Quantificazione del DNA sierico mediante "real time polymerase chain reaction" in pazienti affetti da polipi e da cancro del colon-retto*

Elisa Danese[1], Martina Montagnana[1], Anna Maria Minicozzi[2], Giovanna De Matteis[1], Giovanni Scudo[2], Gian Luca Salvagno[1], Claudio Cordiano[2], Giuseppe Lippi[3], Gian Cesare Guidi[1]

[1]Sezione di Chimica Clinica, Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi, Verona

[2]Sezione di Chirurgia d'Urgenza, Dipartimento di Scienze Anestesiologiche e Chirurgiche Specialistiche, Università degli Studi, Verona

[3]U.O. di Diagnostica Ematochimica, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Parma

ABSTRACT

Free DNA quantification by real-time polymerase chain reaction (PCR) in serum of patients with polyps and colorectal cancer. Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequent cause of cancer death worldwide. Recently, the evaluation of cell-free DNA as diagnostic tools to identify cancer has been investigated. Aim of this work was to investigate whether circulating DNA could be considered a useful marker for detection of early stage CRC and polyps. 118 patients with CRC were included in the study, along with 49 patients affected by colorectal polyps and 26 control subjects. Cell-free DNA, extracted from 200 µL serum, were quantificated by real time TaqMan-PCR assay. We chose primers and probes to specifically amplify the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene. Serum DNA concentrations were significantly higher in CRC patients compared with both subjects with polyps (median value, 106 µg/L vs. 40 µg/L, P <0.0001) and controls (median value, 106 µg/L vs. 14 µg/L, P <0.0001). Although the carcinoembryonic antigen (CEA) was above the cut-off in only 13 out of 66 (19.7%) CRC patients at early stage, serum free DNA displayed values above the threshold in 53 out of 66 (80.3%). Our data confirm that serum DNA concentrations are significantly increased in CRC patients, also at early disease stage, and in patients affected by polyps, so that this marker might be useful for identifying high risk individuals.

INTRODUZIONE

In Europa il cancro del colon-retto (CCR) è la terza forma tumorale per frequenza nell'uomo dopo quella del polmone e della prostata e la seconda nella donna dopo quella della mammella. In entrambi i sessi rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia (1). In Italia il reparto di epidemiologia dei tumori dell'Istituto Superiore di Sanità ha stimato che il tasso di incidenza standardizzato per età è aumentato dal 1970 al 2010 da 30 a 70 per 100.000 abitanti negli uomini e si è stabilizzato a circa 38 per 100.000 nelle donne (2). Ad oggi, il rischio di avere una diagnosi di CCR nel corso della vita (fra 0 e 84 anni) è del 9% nei maschi (1 caso su 11) e del 5,9% nelle femmine (1 caso su 17), mentre il rischio di morire per questa causa è del 3,8% negli uomini e del 2,1% nelle donne (3). La percentuale media di sopravvivenza relativa standardizzata a 5 anni dalla diagnosi è del 57,5% in Italia e del 53,5% in Europa (4, 5). Un recente studio prospettico ha evidenziato che in Italia, nonostante i progressi registrati dal 1984 al 2004, ancora oggi quasi il 50% dei CCR vengono diagnosticati in stadio avanzato (III o IV), condizionando pesantemente la prognosi di questi pazienti che è strettamente dipendente dallo stadio di malattia in cui viene diagnosticato il tumore (6). La percentuale di sopravvivenza a 5 anni, infatti, è del 94,7% se la neoplasia viene riconosciuta al I° stadio, del 80,8% al II° stadio, del 66,1% al III° stadio e solo del 6,2% per tumori al IV° stadio (7).

Al fine di ridurre la mortalità per CCR, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse della comunità scientifica verso nuovi biomarcatori in grado di permettere una diagnosi precoce degli adenocarcinomi e dei polipi adenomatosi ad alto rischio di degenerare in CCR (8, 9). Nonostante gli enormi sforzi fatti in questo senso, ad oggi l'unico marcatore che viene comunemente utilizzato nella pratica clinica è l'antigene carcinoembrionario (CEA). Similmente ad altri antigeni sierici, le concentrazioni del CEA aumentano nei pazienti con malattia e diminuiscono in seguito a terapia o asportazione chirurgica (10). Per questo motivo tale marcatore viene oggi utilizzato per la valutazione della prognosi e del rischio di ricorrenza,

**Questo lavoro è stato in parte presentato al 41° Congresso Nazionale SIBioC, 27-30 ottobre 2009, Napoli, sotto forma di poster (Biochim Clin 2009;33:460), ricevendo, nella persona del suo primo autore (E. Danese), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.*

mentre il dosaggio non viene raccomandato per la diagnosi di CCR a causa delle basse specificità e sensibilità diagnostiche (11, 12).

La scoperta che diversi tipi di tumore rilasciano DNA libero nel circolo ematico ha aperto nuove interessanti prospettive nell'ambito della ricerca di nuovi marcatori molecolari (13). Molti Autori hanno dimostrato come il DNA libero presenti le stesse caratteristiche biofisiche del DNA contenuto nelle cellule cancerose e sia quindi tumore-specifico, per quanto riguarda l'espressione degli oncogeni, le mutazioni dei geni onco-sopressori, le alterazioni microsatellitari ed epigenetiche e le traslocazioni cromosomiche (14). In accordo con queste osservazioni, alcuni Autori hanno studiato le mutazioni del DNA sierico o plasmatico di pazienti con CCR (15, 16). I geni candidati maggiormente oggetto di studio sono stati l'"adenomatous polyposis coli" (APC), il "tumor protein 53" (TP53), il "Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog" (K-ras) e il gene oncosoppressore "cyclin-dependent kinase inhibitor" ($p16^{INK4a}$) (17). Sebbene questo approccio preveda la misura di marcatori specifici per la patologia, presenta notevoli svantaggi. Lo spettro mutazionale dei geni APC e TP53 è molto vasto e per questo la sua analisi richiede tempi lunghi e costi elevati. D'altra parte, le mutazioni del gene K-ras e l'ipermetilazione del promotore di $p16^{INK4a}$ sono alterazioni che si riscontrano solamente in una piccola percentuale di pazienti con CCR.

Recentemente è stato dimostrato come la quantificazione del DNA libero nel siero possa rappresentare uno strumento valido per la diagnosi ed il monitoraggio del CCR (18). Scopo del nostro studio è stato inizialmente di mettere a punto una metodica di laboratorio per la determinazione delle concentrazioni sieriche di DNA libero. Successivamente abbiamo voluto valutare l'utilità di questa quantificazione nella diagnosi precoce di CCR allo scopo di individuare adenocarcinomi in stadio precoce e polipi adenomatosi ad alto rischio di progressione neoplastica.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Da settembre 2006 a settembre 2009 sono stati arruolati 118 pazienti con CCR (età: 65±11 anni; 49 femmine, 69 maschi) e 49 pazienti affetti da polipi (età: 64±12 anni; 17 femmine, 32 maschi) afferenti alla Sezione di Chirurgia d'Urgenza dell'Azienda Ospedaliera di Verona. Nello studio sono stati inoltre inclusi 26 controlli sani (età: 64±10 anni; 13 femmine e 13 maschi), reclutati tra il personale dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona. Per escludere la presenza di stati patologici che possono causare alterazioni dei valori di DNA libero, i soggetti sono stati sottoposti ad esami ematochimici in grado di evidenziare eventuali stati flogistici o patologie epatiche in atto.

In accordo ai criteri di stadiazione TNM proposti dall'"American Joint Committee on Cancer" (19) alla diagnosi 7 pazienti erano in stadio 0 (5,9%), 20 in stadio I (16,9%), 34 in stadio IIA (28,8%), 5 in stadio IIB (4,3%), 4 in stadio IIIA (3,4%), 17 in stadio IIIB (14,4%), 10 in stadio IIIC (8,5%) e 21 in stadio IV (17,8%). 78 pazienti (66%) presentavano una neoplasia moderatamente differenziata (G1, G2), mentre i restanti 40 (34%) presentavano invece neoplasie scarsamente differenziate (G3). Per 110 di questi pazienti è stato possibile definire i seguenti sottotipi istologici: adenocarcinoma mucinoso (69, 58,5%) e adenocarcinoma NAS (non altrimenti specificato) (41, 34,7%) (20).

I 49 pazienti affetti da polipi sono stati suddivisi in due gruppi in base alla classificazione istologica della lesione (21): 15 pazienti presentavano polipi iperplastici, mentre i restanti 34 presentavano polipi adenomatosi. All'interno di quest'ultimo gruppo sono state distinte 2 ulteriori categorie sulla base del potenziale maligno dei polipi. 15 pazienti presentavano polipi "avanzati", cioè polipi con parametri clinico-patologici ad alto valore predittivo di trasformazione neoplastica in quanto rispondenti ad uno o più dei seguenti criteri: dimensioni >10 mm, presenza di almeno una componente villosa, alto grado di displasia (22). Gli altri 19 pazienti presentavano polipi a basso potenziale maligno, cioè polipi di dimensioni comprese tra 1 e 10 mm, istologia tubulare e basso grado di displasia.

Per ciascun soggetto sono stati eseguiti il dosaggio del CEA e la quantificazione del DNA libero nel siero.

Metodi

5 mL di sangue periferico, prelevati a tutti i pazienti e ai volontari sani, sono stati raccolti in provette senza coagulante e centrifugati a 3000 rpm per 15 min a temperatura ambiente. Il siero così ottenuto è stato congelato e mantenuto a –80 °C fino al momento della processazione.

Le concentrazioni sieriche di CEA sono state determinate con metodo immunoenzimatico in chemiluminescenza sull'analizzatore Liaison (DiaSorin). Il livello decisonale per questo marcatore è di 5 µg/L.

Il DNA di ciascun paziente e dei controlli è stato estratto da 200 µL di siero utilizzando il kit di estrazione QIAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen) e processato entro 48 ore dall'estrazione al fine di evitare idrolisi del DNA (23). La quantificazione del DNA sierico è stata ottenuta mediante tecnica "real time polymerase chain reaction" (PCR) utilizzando il termociclatore Rotor gene 3000 (Corbett Research) e la maxima Probe qPCR Master Mix (M-medical). I "primer" utilizzati sono stati scelti per amplificare selettivamente il gene gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) come riportato in letteratura (24). La tecnologia scelta per l'amplificazione prevedeva l'utilizzo di sonde TaqMan marcate con il fluorocromo Vic. Ciascuna miscela per PCR è stata preparata in un volume totale di 25 µL e processata con il seguente profilo di amplificazione: 50 °C per 2 min, 95 °C per 10 min e 45 cicli a 95 °C per 15 s e 58 °C per 1 min. Ogni reazione è stata eseguita in duplicato. La quantificazione assoluta del DNA sierico in ciascun campione è stata ottenuta utilizzando una curva di calibrazione costituita da 5 diluizioni seriali di DNA genomico umano (Applied Biosystems).

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati riportati come mediana (intervallo). Il confronto tra i gruppi è stato eseguito mediante i test non parametrici Mann-Whitney e Kruskall-Wallis, mentre la correlazione tra le diverse variabili è stata valutata mediante il test di Spearman. Il livello di significatività statistica scelto è stato P <0,05. In assenza di valori di cut-off definiti per il DNA sierico, i livelli di sensibilità e specificità per questo marcatore sono stati identificati mediante analisi della curva ROC. Tutte le analisi sono state eseguite usando il programma Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.).

RISULTATI

I pazienti con CCR hanno mostrato concentrazioni di CEA significativamente più elevate sia rispetto ai controlli [3 µg/L (0,2-678) vs. 2 µg/L (0,2-3,7), P <0,0001] sia rispetto ai pazienti affetti da polipi [1,3 µg/L (0,2-12,0), P=0,0049]. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i pazienti con polipi ed i controlli (P=0,3412).

Le concentrazioni del DNA sierico erano più elevate nei pazienti con CCR, sia rispetto ai controlli [105,5 µg/L (9,0-1334,5) vs. 14,0 (5,5-52,0), P <0,0001], che rispetto ai pazienti con polipi [40,0 (8,0-319,0), P <0,0001]. Inoltre, per questo marcatore è stata osservata una differenza statisticamente significativa anche tra pazienti con polipi e controlli (P <0,0001) (Figura 1). Nessuna correlazione è stata osservata tra le concentrazioni di DNA sierico e i seguenti parametri clinico-patologici: età, sesso, stadio del tumore, grado di differenziazione, sottotipo istologico.

Il cut-off ottimale per il DNA sierico (che meglio discrimina tra controlli e pazienti) è di 37,0 µg/L, a cui corrispondono livelli di sensibilità e specificità rispettivamente di 82,9% [95% intervallo di confidenza (CI): 74,8-89,2] e 92,3% (95% CI: 74,9-99,0). L'analisi della curva ROC per questo marcatore ha mostrato un'area sotto la curva (AUC) di 0,93 (95% CI: 0,89-0,97), mentre l'AUC relativa al CEA è risultata di 0,68 (95% CI: 0,58-0,77), con livelli di sensibilità e specificità rispettivamente di 36,1% (95% CI: 27,1-45,9) e 100% (95% CI: 86,8-100,0) al cut-off di 5 µg/L.

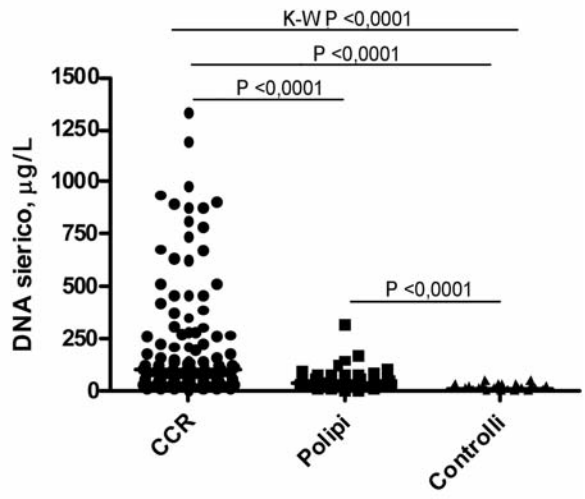


Figura 1
Quantificazione del DNA sierico in pazienti con cancro del colon-retto (CCR), pazienti affetti da polipi e controlli.
K-W: test di Kruskall-Wallis.

Considerando solamente i pazienti in stadio precoce di malattia (stadi TNM 0, I e II), il CEA ha mostrato valori ≥5 µg/L in 13 pazienti su 66 (19,7%), mentre le concentrazioni di DNA sierico erano >37,0 µg/L in 53 pazienti su 66 (80,3%). Nessuna correlazione tra DNA sierico e CEA è stata riscontrata nei pazienti con CCR (r=-0,028; P=0,77).

La quantificazione del DNA sierico nei pazienti con polipi non ha mostrato valori statisticamente differenti fra i tre sottogruppi di pazienti con polipi iperplastici [42,0 µg/L (14,0-150,0)], polipi a basso [33,0 µg/L, (8,0-177,0)] e ad alto potenziale maligno [62,0 µg/L (9,0-319,0)].

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi sulla quantificazione del DNA libero nel siero o nel plasma di pazienti affetti da diversi tipi di neoplasie (25-29). Questi studi hanno dimostrato che le concentrazioni del DNA circolante sono significativamente più elevate nei pazienti con tumore rispetto ai controlli. Nonostante tale aumento non sia tumore-specifico, questo nuovo approccio non invasivo ha destato notevole interesse in virtù delle sue potenziali applicazioni diagnostiche (30, 31). Alcuni Autori hanno suggerito l'utilizzo del DNA libero come marcatore prognostico per il monitoraggio della terapia (32, 33), altri lo hanno utilizzato, in combinazione con altri marcatori, per la diagnosi precoce di malattia (34).

Rispetto a studi precedentemente pubblicati, abbiamo voluto valutare l'utilità della quantificazione del DNA sierico non solo nei pazienti affetti da CCR, ma anche nei pazienti affetti da polipi e per questo potenzialmente a rischio di sviluppare neoplasia. È noto, infatti, che in oltre il 90% dei casi, il CCR prende origine da un precursore focale, displastico, polipoide: l'adenoma o polipo adenomatoso (35). Tale tipo di progressione tumorale, conosciuta come sequenza adenoma-carcinoma, ha trovato riscontro e validazione clinica ed epidemiologica. Poiché la tempestiva asportazione degli adenomi si è dimostrata efficace nel ridurre l'incidenza del CCR, l'identificazione di lesioni precancerose è di fondamentale importanza nella gestione clinica di questi pazienti (36).

Dal momento che le concentrazioni del DNA libero nel siero o nel plasma sono estremamente basse, risulta evidente come l'estrazione del DNA rappresenti un passaggio critico nei protocolli di quantificazione. Da un esame della letteratura è emerso come il kit QIAmp DNA Blood Mini, scelto per questo studio, risulti il più utilizzato, sia per analisi qualitative che quantitative del DNA libero. Nonostante Xue et al. (37) riportino per questo metodo un'efficienza di estrazione significativamente più

bassa rispetto ad altri metodi, l'estrazione con QIAmp DNA Blood Mini kit consente di ottenere in breve tempo un DNA altamente purificato e quindi adatto all'utilizzo in protocolli che prevedono analisi in "real time PCR". L'analisi quantitativa del DNA sierico, eseguita mediante l'applicazione della tecnica "real time PCR" utilizzando come sequenza target il gene GAPDH, ha mostrato buone prestazioni: al cut-off di 37,0 µg/L questo marcatore discrimina pazienti con CCR da controlli sani con una sensibilità e specificità rispettivamente del 82,9% e del 92,3%. D'altra parte, il CEA, che rappresenta il marcatore sierico di riferimento per questa malattia, mostrava un livello di sensibilità notevolmente più basso, pari al 36,1%, in accordo con i numerosi dati riportati in letteratura (9, 38, 39).

Le concentrazioni mediane del DNA libero nei pazienti con CCR sono risultate quasi 8 volte superiori a quelle dei controlli e, a differenza del CEA, aumentano precocemente nei primi stadi di malattia. Considerando solo i pazienti con stadi TNM da 0 a II, il DNA sierico ha mostrato una sensibilità del 80,3% a fronte di una sensibilità del 19,7% per il CEA. Questo risultato è di particolare rilevanza dal momento che il riconoscimento di lesioni in stadio precoce riduce la morbilità e la mortalità del CCR.

Infine, la quantificazione di questo nuovo marcatore molecolare si è dimostrata utile nell'identificazione di pazienti affetti da polipi intestinali, mostrando concentrazioni significativamente più elevate rispetto ai controlli. L'assenza di correlazione tra DNA e CEA, così come la mancanza di associazione riscontrata sia tra DNA libero e stadio del tumore, che tra DNA libero e sottotipo istologico del polipo, riflettono molto probabilmente la varietà dei processi fisiopatologici che sono alla base dei diversi meccanismi di rilascio del DNA libero nel sangue. È stato ipotizzato che lesioni neoplastiche in stadio precoce rilascino elevate quantità di DNA mutato; quando il tumore è in stadio avanzato, le cellule maligne perdono la capacità di andare incontro ad apoptosi, ma in circolo le concentrazioni di DNA rimangono ugualmente elevate. In questa fase, infatti, il DNA viene rilasciato da cellule normali che circondano il tumore e che vanno incontro ad apoptosi e necrosi in seguito all'ipossia generata dall'avanzamento della lesione stessa (14, 15). In accordo con questi presupposti, nel nostro studio, così come in altri precedentemente pubblicati (16), non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra le concentrazioni di DNA libero di pazienti con diversi stadi di CCR. Alcuni Autori hanno inoltre suggerito la possibilità che il DNA possa essere rilasciato attivamente da cellule vitali (40). Questo meccanismo sembrerebbe giustificare la presenza di elevate quantità di DNA circolante nel siero di pazienti con lesioni benigne, infiammazioni, traumi e patologie croniche, sebbene tali concentrazioni risultino più basse rispetto a quelle rilevate in pazienti affetti da neoplasie (41). Questa ipotesi supporta i risultati da noi ottenuti nei pazienti affetti da polipi iperplastici. È presumibile, infatti, che queste lesioni benigne, derivando da un'alterata proliferazione delle cellule endoteliali, possano rilasciare attivamente DNA libero nel siero in concentrazioni paragonabili a quelle riscontrate in pazienti con polipi adenomatosi a basso e alto potenziale maligno.

In conclusione, i nostri dati seppur preliminari suggeriscono che la quantificazione del DNA sierico mediante tecnica "real time PCR" potrebbe rappresentare uno strumento utile nel confermare la presenza di CCR in stadio precoce, là dove il CEA risulta informativo solo in una piccola percentuale di pazienti, e nell'identificare pazienti affetti da polipi a rischio di sviluppare CCR.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe 2006. Ann Oncol 2007;18:581-92.
2. Grande E, Inghelmann R, Francisci S, et al. Regional estimates of colorectal cancer burden in Italy. Tumori 2007;93:352-9.
3. AIRTUM working group. I tumori in Italia - Rapporto 2009. Nuovi dati di incidenza e mortalità. Epidemiol Prev 2009;33:1-26.
4. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data. Lancet Oncol 2007;8:784-96.
5. AIRTUM working group. La sopravvivenza per tumore in Italia è nella media europea. Epidemiol Prev 2008;32:265.
6. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman M, et al. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. Gut 2005;54:268-73.
7. Ponz de Leon M, Rossi G, Di Gregorio C, et al. Epidemiology of colorectal cancer: the 21-year experience of a specialised registry. Intern Emerg Med 2007;2:269-79.
8. Khair G, Monson JR, Greenman J. Epithelial molecular markers in the peripheral blood of patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 2007;50:1188-203.
9. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European group on tumor markers (EGTM) guidelines. Eur J Cancer 2003;39:718-27.
10. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. Clin Chem 2008;54:e11-79.
11. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? Clin Chem 2001;47:624-30.
12. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. Cancer Invest 2005;23:338-51.
13. Stroun M, Anker P, Lyautey J, et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. Eur J Cancer Clin Oncol 1987;23:707-12.
14. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res 2001;61:1659-65.
15. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:16368-73.
16. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. Cancer Lett 2008;263:170-81.

17. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, 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.
18. Gormally E, Caboux E, Vineis P, et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. Mutat Res 2007;635:105-17.
19. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed. New York: Springer, 2002.
20. Jass JR, Sobin LH. Histological typing of intestinal tumors. WHO international histological classification of tumors. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
21. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. Pathology & genetics. Tumours of the digestive system. WHO classification of tumours. Lyon: IARC Press 2000;105-19.
22. Simons BD, Morrison AS, Lev R, et al. Relationship of polyps to cancer of the large intestine. J Natl Cancer Inst 1992;84:962-6.
23. Sozzi G, Roz L, Conte D, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. J Natl Cancer Inst 2005;97:1848-50.
24. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. J Clin Oncol 2004;22:4157-64.
25. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? Cancer Treat Rev 2002;28:255-71.
26. Wu TL, Zhang D, Chia JH, et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. Clin Chim Acta 2002;321:77-87.
27. Sozzi G, Conte D, Leon ME, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. J Clin Oncol 2003;21:3902-8.
28. Gai S, Fidler C, Lo YMD, et al. Quantification of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. Br J Cancer 2004;90:1211-5.
29. Johnson PJ, Lo DYM. Plasma nucleic acids in diagnosis and management of malignant disease. Clin Chem 2002;48:1186-93.
30. Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, et al. Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. Ann NY Acad Sci 2004;1022:25-32.
31. Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I, et al. Detection of tumor specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. Int J Cancer 2007;120:1465-71.
32. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977;37:646-50.
33. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. Cancer 1983;51:2116-20.
34. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, et al. Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. Clin Cancer Res 2006;12:6985-8.
35. Morson BC, Whiteway JE, Jones EA, et al. Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. Gut 1984;25:437-44.
36. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. N Engl J Med 1993;329:1978-81.
37. Xue X, Teare MD, Holen I, et al. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. Clin Chim Acta 2009;404:100-4.
38. Fernandes CL, Kim SB, Matos D. Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging, and prognosis of colorectal adenocarcinoma. World J Gastroenterol 2005;11:645-8.
39. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UA, et al. Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease. Oncology 2004;66:296-302.
40. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. Clin Chim Acta 2001;313:139-42.
41. Jiang N, Pisetsky DS. The effect of inflammation on the generation of plasma DNA from dead and dying cells in the peritoneum. J Leukocyte Biol 2005;77:296-302.