

TC y PET/TC como biomarcadores de la integridad del ADN en la biopsia líquida en pacientes con cáncer de pulmón

Ivan Vollmer Torrubiano¹, Jose González de Aledo², Alexandre Soler Perromat¹, Sebastián Casanueva³, Pilar Paredes Barranco³, Joan Antón Puig²

¹Servicio de Radiología (CDI). Hospital Clínic, Barcelona

²Servicio de Medicina Nuclear (CDI). Hospital Clínic, Barcelona

³Servicio de Bioquímica y Genética Molecular (CDB). Hospital Clínic, Barcelona

Introducción:

- El cáncer de pulmón es uno de los cánceres más frecuentes y letales en todo el mundo. Los hallazgos clínico-histopatológicos, combinados con los marcadores tumorales séricos, han demostrado su utilidad en el diagnóstico histológico del cáncer de pulmón. Sin embargo, los avances recientes en las bases moleculares del cáncer de pulmón han promovido una nueva clasificación basada en el perfil molecular. El aumento del conocimiento molecular del cáncer de pulmón ha dado lugar a un cambio de paradigma con respecto al manejo clínico de los pacientes, mejorando así la supervivencia y el pronóstico de la enfermedad.
- La biopsia de tejido tumoral sigue siendo el estándar de oro para las pruebas moleculares en pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, la falta de material adecuado para el análisis molecular, combinada con las limitaciones intrínsecas y las complicaciones derivadas de una biopsia, han impedido el desarrollo de ADN libre circulante (cfDNA) como fuente de muestra alternativa.

Introducción:

- El ADN libre de células (cfDNA) son fragmentos cortos de ADN nuclear liberados por células tumorales y no tumorales en una variedad de fluidos biológicos, incluido el plasma. La apoptosis y la necrosis son los principales mecanismos de liberación de cfDNA. Además, la secreción activa y la liberación de las células tumorales circulantes constituyen fuentes alternativas de cfDNA. En individuos sanos, el cfDNA en plasma se deriva principalmente de células linfoides y mieloides, mientras que en pacientes con cáncer el cfDNA se deriva principalmente de células tumorales (DNA tumoral circulante; ctDNA). El ctDNA es un marcador sustituto de la biología tumoral y ha surgido como una fuente alternativa para las pruebas moleculares en pacientes con cáncer y un biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento.
- Numerosos estudios han sugerido que los niveles de cfDNA podrían ser un marcador potencial de diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer. Los niveles de cfDNA están significativamente elevados en los pacientes con cáncer en comparación con los sujetos normales, incluidos los pacientes con cáncer de pulmón, y están asociados con el pronóstico de la enfermedad y la recaída.

Introducción:

- El cfDNA está compuesto por fragmentos de DNA de longitud variable. Curiosamente, el patrón de tamaño de fragmento de cfDNA se ha asociado con los mecanismos de liberación. El tamaño del cfDNA apoptótico es de 160-180 pares de bases (pb), con un tamaño modal de 166 pb. La actividad apoptótica también podría producir fragmentos más grandes correspondientes a polinucleosomas di (332 pb) o tri (498 pb). La necrosis da como resultado la aglutinación de la cromatina nuclear y la digestión no específica, lo que produce fragmentos de ADNc que suelen ser mayores de 10000 pb. Los fragmentos entre 1000-3000bp están asociados con procesos de liberación activos. El papel del patrón de tamaño de los fragmentos de cfDNA en el cáncer se ha explorado poco. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el ctDNA tiene un tamaño de fragmento más corto que el liberado por células no malignas. En la práctica clínica, se ha observado el valor diagnóstico y pronóstico de fragmentos cortos de cfDNA en carcinoma de células renales, cáncer de páncreas y de pulmón.

Introducción:

- El diagnóstico por imágenes del NSCLC incluye TC toracoabdominal y PET / TC con 2- [18F] F-FDG (PET / TC con FDG). La TC toracoabdominal ha sido la técnica de referencia durante décadas y sigue siendo fundamental para la evaluación del tumor primario y las estructuras circundantes. FDG PET / CT es un análogo de glucosa radiomarcado que se acumula en tejidos con un metabolismo elevado de la glucosa. La PET / TC con FDG se utiliza ampliamente en el diagnóstico de cáncer de pulmón y su principal ventaja es la combinación de la información anatómica de la TC y la actividad metabólica de la imagen de la PET. La captación de FDG se evalúa mediante el valor de captación máximo estandarizado (SUV_{máx}) en la práctica habitual, pero los parámetros volumétricos han ganado un papel relevante en la última década. La glucólisis total de la lesión (TLG) incorpora tanto la actividad metabólica, medida como el nivel medio de ingesta de glucosa tumoral (SUV_{mean}), como los datos volumétricos, obtenidos por el volumen metabólico del tumor (MTV). Por tanto, parámetros volumétricos como TLG y MTV representan la carga tumoral con mayor precisión que la carga tumoral evaluada por la tomografía computarizada, ya que también tiene en cuenta la actividad metabólica de la enfermedad. Sin embargo, vale la pena señalar que como TLG depende de SUV_{mean}, que puede diferir dentro de los dispositivos PET, no tiene validez externa. Sin embargo, MTV, que se obtiene a partir de un umbral de valores de SUV_{max}, permite la comparación entre dispositivos.
- Es esencial seguir explorando la relación entre la biología del tumor y el cfDNA o ctDNA para explotar la utilidad potencial de los ácidos nucleicos libres de células en la práctica clínica. Hasta la fecha, algunos estudios han evaluado la relación entre la concentración de cfDNA o ctDNA y los parámetros volumétricos de la FDG PET/CT en el cáncer y particularmente en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) con diferentes enfoques y resultados. Algunos estudios han comparado los niveles de cfDNA con el comportamiento metabólico del tumor primario o la enfermedad de todo el cuerpo. Aunque no se han encontrado correlaciones claras, estos estudios subyacen al potencial de la concentración de cfDNA como biomarcador de la biología tumoral.

Objetivo:

- Evaluar el papel de la TC y la PET/TC como biomarcadores de la integridad del ADN libre circulante (cfDNA) en pacientes con cáncer de pulmón.

Material y métodos:

- Se incluyeron 69 pacientes (media de edad de 67 ± 12 años) con diagnóstico de cáncer de pulmón y biopsia líquida.
- Se calcularon parámetros volumétricos (MTV y TLG) para el tumor primario (IMTV), para toda la enfermedad corporal (wbMTV) y para la enfermedad extratorácica (eMTV). Se valoró la presencia de necrosis, metástasis a distancia y la localización de las metástasis en ambas técnicas.
- El cfDNA en plasma fue extraído mediante Cobas[®] cfDNA Sample Preparation Kit (Roche) y la concentración de cfDNA fue medida con un fluorómetro Qubit.
- El tamaño de los fragmentos de ADN se midió en pares de bases (pb) (100-250, 250-700, 700-1000, >1000) y se calculó su porcentaje sobre el total.
- Se emplearon métodos estadísticos no paramétricos para calcular las correlaciones entre la integridad de cfDNA y los parámetros obtenidos por TC y PET/TC como la presencia de enfermedad a distancia, la presencia de necrosis, el lugar de afectación metastásica, la carga tumoral (RECIST 1.1), la carga tumoral metabólica, MTV y TLG (del tumor primario, de todo el cuerpo y de la afectación extratorácica).

Material y métodos:

Table 1. Patients characterized characteristics of the study cohort

Characteristics	N (%)
Age (y) median (range)	66 (41-84)
Gender	
Male	31 (58.5)
Female	22 (41.5)
Smoking History	
Currently smokers	8 (15.1)
Former smokers	30 (56.6)
Never smokers	15 (28.3)
Histology and stage	
ADK	42 (79.3)
Other lung cancer	11 (20.7)
Stage III	4 (7.6)
ADK III	3 (7.1)
Other NSCLC stage III	1 (9.0)
Stage IV	49 (92.4)
ADK IV	39 (92.9)
Other NSCLC stage IV	10 (91.0)
EGFR status in plasma <u>cfDNA</u>	
Mutated <i>EGFR</i>	12 (22.6)
No mutated <i>EGFR</i>	41 (77.4)

ADK: Adenocarcinoma; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; N: sample size; NSCLC: Non Small-Cell Lung Cancer

Resultados:

- Se encontró correlación entre los parámetros metabólicos y los siguientes pares de bases:

	wbMTV	wbTLG	eMTV	eTLG
100-250pb	r0,43(p0,02)	r0,31(p0,03)	r0,5(p0,0003)	r0,44(p0,015)
700-1000pb	r-0,44(p0,002)	r-0,31(p0,03)	r-0,49(p0,0004)	r-0,44(p0,002)

- Los pacientes con metástasis hepáticas o pleurales mostraron un elevado porcentaje de fragmentos entre 100-250 pb:

	Afectación hepática	NO afectación hepática	
100-250 pb	54,5%	33,5%	p=0,01

	Afectación pleural	NO afectación pleural	
100-250 pb	41%	33%	p=0,04

- Los pacientes sin afectación hepática, ósea o pleural mostraron mayor porcentaje de fragmentos > 1000 pb:

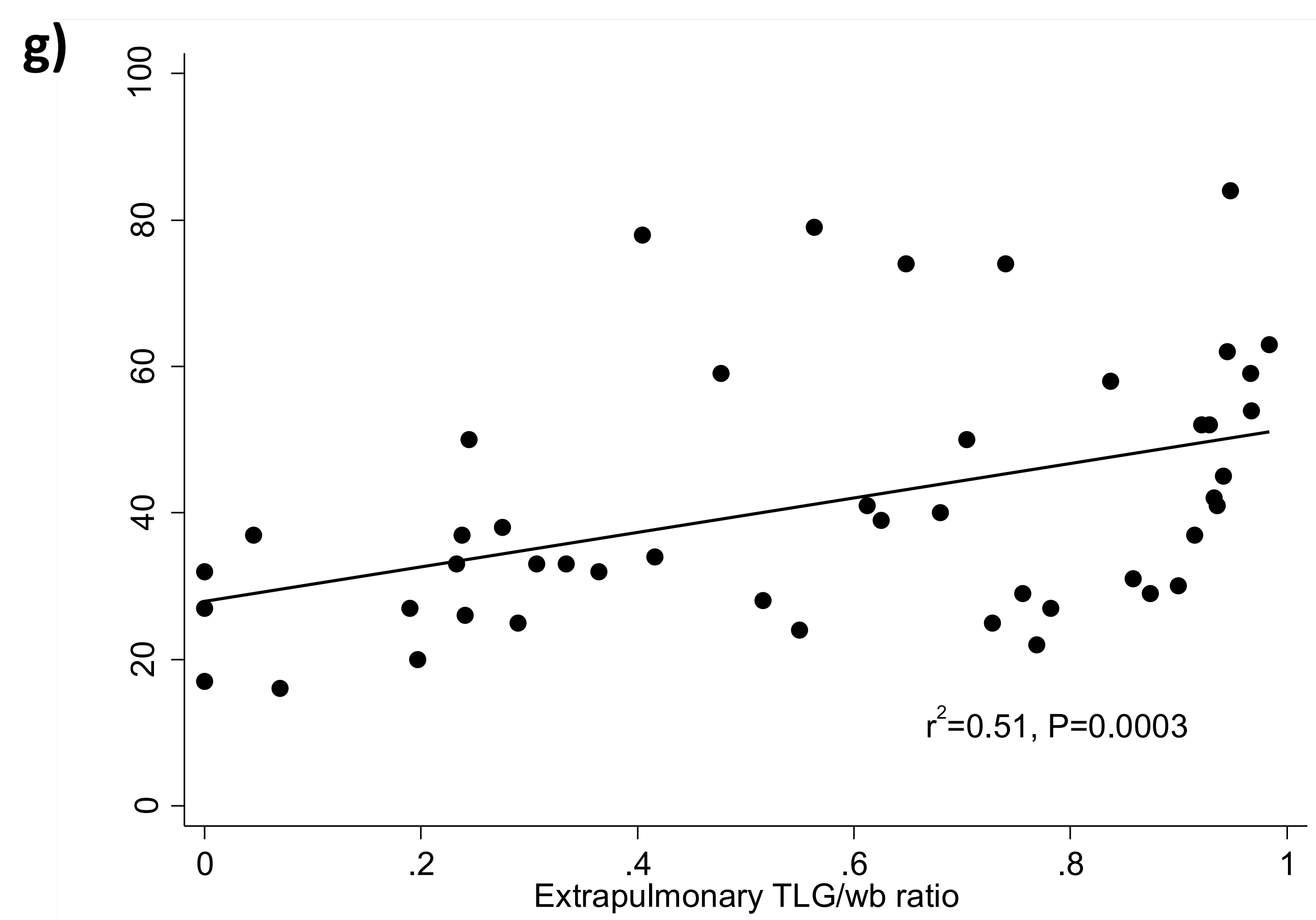
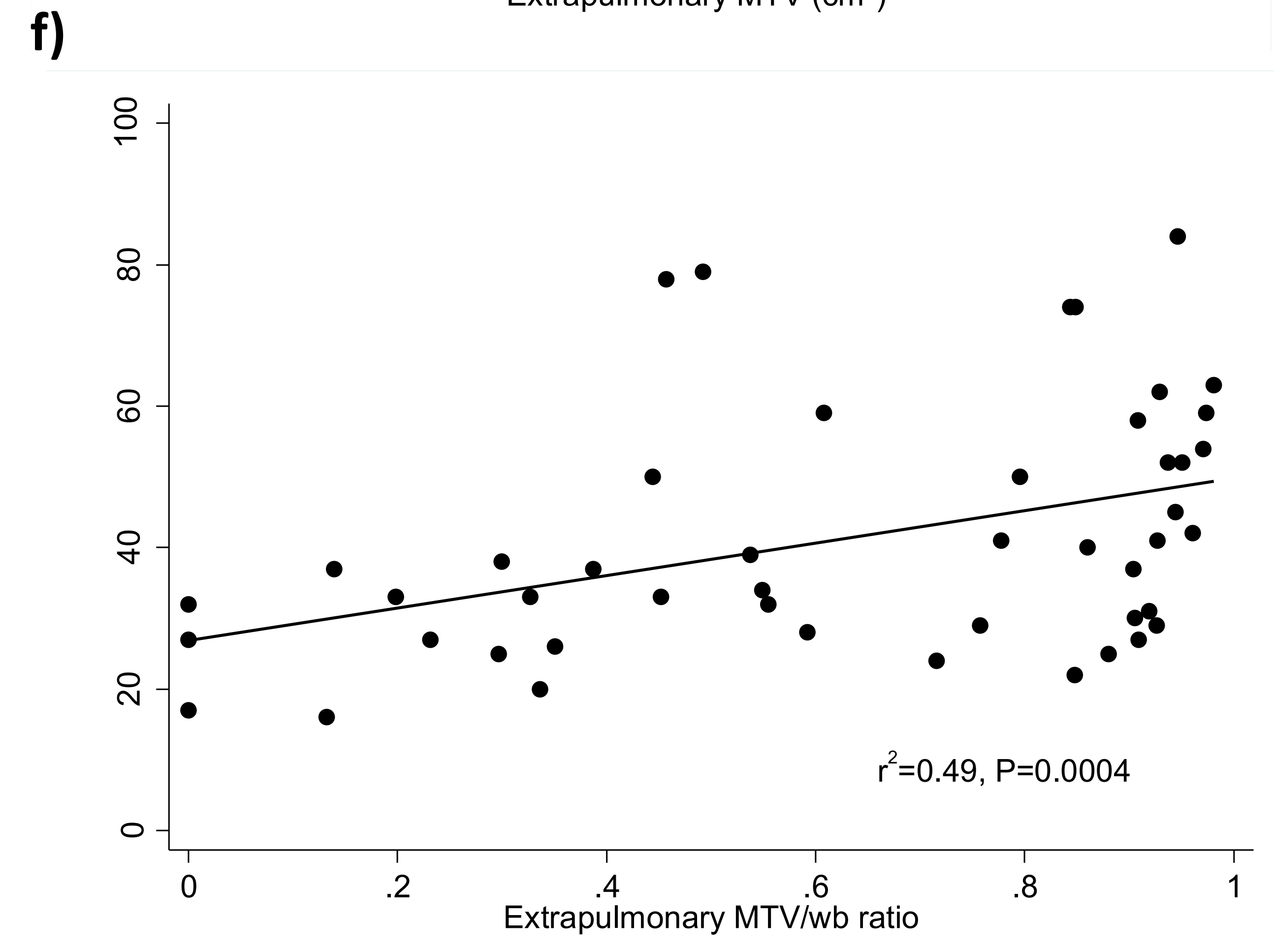
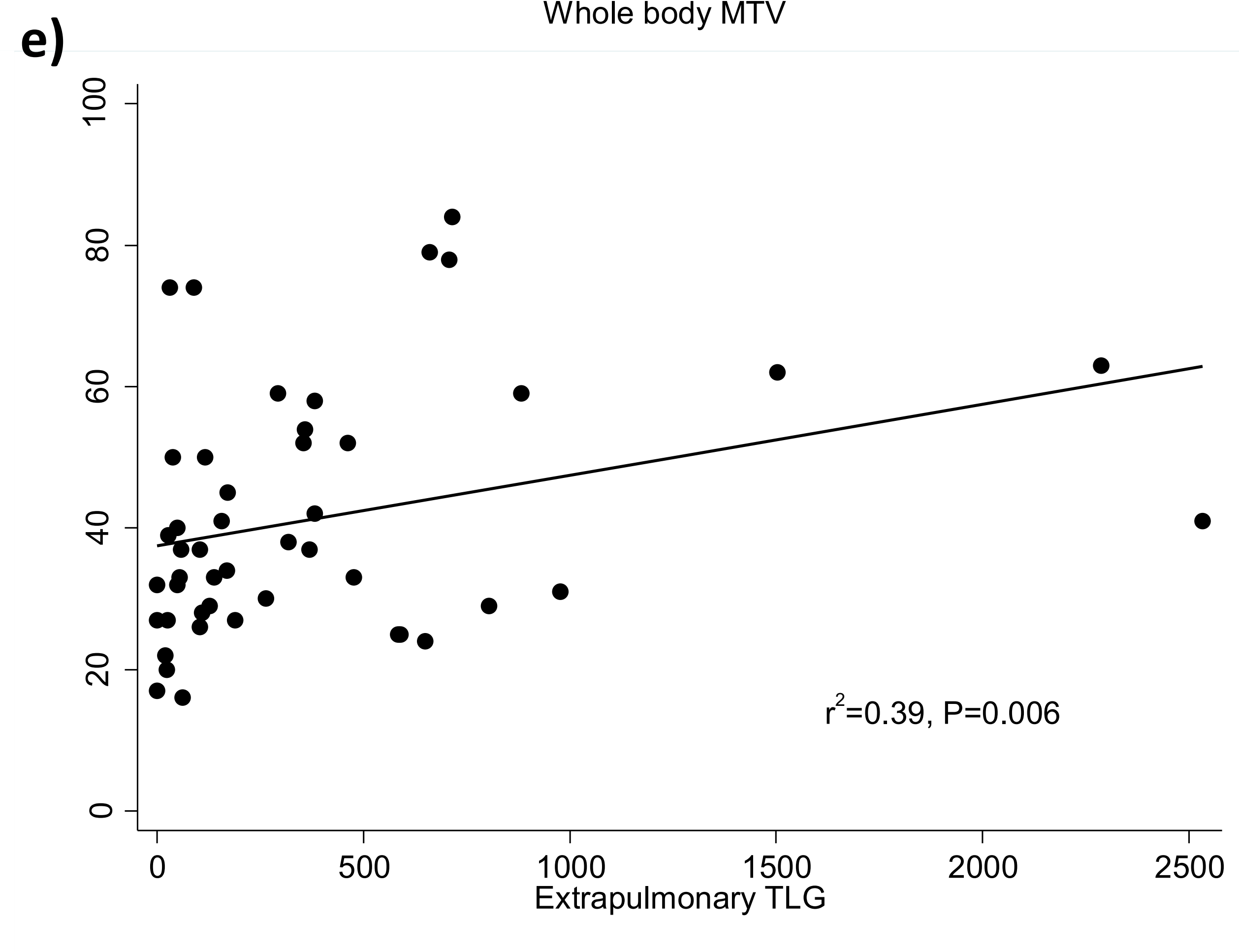
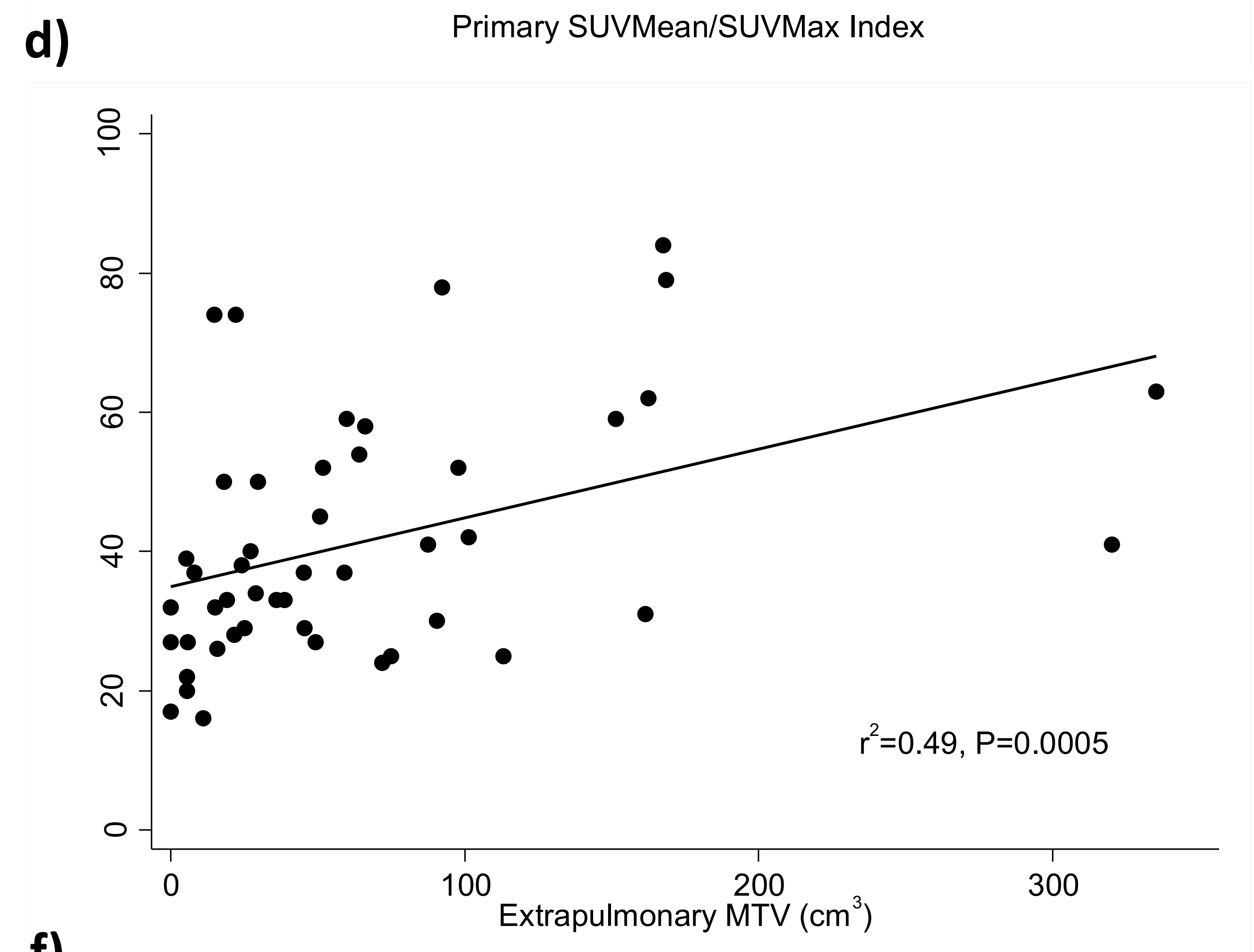
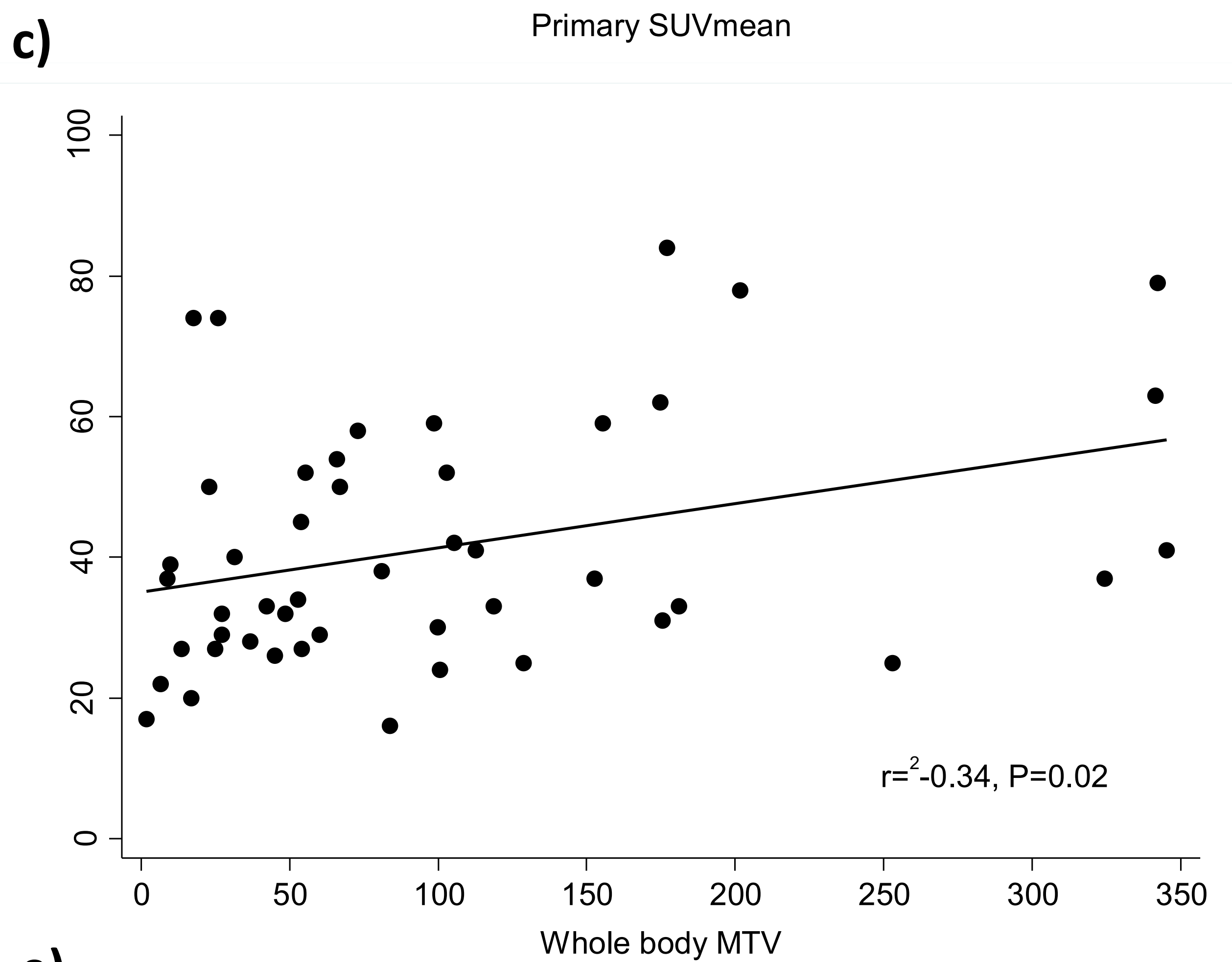
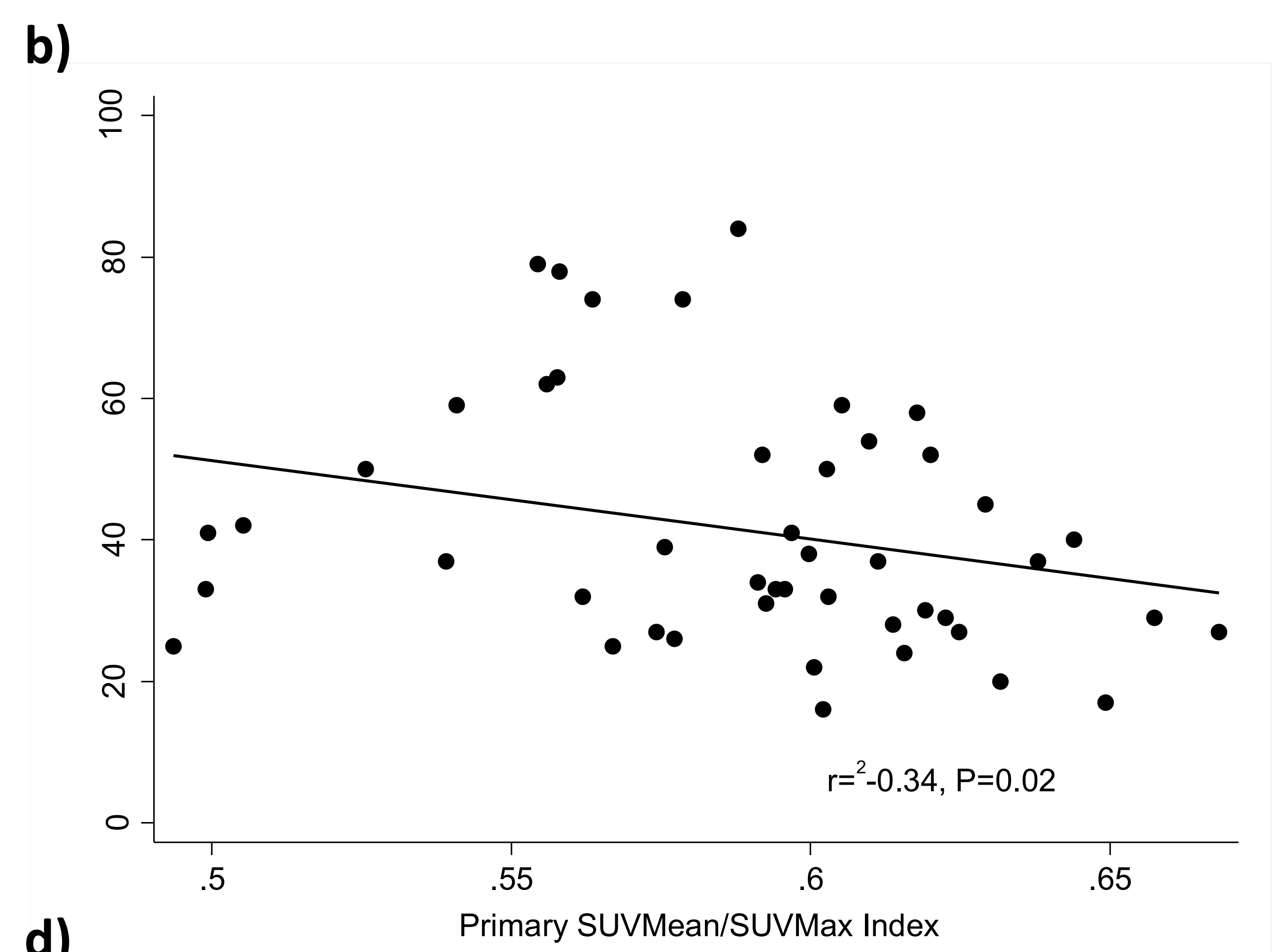
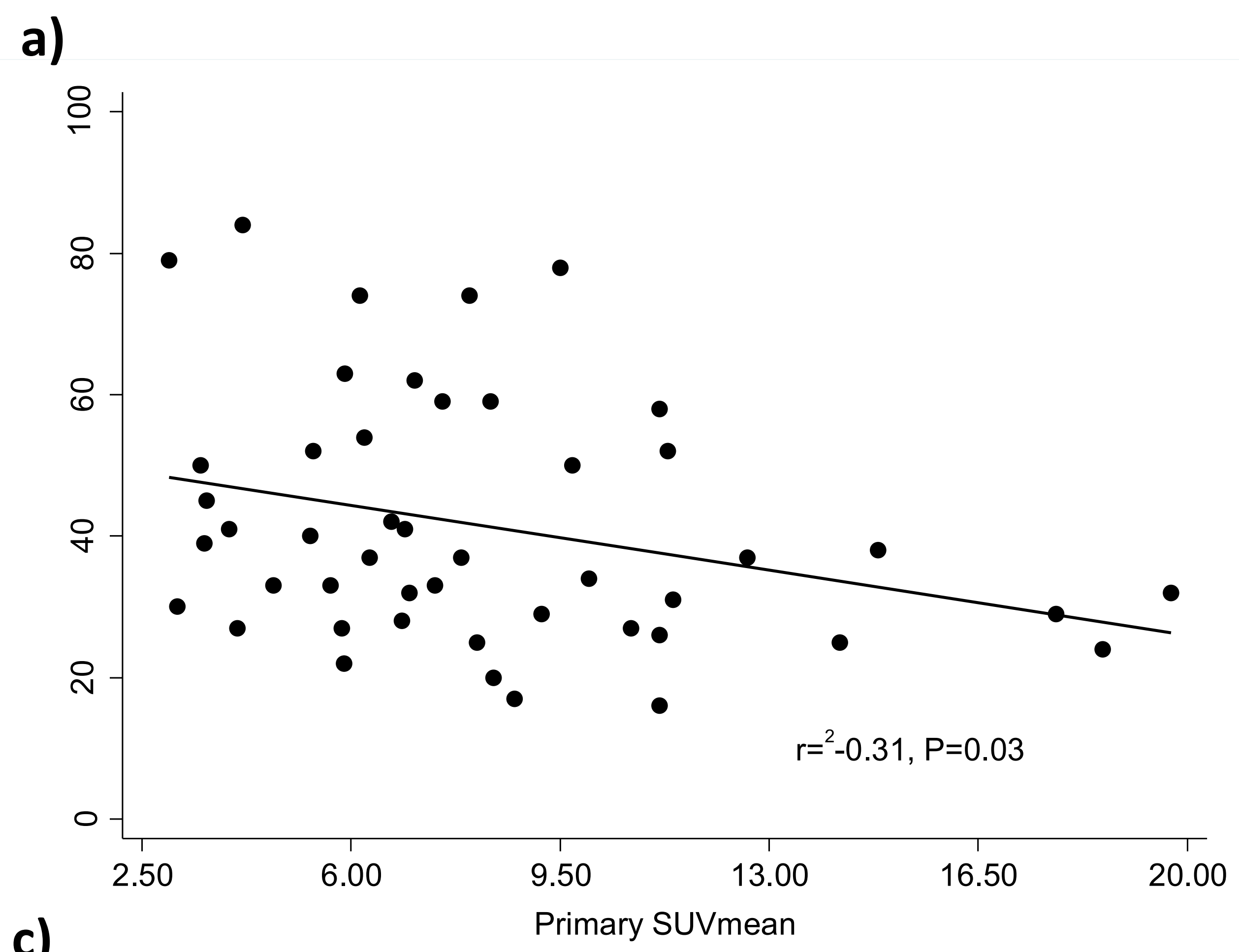
	NO afectación hepática	Afectación hepática	
>1000pb	32,3%	17,8%	p0,0008
	NO afectación ósea	Afectación ósea	
>1000pb	31,7%	25,4%	p0,04
	NO afectación pleural	Afectación pleural	
>1000pb	31,5%	24,3%	p0,04

Resultados:

Table 2. cfDNA 100-250bp cfDNA fragments (%) in absence or presence of body lesions assessed by FDG PET/CT and thoracoabdominal CT.

	Absence of lesions		Presence of lesions		P
	n	Median (range)	n	Median (range)	
PET/CT					
Necrosis	22	40.5 (17.0 – 84.0)	25	34.0 (16.0 – 78.0)	0.62
Bone	26	33.0 (16.0 – 78.0)	21	42.0 (20.0 – 84.0)	0.06
Adrenal	32	35.0 (16.0 – 84.0)	15	38.0 (20.0 – 63.0)	0.61
Liver	38	33.5 (16.0 – 74.0)	9	58.0 (30.0 – (84.0)	0.01
Pleural	28	32.5 (16.0 – 84.0)	19	42.0 (25.0 – 79.0)	0.02
CT					
Necrosis	18	37.0 (22.0 – 79.0)	15	34.0 (16.0 – 84.0)	0.59
Bone	27	33.0 (16.0 – 84.0)	6	35.5 (27.0 – 62.0)	0.76
Adrenal	29	33.0 (16.0 – 84.0)	4	37.0 (29.0 – 50.0)	0.78
Liver	28	33.0 (16.0 – 84.0)	5	78.0 (31.0 – 84.0)	0.02
Pleural	15	32.0 (22.0 – 84.0)	18	37.0 (16.0 – 79.0)	0.42
Lymph nodes	12	35.0 (22.0 – 54.0)	21	33.0 (16.0 – 84.0)	0.69
C. lymphangitis	26	33.5 (22.0 – 84.0)	7	33.0 (16.0 – 79.0)	0.95

C. lymphangitis: carcinomatous lymphangitis; CT: Thoracoabdominal CT. n: sample size; PET/CT: 2-¹⁸F-FDG PET/CT.



La fracción de fragmentos de cfDNA de 100-250 pb (%) es un biomarcador de la actividad metabólica en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Gráficos de dispersión que muestran la correlación entre el % de fragmentos de cfDNA de 100-250 pb y la media de SUV en la lesión primaria (a), índice de SUV medio / SUV máximo primario (b), wbMTV (c), MTV extrapulmonar (d), TLG extrapulmonar (e), MTV extrapulmonar / relación wbMTV (f), relación TLG extrapulmonar / wbTLG (g).

Conclusión:

- Los pacientes con mayor porcentaje de fragmentos de 100-250 pb tienen mayor enfermedad metabólica (MTV, TLG).
- Un elevado porcentaje de fragmentos de 100-250 pb es más frecuente en pacientes con enfermedad pleural o hepática.

Relevancia clínica:

- Los resultados obtenidos pueden ser de utilidad en el diagnóstico inicial de la enfermedad cuando existan dudas de afectación extratorácica o sobre la afectación hepática o pleural.
- Los fragmentos "cortos" de DNA (100-250 pb) correlacionan con fenómenos de apoptosis y, en nuestra serie, correlacionan con aquellos tumores con mayor índice proliferativo extrapulmonar. Por ello, consideramos que pueden ser de interés su estudio en el seguimiento de los pacientes con neoplasias pulmonares primarias para evaluar si estos cambios se mantienen en el tiempo.
- A su vez, la presencia de un elevado porcentaje fragmentos "cortos" en los pacientes con afectación metastásica pleural o hepática podría ser de utilidad para su diagnóstico en aquellas personas que debuten con dudosas lesiones en el hígado o con derrame pleural.

Bibliografía:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424.
2. Molina R, Marrades RM, Augé JM, Escudero JM, Viñolas N, Reguart N, et al. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:427–37.
3. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017;7:1–7.
4. Pakkala S, Ramalingam SS. Personalized therapy for lung cancer: striking a moving target. *JCI insight.* 2018;3.
5. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammastro M, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1437–43.
6. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32:579–86.
7. Wiener RS, Schwartz LM, Woloshin S, Welch HG. Population-based risk for complications after transthoracic needle lung biopsy of a pulmonary nodule: an analysis of discharge records. *Ann Intern Med.* 2011;155:137–44.
8. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev.* 2018;93:1649–83.
9. 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;6.
10. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* Nature Publishing Group; 2011;11:426–37.
11. 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;164:57–68.
12. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet.* 2018/04/23 ed. Springer International Publishing; 2018;26:937–45.
13. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer [Internet].* Nature Publishing Group; 2017;17:223–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.7>
14. Valpione S, Gremel G, Mundra P, Middlehurst P, Galvani E, Girotti MR, et al. Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer [Internet].* Elsevier; 2018;88:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.029>
15. Tissot C, Toffart A-C, Villar S, Souquet P-J, Merle P, Moro-Sibilot D, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J. European Respiratory Society;* 2015;46:1773–80.
16. Spindler K-LG, Boysen AK, Pallisgård N, Johansen JS, Tabernero J, Sørensen MM, et al. Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist [Internet].* John Wiley & Sons, Ltd; 2017;22:1049–55. Available from: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0178>
17. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med [Internet].* Massachusetts Medical Society; 2013;368:1199–209. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213261>
18. Singh N, Gupta S, Pandey RM, Chauhan SS, Saraya A. High Levels of Cell-Free Circulating Nucleic Acids in Pancreatic Cancer are Associated With Vascular Encasement, Metastasis and Poor Survival. *Cancer Invest [Internet].* Taylor & Francis; 2015;33:78–85. Available from: <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.1001894>
19. Winther-Larsen A, Fledelius J, Demuth C, Bylov CM, Meldgaard P, Sorensen BS. Early change in FDG-PET signal and plasma cell-free DNA level predicts erlotinib response in EGFR wild-type NSCLC patients. *Transl Oncol [Internet].* The Authors; 2016;9:505–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.09.003>
20. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *Br J Cancer [Internet].* Nature Publishing Group; 2015;113:476–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.225>
21. Weng J-L, Atyah M, Zhou C-H, Ren N. Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Genet [Internet].* 2019;239:75–84. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210776219301486>
22. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019;17:100087.
23. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, Welker NC, Daza R, Baker DN, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet.* 2016;12:1–24.
24. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VWS, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E1317–25.
25. Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6.

Bibliografía:

26. Yamamoto Y, Uemura M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Ishizuya Y, et al. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9:20467–75.
27. Lapin M, Oltedal S, Tjensvoll K, Buhl T, Smaaland R, Garresori H, et al. Fragment size and level of cell-free DNA provide prognostic information in patients with advanced pancreatic cancer. *J Transl Med [Internet]*. BioMed Central; 2018;16:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1677-2>
28. Soliman SES, Alhanafy AM, Habib MSE, Hagag M, Ibrahim RAL. Serum circulating cell free DNA as potential diagnostic and prognostic biomarker in non small cell lung cancer. *Biochem Biophys Reports [Internet]*. Elsevier B.V.; 2018;15:45–51. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.06.002>
29. Delgado Bolton RC, Calapaquí-Terán AK, Giammarile F, Rubello D. Role of 18F-FDG PET/CT in establishing new clinical and therapeutic modalities in lung cancer. A short review. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol [Internet]*. Sociedad Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular; 2019;38:229–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rem.2019.02.003>
30. Mayoral M, Fernandez-Martinez A, Vidal L, Fuster D, Aya F, Pavia J, et al. Prognostic value of 18F-FDG PET/CT volumetric parameters in recurrent epithelial ovarian cancer. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2016;35:88–95.
31. McEvoy AC, Warburton L, Al-Ogaili Z, Celliers L, Calapre L, Pereira MR, et al. Correlation between circulating tumour DNA and metabolic tumour burden in metastatic melanoma patients. *BMC Cancer*. BMC Cancer; 2018;18:1–8.
32. Woff E, Kehagias P, Vandeputte C, Ameye L, Guiot T, Paesmans M, et al. Combining 18F-FDG PET/CT-based metabolically active tumor volume and circulating cell-free DNA significantly improves outcome prediction in chemorefractory metastatic colorectal cancer. *J Nucl Med*. 2019;60:1366–72.
33. Winther-Larsen A, Demuth C, Fledelius J, Madsen AT, Hjorthaug K, Meldgaard P, et al. Correlation between circulating mutant DNA and metabolic tumour burden in advanced non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2017;117:704–9.
34. Morbelli S, Alama A, Ferrarazzo G, Coco S, Genova C, Rijavec E, et al. Circulating tumor DNA reflects tumor metabolism rather than tumor burden in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer: 18F-FDG PET/CT study. *J Nucl Med*. 2017;58:1764–9.
35. Vizza E, Corrado G, De Angeli M, Carosi M, Mancini E, Baiocco E, et al. Serum DNA integrity index as a potential molecular biomarker in endometrial cancer. *J Exp Clin Cancer Res. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2018;37:1–9.
36. Çelik F, Tan YZ, Özdemir S, Silan F. Comparison of SUVmax values obtained from F-18 FDG PET/CT and cell-free DNA levels measured from plasma in oncology patients. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2019;28:46–52.
37. Nygaard AD, Holdgaard PC, Spindler KLG, Pallisgaard N, Jakobsen A. The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *Br J Cancer*. Nature Publishing Group; 2014;110:363–8.
38. Vesselle H, Salskov A, Turcotte E, Wiens L, Schmidt R, Jordan CD, et al. Relationship Between Non-small Cell Lung Cancer FDG Uptake at PET, Tumor Histology, and Ki-67 Proliferation Index. *J Thorac Oncol*. 2008;3:971–8.
39. Cappabianca S, Porto A, Petrillo M, Greco B, Reginelli A, Ronza F, et al. Preliminary study on the correlation between grading and histology of solitary pulmonary nodules and contrast enhancement and [18F]fluorodeoxyglucose standardised uptake value after evaluation by dynamic multiphase CT and PET/CT. *J Clin Pathol*. 2011;64:114–9.
40. Chiu C-H, Yeh Y-C, Lin K-H, Wu Y-C, Lee Y-C, Chou T-Y, et al. Histological Subtypes of Lung Adenocarcinoma Have Differential 18F-Fluorodeoxyglucose Uptakes on the Positron Emission Tomography/Computed Tomography Scan. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1697–703.
41. Stewart CM, Tsui DWY. Circulating cell-free DNA for non-invasive cancer management. *Cancer Genet*. 2018/03/11 ed. 2018;228-229:169–79.
42. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta*. Netherlands; 2015;450:243–53.
43. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, De Winne K, Goethals S, Reclusa P, et al. Circulating Cell-Free DNA and RNA Analysis as Liquid Biopsy: Optimal Centrifugation Protocol. *Cancers (Basel)*. 2019;11.
44. Shi J, Zhang R, Li J, Zhang R. Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing. *Theranostics*. 2020;10:4737–48.
45. Jreige M, Nicod Lalonde M, Krueger T, Peters S, Prior JO, Letovanec I, et al. Tumor Necrosis in NSCLC revealed by metabolic analysis of FDG PET/CT imaging. *EANM 18*. 2018. p. EP – 0514.
46. Sabine Jahr, Hannes Hentze, Sabine Englisch, Dieter Hardt, Frank O. Fackelmayer, Rolf-Dieter Hesch, et al. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res*. 2001;61:1659–65.
47. Dooms C, van Baardwijk A, Verbeken E, van Suylen RJ, Stroobants S, De Ruyscher D, et al. Association between 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake values and tumor vitality: prognostic value of positron emission tomography in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. United States; 2009;4:822–8.
48. Wang R-A, Li Q-L, Li Z-S, Zheng P-J, Zhang H-Z, Huang X-F, et al. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize. *J Cell Mol Med*. 2013;17:205–11.
49. Kaira K, Okumura T, Ohde Y, Takahashi T, Murakami H, Oriuchi N, et al. Correlation between 18F-FDG uptake on PET and molecular biology in metastatic pulmonary tumors. *J Nucl Med*. United States; 2011;52:705–11.