



Biología del cáncer temprano: aplicación en la práctica clínica

Biology of early-stage cancer: Clinical Application

Alejandro Ruiz-Patiño^{1,2,*}

¹Genética médica, Centro de Tratamiento e Investigación sobre Cáncer Luis Carlos Sarmiento Angulo (CTIC), Bogotá, Colombia

²Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer – FICMAC, Bogotá, Colombia

Recibido: 12 febrero 2025

Aceptado: 28 marzo 2025

*Correspondencia: Alejandro Ruiz-Patiño. Alejandro.ruiz.pat@gmail.com

Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por la desregulación genómica y la evolución clonal a lo largo de su desarrollo. A medida que avanza, las células neoplásicas pueden adquirir características como la transición epitelio-mesénquima, la evasión inmune y la capacidad metastásica. Esto impacta en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, especialmente cuando se detecta en estadios avanzados. Actualmente, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, con un 50% de los casos diagnosticados en etapas tardías, lo que limita las opciones terapéuticas y reduce la posibilidad de curación. Las estrategias de detección temprana han demostrado mejorar significativamente la supervivencia en algunos tipos de cáncer, como el colorrectal y de mama; sin embargo, existen neoplasias para las cuales no hay métodos de tamización suficientemente sensibles. Una alternativa prometedora es el uso de pruebas basadas en la identificación de biomarcadores comunes en diversos tipos tumorales. Dentro de estos, se destacan las mutaciones conductoras (*drivers*), las alteraciones epigenéticas, la fragmentación del ADN libre de células (cfDNA), el perfil transcriptómico de plaquetas educadas por el tumor y las vesículas extracelulares. Estas estrategias, determinadas por métodos no invasivos como la biopsia líquida, han mostrado potencial en la detección de cáncer en fases iniciales, abriendo la posibilidad de un diagnóstico temprano con una mayor sensibilidad que los métodos actuales.

Palabras clave: Detección temprana. Biopsia líquida. Biomarcadores del cáncer. ADN libre de células. Evolución tumoral.

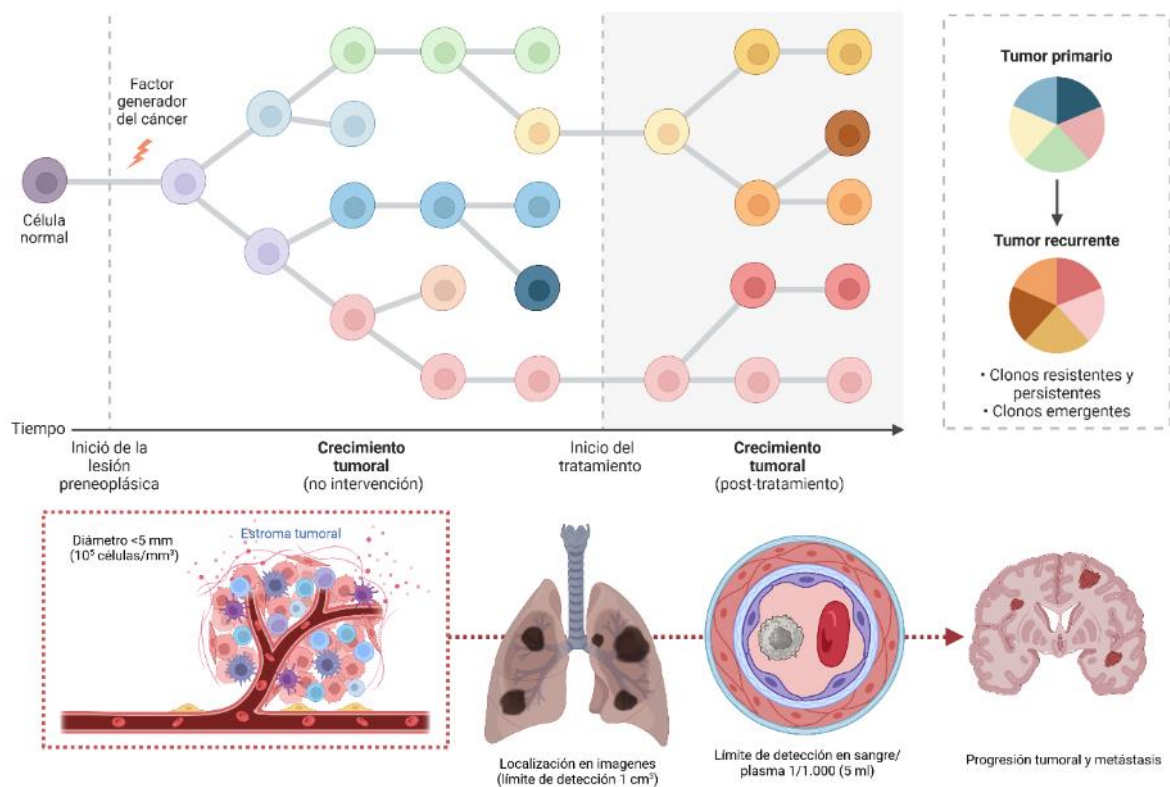
Abstract

Cancer is a group of diseases characterized by genomic deregulation and clonal evolution throughout its development. As it progresses, neoplastic cells may acquire epithelial-mesenchymal transition, immune evasion, and metastatic capability. This impacts disease diagnosis and prognosis, especially when detected at advanced stages. Currently, cancer is the second leading cause of death worldwide, with 50% of cases diagnosed in late stages, limiting therapeutic options and reducing the chances of cure. Early detection strategies have significantly improved survival rates in specific cancer types, such as colorectal and breast cancer. However, for some malignancies, no sufficiently sensitive screening methods are available. A promising alternative is using tests based on identifying common biomarkers across different tumor types. These include driver mutations, epigenetic alterations, cell-free DNA (cfDNA) fragmentation, the transcriptomic profile of tumor-educated platelets, and extracellular vesicles. These strategies, assessed through non-invasive methods like liquid biopsy, have shown potential in detecting cancer at early stages, offering the possibility of earlier diagnosis with greater sensitivity than current methods.

Keywords: Early detection. Liquid biopsy. Cancer biomarkers. Cell-free DNA. Tumor evolution.

Resumen gráfico

Evolución del cáncer



Puntos clave

- Las células tumorales pueden evolucionar mediante diversos mecanismos, incluyendo la selección natural y evolución neutral. Aunque la evolución clonal se consideró inicialmente como un proceso continuo y gradual, recientemente se ha demostrado que también pueden ocurrir por ráfagas a través de la estasis, el gradualismo o la puntuación, con diferentes dinámicas moleculares que pueden proceder por evolución lineal o ramificada.
- Aunque el modelo de evolución clonal se centra tradicionalmente en la progresión de las alteraciones de las células tumorales pluripotenciales como unidad básica de selección, esta puede ocurrir en niveles superiores, incluyendo grupos de células en lugar de elementos individuales. Existe un debate sobre la evolución por selección natural entre las metástasis, contando cada lesión como una entidad reproductiva individual capaz de generar metástasis secundarias. La selección de nivel superior también podría ser entre colonias de células pluripotenciales y su progeñe. La selección en el cáncer también puede ocurrir en niveles inferiores a la célula, a través de elementos transponibles, DNA extra cromosómico y micronúcleos.
- El modelo de evolución clonal predice que diferentes entornos modificarán la capacidad de expansión de los clones mutados. En el sistema hematopoyético, por ejemplo, los clones mutados surgen con el envejecimiento, un proceso conocido como hematopoyesis clonal. Diferentes cambios ambientales, como el envejecimiento, la quimioterapia, las infecciones y el tabaquismo, pueden conducir a hematopoyesis clonal. Esto también permite explicar la aparición tardía del cáncer, ya que la disminución de la aptitud física de las células sanas con el envejecimiento genera competidores más débiles para la selección de los clones mutados.

Introducción

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades que comparten la desregulación genómica como mecanismo fisiopatológico común. A lo largo de su desarrollo en un paciente, tiende a tener una evolución clonal, en la que las vías moleculares implicadas pueden cambiar y comenzar a manifestar fenómenos como transición epitelio-mesénquima, ganancia de facultades para la evasión del sistema inmunitario, e incluso, la adquisición de la capacidad de desarrollo de metástasis¹. Esto resulta en dos fenómenos: Primero, si se analizan los perfiles genómicos de la enfermedad a través de los diferentes estadios, estos no serán iguales² y segundo, a un diagnóstico tardío, el pronóstico derivado no solamente de la extensión anatómica y diseminación hematolinfode, que de la adquisición de funciones genómicas que aumentan su capacidad de resistir a los tratamientos sistémicos convencionales³.

Frente al impacto del cáncer sobre la salud pública, se estima que actualmente es la segunda causa de muerte a nivel mundial, ya que el 50% de los casos de cáncer son diagnosticados en estadios avanzados donde la posibilidad de curación se reduce. De esta forma, se han desarrollado una serie

de estrategias para, en determinados escenarios, prevenir casos de cáncer, así como potenciar la detección temprana de los no prevenibles, elevando sustancialmente la posibilidad de remisión, reduciendo morbilidad y costos del tratamiento⁴. Estas estrategias, tales como la vacunación contra el virus de papiloma humano (VPH) y la tamización para cáncer colorrectal, mama y otros, han demostrado positivamente impactar la mortalidad de estas condiciones⁵⁻⁸. Por otro lado, existen otras patologías tales como el cáncer de pulmón en no fumadores, cáncer de ovario, páncreas y otros, donde no existen herramientas lo suficientemente sensibles para ser utilizadas como medidas de tamización general que impacten en su supervivencia⁹⁻¹¹. Esto plantea la necesidad de la utilización de novedosas estrategias que puedan ser implementadas como medidas de tamización general al igual que sean aceptadas, costo efectivas y lo suficientemente sensibles. Una propuesta interesante sería la utilización de una prueba que permitiera detectar los casos de cáncer, independientemente del tumor primario. Para su implementación, se debería buscar mecanismos comunes y extrapolables; de esta manera, entendiendo la biología de los tumores tempranos, se pueden desarrollar estrategias que permitan la identificación de los procesos oncogénicos a nivel

molecular y orienten a la presencia de un tumor. Con base en esta hipótesis se plantea como objetivo de esta revisión entender los procesos involucrados en la evolución del cáncer temprano y cómo estos pueden ser utilizados en la clínica.

Fenómenos mutacionales

Considerando que debe existir una instrucción genómica, ya sea por mecanismos mutacionales tales como la adquisición de variantes de ganancia de función en protooncogenes o por mecanismos epigenéticos consistentes en metilación de promotores de genes supresores tumorales, por ejemplo, se plantea la posibilidad de la búsqueda y la detección de estas mutaciones como medidas indirectas para la identificación del cáncer.

Este fenómeno se conoce como la adquisición de mutaciones conductoras o “*driver*” en el que las células sufren un proceso de ganancia de función en una vía de señalización responsable de la división celular, la desdiferenciación, proliferación y otros procesos similares. Es importante mencionar que, como estos genes son considerados iniciadores y promotores de la enfermedad, se manifestarían desde el inicio de esta y, a menos que exista una presión clonal, continuarían a lo largo de la evolución.

El compendio de *drivers* de genes del cáncer recopila información de alrededor de 22.000 muestras de 66 tipos diferentes de cáncer, donde logra identificar 568 genes, los cuales contribuyen al proceso de tumorigénesis. Este estudio revela incluso que existe una heterogeneidad en el tipo y el número de genes responsables de la oncogénesis dependiendo de la histología del tumor en cuestión.

En el caso del cáncer de mama, se identificaron en el momento del estudio alrededor de 99 genes *driver*, siendo la enfermedad con mayor número de los mismos. En un punto medio aparece el adenocarcinoma de pulmón con 42 y no menos importante el neuroblastoma con 20. De forma interesante, cerca del 80% de estos genes son comunes para varias patologías. De los genes más

frecuentemente alterados se encuentran TP53 (52%), PIK3CA (36%), KMT2C (32%), KRAS (29%), PTEN (28%), RB1(24%) entre otros.

Lo que es llamativo es que, a su vez, se estima que 360 genes son considerados *drivers* únicamente en uno o dos tumores, mientras que menos de 20 se encuentran presentes en más de 20 tipos distintos de cáncer. Esto abre la posibilidad de que, si se quiere identificar las mutaciones *drivers* como una medida de detección temprana del cáncer, las pruebas que se diseñen pueden ser paneles de unos cientos de genes en comparación con el exoma o genoma.

Por otro lado, existen patrones específicos mutacionales, en donde protooncogenes tienden a agrupar las mutaciones en un tipo y en dominios específicos de la proteína. Es el caso de EGFR y otros receptores de tirosina cinasa, conocidos como *drivers* en el adenocarcinoma de pulmón, cuyas mutaciones de ganancia de función se localizan en el dominio intracelular de la proteína, debido a que son las responsables de la activación independiente de ligando que da origen a esta enfermedad. De esta manera, se podría considerar que para la detección de ciertos tipos de *drivers*, analizar una región específica del gen podría ser suficiente¹². Si adicionalmente entendemos que todas las células del organismo liberan contenido genómico al intersticio dentro de los procesos normales de apoptosis y tránsito de vesículas extracelulares, tanto de origen neoplásico como no neoplásico¹³, podemos plantear que es posible detectar estos *drivers* en ausencia de evidencia de una masa como tal. Esta metodología se conoce como biopsia líquida y se basa en la identificación de este material genético, en este caso ADN, conocido como ADN libre de células o cfDNA por sus siglas en inglés. En el caso específico del cfDNA asociado a cáncer, se le conoce como ADN tumoral circulante o ctDNA. Éste la tiene la particularidad de que puede ser detectado en sangre o saliva, convirtiéndose un vehículo aceptable para la detección de mutaciones *driver*. Por otro lado, es pertinente mencionar que, al concentrarse el ctDNA en un fluido, no permite identificar la localización anatómica del primario,

aunque por el tipo de alteraciones, si pertenecen a uno de estos conductores tumorales específicos, podrían orientar al tipo de primario¹⁴.

En el caso de las mutaciones comunes de los *drivers* compartidos, la identificación de variantes tipo BRAF V600E o KRAS G12/13X, las cuales son relativamente frecuentes en varios tipos de tumores tales como carcinoma colorrectal o melanoma, las técnicas como la PCR permiten llegar a una identificación de hasta una copia dentro de 12.000 equivalentes genómicos, lo que supone un límite de detección de $-8,3\log$ ¹⁵. Considerando que se trata de variantes comunes a varios tumores, la identificación de estas nos ofrece una visión específica únicamente de ciertos tumores. Si se quiere ir a una metodología la cual se aplique para otros tipos tumorales, conocida como tumor-agnóstica, de cierta forma incluyendo *drivers* adicionales, se necesita implementar otras técnicas moleculares como la secuenciación de próxima generación o NGS por sus siglas en inglés. Este procedimiento tiene la limitación de que el umbral de detección obtenida por la PCR podría ser más complicada de equiparar. Por un lado, se estima que se necesita una profundidad de lectura de más de 60.000X (es decir cada base candidata del estudio debe secuenciarse ese número de veces) para poder detectar alrededor de 30 moléculas mutantes derivadas del tumor, si la concentración de ctDNA es de 0,1% en sangre. Esto eleva sustancialmente los costos de su conducción. Por otra parte, se estima que la tasa de mutaciones somáticas en el genoma tumoral puede oscilar entre 0,1 a 100 mutaciones por megapar de bases, por lo que la posibilidad de fallar al atribuir significancia clínica a una variante encontrada en un *driver* podría ser una posibilidad. Frente a falsos positivos, considerando que el cfDNA representa también material genómico proveniente de otros tejidos, podrían existir variantes somáticas sin impacto clínico, las cuales sean falsamente atribuibles a una neoplasia¹². Considerando estas limitaciones técnicas se ha planteado el uso de otros fenómenos de enfermedad temprana como herramientas para su detección.

Epigenotipo y metilación

Como se mencionaba previamente, existen otros mecanismos responsables de la conducción del desarrollo de las neoplasias, dentro de los cuales se encuentra la desregulación epigenética. Este fenómeno se ha descrito incluso antes de la aparición de mutaciones *driver* y se caracteriza de forma similar a los *drivers*, por la expresión de protooncogenes y el silenciamiento de genes supresores tumorales¹⁶. Se ha descrito casos en donde incluso se pudo detectar cambios en la metilación cuatro años antes de un diagnóstico patológico de cáncer¹⁷. Estos sitios de metilación se conocen como islas CpG y tienen la particularidad que su extensión es menor a la de un gen completo. Se encuentran distribuidos a lo largo del genoma, pero concentrándose en aproximadamente 30.000 sitios, teniendo la ventaja que muchos procesos de diferenciación celular están mediados por sus patrones de metilación. Esto a su vez nos indica que el cáncer tiene unos patrones de metilación aberrantes que se distancian de las células sanas y, de la misma manera, podría ayudar a orientar al origen neoplásico^{16,18}. Bajo este supuesto, se han desarrollado ensayos que capturan únicamente sitios de metilación asociados con cáncer; sin embargo, requieren conversión con bisulfitos y una alta concentración de ADN, la cual a veces en muestras de cfDNA es difícil de obtener, aunque ofrecen una alta especificidad como contrapartida¹⁹. Nuevas metodologías como la inmunoprecipitación seguida de secuenciación de alto rendimiento enriquece la captura del ADN metilado empleando un tampón de ADN metilado y no metilado que favorece la precipitación del metiloma, permitiendo reducir la cantidad de ADN necesaria para la secuenciación e incrementar la especificidad el ensayo, en una prueba libre de bisulfitos²⁰.

Fragmentómica

Otra diferencia fundamental del cáncer temprano con los tejidos de donde se origina radica en la actividad nucleosomal. Esta corresponde a la organización cromosómica donde el enrollamiento en estas estructuras depende de las regiones

relacionadas con las histonas y, de la misma forma, depende de los patrones epigenotípicos mencionados previamente. Al igual que la metilación, el enrollamiento nucleosomal es dependiente del tejido de origen²¹. Una vez las células experimentan apoptosis, estas estructuras son fragmentadas, lo que lleva a que estos segmentos sean liberados y se vean representados en el cfDNA. Considerando que la organización depende de la regulación, o en el caso del cáncer, la desregulación epigenotípica, los fragmentos producto de la tensión nucleosomal, como se esperaría, son diferentes entre los tejidos sanos y las células tumorales. Frente a la longitud de estos elementos se estima que el pico se obtiene para ctDNA en 143 pares de bases (pb) vs 167 pb para fragmentos de células sanas²². Tomando en cuenta que el ADN tumoral no se encuentra tan correctamente empaquetado, ciertas regiones, especialmente un enlace internucleosómico, son objeto de actividad de ADNasa inducidas por caspasas²³. La identificación de estos fragmentos ha permitido conocer que las zonas de clivaje también corresponden a un patrón específico que orientan al tumor de origen del fragmento. Al igual que los estudios pivotaes de metilación, esta metodología requiere de altas concentraciones de ADN para ser informativo, por lo que su uso en la clínica no ha alcanzado su cenit²¹.

Es importante mencionar que, como todos estos métodos emplean cfDNA para la detección, existen algunas condiciones que pueden reducir el rendimiento de estas técnicas. En el caso de las enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias, así como fenómenos de inflamación crónica, se ha visto un incremento significativo en los niveles de esta molécula en sangre. Esto, a su vez, provoca que la liberación de otras fuentes de cfDNA diluya las moléculas de interés, reduciendo la sensibilidad. Esto es particularmente llamativo en los estudios clínicos que buscaron evaluar estas pruebas debido a que un gran número de ensayos excluyó estos pacientes mientras que unos pocos mantuvieron pacientes con enfermedad hepática o neoplasias asociadas a enfermedad inflamatoria intestinal^{24,25}.

Plaquetas entrenadas por el tumor

Hasta este punto se han presentado cambios intrínsecos de los diferentes tumores, sin embargo, es importante mencionar que las enfermedades neoplásicas se componen también de células acompañantes tales como plaquetas, fibroblastos, células inflamatorias infiltrantes, entre otras. La interacción que se genera entre estas y los tumores recibe el nombre de microambiente tumoral y fomenta ambientes adaptativos que responden a presiones de hipoxia, promoción de angiogénesis y otros. Asimismo, se ha visto que estas células favorecen incluso respuestas protumorales así como fomentan metástasis y desarrollo de resistencia a terapias²⁶.

Se ha descrito que la composición y el funcionamiento del microambiente tumoral es dinámico y va evolucionando con el paso de la proliferación del tumor. En el caso de la enfermedad temprana, existe un influjo de células inflamatorias, las cuales van perdiendo capacidad citotóxica debido a un cambio en la relación celular favoreciendo células supresoras, así como regulación al alza de moléculas de puntos de control como CTLA4 o PD-L1 y pérdida de diversidad de clonotipos de receptores de células T. De la misma manera se da un fenómeno de influjo celular compuesto por células mieloides, las cuales fomentan la respuesta inmunosupresora²⁷. Para que se den estos fenómenos, las células tumorales ganan la capacidad de modular las respuestas de las otras células por medio de inducción de señales, expresión de ciertas proteínas de matriz extracelular, producción de moléculas de comunicación, entre otras. De esta manera y considerando que estos fenómenos se empiezan a presentar de forma temprana dentro del proceso oncogénico, se podría pensar en detectar estas células como marcadores indirectos del cáncer. Las principales células identificadas en este proceso son las plaquetas, que reciben el nombre de plaquetas entrenadas o educadas por el tumor.

La célula neoplásica gana tempranamente en su evolución la expresión de ligandos específicos de receptores de plaquetas tales como factor de

von Willebrandt tumoral, integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, integrina tumoral $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, entre otras^{28,29}. La unión de estos elementos a su vez fomenta la desgranulación de plaquetas, su agregación sobre las células tumorales, promoviendo su protección contra el sistema inmunitario y fomentando la angiogénesis por vías paracrina, en los cuales se incluye VEGF y otras citoquinas^{30,31}. Debido a que estos cuerpos celulares son altamente específicos, se ha visto que su presencia permite diferenciar pacientes con cáncer vs sanos con hasta un 96% de confianza³².

Frente a su detección es importante mencionar que en estos elementos se han identificado de 6.000 a 9.000 tipos diferentes de mRNA, los cuales hasta el 20% corresponden con transcritos productos de *splicing* o empalme alternativo, y no se identifican en tejidos sanos. Las plaquetas, al ser anucleadas, heredan de sus progenitores megacariocitos una gran cantidad de pre-mRNA, los cuales, posterior a la activación de las plaquetas, causan empalme alternativo y la creación de este amplio repertorio de isoformas. Se estima que incluso esos perfiles transcriptómicos tienen la capacidad de orientar al tipo de tumor primario³³. Teniendo en cuenta que estos cuerpos celulares se desprenden y viajan en el torrente sanguíneo, su detección por medio de una muestra de sangre total es posible. Estudios con pacientes que incluyeron 18 tipos de cáncer identificaron una sensibilidad cercana al 50%. Lo interesante es que en el grupo control reclutaron pacientes con enfermedad coronaria, trastornos inflamatorios y tumores benignos, los cuales pudieron ser identificados contra un fondo de pacientes sanos, abriendo la posibilidad que esta metodología podría tener aplicabilidad fuera de la oncología³⁴.

Vesículas extracelulares

Estos elementos celulares están conformados por membrana celular la cual se organiza para formar esferas que son liberadas al microambiente tumoral y al torrente sanguíneo. Los exosomas son estas vesículas con un tamaño entre 30 y 150 nm, que empaquetan componentes de la proteómica tumoral. Se ha visto que estos contienen elementos

como Neuropilina 1 y TIMP-1, promotores de la desdiferenciación de los tumores, la promoción de la angiogénesis y el desarrollo de metástasis^{35,36}. La ventaja de estos elementos es que son liberados desde el inicio de la enfermedad y, debido a que se necesita integridad celular para formarlos, no requieren de apoptosis; además, tumores con mayores índices de proliferación tienden a liberar mayor cantidad de vesículas^{37,38}.

Como se preserva la integridad de la membrana, los exosomas pueden transportar en ellos ADN protegido de nucleasas. Esto a su vez favorece que la detección de ctDNA pueda ser superior en vesículas a su contraparte de cfDNA³⁹. Asimismo, estudios en adenocarcinoma de páncreas han logrado alcanzar una sensibilidad cercana al 95% para estadio I, y 96% para II. Curiosamente, en otras histologías como el cáncer de ovario, su sensibilidad para los mismos estadios alcanza 68 y 73%, respectivamente.

Para su captura, los marcadores de cada vesícula extracelular tienen que ser determinados antes de su búsqueda. En el caso de cáncer de páncreas, el CA19-9 es un marcador que se encuentra elevado en la mayoría de los casos, siendo altamente específico del mismo. En cáncer de ovario y otros tumores, aún no se han identificado marcadores equivalentes. Una vez se ha seleccionado uno o varios marcadores, se pueden capturar por medio de atracción por cargas electrostáticas, citometría de flujo, ELISA u otros^{40,41}.

Conclusiones

El cáncer en estadio temprano tiene fenómenos moleculares que marcan su origen y determinan su evolución hacia una patología con capacidad de desdiferenciación, proliferación, invasión y potencial metastático, sumado a la promoción de angiogénesis, inducción resistencia a la hipoxia, entre otros. Entender estos procesos nos ha llevado al desarrollo de pruebas para buscar alteraciones *drivers*, fragmentos de ADN, metilaciones diferenciales y efectos sobre células estromales o productos de

excreción celular. El análisis de estas moléculas, presentes a lo largo de todos los estadios de la enfermedad, constituye una potente herramienta para la detección temprana del cáncer y, en algunos casos, incluso para determinar el tejido de origen.

Financiamiento

Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiamiento de los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflicto de interés.

Contribución de autoría

El autor certifica haber concebido la idea del estudio, así como haber contribuido con el material científico e intelectual y la redacción del manuscrito, haciéndose responsable de su contenido.

Referencias

- Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31–46.
- Cheng Z, Mirza H, Ennis DP, Smith P, Morrill Gavarró L, Sokota C, et al. The Genomic Landscape of Early-Stage Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2022 Jul 1;28(13):2911–22.
- Zhong L, Zhao Z, Zhang X. Genetic differences between primary and metastatic cancer: a pan-cancer whole-genome comparison study. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Sep 29;8(1):363.
- Schwartzberg L, Broder MS, Ailawadhi S, Beltran H, Blakely LJ, Budd GT, et al. Impact of early detection on cancer curability: A modified Delphi panel study. *PLoS One.* 2022;17(12):e0279227.
- Ellingson MK, Sheikh H, Nyhan K, Oliveira CR, Niccolai LM. Human papillomavirus vaccine effectiveness by age at vaccination: A systematic review. *Hum Vaccines Immunother.* 2023 Aug 1;19(2):2239085.
- Christiansen SR, Autier P, Størvring H. Change in effectiveness of mammography screening with decreasing breast cancer mortality: a population-based study. *Eur J Public Health.* 2022 Aug 1;32(4):630–5.
- Shaukat A, Levin TR. Current and future colorectal cancer screening strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2022 Aug;19(8):521–31.
- Adams SJ, Stone E, Baldwin DR, Vliegenthart R, Lee P, Fintelmann FJ. Lung cancer screening. *Lancet Lond Engl.* 2023 Feb 4;401(10374):390–408.
- Sideris M, Menon U, Manchanda R. Screening and prevention of ovarian cancer. *Med J Aust.* 2024 Mar 18;220(5):264–74.
- Maurer E, Lehman B, Matthäi E, Denzer U, Figiel J, Jesinghaus M, et al. Pancreatic cancer screening is effective in individuals at risk with predisposing germline gene variants, but not in gene variant-negative familial pancreatic cancer families. *United Eur Gastroenterol J.* 2024 Nov;12(9):1211–21.
- Kerpel-Fronius A, Tammemägi M, Cavic M, Henschke C, Jiang L, Kazerooni E, et al. Screening for Lung Cancer in Individuals Who Never Smoked: An International Association for the Study of Lung Cancer Early Detection and Screening Committee Report. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2022 Jan;17(1):56–66.
- Martínez-Jiménez F, Muiños F, Sentís I, Deu-Pons J, Reyes-Salazar I, Arnedo-Pac C, et al. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer.* 2020 Oct;20(10):555–72.
- Grabuschnig S, Soh J, Heidinger P, Bachler T, Hirschböck E, Rosales Rodriguez I, et al. Circulating cell-free DNA is predominantly composed of retrotransposable elements and non-telomeric satellite DNA. *J Biotechnol.* 2020 Apr 10;313:48–56.
- Medina JE, Dracopoli NC, Bach PB, Lau A, Scharpf RB, Meijer GA, et al. Cell-free DNA approaches for cancer early detection and interception. *J Immunother Cancer.* 2023 Sep;11(9):e006013.
- Ruiz C, Huang J, Giardina SF, Feinberg PB, Mirza AH, Bacolod MD, et al. Single-molecule detection of cancer mutations using a novel PCR-LDR-qPCR assay. *Hum Mutat.* 2020 May;41(5):1051–68.
- Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet Lond Engl.* 2018 Sep 1;392(10149):777–86.
- Chen X, Gole J, Gore A, He Q, Lu M, Min J, et al. Non-invasive early detection of cancer four years before conventional diagnosis using a blood test. *Nat Commun.* 2020 Jul 21;11(1):3475.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
- Liu MC, Oxnard GR, Klein EA, Swanton C, Seiden MV, CCGA Consortium. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020 Jun;31(6):745–59.
- Shen SY, Burgener JM, Bratman SV, De Carvalho DD. Preparation of cfMeDIP-seq libraries for methylome profiling of plasma cell-free DNA. *Nat Protoc.* 2019 Oct;14(10):2749–80.
- 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 Jan 14;164(1–2):57–68.
- Jiang P, Lo YMD. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet TIG.* 2016 Jun;32(6):360–71.
- Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):12–8.
- Mondelo-Macía P, Castro-Santos P, Castillo-García A, Muínelo-Romay L, Diaz-Peña R. Circulating Free DNA and

- Its Emerging Role in Autoimmune Diseases. *J Pers Med*. 2021 Feb 20;11(2):151.
25. Marchio A, Amougou Atsama M, Béré A, Komas NP, Noah Noah D, Atangana PJA, et al. Droplet digital PCR detects high rate of TP53 R249S mutants in cell-free DNA of middle African patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Med*. 2018 Aug;18(3):421–31.
 26. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol CB*. 2020 Aug 17;30(16):R921–5.
 27. Güç E, Pollard JW. Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity*. 2021 May 11;54(5):885–902.
 28. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan;10(1):9–22.
 29. Qi Y, Chen W, Liang X, Xu K, Gu X, Wu F, et al. Novel antibodies against GPIIb/IIIa inhibit pulmonary metastasis by affecting vWF-GPIIb/IIIa interaction. *J Hematol Oncol*. 2018 Sep 17;11(1):117.
 30. Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res*. 2020 Jul 3;127(2):310–29.
 31. Ding S, Dong X, Song X. Tumor educated platelet: the novel BioSource for cancer detection. *Cancer Cell Int*. 2023 May 11;23(1):91.
 32. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell*. 2018 Jun 11;33(6):965–83.
 33. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 2015 Nov 9;28(5):666–76.
 34. In 't Veld SGJG, Arkani M, Post E, Antunes-Ferreira M, D'Ambrosi S, Vessies DCL, et al. Detection and localization of early- and late-stage cancers using platelet RNA. *Cancer Cell*. 2022 Sep 12;40(9):999-1009.e6.
 35. Niland S, Eble JA. Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 1;20(3):639.
 36. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018 Feb 23;359(6378):926–30.
 37. Wang J, Bonacquisti EE, Brown AD, Nguyen J. Boosting the Biogenesis and Secretion of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. *Cells*. 2020 Mar 9;9(3):660.
 38. Bebelman MP, Janssen E, Pegtel DM, Crudden C. The forces driving cancer extracellular vesicle secretion. *Neoplasia N Y N*. 2021 Jan;23(1):149–57.
 39. Wan Y, Liu B, Lei H, Zhang B, Wang Y, Huang H, et al. Nanoscale extracellular vesicle-derived DNA is superior to circulating cell-free DNA for mutation detection in early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Dec 1;29(12):2379–83.
 40. Ferguson S, Yang KS, Weissleder R. Single extracellular vesicle analysis for early cancer detection. *Trends Mol Med*. 2022 Aug;28(8):681–92.
 41. Hinestroza JP, Kurzrock R, Lewis JM, Schork NJ, Schroeder G, Kamat AM, et al. Early-stage multi-cancer detection using an extracellular vesicle protein-based blood test. *Commun Med*. 2022;2:29.