ctDNA* i CTC

Com ja s'ha apuntat anteriorment, dins el *cfDNA* total, hi podem diferenciar diverses fraccions:

- DNA que conté les mutacions, deleccions, reorganitzacions i amplifícacions que únicament estaran presents en les cèl·lules tumorals (*ctDNA*).
- DNA procedent de les cèl·lules que envolten el tumor originat a partir dels processos d'apoptosi/necrosi cel·lulars.

Un altre concepte és el de les cèl·lules tumorals circulants (CTC), les quals no contribueixen a la concentració del *cfDNA* en sang, s'identifiquen mitjançant la determinació de citoqueratines, i són molt útils en la monitorització del tractament i pronòstic de la malaltia (19). Tanmateix, el seu aïllament i la determinació del DNA que contenen pot aportar informació de la part del tumor de la qual procedeixen.

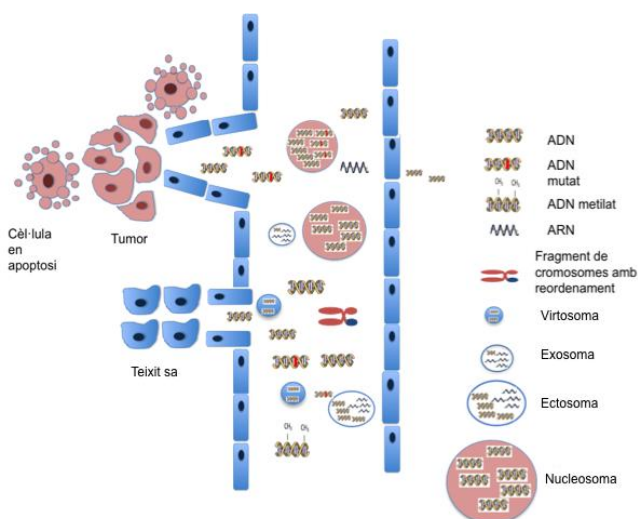


Figura 1. Principals estructures dels àcids nucleics circulants.

4. Fonts de variabilitat de les concentracions de *cfDNA*

Les fonts de variabilitat de la concentració de *cfDNA* en la sang poden ser diverses: variabilitat biològica que explica la variabilitat entre pacients amb el mateix tipus de càncer, variabilitat metroològica (diferents sensibilitats depenent del procediment emprat) o interferència per possibles fonts contaminants de DNA generades sobretot a la fase preanalítica. D'altra banda, la concentració de *cfDNA* també pot dependre del tipus de neoplàsia, amb valors que poden oscil·lar entre el 0,01 % i el 90 % respecte al *cfDNA* total (20, 21).

5. Consideracions preanalítiques en la determinació de *cfDNA*

Algunes de les variables que afecten la concentració de *cfDNA* a la fase preanalítica són:

La matriu

Diverses publicacions han demostrat que el plasma és la millor matriu per determinar *cfDNA*. Tot i que el *cfDNA* és més abundant en el sèrum, es creu que la majoria prové de contaminació de DNA genòmic (fragments més llargs) alliberat durant la lisi cel·lular que té lloc durant la retracció del coàgul. A més, el *cfDNA* es pot trobar associat a partícules, capaces d'unir-se a fibrina i fibrinogen, la qual cosa podria traduir-se en una pèrdua de *cfDNA* clínicament significatiu si s'analitzessin mostres de sèrum.

Processament de la mostra

És necessari utilitzar material descontaminat, és a dir, lliure de cèl·lules que poguessin alliberar *cfDNA*. Es recomana realitzar una microcentrifugació o filtració prèvia centrifugació de les mostres per tal d'assegurar que el plasma està lliure de tot element cel·lular. Sembla que el nombre de centrifugacions també pot afectar la concentració de *cfDNA* de manera directament proporcional.

Anticoagulants

Els més emprats són l'EDTA, l'heparina i el citrat. Si l'anàlisi es duu a terme abans de 6 hores de l'extracció de la mostra, qualsevol dels anteriors és correcte. Si se superen les 24 hores, és més recomanable utilitzar EDTA.

Temps de processament

Tot i que es coneix que durant el temps que passa entre l'extracció i el processament de la mostra, la concentració de *cfDNA* va augmentant, hi ha molta disparitat d'opinions. Alguns autors han observat que la concentració de *cfDNA* augmenta significativament al cap de 2 hores postextracció i n'hi ha d'altres que apunten que no es modifica durant les primeres 24 hores.

Tipus de tub

S'ha comprovat que part del *cfDNA* que conté la mostra es pot perdre a causa de la seva adsorció a les parets dels tubs. El plàstic polipropilè és un dels materials més emprats en la fabricació de tubs que s'utilitzen en l'àmbit hospitalari i s'ha demostrat que pot interaccionar amb el DNA provocant canvis

conformacionals com la desnaturalització. Per aquest motiu s'aconsella utilitzar tubs de polial·lòmer, que tot i ser més cars, són més adequats per l'emmagatzematge del *cfDNA*.

Presència d'agents inhibidors/contaminants

S'ha observat que durant el procés de congelació de les mostres de *cfDNA* ja aïllat, petites traces de ions metàl·lics com el coure (2+) i el ferro (2+) desestabilitzen els complexos lípids-DNA, causant dany al material genètic. Afegint quelants de tipus tampó fosfat salí (PBS) a les mostres, es redueix la formació de radicals lliures i es manté la integritat del DNA (22).

6. Principals procediments per a la determinació de *cfDNA* i *ctDNA*

6.1 *cfDNA*

Històricament, el procediment més utilitzat per al mesurament de la concentració i la determinació qualitativa del *cfDNA* és el basat en l'espectrofotometria, que permet determinar la quantitat i la puresa o integritat del DNA present en una mostra. Aquest procediment es basa en la mesura de l'absorció ultraviolada per part dels nucleòtids. El quocient de densitats òptiques (DO): DO_{260}/DO_{280} determina la puresa del DNA, sent acceptable un resultat igual o superior a 1,8 (22). Tot i ser un procediment fàcil relativament sensible i que no requereix una corba de calibratge, presenta certes limitacions: la presència d'agents contaminants, com les proteïnes, DNA de cadena senzilla, RNA o nucleòtids lliures que contribueixen a la DO_{260} , poden provocar una sobreestimació de la concentració total de *cfDNA*; a més aquest procediment no és capaç de distingir entre fragments de diferents longituds de *cfDNA* ni diferenciar entre DNA de doble cadena o de cadena senzilla (22, 23).

Altres procediments, com l'ús de sondes fluorescents que s'uneixen específicament a DNA de doble cadena, s'han utilitzat per al mesurament de la concentració del *cfDNA*. Idealment, aquests fluorocroms tenen alta afinitat pels àcids nucleics, evitant així la interferència provocada pels contaminants comentats anteriorment. La concentració de *cfDNA* serà proporcional a la fluorescència emesa. Tanmateix però, aquest procediment tampoc permet diferenciar entre les diferents fonts de DNA, de manera que davant d'una infecció (viral, bacteriana o fúngica), per exemple, el *cfDNA* procedent dels microorganismes també contribueix al càlcul final de la concentració de *cfDNA*.

Per tots aquests motius, el procediment més emprat actualment i d'elecció per determinar la quantitat i la qualitat del *cfDNA* és la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa (qPCR). La reacció consta de tres etapes que es van repetint contínuament (desnatura, hibridació i extensió del motlle de DNADN). Per fer-ho s'utilitza una DNA polimerasa termoestable, dos encebadors específics, desoxiribonucleòtids (dNTP), clorur de magnesi, un tampó de reacció adequat i aigua per PCR (24).

Des del punt de vista de la detecció del producte amplificat, es poden utilitzar diversos procediments, els més utilitzats dels quals són els següents: el que empra una sonda amb doble marcat fluorescent (TaqMan) específica de la seqüència amplificada; i l'anomenat SYBR Green, que utilitza una substància intercalant que s'uneix a la doble cadena de DNA i produeix una emissió de fluorescència.

Els gens o seqüències que se solen amplificar són les seqüències Alu, l'ERV-3, la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTert), la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, la β -actina i la β -globina. D'aquests, amb el que s'obtenen rendiments de quantificació més alts és amb el gen de la β -globina (22, 24).

6.2 *ctDNA*

Els procediments de què es disposa actualment per la detecció de *ctDNA* es poden dividir en dos grups; els que detecten mutacions específiques ja conegudes, com els basats en la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR), PCR digital (dPCR), i BEAMing (acrònim de l'anglès *beads, emulsion, amplification and magnetics*); i els basats en la seqüenciació de nova generació completa d'exomes o genoma (NGS, acrònim de *next generation sequencing*) (25).

6.2.1 PCR digital (dPCR)

L'estratègia que segueix la dPCR es pot resumir en la premissa "divideix i venceràs". La mostra que conté el *cfDNA* extret es reparteix en centenars o milers de pouets o cambres de reacció diferents, on és amplificat i analitzat de manera independent (Figura 2) (26, 27).

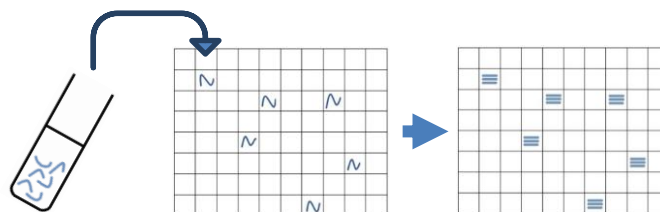


Figura 2. Compartimentació en la PCR digital.

Pel que fa a l'amplificació, s'utilitzen els mateixos reactius que per PCR quantitativa convencional, ja esmentats anteriorment.

L'estadística de Poisson, que descriu una distribució aleatòria, assumeix que cada compartiment pot contenir zero o diverses còpies de la seqüència senyal d'interès, de manera que hi haurà compartiments "negatius" (on no es produirà amplificació) i "positius" (on es produirà l'amplificació del gen mutat d'interès). Assumint que els compartiments de reacció no s'han saturat, a partir del recompte de positius i negatius es pot estimar la concentració total de *cfDNA* en la mostra original (26, 27, 28). A més particions, s'obtingran resolucions més altes.

Actualment es disposa de diverses plataformes de dPCR, però la que està més implementada als laboratoris clínics o centres

d'investigació és la basada en el procediment de goteta (*droplet* en anglès), o ddPCR (acrònim de *digital droplet PCR*). En aquesta variant de dPCR, la mostra de *cfDNA* es dispersa en una emulsió oliosa-aquosa generant-se milers de gotetes de reacció, cadascuna de les quals podrà contenir o no el *cfDNA* mutat, que s'amplificarà igual que anteriorment. Les gotetes que continguin el *cfDNA* mutat es marcaran mitjançant sondes fluorescents tipus "TaqMan" i es comptabilitzaran per citometria de flux (27).

El procediment basat en dPCR presenta sensibilitats que van del 0,01 % al 0,1 %, és a dir, que utilitzant els mateixos encebadors (*primers* en anglès) que en PCR convencional s'assoleix una sensibilitat i precisió superiors (28).

Es pot aplicar en la detecció de variants rares, en la variació del nombre de còpies d'un gen, o en la quantificació absoluta de biblioteques de seqüenciació massiva (NGS), entre altres (23, 27).

També permet analitzar diferències igual o menors al 30 % d'expressió gènica i identificar al·lels amb una freqüència d'1 entre 1000. Un dels seus grans avantatges és que no requereix l'ús de calibradors, al contrari que el procediment de la PCR quantitativa convencional. A causa d'aquesta compartimentació, també és menys sensible a la presència d'inhibidors de PCR, a diferència del procediment de la PCR quantitativa convencional, en la qual es requereixen més cicles per superar el llindar o obtenir el senyal d'amplificació (28).

6.2.2 BEAMing

El procediment basat en BEAMing (acrònim de l'anglès *beads, emulsion, amplification and magnetics*) constitueix una variant de la PCR en emulsió.

Partint del *cfDNA* present en la mostra de plasma es realitza una preamplificació utilitzant encebadors que introdueixen una seqüència senyal coneguda als amplicons resultants. Aquests s'amplifiquen novament via PCR d'emulsió, utilitzant encebadors dirigits contra aquestes seqüències senyal i units covalentment a unes perles magnètiques a través d'interaccions estreptavidina-biotina (26).

Aquest disseny permet que els productes generats en cada goteta de l'emulsió romanguin fixes a les microperles al final de la reacció, permetent la seva separació o purificació utilitzant un imant.

Així doncs, després de la purificació magnètica, el DNA amplificat s'hibrida amb oligonucleòtids complementaris marcats amb un fluoròfor, la qual cosa permetrà diferenciar, mitjançant citometria de flux, el nombre de variants mutades i habituals (*wildtype* en anglès) (Figura 3).

Aquest procediment també permet realitzar una lectura digital, ja que s'assumeix que cada goteta de l'emulsió conté una microperla magnètica i un amplicó de *cfDNA*. Això fa possible detectar variants rares amb freqüències iguals o superiors a 1/10000 (25).

És molt més sensible que altres procediments competitiu i un aspecte clau, en termes d'exactitud, és el d'utilitzar DNA polimerases d'alta fidelitat que minimitzin la taxa d'errors i que assegurin que la detecció de falsos positius o negatius no li restin valor diagnòstic.

Com a limitacions, el BEAMing només permet la detecció i quantificació de mutacions conegudes, sent un procediment complex i costós que requereix personal especialitzat, la qual cosa fa difícil la seva implementació a la pràctica clínica (25).

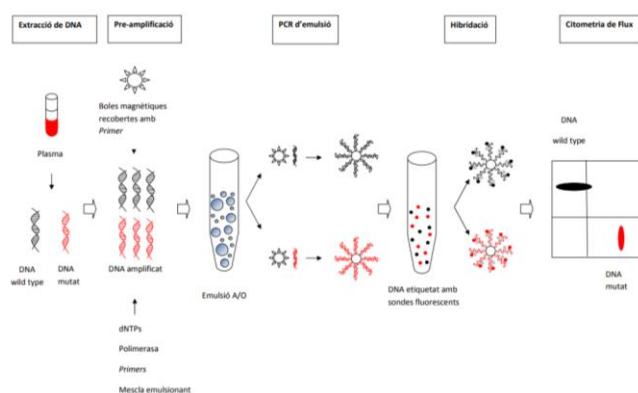


Figura 3. Etapes del procediment basat en BEAMing.

6.2.3 Procediments de seqüenciació massiva de nova generació

La seqüenciació de nova generació (NGS) també coneguda com a seqüenciació massiva, està basada en el mesurament de milions de seqüències curtes de molècules de DNA i la seva comparació amb una seqüència de referència. S'han desenvolupat múltiples aplicacions (moltes d'elles en el camp de l'oncologia), com la seqüenciació específica o seqüenciació completa de l'exoma o del genoma.

Tot i que presenta una elevada sensibilitat i especificitat, la taxa d'errors aleatoris de les plataformes de seqüenciació oscil·la entre el 0,1 i l'1 %, fent impossible la detecció de variants rares.

Actualment però, tot i que és capaç de detectar múltiples alteracions somàtiques de manera simultània, segueix sent un procediment costós, que consumeix molt de temps i que requereix personal especialitzat i un equip de bioinformàtics amb molta experiència en identificar mutacions rellevants (27).

A la taula 1 es presenta un quadre resum de les principals característiques dels procediments emprats en la determinació del *cfDNA*.

7. Utilitat clínica del *cfDNA*

El mesurament de la concentració del *cfDNA* total té baixa especificitat, ja que com s'ha comentat, hi ha diferents situacions clíniques que poden conduir a un increment de *cfDNA*, les quals inclouen l'exercici, la insuficiència renal crònica, qualsevol tipus de cirurgia, infart agut de miocardi, accidents vasculars, traumatismes, és a dir, situacions associades a un augment de la necrosi i la mort cel·lular. Així en vessaments pleurals, aquells que tenen una etiologia infecciosa, parapneumònics, tenen una concentració més elevada de *cfDNA* que els d'origen neoplàsic (29).

El *ctDNA* en canvi, té una gran capacitat de discriminació, ja que presenta les alteracions típiques del tumor.

No tots els tumors ni en tots els estadis presenten la mateixa capacitat per alliberar o secretar *ctDNA*. Així, Bettogowda *et al.* (14) descriuen en tumors localitzats una fracció detectable de *ctDNA* entre el 49 i el 78 % dels casos, mentre que en els tumors metastàtics és del 86 % al 100 % dels casos. En aquesta línia altres autors descriuen sensibilitats d'entre el 60 i 70 % en estadis inicials en càncer de còlon, mama, pulmó i ovari (30). També, Wang *et al.* (31) troba en càncer de pulmó una detecció del 53 % en estadis inicials (IA-IIIa) i del 88 % en estadis amb metastàsis. També existeixen diferències importants entre els diferents tumors. En tumors metastàtics, per exemple, la detecció de *ctDNA* en neoplàsies de bufeta, col·rectals, gastroesofàgiques i ovàriques era del 100 % mentre en neoplàsies de mama, pàncrees, cap i coll, melanoma, hepatocarcinoma i neuroblastoma era entre el 60 i el 80 %. Deteccions inferiors al 50 % les trobaven en medul·loblastoma, glioblastoma, carcinoma de cèl·lules renals, tiroide i pròstata (14).

Es necessiten analitzadors amb una alta sensibilitat ja que la quantitat i qualitat del DNA derivat del tumor pot ser molt variada. Actualment hi ha procediments disponibles capaços de monitoritzar anomalies genètiques associades a tumors que inclouen mutacions somàtiques, pèrdues d'heterozigosi i anormalitats cromosòmiques en sang amb freqüències tan baixes com 0,01 % (Taula 2) (15).

La determinació del *ctDNA* pot proporcionar informació crucial sobre la biologia del tumor, permetent trobar o distingir aquelles mutacions que s'han produït inicialment en el tumor primari de les que s'han produït *a posteriori* o en el procés de metastasi.

Per tant, el coneixement i l'anàlisi de les diferents estructures que conformen el *ctDNA* (gràcies al desenvolupament de procediments altament sensibles), pot contribuir al coneixement de l'evolució tumoral, especialment en el seguiment i la progressió, a orientar-nos sobre els mecanismes d'agressivitat del tumor i permetre l'adopció de tractaments individualitzats per a cada pacient.

7.1 Aplicacions clíniques de la determinació de *ctDNA*

7.1.1 Complement en el diagnòstic

El procediment de referència (*gold standard* en anglès) pel diagnòstic en oncologia és la biòpsia de teixit, en la qual el patòleg afirma o descarta la presència de cèl·lules neoplàsiques. Aquesta estratègia, però, presenta una sèrie de limitacions.

En primer lloc es tracta d'un procediment invasiu, no exempt de riscos o complicacions clíniques pel pacient. S'han descrit per exemple complicacions greus en el 17,1 % de les biòpsies toràciques i en l'1,6 % de les biòpsies abdominals (32). D'altra banda, l'accés al teixit pot ser difícil i el grau d'extensió o afectació tumoral pot ser molt variable, per la qual cosa moltes vegades no s'obté una mostra representativa del tumor i cal repetir la biòpsia. Finalment, cal tenir en

compte que una de les principals característiques de les neoplàsies és la inestabilitat genètica que condueix a l'heterogeneïtat del tumor. En el cas de tumors primaris hi pot haver zones que presentin una determinada mutació i en altres aquesta quedi absent; aquest fet és més evident en les metastàsis, en què s'ha descrit heterogeneïtat genètica entre el tumor primari, les metastàsis i les intermetastàsis. En pacients tractats amb quimioteràpia aquestes diferències encara s'evidencien més, ja que es pot produir una selecció positiva dels clons resistents.

Per tant, amb el material que s'obté d'una biòpsia no es poden determinar totes les alteracions genòmiques presents en el tumor i és per això que cal abordar la determinació de *ctDNA* en sang perifèrica, el qual sí que pot aportar informació de tot l'estat mutacional de la neoplàsia primària i les metastàsis; no coneixerem quina metastasi conté la mutació o si es troba en una part del tumor primari, però sí que es coneixerà la seva existència. S'ha descrit una concordança entre el *ctDNA* i les biòpsies del 96,6 % en l'EGFR en càncer de pulmó no microcític (33) i de 91 % en la detecció d'HER-2 en el càncer gàstric (34).

7.1.2 Malaltia mínima residual

Una altra potencial utilitat de la determinació de *ctDNA* és la detecció de la malaltia mínima residual. En pacients que reben tractament amb intenció curativa, especialment en el càncer de mama i en el col·rectal, la disminució de la concentració de *ctDNA* per sota del límit de detecció utilitzant procediments molt sensibles (<0,01 %) podria indicar absència de malaltia residual i, per tant, es podria saber quins pacients haurien de ser tractats amb quimioteràpia de rescat i quins no.

Diehl *et al.* (17) van descriure el 2008 en una sèrie curta, emprant un perfil de mutacions específiques per cada pacient, que la presència de *ctDNA* postoperatori presentava una especificitat excel·lent per detectar malaltia residual.

Resultats similars però no tan bons van ser obtinguts per Tie *et al.* (35) en pacients amb càncer col·rectal en estadi II. Els pacients als quals se'ls detectava *ctDNA* en plasma post cirurgia presentaven un risc de recaiguda 18 vegades superior que aquells en què no se'ls hi detectava. Concretament, el 79 % dels pacients que presentaven *ctDNA* detectable van desenvolupar recidiva amb una mediana de seguiment de 27 mesos, mentre que només van recidivar un 10 % dels pacients amb *ctDNA* no detectable.

Altres estudis en càncer de mama, càncer de pulmó, càncer col·rectal i carcinoma oral de cèl·lules escamoses, demostren la recurrència de la malaltia i la reparició d'algunes alteracions tumorals que inclouen, tant mutacions a KRAS, APC i TP53, com desequilibris al·lèlics (15).

Caldran més estudis per verificar la seva utilitat en la detecció de la malaltia mínima residual.

	PCR digital (ddPCR)	BEAMing	NGS
Avantatges	<p>No precisa de patró/calibratge ni controls interns.</p> <p>Elevada sensibilitat i precisió.</p> <p>Menys sensible als inhibidors de PCR.</p> <p>Implementació factible en laboratoris genètics/de biologia molecular en la pràctica clínica programada.</p> <p>Possibilitat de detecció de dos o més amplicons/seqüències senyal en una mateixa reacció de PCR (<i>múltiplex</i> dPCR).</p>	<p>No precisa de patró/calibratge ni controls interns.</p> <p>Elevada sensibilitat i precisió.</p> <p>Menys sensible als inhibidors de PCR.</p>	<p>Elevada sensibilitat i precisió.</p> <p>Detecció simultània de múltiples alteracions/mutacions somàtiques.</p> <p>Proporciona un espectre mutacional del tumor més precís que els procediments dirigits.</p>
Inconvenients	<p>Només permet la detecció i quantificació de mutacions conegudes.</p> <p>En alguns casos es pot requerir una preamplificació del material genètic.</p> <p>Error de partició i mostreig: la mostra s'ha de diluir a una concentració que assegurí que en cada partició/cambra de reacció contingui un única molècula amb la seqüència senyal d'interès.</p>	<p>Només permet la detecció i quantificació de mutacions conegudes.</p> <p>procediment complex.</p> <p>Cost elevat per mostra.</p> <p>Requereix de personal especialitzat.</p> <p>Implementació a la pràctica clínica del laboratori poc factible.</p>	<p>Taxa d'errors aleatoris de les plataformes de seqüenciació: entre el 0,1 i 1 %, la qual cosa no permet la detecció de variants rares.</p> <p>Procediment complex i llarg.</p> <p>Cost elevat.</p> <p>Requereix de personal especialitzat (bioinformàtics experts).</p> <p>Dificultat en la identificació de mutacions rellevants.</p>
Aplicacions	<p>Detecció de mutacions/variants rares.</p> <p>Variació del nombre de còpies d'un gen.</p> <p>Expressió genètica diferencial.</p> <p>Detecció de "càrregues virals".</p> <p>Quantificació absoluta de biblioteques de seqüenciació massiva.</p>	<p>Detecció de mutacions/variants rares.</p> <p>Variació del nombre de còpies d'un gen.</p> <p>Detecció de patrons de metilació (<i>methyl</i> BEAMing).</p>	<p>Seqüenciació completa del genoma.</p> <p>Seqüenciació d'exomes, transcriptomes, microRNAs, etc.</p> <p>Variació del nombre de còpies d'un gen.</p>

Taula 1: Principals avantatges, inconvenients i aplicacions dels procediments per determinar *ctDNA*.

Tipus de tumor	Alteracions tumor-específiques	Procediment	Referència
Colorectal	APC	BEAMing	Diehl <i>et al.</i> (2005) (16)
	APC, KRAS, PIK3CA, TP53	BEAMing	Diehl <i>et al.</i> (2008) (17)
	APC, KRAS, TP53	PCR-SSCP	Wang <i>et al.</i> (2004) (18)
	KRAS	ME-PCR	Frattini <i>et al.</i> (2008) (32)
Mama	PIK3CA	ARMS-Scorpion PCR	Board <i>et al.</i> (2010) (33)
	PIK3CA	BEAMing	Higgins <i>et al.</i> (2012) (34)
	PIK3CA, TP53	Tam-Seq i digital PCR	Dawson <i>et al.</i> (2013) (35)
Ovari	TP53, PTEN, EGFR, BRAF, KRAS	Tam-Seq i digital PCR	Forsheew <i>et al.</i> (2012) (36)
	PIK3CA	Fluorescent -PCR	Kuhlman <i>et al.</i> 2012) (37)
Hepatocel·lular	SNV	WGS	Chan <i>et al.</i> (2013) (38)
Pancreàtic	KRAS	MASA PCR	Yamada <i>et al.</i> (1998) (39)
	KRAS	RFLP-PCR	Castells <i>et al.</i> (1999) (40)
Pulmó (NSCLC)	KRAS	ARMS-qPCR	Nygaard <i>et al.</i> (2013) (41)
Colorectal i mama	Alteracions cromosòmiques	WGS	Leary <i>et al.</i> (2012) (42)

EAMing: acrònim de l'anglès *beads, emulsion, amplification and magnetics*; PCR-SSCP: acrònim de *polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism*; ME-PCR: acrònim de *multithreaded e-polymerase chain reaction*, ARMS-Scorpion PCR: acrònim de *amplification-refractory mutation system Scorpion polymerase chain reaction*, WSG: acrònim de *whole genome sequencing*, RFLP-PCR: acrònim de *restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction*, MASA PCR: acrònim de *polymerase chain reaction mutant allele specific amplification*; ARMS-qPCR: acrònim de *amplification-refractory mutation system quantitative polymerase chain reaction*

Taula 2. Alteracions específiques en el *ctDNA* associades a alguns dels tumors més freqüents (15).

7.1.3 Seguiment

La concentració del *ctDNA* pot ser utilitzada en el seguiment del tumor com a marcador subrogat de la càrrega tumoral ja que presenta alguns avantatges respecte als marcadors tumorals clàssics. Per una banda, la semivida dels marcadors clàssics pot oscil·lar entre les 24-36 hores (com és el cas de la

coriogonadotropina(cadena β), β hCG), als 3-11 dies (com és el cas de l'antigen carcinoembrionari, CEA) (36). Els marcadors genòmics, en canvi, presenten una semivida de 2 hores (17), la qual cosa fa possible avaluar la resposta terapèutica en un interval més petit de temps. Per altra banda, destaca l'elevada especificitat en el cas que es trobin mutacions somàtiques homogènies que ens permetin identificar la totalitat del tumor.

Una altra manera de poder realitzar el seguiment de la càrrega tumoral és buscar a cegues mutacions del DNA en el plasma en el cas que no es coneguin exactament les mutacions del tumor.

7.1.4 Elecció de fàrmacs, detecció de resistència i heterogeneïtat de la resposta

Cada vegada més apareixen nous fàrmacs destinats a bloquejar la via metabòlica. Com hem descrit abans, una de les potencials aplicacions seria detectar les mutacions que permeten l'elecció d'uns determinats fàrmacs en cas de baixa accessibilitat al tumor. S'ha vist que la presència o absència d'una alteració en el DNA tumoral ens pot servir per decidir el tractament a utilitzar (Taula 3).

Gen	Fàrmac	Acció	Tipus de càncer
EGFR	gefitinib, erlotinib	sensibilització	CPCNP
BRAF	vemurafemib, dabrafenib	sensibilització	melanoma
KRAS NRAS	cetuximmab, panitumumab	resistència	càncer colorectal
ALK	crizotinib	sensibilització	CPCNP
PIK3CA	trastuzumab	resistència	càncer de mama

CPCNP: càncer de pulmó de cèl·lula no petita.

Taula 3. Exemples de gens associats a la utilització de diferents tractaments per tipus de càncer (48).

En funció de la mutació trobada, es podrà utilitzar un tractament més dirigit, com per exemple en el cas del càncer de pulmó amb el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) mutat, que comentarem seguidament, en el qual un cop confirmada la presència de la mutació en el *ctDNA* en sang es podrà donar un fàrmac específic. De la mateixa manera, també podem trobar mutacions en el gen KRAS en el càncer colorectal, TP53 i PIK3CA en el càncer de mama o en el gen AR en el càncer de pròstata (37).

En el curs d'un tractament, l'adquisició de resistències a un determinat fàrmac és freqüent, i és important saber quines són les causes d'aquesta resistència. Poden haver-hi mutacions que afectin directament la molècula diana del fàrmac, canviant la seva configuració i impeding la seva acció.

En el càncer de pulmó per exemple, un 35 % dels adenocarcinomes presenten mutacions que activen l'EGFR. Els pacients amb aquestes mutacions són tributaris de rebre erlotinib, un inhibidor d'aquest receptor; d'aquests pacients el 50 % desenvolupen resistència en adquirir una mutació (T790M) que provoca la pèrdua d'afinitat de l'erlotinib pel receptor (38). Aquesta mutació pot ser detectada en sèrum, donant informació sobre el mecanisme de resistència del fàrmac. La detecció d'aquesta resistència ha donat lloc al desenvolupament de nous fàrmacs (com el rociletinib) capaços d'inhibir l'EGFR amb la mutació T790M, oferint una alternativa terapèutica eficaç als pacients erlotinib-resistents.

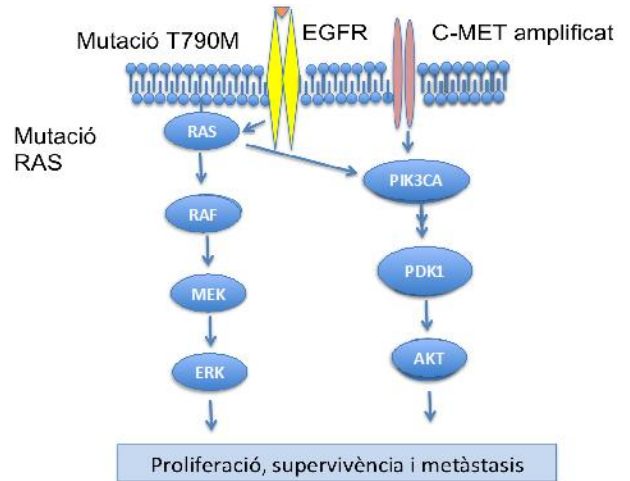


Figura 4. Vies involucrades en la resistència a fàrmacs dirigits a dianes terapèutiques.

A part de la mutació T790M, s'han descrit altres mecanismes de resistència als inhibidors de l'EGFR, com és la mutació del gen KRAS i les amplificacions del gen MET, que codifica per un receptor de membrana, ambdós implicats en l'activació de vies de proliferació, supervivència i metàstasi cel·lulars (vegeu la figura 4).

Totes aquestes alteracions genètiques es poden detectar en la sang i la seva determinació permet avaluar la resposta al tractament i la possibilitat d'administrar un fàrmac amb activitat sobre el tumor. La mateixa heterogeneïtat del tumor provoca que disminueixin les cèl·lules sensibles al fàrmac i potencia la proliferació d'aquelles que són resistents, incrementant-se així la concentració de *ctDNA* en el sèrum dels pacients que presenten aquestes mutacions.

El genotipat de tumors en la sang, abans i després de la teràpia ens permet avaluar l'heterogeneïtat de la neoplàsia i els canvis a nivell mutacional en funció del tractament rebut (38).

Hem de tenir en compte que, en introduir un tractament antitumoral, es pot produir una selecció de les cèl·lules que presenten o han adquirit mutacions de resistència al fàrmac (mutacions subclonals). El genotipat podria evidenciar-les i l'ús de fàrmacs específics contra la mutació, o la suspensió del fàrmac que va provocar la selecció, permetria reduir els clons resistents.

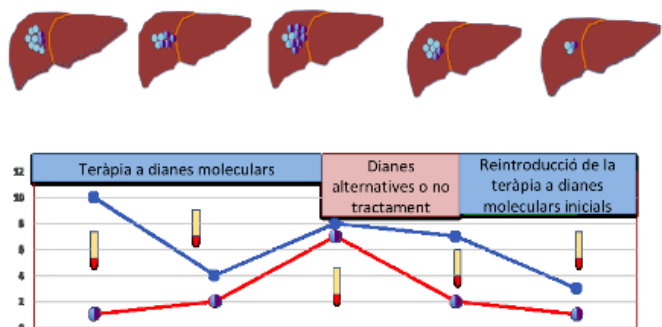


Figura 5. Evolució de l'heterogeneïtat del tumor seguint la clonalitat del tumor durant el tractament. Es pot observar un increment dels clons resistents i la disminució de les mateixes amb la introducció de la teràpia específica.

La figura 5 mostra els mecanismes d'heterogeneïtat del tumor/metàstasis durant el tractament amb fàrmacs dirigits a dianes.

7.1.5 Detecció de canvis epigenètics

Els fragments de DNA metilat circulants derivats del tumor són molt similars als que trobem al mateix teixit tumoral. A diferència de les mutacions i reordenacions, que són tumor-específiques, el grau de metilació no ho és tant, ja que s'ha vist que hi ha teixit al voltant del tumor que presenta modificacions anàlogues al tumor. En alguns casos, la determinació de forma dinàmica del patró de metilació d'alguns gens pot aportar informació sobre canvis en l'agressivitat de la neoplàsia.

Es creu que les alteracions que afecten el patró de metilació es produeixen a l'inici de la carcinogènesi; per tant, la seva determinació pot tenir un paper fonamental en la detecció precoç del càncer (39, 40).

Alguns patrons de metilació estan relacionats amb la resposta a determinats fàrmacs, un exemple seria el càncer de mama, en què si el gen *GSTP1* es troba metilat, se'l relaciona amb la falta de resposta al tractament neoadjuvant i si el gen *RASSF1A* no es troba metilat, els pacients responen favorablement (41).

S'han trobat patrons de metilació en diferents gens per diferents tipus de càncer entre els quals hi ha el de mama, pulmó, ovari o cèrvix (42). En els pacients amb càncer de pròstata resident a la castració s'ha trobat una menor supervivència en els pacients amb el gen *APC* o *GSTP1* hipermetilat que en els pacients sense hipermetilació (43).

Els canvis en la metilació del genoma del tumor poden ser detectats a la sang mitjançant procediments com els basats en *methyl Beaming*, PCR específica de metilació i QD-FRET (acrònim de *quantum dot based fluorescence resonance energy transfer*).

8. Conclusions

- La mesura de la concentració a la sang de *cfDNA* en el camp de l'oncologia té una utilitat limitada a causa dels diferents orígens del *cfDNA*. En canvi la mesura de la concentració del *cfDNA* que presenta alteracions genètiques (mutacions, amplificacions o reordenaments cromosòmics) és una àrea de coneixement amb un potencial extraordinari.

- Les principals consideracions preanalítiques a tenir en compte són: els espècimens de plasma dels pacients són els recomanables i l'anticoagulant d'elecció l'EDTA; la velocitat de centrifugació ha de ser l'adequada per tal d'evitar la contaminació per DNA procedent de cèl·lules i s'aconsella emprar tubs de polial·lòmer.

- L'elecció del procediment dependrà de l'aplicació clínica que es busqui. Així, si el que es vol és determinar una mutació coneguda, com per exemple les mutacions dels gens *EGFR* o *KRAS*, els procediments basats en la PCR a temps real, especialment la PCR digital o *BEAMing* per la seva sensibilitat analítica (0,01 %), poden ser utilitzats en el diagnòstic, detecció de malaltia mínima residual, seguiment i elecció del tractament. Els procediments basats en NGS, en canvi, estarien més indicats en la recerca de mutacions no conegudes per la seva menor sensibilitat.

- L'estudi del *cfDNA* ens permet realitzar el genotipatge del tumor, és a dir conèixer les alteracions genètiques de tumors poc accessibles facilitant la seva classificació. La troballa d'alteracions específiques en el tumor primari permetria fer el seguiment de la malaltia mínima residual, indicant així quins serien els pacients tributaris a ampliar el tractament amb quimioteràpia o radioteràpia per exemple.

- La seva determinació també permetria conèixer l'heterogeneïtat i metàstasis del tumor i la possibilitat d'utilitzar tractaments dirigits contra les cèl·lules que presenten alteracions diferents de les trobades en el tumor primari o en les metàstasis analitzades mitjançant biòpsia.

- El genotipat dels tumors i les seves metàstasis amb procediments de seqüenciació massiva i la detecció d'amplificacions, delecions, translocacions i metilacions de determinats gens, per procediments altament sensibles, podrà orientar-nos en el diagnòstic i seguiment de tumors, permetent detectar nous mecanismes de resistència a fàrmacs, la qual cosa ens podria aportar la informació necessària per a l'elecció de la teràpia farmacològica més adient en cada cas.

Bibliografia

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142:241-43.
2. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* 1966;45(11):1732-40.

3. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* 1977;37(3):646-50.
4. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of genomestasis. *Histol Histopathol* 1999;14:1159-64.
5. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010;70:560-7.
6. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35(3):347-76.
7. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Research* 2010;38(18):6159-75.
8. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free. DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016;164(1-2):57-68.
9. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics* 2012;21:R125-34.
10. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306:C621-33.
11. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, et al. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111:14888-93.
12. Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine* 2013;44:11-9.
13. Chistiakov DA, Chekhonin VP. Extracellular vesicles shed by glioma cells: pathogenic role and clinical value. *Tumour Biology* 2014;35:8425-38.
14. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014 19;6:224ra24.
15. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:472-84.
16. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16368-73.
17. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14:985-90.
18. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, et al. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg* 2004;28:721-6.
19. Andreopoulou E, Yang LY, Rangel KM, Reuben JM, Hsu L, Krishnamurthy S, Valero V, Fritsche HA, Cristofanilli M. Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *Int J Cancer* 2012;130(7):1590-7.
20. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta* 2015;450:243-53.
21. Salvi S, Gurioli G, De Giorgi U, Conteduca V, Tedaldi G, Calistri D, et al. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther* 2016;9:6549-59.
22. Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. *Adv Clin Chem* 2015;70:197-246.
23. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Molecular Cancer Research* 2016;14:898-908.
24. Pinzani P, Salvianti F, Orlando C, Pazzagli M. Circulating cell-free DNA in cancer. *Methods Mol Biol* 2014;1160:133-45.
25. Vendrell JA, Mau-Them FT, Béganton B, Godreuil S, Coopman P, Solassol J. Circulating Cell Free Tumor DNA Detection as a Routine Tool for Lung Cancer Patient Management. *Int J Mol Sci* 2017;18:E264.
26. Baker M. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 2012;9 (6):541-4.
27. Bizouarn F. Introduction to digital PCR. *Methods Mol Biol* 2014;1160:27-41.
28. Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 2015;61(1):79-88.
29. Santotoribio JD, Cabrera-Alarcón JL, Batalha-Caetano P, Macher HC, Guerrero JM. Pleural fluid cell-free DNA in

parapneumonic pleural effusion. *Clin Biochem* 2015;48:1003-5.

30. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, Anagnostou V, Fiksel J, Cristiano S, Papp E, Speir S, Reinert T, Orntoft MW, Woodward BD, Murphy D, Parpart-Li S, Riley D, Nesselbush M, Sengamalay N, Georgiadis A, Li QK, Madsen MR, Mortensen FV, Huiskens J, Punt C, van Grieken N, Fijneman R, Meijer G, Husain H, Scharpf RB, Diaz LA Jr, Jones S, Angiuoli S, Ørntoft T, Nielsen HJ, Andersen CL, Velculescu VE. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017;9. pii: eaan2415.

31. Wang X, Gao Y, Wang B, Zhang Z, Liang C, Feng H, Guo Y, Da J, Mo M, Zhang M, Ding F, Chen Z, Li H, Liu D. Analytic and Clinical Validation of an Ultrasensitive, Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for EGFR Mutation Analysis With Circulating Tumor DNA. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:978-984.

32. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, Abbruzzese JL, Tam AL. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol* 2013;31:17-22.

33. Veldore VH, Choughule A, Routhu T, Mandloi N, Noronha V, Joshi A, Dutt A, Gupta R, Vedam R, Prabhash K. Validation of liquid biopsy: plasma cell-free DNA testing in clinical management of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*. 2018;9:1-11.

34. Shen L. Circulating tumor DNA functions as an alternative for tissue to overcome tumor heterogeneity in advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 2017;108:1881-1887.

35. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra92.

36. Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 1999;45:1695-707.

37. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* 2016;6:479-91.

38. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forsheo T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS, Marass F, Humphray S, Hadfield J, Bentley D, Chin TM, Brenton JD, Caldas C, Rosenfeld N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108-12.

39. Weaver KD, Grossman SA, Herman JG: Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma. *Cancer Invest* 2006;24:35-40.

40. Bailey VJ, Keeley BP, Zhang Y, Ho YP, Easwaran H, Brock MV, et al. Enzymatic incorporation of multiple dyes for increased sensitivity in QD-FRET sensing for DNA methylation detection. *Chembiochem* 2010;11:71-4.

41. Fujita N, Kagara N, Yamamoto N, Shimazu K, Shimomura A, Shimoda M, et al. Methylated DNA and total DNA levels in the serum of patients with breast cancer following are predictive of a poor prognosis. *Oncology Letters* 2014;8:397-403.

42. Kohler C, Barekati Z, Radpour R, Zhong XY. Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker. *Anticancer Research* 2011;31:2623-8.

43. Hendriks RJ, Dijkstra S, Smit FP, Vandersmissen J, Van de Voorde H, Mulders PFA, van Oort IM, Van Criekinge W, Schalken JA. Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients. *Prostate* 2018;78:336-42.