

# El ADN circulante y su potencial clínico

José Darío Martínez-Ezquerro, Catalina Trejo-Becerril y Alfonso Dueñas-González

A lo largo de su vida, las personas pueden atravesar por distintos escenarios clínicos. Enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico; infecciones bacterianas y virales, como la tuberculosis y la hepatitis, respectivamente; el embolismo pulmonar y otras condiciones, como el infarto y el embarazo. Todas ellas, a simple vista, parecen no compartir característica alguna. Sin embargo, quienes presentan estas condiciones sí tienen algo en común: la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) fuera de sus células, que circula libremente en su sangre.

¿Qué es el ADN extracelular? Son moléculas de ADN de cadena sencilla o doble (el ADN normalmente forma una doble hélice compuesta de dos cadenas complementarias), cuya longitud abarca desde menos de 500 hasta 21 mil pares de bases (las unidades que se unen entre sí para formar cadenas de ADN). Lo encontramos circulando, fuera de las células, en distintos líquidos corporales: el amniótico (que rodea a un feto en el útero), el pleural (que lubrica la pleura, membrana que recubre la cavidad torácica y rodea los pulmones), el sinovial (que reduce la fricción entre las articulaciones) y la orina, aunque la mayoría de los estudios al respecto se han enfocado en su detección en el plasma y suero sanguíneos, gracias a que son líquidos fácilmente accesibles que pueden obtenerse mediante un método poco invasivo.

Curiosamente, la existencia del ADN circulante fue reportada por primera vez por Mandel y Métais en 1948, sólo cuatro años después de la demostración de

que el ADN es el material de la herencia y cinco años antes del artículo de Watson y Crick sobre la estructura en doble hélice del ADN. Esto provocó que, a pesar de la naturaleza innovadora del trabajo de Mandel y Métais, quienes observaron la presencia de ADN extracelular en la sangre de personas sanas y con distintas enfermedades, no se le tomara en cuenta sino hasta finales de 1960, cuando el ADN extracelular se redescubrió en suero y plasma de personas con lupus eritematoso sistémico.

Desde entonces, se ha demostrado la presencia del ADN circulante en personas sanas, personas con distintas enfermedades y pacientes con cáncer, principalmente en forma de *mononucleosomas* u *oligonucleosomas* (los *nucleosomas* son estructuras repetitivas, formadas por ADN y proteínas, que constituyen la unidad fundamental de la *cromatina*, forma de organización del ADN en las células *eucariontes*, es decir, las que tienen un núcleo delimitado por una membrana). Esta conformación probablemente contribuye a proteger al ADN de la acción de las *nucleasas* (enzimas que destruyen los ácidos nucleicos). Esto, en primera instancia, ha hecho posible su detección en plasma y suero sanguíneo. Posteriormente, gracias al desarrollo tecnológico, se ha logrado observar un aumento en los niveles del ADN circulante de personas con distintas condiciones patológicas, incluyendo inflamación, infección, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria severa, embolismo pulmonar, enfermedades autoinmunes y cáncer, en comparación con los niveles que presentan las personas sanas.



También se ha registrado la presencia de ADN del feto en la sangre materna, al igual que de ADN extracelular derivado del órgano donado en la sangre de personas que han recibido un trasplante. Además, se ha observado ADN circulando en la sangre de pacientes con trauma. Estas observaciones demuestran la diversidad de condiciones de importancia clínica cuyo común denominador es la presencia de ADN circulante.

Todos estos descubrimientos han originado un gran interés de los investigadores en el potencial que posee el ADN circulante para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de distintas condiciones clínicas. Dicho inte-



rés se ha enfocado principalmente en pacientes con cáncer, ya que presentan aumentos considerables de ADN circulante en comparación con los niveles observados en las personas sanas. A su vez, estos incrementos son mayores cuando la persona presenta *metástasis*, que es la diseminación del tumor primario a zonas distintas de la original en estados avanzados de la enfermedad.

Estas diferencias detectables de ADN en la sangre han hecho que los investigadores se pregunten cuáles son los mecanismos de liberación que explican la presencia de ADN fuera de las células. Un mecanismo planteado es la muerte celular, tanto la *necrosis* (proceso patológico asociado con trauma celular severo) como la *apoptosis* (muerte celular programada). La necrosis tumoral suscita la liberación del material celular provocada por la acción de enzimas degradativas, mientras que en la apoptosis el ADN es liberado a la circulación al morir la célula, contenido dentro de los fragmentos celulares llamados *cuerpos apoptóticos*. Otro mecanismo propuesto es la *lisis* (destrucción) de células cancerosas, pero en este caso se trata de células liberadas por el tumor a la sangre.

Además de la muerte celular, se ha planteado la liberación activa y espontánea de ADN, la cual ya ha sido observada en distintos tejidos. Este mecanismo supone la expulsión de ADN recientemente sintetizado (fabricado), que se libera de acuerdo a un mecanismo homeostático (de balance interno).

Queda implícito que, sea cual fuere el mecanismo o mecanismos involucrados en la liberación de ADN a la circulación, el incremento de la concentración de ADN circulante en distintas condiciones, patológicas o no, es debido en parte a la incapacidad del organismo para deshacerse del exceso de ADN circulante. Este exceso puede ser provocado por alguna alteración o porque el número de macrófagos o células vecinas, que eliminan al ADN circulante, son insuficientes para asimilar dicho incremento. El exceso puede deberse también a que haya alcanzado el límite de saturación de los macrófagos, que se encuentran por ello incapacitados (por lo menos momentáneamente) para asimilar un mayor volumen de ADN. Además, se ha observado que la eficiencia de las enzimas nucleasas para destruir el ADN disminuye en muestras de personas con cáncer, al igual que la capacidad de los macrófagos para fago-

citar (ingerir y destruir) el ADN en personas con lupus eritematoso sistémico. Esto explicaría la permanencia del ADN extracelular en dichas personas.

Sin embargo, no sólo se ha encontrado ADN extracelular en los distintos líquidos corporales de las personas que presentan algún padecimiento, sino también en líquidos corporales de personas sanas. Entonces, ¿de dónde proviene el ADN circulante?

Se ha propuesto que su origen, en personas sanas o con enfermedades distintas al cáncer, son las células nucleadas normales, principalmente las células *hematopoyéticas* (células sanguíneas). Sin embargo, en personas con cáncer, la mayor parte del ADN en circulación sanguínea proviene de células tumorales.

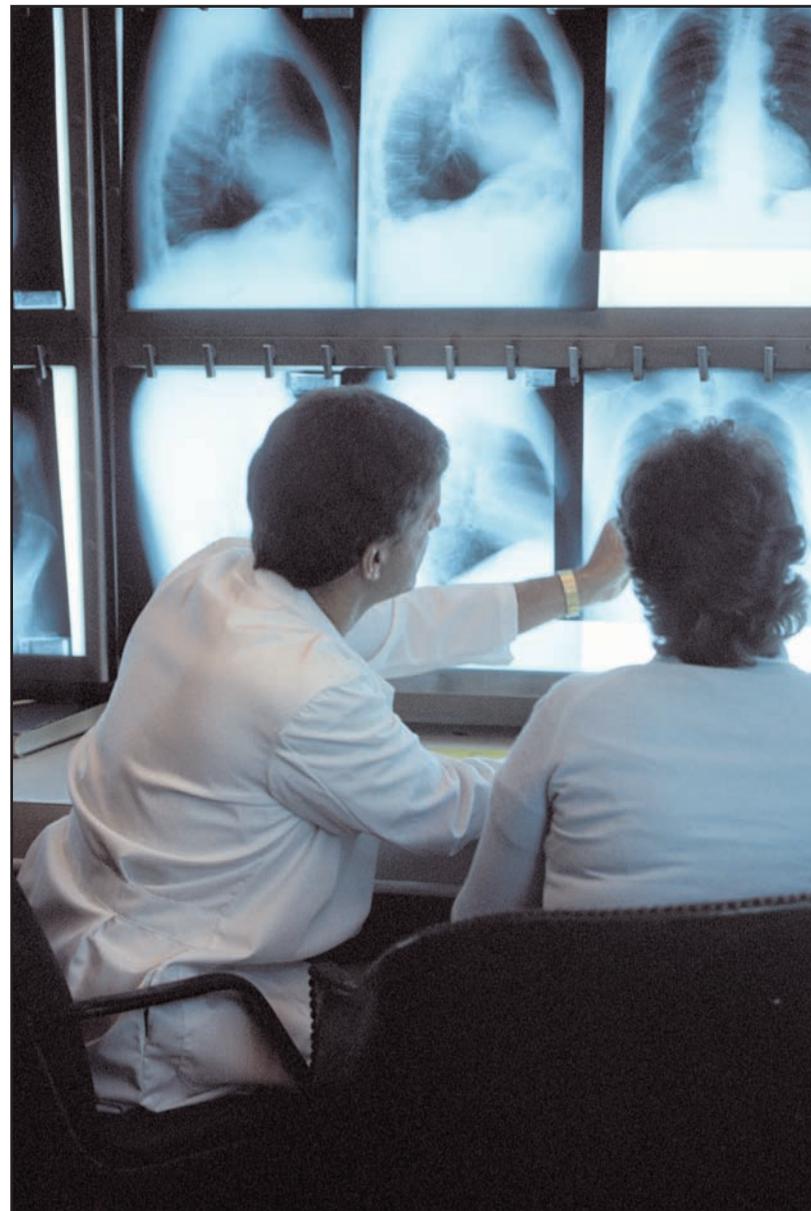
### ADN circulante y cáncer

Dentro del potencial clínico del ADN circulante, su medición cuantitativa se ha planteado como un marcador que permitiría detectar tumores, a partir de que se demostró que las concentraciones de ADN circulante son mayores en personas con cáncer que en personas sanas, y significativamente mayores en personas con metástasis; que en muchos casos estos niveles disminuyen en respuesta a una terapia anticáncer exitosa, y que cuando dichas concentraciones no disminuyen después de la terapia esto coincide con una falta de respuesta del tumor a la terapia.

Sin embargo, se pueden encontrar niveles elevados de ADN extracelular en distintas condiciones fisiológicas y patológicas distintas al cáncer, como ya anteriormente se ha mencionado. Por ello, el esfuerzo emprendido para desarrollar pruebas sanguíneas poco invasivas, suficientemente sensibles y específicas para aplicarse en la evaluación clínica de personas con cáncer se ha concentrado en la detección de alteraciones moleculares características del cáncer en el ADN circulante. Estos rasgos, que actualmente pueden detectarse en el ADN que circula en la sangre de personas con cáncer mediante el empleo de tecnologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés; técnica con la que se pueden detectar, cuantificar y analizar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos), pueden reflejar tanto el tamaño del tumor (a mayor masa tumoral, mayor cantidad de ADN

tumoral circulante) como el llamado *grado histológico* (los cambios en la diferenciación celular que van de la mano con los cambios en la actividad de genes: activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores), la eficacia del tratamiento y el riesgo de recurrencia del cáncer. Todas estas alteraciones moleculares las podemos clasificar en siete grupos:

a) *Mutaciones en oncogenes*. Los *oncogenes* son genes asociados a la proliferación y supervivencia celular. Cuando están mutados, las proteínas que producen tienen una mayor actividad, lo que promueve el desarrollo del tumor. Los primeros reportes que descri-



bieron mutaciones específicas tumorales en el ADN circulante involucran a miembros de la familia de genes *ras* (*H-ras*, *K-ras* y *N-ras*), probablemente porque se encuentran mutados con gran frecuencia en cánceres de distinto origen, incluyendo páncreas (90 por ciento), colon (50 por ciento), pulmón (30 por ciento), tiroides (50 por ciento), vejiga (6 por ciento), ovario (15 por ciento), mama, piel, hígado, riñón y algunas leucemias. Estas pruebas tienen gran especificidad para detectar tanto el gen mutado como el cáncer, debido a que en la sangre de individuos sanos no se encuentran mutaciones de estos oncogenes, por lo que podrían utilizarse en el pronóstico y monitoreo de la enfermedad. Además, se han encontrado mutaciones de genes *ras* en sangre que no corresponden con las mutaciones

detectadas en biopsias del tumor de la misma persona; y en ciertos casos, las alteraciones de este gen se encuentran en la sangre de personas a las que no se les ha detectado ningún tumor. Esto significa que esta técnica podría tener potencial para detectar subclonas tumorales (grupos de células de tumor que han ganado mutaciones adicionales durante el proceso de metástasis) y para detectar mutaciones tempranas en personas con riesgo de padecer cáncer. Incluso, ¿por qué no?, para detectar tumores primarios adicionales.

b) *Mutaciones en genes supresores de tumores*. Los supresores de tumores son genes asociados a la regulación del ciclo celular que evitan la proliferación, reparan errores en el ADN, promueven la apoptosis (muerte celular programada) y la estabilidad genómica. Cuando las proteínas producidas por estos genes pierden su función, aumenta la probabilidad de que se desarrolle un tumor. Un ejemplo de gen supresor de tumores es el denominado *p53*, conocido como “el guardián del genoma”, por su participación en la estabilidad genómica.

c) *Translocaciones cromosómicas*. Ocurren cuando los brazos de dos cromosomas distintos se unen como consecuencia de fenómenos de recombinación no homóloga, lo que puede dar lugar a que dos genes, en principio distantes, entren en proximidad física de forma que uno de ellos pueda controlar la expresión del otro, o bien que se fusionen dando lugar a un gen híbrido con propiedades oncogénicas (cancerígenas).

d) *Alteraciones de microsatélites*. Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN de 2 a 6 pares de bases cuyas alteraciones en longitud (disminución o aumento) reflejan errores de replicación y son frecuentes en cáncer. Así, utilizando *oligonucleótidos* apropiados –secuencias de ADN diseñadas para acoplarse a los extremos del fragmento que se quiere amplificar con PCR–, pueden detectarse en la sangre de las personas y emplearse en el diagnóstico de distintos tipos de cáncer.

e) *Hipermetilación de promotores de genes*. Son alteraciones epigenéticas –cambios heredables en la expresión génica que no involucran un cambio en la secuencia de ADN– que resultan de la metilación aberrante de los residuos de citosina de ciertas regiones del ADN, en particular en las secuencias que activan a los genes supresores de tumores involucrados en el

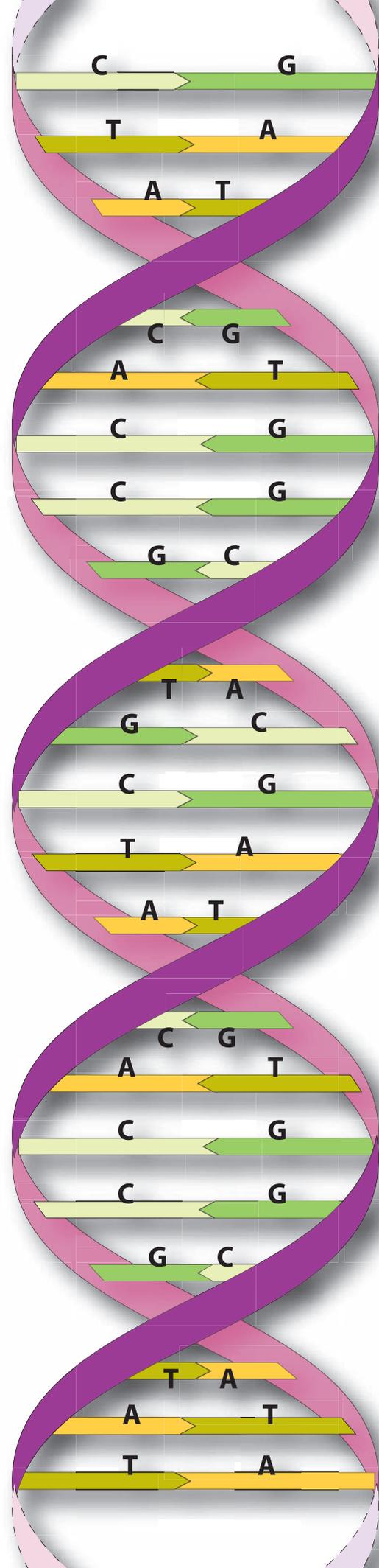


control del ciclo celular y la apoptosis, lo que ocasiona que no se activen y se potencie el desarrollo de tumores.

f) *Mutaciones de ADN mitocondrial*. Se han descrito diversas mutaciones del ADN de las mitocondrias –del que cada célula humana contiene cientos de copias– en diversos tipos de cáncer, y también en líquidos corporales como la orina, la saliva y el líquido de lavado broncoalveolar. La observación de que dichas alteraciones coinciden con las de las células tumorales de la persona con cáncer le confiere potencial clínico a su detección, aunque se requiere de un número mayor de estudios que correlacionen estas alteraciones con los parámetros clínicos.

g) *ADN viral circulante*. Otra fuente de ADN circulante son los virus. Algunos, como el de Epstein-Barr y el del papiloma humano están asociados a ciertos tipos de cáncer, como el de faringe, el linfoma de Hodgkin o el cáncer cervicouterino. Se han encontrado evidencias de la liberación de ADN viral en la sangre, por lo que su cuantificación tiene el potencial de servir como marcador tumoral –si se detecta este ADN viral en sangre, indicaría una posible transformación maligna– que puede reflejar el tamaño del tumor, la carga viral y la respuesta al tratamiento.

La correlación de estas características con distintos parámetros clínicos ha permitido que se visualice al ADN circulante derivado del tumor como un prometedor marcador tumoral para su futura aplicación en estudios de diagnóstico, pronóstico y monitoreo del cáncer. Estas modificaciones podrían emplearse como parámetros específicos para cada tipo de cáncer. Así, los diferentes niveles de ADN extracelular y las distintas alteraciones del ADN circulante podrían emplearse individualmente o en coordinación con otros marcadores, dependiendo del cáncer del que se trate, para optimizar su sensibilidad o especificidad en la evaluación de cada caso. Por ello, conviene incrementar los estudios por tipo de cáncer, para poder realizar comparaciones en cuanto a la eficiencia del método de extracción de ADN y a la sensibilidad y especificidad de los marcadores de manera individual o en combinación con otros. Así, posteriormente se podrán estandarizar las metodologías para obtener mejores resultados en la evaluación del cáncer.



De hecho, tomando en consideración los resultados obtenidos en un estudio en el que se encontraron en la sangre de distintas personas mutaciones en un oncogen en etapas tempranas del desarrollo del cáncer (hasta catorce meses antes del diagnóstico clínico de la enfermedad), la aplicación clínica del ADN circulante para detectar cáncer resulta prometedora.

Sin embargo, el ADN no es el único ácido nucleico que puede detectarse extracelularmente. También se ha observado la presencia de ácido ribonucleico (ARN) circulante, tanto de manera libre como protegido den-

tro de cuerpos apoptóticos distintos de los que contienen ADN.

En relación al cáncer, por presentar un solo ejemplo, se ha encontrado ARN relacionado con el tumor en distintos líquidos corporales de personas que presentan dicha enfermedad, por lo que el campo de los ácidos nucleicos circulantes cobra cada día mayor fuerza en la investigación de distintas condiciones clínicas. Debido a las limitaciones de espacio, un próximo artículo respecto al ARN circulante y su potencial clínico profundizará en este interesante tema.



### Aplicación en el embarazo

El embarazo es una condición que despertó el interés de quienes investigan el ADN circulante debido a las similitudes que hay entre la placenta y un tumor. Es muy invasiva, altamente anaplásica (sin morfología celular normal), presenta un alto índice mitótico (divisiones frecuentes) y produce antígenos oncofetales (que evitan el ataque del sistema inmune). Dicho interés dio como resultado la demostración de la existencia de ADN fetal en la sangre de mujeres embarazadas, lo que se logró al estudiar la sangre de mujeres preñadas de fetos varones, utilizando secuencias del cromosoma Y como marcador de ADN fetal masculino. Esta técnica, además de cuantificar el ADN fetal, también puede utilizarse para determinar el género del feto.

Como ya hemos visto, y contrariamente a la creencia tradicional de que la placenta es una barrera impermeable, el ADN fetal circula libremente en la sangre materna, y se sugiere que procede principalmente de la placenta y probablemente, mediante transferencia directa, de las células del mismo feto, aunque como en la mayoría de los casos se sugiere también la participación de células hematopoyéticas (en este caso fetales) como fuente en menor proporción del ADN fetal en circulación materna.

La principal estrategia en la detección de ADN fetal en la sangre materna es la búsqueda de secuencias diferentes entre la madre y el feto; por ello, en su mayoría, se han detectado genes o mutaciones heredadas del padre, las cuales son genéticamente distintas de las secuencias de origen materno. Actualmente, la inves-

estigación se ha extendido a marcadores epigenéticos fetales y polimorfismos (variaciones) del ADN de los autosomas (cromosomas no sexuales). Esto hace posible la detección, en sangre materna, de ADN fetal heredado tanto por parte del padre como de la madre. Además, el análisis cuantitativo de ADN fetal tiene el potencial clínico para diagnosticar desórdenes genéticos prenatales, mientras que las cantidades elevadas de ADN fetal, al compararlos con los niveles encontrados en la sangre de mujeres con embarazos normales en las mismas etapas de gestación, se han relacionado con ciertas complicaciones asociadas al embarazo, como síndrome de Down, hipertensión, náuseas y vómitos excesivos, placenta invasiva y parto prematuro.

La aplicación de los estudios prenatales actuales, como la *amniocentesis* (método en el que se inserta una aguja en el abdomen y se extrae líquido amniótico del útero) y la biopsia de vellosidades coriales (método en el que un tubo o catéter de plástico delgado se inserta en el cérvix a través de la vagina), conllevan cierto grado de invasividad y de riesgos tanto para la madre como para el feto que podrían resultar en aborto. Por ello, no se aplica rutinariamente a todas las mujeres embarazadas, sino sólo a aquellas que presentan mayor riesgo de tener bebés con alteraciones genéticas. Estos riesgos se acentúan en casos en los que la mujer ha sufrido un aborto espontáneo o ha recibido tratamientos para facilitar el embarazo, es decir, mujeres con un historial de complicaciones en el embarazo que probablemente provoquen que rechacen estos métodos. Al comparar estos procedimientos con lo poco invasivo y el mucho menor riesgo que posee el análisis de ADN fetal circulante en sangre materna, se aprecia el potencial de diagnóstico prenatal que tiene esta técnica en distintas condiciones asociadas al embarazo, como desórdenes ligados al sexo, riesgo de enferme-

dad hemolítica, trastorno muscular y la virilización de los genitales externos en fetos de sexo femenino. Por eso, seguramente en un futuro no muy lejano su análisis se aplicará rutinariamente en la evaluación de las distintas condiciones que pueden presentar las mujeres embarazadas.

### Aplicación en transplantes

Se ha demostrado la presencia de ADN del donante en la sangre de mujeres que recibieron un transplante renal o de hígado por parte de donantes masculinos. Para detectarlo se usaron secuencias del cromosoma Y como marcador del ADN del donante.



Un posible origen del ADN circulante derivado del donador en la sangre de la persona que recibió el trasplante son las células del órgano transplantado que han muerto por necrosis o apoptosis. Esto concuerda con la asociación que existe entre la liberación del ADN y la muerte celular, que como se ha observado sería resultado tanto de procesos normales como del rechazo al trasplante, además de infecciones por citomegalovirus, de complicaciones vasculares o biliares (en el caso de trasplantes de hígado) y del desarrollo neoplásico del órgano transplantado. Así, es posible utilizar las concentraciones de ADN del donante en la sangre de las personas transplantadas como marcador de rechazo o de daños en el tejido del órgano transplantado, lo que podría ser utilizado para monitorear a las personas que han recibido un trasplante.

### Aplicación en trauma

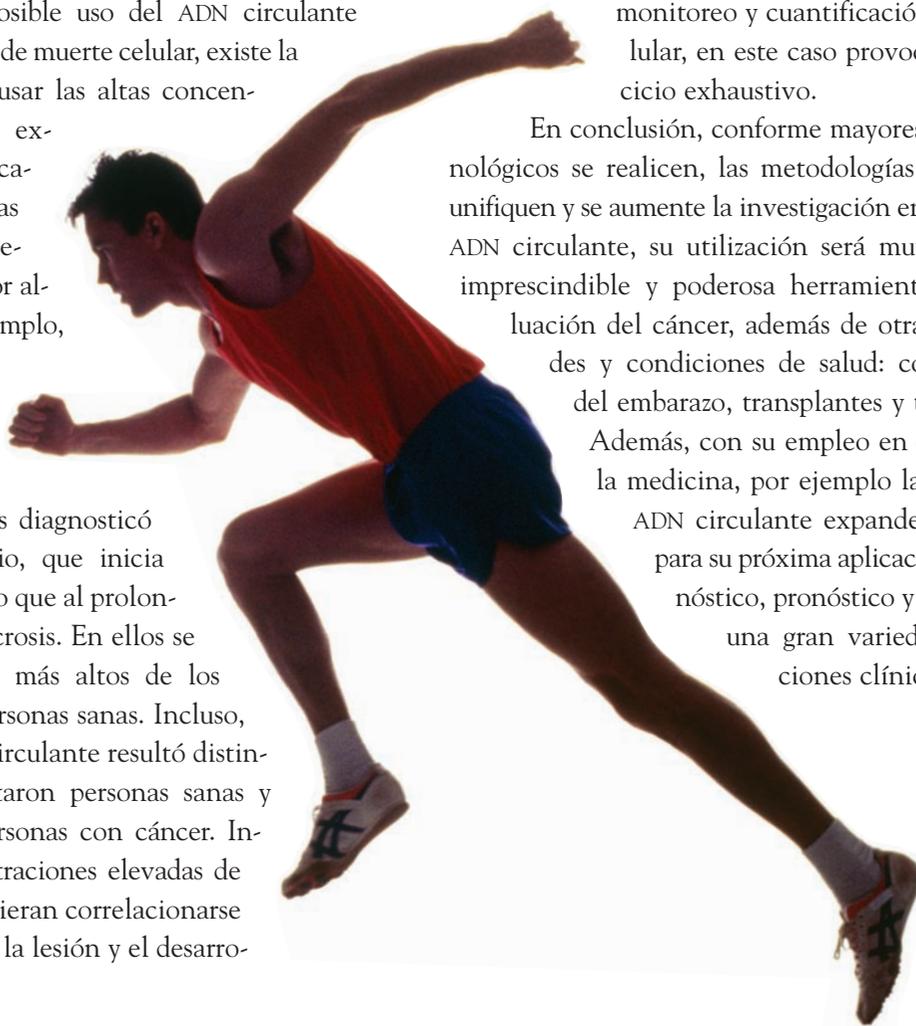
En vista del posible uso del ADN circulante como marcador de muerte celular, existe la posibilidad de usar las altas concentraciones de ADN extracelular que teóricamente resultan de las lesiones y muerte celular ocasionadas por algún trauma. Por ejemplo, se han estudiado las concentraciones de ADN en la sangre de personas a las que se les diagnosticó infarto al miocardio, que inicia con falta de oxígeno que al prolongarse resulta en necrosis. En ellos se observaron niveles más altos de los que presentaron personas sanas. Incluso, su patrón de ADN circulante resultó distinto del que presentaron personas sanas y también del de personas con cáncer. Inclusive, las concentraciones elevadas de ADN circulante pudieran correlacionarse con la severidad de la lesión y el desarro-

llo de complicaciones post-traumáticas, al servir de reflejo de la extensión del trauma. Por tanto, el ADN circulante tiene el potencial clínico para ser utilizado en el pronóstico y monitoreo de personas que han padecido algún tipo de lesión física.

### Otras aplicaciones

En un estudio se trató de investigar los efectos que tiene la actividad física sobre el daño muscular y el estrés oxidativo. Para ello, se cuantificaron los niveles de ADN circulante de la sangre de personas que participaron en una carrera de medio maratón y se observó que inmediatamente después de la carrera el nivel de ADN circulante aumentaba significativamente, en comparación con los detectados previamente a la carrera, y el nivel basal se recuperó dos horas después de la carrera. Con estos resultados, se sugiere que el ADN circulante tiene potencial en el monitoreo y cuantificación de daño celular, en este caso provocado por ejercicio exhaustivo.

En conclusión, conforme mayores avances tecnológicos se realicen, las metodologías empleadas se unifiquen y se aumente la investigación en el campo del ADN circulante, su utilización será muy pronto una imprescindible y poderosa herramienta en la evaluación del cáncer, además de otras enfermedades y condiciones de salud: complicaciones del embarazo, trasplantes y traumatismos. Además, con su empleo en otras áreas de la medicina, por ejemplo la deportiva, el ADN circulante expande su potencial para su próxima aplicación en el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de una gran variedad de condiciones clínicas.



**José Darío Martínez-Ezquerro** nació en la Ciudad de México y radicó diez años en Cuernavaca, donde su acercamiento a la Casa de las Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos le permitió participar en Expociencias estatales, nacionales (Morelos) e internacionales (Estados Unidos). Regresó a la Ciudad de México para estudiar la carrera de Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Actualmente colabora en el Laboratorio de Epigenética del Instituto Nacional de Cancerología, en dos líneas de investigación: la biología del ADN circulante y su posible papel en cáncer (modelos *in vivo* e *in vitro*) y el efecto de la terapia epigenética en líneas celulares quimiorresistentes.

jdezquerro@yahoo.com.mx

**Catalina Trejo-Becerril** es maestra y candidata a doctora en ciencias biomédicas. Es investigadora en el Instituto Nacional de Cancerología y tiene 16 publicaciones internacionales y 7 nacionales. Las líneas de trabajo que desarrolla son el estudio de factores de crecimiento y HPV en cáncer cérvico uterino y el estudio de nucleosomas y transferencia horizontal de ADN circulante en enfermedades neoplásicas.

ctrejobecerril@yahoo.com.mx

**Alfonso Dueñas-González** es médico cirujano por la Universidad de Guadalajara, especialista en medicina interna y oncología médica por los Institutos Nacionales de la Nutrición y Cancerología, respectivamente, y doctor en medicina por la Universidad de Salamanca. Actualmente es investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y director de investigación del Instituto Nacional de Cancerología. Ha publicado 64 artículos en revistas científicas indexadas.

alfonso\_duenas@yahoo.com

## Bibliografía

- Anker, P., H. Mulcahy y M. Stroun (2003), "Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies?", *International journal of cancer*, 103, 2, 149-152.
- Atamaniuk, J., C. Vidotto, H. Tschan, N. Bachl, K. Stuhlmeier y M. Müller (2004), "Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise", *Clinical chemistry*, 50, 1668-1670.
- Bianchi, D. (2004), "Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potencial –a review", *Placenta*, 25, Supplement A, "Trophoblast research", 18, S93-S101.
- Johnson, P. y D. Lo (2002), "Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease", *Clinical chemistry*, 48, 8, 1186-1193.
- Lui, Y. y D. Lo (2002), "Circulating DNA in plasma and serum: biology, preanalytical issues and diagnostic applications", *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 40, 10, 962-968.
- Lui, Y., K. Woo, A. Wang, C. Yeung, P. Li, E. Chau, P. Ruygrok y D. Lo (2003), "Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation", *Clinical chemistry*, 49, 3, 495-496.
- Trejo-Becerril, C., E. Pérez-Cárdenas, H. Treviño-Cuevas, L. Taja-Chayeb, P. García-López, B. Segura-Pacheco, A. Chávez-Blanco, M. Lizano-Soberón, A. González-Fierro, I. Mariscal, T. Wegman-Ostrosky y A. Dueñas-González (2003), "Circulating nucleosomes and response to chemotherapy: an *in vitro*, *in vivo* and clinical study on cervical cancer patients", *International journal of cancer*, 104, 663-668.
- Ziegler, A., U. Zangemeister-Wittke y R. Stahel (2002), "Circulating DNA: a new diagnostic gold mine?", *Cancer treatment reviews*, 28, 255-271.