UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie

ELABORATO DI LAUREA

ANALISI DEL DNA TUMORALE LIBERO CIRCOLANTE MEDIANTE NEXT GENERATION SEQUENCING NEL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA IMMUNOLOGICA IN PAZIENTI CON TUMORE DEL POLMONE

Tutor: Prof. Stefano Indraccolo
Dipartimento di Scienze Chirurgiche Oncologiche e Gastroenterologiche
Università degli studi di Padova

Co-tutor: Dott.ssa Elisabetta Zulato
Istituto oncologico veneto IOV IRCCS

Laureanda: Tamara Garziera

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Dedicato a chi,
dall'alto o da quaggiù,
mi protegge tutti i giorni.

SOMMARIO

ABSTRACT……..…….……..Pag. 1

CAPITOLO 1: TUMORE AL POLMONE

- 1.1 Il tumore del polmone: classificazione istologica e caratterizzazione molecolare……..…….Pag. 3
- 1.2 Strategie terapeutiche nel tumore del polmone…….Pag. 6

CAPITOLO 2: BIOPSIA LIQUIDA

- 2.1 Il DNA libero circolante (cfDNA)…..……....Pag. 11
- 2.2 La biopsia liquida nella pratica clinica …….……..……...Pag. 13
- 2.3 Analisi del cfDNA come strumento per monitorare la terapia…….....Pag. 14

CAPITOLO 3: L'APPROCCIO NGS IN BIOPSIA LIQUIDA

- 3.1 Sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing)……..……..Pag. 19
- 3.2 NGS e Biopsia liquida: esempio di applicazione per il monitoraggio del trattamento con immunoterapia in pazienti con NSCLC…….....Pag. 21

CONCLUSIONI……..……...Pag. 25

BIBLIOGRAFIA……...Pag. 27

ABSTRACT

Il tumore del polmone rappresenta attualmente la principale causa di morte per neoplasia a livello mondiale.

Nell'ultimo decennio si sono osservati importanti cambiamenti nel campo della caratterizzazione molecolare del tumore del polmone. In particolare, l'identificazione di mutazioni in oncogeni *driver*s e il concetto di dipendenza della crescita tumorale da tali oncogeni ha modificato l'approccio terapeutico per i pazienti con tumore del polmone avanzato. Inoltre, l'introduzione dell'immunoterapia ha recentemente e ulteriormente rivoluzionato l'approccio terapeutico; viene avviata previa valutazione del livello di espressione del marcatore PD-L1 che, tuttavia, non si è dimostrato un marker predittivo robusto della risposta terapeutica.

La biopsia tissutale rappresenta l'approccio di elezione per le indagini molecolari; tuttavia, non sempre è eseguibile ed il materiale prelevato può risultare non idoneo per le analisi molecolari.

L'analisi del DNA libero circolante (cfDNA), nota anche come biopsia liquida, rappresenta uno strumento alternativo e complementare per definire lo stato mutazionale del tumore. Si tratta di un approccio poco invasivo, accettato dal paziente e facilmente ripetibile.

Scopo della tesi è quello di illustrare come tale metodica, se unita ad un approccio di sequenziamento di nuova generazione, possa rappresentare uno strumento utile per monitorare gli effetti terapeutici in pazienti con tumore del polmone trattati con immunoterapia.

CAPITOLO 1 - TUMORE DEL POLMONE

1.1 Il tumore del polmone: classificazione istologica e caratterizzazione molecolare

La neoplasia, o tumore, viene definita come una patologia multifattoriale caratterizzata da una proliferazione non controllata delle cellule dell'organismo, con conseguente alterazione della normale struttura e fisiologia di organi e tessuti. (1)

Durante il processo di trasformazione neoplastica vengono alterati i normali meccanismi di controllo della crescita e proliferazione cellulare, a seguito di accumuli di più mutazioni genetiche in diverse classi di geni: oncogeni, oncosoppressori, geni che codificano per enzimi deputati al riparo del DNA o geni coinvolti nel processo di apoptosi. (1)

Il tumore del polmone è un tipo di neoplasia che trova origine nei polmoni, nei bronchi, nei bronchioli o alveoli, a seguito della crescita incontrollata di cellule dell'epitelio respiratorio che rivestono l'intero apparato.

Rappresenta una delle più frequenti cause di morte per neoplasia nei paesi industrializzati; infatti, secondo le stime effettuate dall'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM) nel 2020, circa 40.800 pazienti hanno ricevuto una diagnosi di tumore del polmone, tra cui la gran parte risulta principalmente di sesso maschile (27.500). Si tratta del secondo tumore più comune negli uomini (15%) ed il terzo più frequente nelle donne (6%). (1)

Tuttavia, negli ultimi anni si è osservato un netto cambiamento di tali percentuali, registrando una maggiore incidenza di neoplasia polmonare nel sesso femminile rispetto al sesso maschile (dove, invece, si sta registrando una minore incidenza), soprattutto per l'aumentato utilizzo di tabacco nella popolazione femminile rispetto a quella maschile.

Tra i principali fattori di rischio troviamo l'inquinamento atmosferico e gli stili di vita, primo fra tutti la dipendenza dal fumo.

Sono note, inoltre, diverse sostanze come asbesto, radon, cromo o arsenico (ovvero, metalli pesanti), ai quali è stata riconosciuta la potenziale cancerogenicità, soprattutto nel caso di esposizione di tipo professionale. (2)

Il rischio famigliare di cancro del polmone è ancora in fase di studio e molte delle componenti genetiche rimangono non identificate. (3) Come per tutte le neoplasie, si pensa che anche il processo di cancerogenesi del tumore al polmone, sia il risultato dell'interazione tra fattori ambientali e predisposizione genetica. (2)

1.1.1 Classificazione istologica

Secondo la classificazione istopatologica raccomandata per la diagnosi di tumore polmonare redatta dall'organizzazione mondiale della sanità (*World Health Organization*, WHO) nel 2015, si distinguono due tipi principali di tumore del polmone, i quali risultano nel 95% dei casi tumori maligni, invasivi e di origine epiteliale (2).

In base a tale classificazione è possibile identificare il tumore del polmone non a piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), che risulta la forma di tumore al polmone maligna più frequentemente diagnosticata (circa l'85% dei casi) e il tumore del polmone a piccole cellule (*small cell lung cancer*, SCLC), chiamato anche microcitoma e che rappresenta circa il 15% dei casi.

Il NSCLC è ulteriormente suddiviso in tre sottotipi: carcinoma a cellule squamose (rappresenta il 25-30% dei casi), adenocarcinoma (rappresenta circa il 40% dei casi), e carcinoma a grandi cellule (il meno frequente, diagnosticato nel 15% dei casi). [Figura 1]

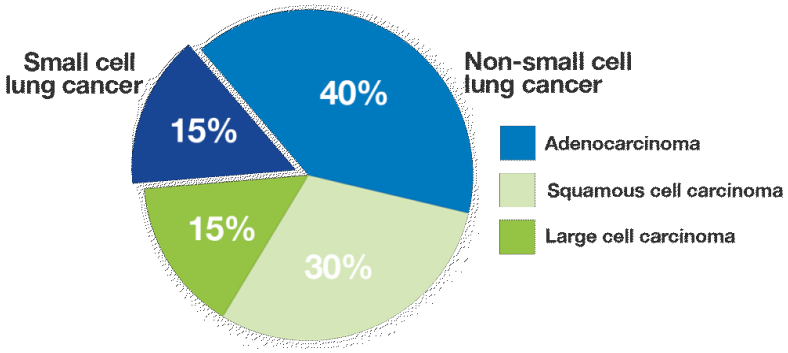

***Fig. 1: classificazione istologica del cancro al polmone**; disponibile alla pagina web: https://lcfamerica.org/lung-cancer-info/types-lung-cancer/*

La precisa differenziazione istologica dei sottotipi del NSCLC è ad oggi necessaria ed essenziale per la valutazione e la scelta del trattamento terapeutico più adeguato all'istotipo. (2)

La maggior parte delle diagnosi di NSCLC avviene in stadio avanzato, quando la malattia non è più resecabile; pertanto, tutte le analisi molecolari utili per impostare il trattamento sistemico devono essere effettuate su piccole biopsie e/o campioni di tipo citologico. È importante che il campione tumorale prelevato per la diagnosi venga maneggiato con cura, evitando sprechi, in quanto spesso il materiale prelevato risulta scarso e deve comunque essere sufficiente per eseguire tutti i test diagnostici necessari per la classificazione tumorale. (2,3)

Indagini di immunoistochimica risultano, inoltre, fondamentali per una migliore definizione di NSCLC, in cui la sottotipizzazione non è possibile valutando la sola morfologia. Nello specifico, mediante l'immunoistochimica può essere valutata la

presenza nel campione in analisi di alcuni marcatori, quali TTF1 (fattore di trascrizione tiroideo), che è presente nelle forme tumorali che rientrano nella classificazione di adenocarcinoma, o P40, presente nel carcinoma a cellule squamose. L'immunoistochimica, a causa della mancanza di marcatori specifici per ogni sottogruppo, è una tecnica che non sempre risulta applicabile per la diagnosi differenziale tra i vari istotipi; ove non sia possibile definire l'istotipo di neoplasia polmonare, il tumore è definito come NSCLC/NAS (non-altrimenti specificata). (2,3)

1.1.2 Caratterizzazione molecolare

Sono ormai note da diversi anni numerose alterazioni molecolari presenti in alcuni geni ed in grado di condizionare la biologia del tumore. Alcune di queste mutazioni, definite mutazioni *drivers*, rappresentano un importante bersaglio terapeutico di diverse terapie, mentre altre potrebbero rappresentarlo in futuro.

Le indagini di tipo molecolare, infatti, mirano all'individuazione di alcune mutazioni in geni coinvolti nel processo di tumorigenesi (ovvero, la capacità del tumore di crescere in modo anomalo) e di progressione tumorale (inclusa l'acquisita capacità di produrre metastasi). (2)

La terapia a bersaglio molecolare vede l'utilizzo di farmaci contro tali alterazioni e la loro introduzione ha acquisito un ruolo importante nel trattamento del tumore al polmone in stadio avanzato, in quanto tali farmaci hanno dimostrato una maggiore efficacia rispetto alla terapia standard a base di chemioterapia. (2)

Nei pazienti con NSCLC metastatico, non candidati a trattamenti loco-regionali, le mutazioni nel gene *EGFR* sono le mutazioni indagate per prime, seguite poi dalla caratterizzazione di eventuali alterazioni nei geni *BRAF*, *ALK*, *NTRK 1*, *2*, *3*, *ROS1* e *KRAS*, per i quali esiste una terapia a bersaglio molecolare. (2,4)

Viene inoltre valutata, ove possibile e senza compromettere la valutazione dei "biomarcatori standard" prima citati, la presenza di alterazioni molecolari nei cosiddetti "biomarcatori emergenti": *RET*, *MET* e *HER2.* Anche per questi ultimi sono disponibili, ad oggi, delle terapie a bersaglio molecolare, seppur nell'ambito della sperimentazione clinica o programmi ad uso compassionevole. (2) [Figura 2]

Infine, per una diagnosi morfologica completa del tumore, è raccomandata, inoltre, la valutazione dei livelli di espressione di PD-L1, marcatore utilizzato per selezionare quei pazienti per i quali è possibile avviare un percorso di immunoterapia. (2)

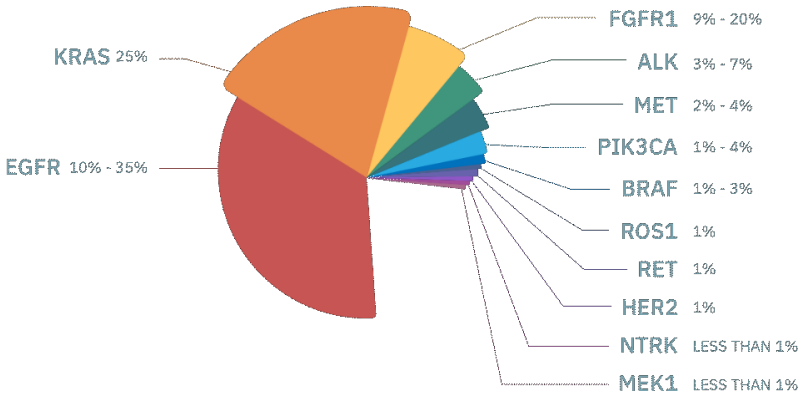

***Fig. 2: principali mutazioni genetiche riscontrabili in pazienti con NSCLC**; disponibile alla pagina web: http://st-0047193.stprod.webmd.com/lung-cancer/story/nsclc-gene-mutations.*

1.2 Strategie terapeutiche nel tumore del polmone

L'approccio terapeutico appropriato per un paziente con tumore del polmone viene avviato previa valutazione dello stadio del tumore stesso, del tipo istologico e delle condizioni cliniche del paziente. (2)

Pazienti con tumore del polmone in stadio precoce (stadio I, II, IIIA) risultano ottimi candidati all'intervento chirurgico per la resecazione del tumore, purché le loro condizioni fisiche siano stabili e sufficienti per la buona riuscita dell'intervento. Si può eventualmente decidere di eseguire alcune sedute di chemioterapia per pazienti con tumore allo stadio IIIA, approccio che permette di ridurre il rischio di recidiva. (5)

Nel 40% dei pazienti con NSCLC la malattia viene diagnosticata in stadio IV, stadio ormai avanzato e metastatico, dove l'operazione chirurgica non è più effettuabile. (5)

In questi casi la scelta del trattamento dipende da diversi fattori, tra cui la presenza di alterazioni molecolari *driver*s, l'istologia, il livello di espressione di PD-L1 e le condizioni generali del paziente. (2)

È possibile, a seguito delle valutazioni effettuate, procedere con un approccio di chemio-radioterapia, immunoterapia oppure avviare un trattamento con farmaci a bersaglio molecolare. (5)

Attualmente per i pazienti con NSCLC avanzato in cui non sono rilevabili mutazioni *drivers* suscettibili a terapie a bersaglio molecolare e in cui il livello di espressione di PD-L1 non sia idoneo per l'avvio di un trattamento di tipo immunoterapico, è raccomandato un trattamento combinato di chemioterapia e immunoterapia. (2)

1.2.1 Terapia a bersaglio molecolare

L'approccio di terapia con farmaci a bersaglio molecolare si è rilevato migliore rispetto alla tradizionale chemioterapia nel trattamento del tumore al polmone allo stadio IIIA o avanzato, tanto da essere selezionato come trattamento di prima scelta per quest'ultimo, previa valutazione della presenza di alterazioni specifiche molecolari. (5)

L'identificazione di alterazioni a carico del gene *EGFR* permette di procedere con l'utilizzo di specifici inibitori tirosinchinasici di *EGFR* (TKI, *tyrosine kinase inhibitors*). (4)

Tuttavia, pazienti trattati con TKIs di prima o seconda generazione, dopo un periodo variabile tra i 9 e i 13 mesi, sviluppano resistenza al farmaco stesso, vanificando così l'efficacia del trattamento farmacologico. (2)

È stato descritto come, in alcuni geni, possono insorgere mutazioni in grado di offrire un vantaggio al tumore, non permettendo il legame del farmaco al proprio bersaglio; è questo il caso della mutazione T790M nel gene EGFR, dopo la quale nel sito catalitico dove verrebbe a legarsi il farmaco stesso per esplicare la sua funzione, viene a trovarsi una catena di metionine, che impedisce il legame tra il farmaco ed il recettore. (4,6)

Un'altra causa per cui il paziente potrebbe divenire resistente alla terapia adoperata, è l'attivazione di altre vie di segnalazione differenti da quelle inibite dal farmaco utilizzato, in modo da garantire comunque alle cellule tumorali la capacità di proliferare e crescere in modo incontrollato. Esempio di questo tipo di resistenza, è la via di segnalazione cMET. (2)

Per tali motivazioni, è stato sviluppato un TKI di terza generazione, Osimertinib, che è in grado di legare comunque il recettore *EGFR* anche in presenza della mutazione T790M. (4) Attualmente questo farmaco viene utilizzato in pazienti *EGFR* mutati come TKI di prima scelta per il trattamento in prima linea, in quanto la sua efficacia si è dimostrata superiore rispetto ai TKIs di prima e seconda generazione. I meccanismi di resistenza che insorgono a seguito del trattamento con Osimertinib sono ancora oggi poco noti e oggetto di studio. (4)

Altri farmaci TKIs attualmente disponibili sono rivolti a geni quali *ALK, ROS1, BRAF* e *NTKR*. (2)

La valutazione della presenza o assenza di nuove mutazioni resistenti viene tradizionalmente eseguita attraverso biopsia tissutale che, tuttavia, è spesso difficilmente eseguibile in pazienti a progressione di malattia dopo trattamento, a causa delle condizioni del paziente stesso o della localizzazione del tumore.

L'utilizzo della biopsia liquida per eseguire tale analisi è stato valutato come alternativa rispetto alla biopsia tradizionale, in quanto l'analisi del DNA libero circolante presente nel plasma dei campioni prelevati, rende possibile l'identificazione di mutazioni tumore-correlate. (4)

1.2.2 Immunoterapia

La scoperta e l'introduzione nella pratica clinica dei *check point inhibitors* ha portato grandi benefici nel campo del trattamento del tumore del polmone. (1)

I *check point inhibitors* sono importanti recettori, espressi sulla superficie delle cellule del sistema immunitario e in grado di regolare la risposta immunitaria in modo negativo, sopprimendola.

È noto il fatto che le cellule tumorali esprimono sulla loro superficie un recettore specifico, chiamato PD1 (*programmed cell death protein 1*), che attraverso il legame di PD-L1 (*programmed cell death protein ligand 1*) espresso invece nella superficie delle cellule della risposta cellulo-mediata, evita che queste ultime esplichino la propria funzione citotossica.

Ciò si traduce in una importante meccanismo di resistenza immunitaria, che permette così una più lunga sopravvivenza delle cellule tumorali. La strategia terapeutica prevede di bloccare queste vie di segnalazione, in modo tale da garantire una maggior azione dei linfociti T attivati verso le cellule neoplastiche. (5)

L'immunoterapia sfrutta, nello specifico, l'utilizzo di anticorpi monoclonali, ovvero farmaci prodotti in laboratorio, di origine sintetica, in grado di riconoscere specificamente molecole target e quindi modificare in modo positivo o negativo la risposta immunitaria.

In questo specifico caso, l'anticorpo monoclonale sarà in grado di legare PD-L1, impedendo così il suo legame con PD1. Tramite tale approccio i linfociti T non vengono inibiti e possono dunque svolgere la propria funzione citotossica nei confronti delle cellule tumorali. [figura 3] (5)

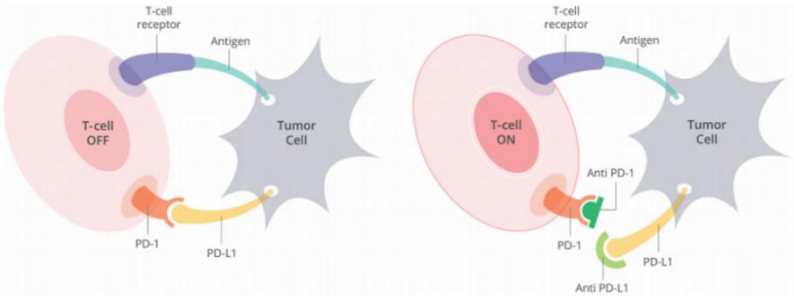

Fig. 3: meccanismo d'azione dell'anticorpo monoclonale anti PD-L1*; disponibile alla pagina web: https://blogs.shu.edu/cancer/2016/11/09/how-pd-1-abrogates-the-anti-tumor-immune-response/*

Attualmente, il trattamento con immunoterapia viene avviato dopo la valutazione dei livelli di espressione di PD-L1: se tale marcatore ha una positività maggiore di 50%, allora si procede con l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale pembrolizumab (anticorpo anti-PD-L1) in monoterapia. Nei casi in cui, invece, il livello di espressione di PD-L1 risulti inferiore al 50% e in assenza di mutazioni a carico di driver molecolari, il paziente viene trattato affiancando alla chemioterapia, l'immunoterapia. (2)

CAPITOLO 2 - BIOPSIA LIQUIDA

2.1 Il DNA libero circolante (cfDNA)

Con il termine biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di liquidi biologici come surrogati del tessuto tumorale, per la ricerca di informazioni utili alla prognosi di neoplasie.
Nel contesto del tumore al polmone, essa consiste in un prelievo di sangue periferico; risulta, quindi, un esame minimamente invasivo e facilmente ripetibile.
Diversi sono gli elementi biologici che possono essere isolati dal sangue periferico: piastrine, esosomi, RNA e DNA libero circolante (*cell free DNA*, cfDNA). (6) [Figura 4]

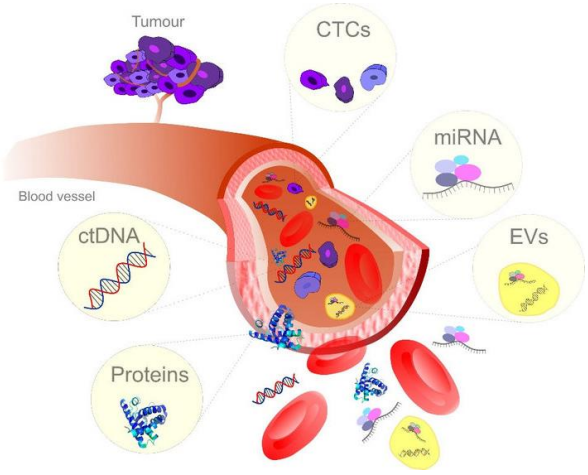

Fig. 4: Elementi biologici isolati dal sangue periferico e rilevabili mediante biopsia liquida; *tratta da: Alena Liskova, Marek Samec, Lenka koklesova, Journal of medicine, 2020.*

Il cfDNA è la diretta conseguenza della normale degradazione di frammenti di DNA cellulare derivante da globuli bianchi o cellule dello stroma. In un paziente affetto da tumore, una parte del cfDNA rilevabile è rappresentato da DNA tumorale circolante *(circulating tumor DNA, ctDNA).* Come tutte le cellule dell'organismo, anche le cellule tumorali possono andare incontro a processi di morte cellulare programmata (apoptosi) o necrosi, con conseguente rilascio di frammenti di acidi nucleici liberi nel plasma. (6,7)
Nei pazienti con cancro del polmone, la frazione di ctDNA, rispetto al quantitativo complessivo di cfDNA, può variare dallo 0,1% a più del 90%. Inoltre, il ctDNA è presente nel plasma come piccoli frammenti, la cui lunghezza massima rilevabile è

dell'ordine delle 90-150 paia di basi, a differenza dei frammenti di cfDNA, che presentano una lunghezza variabile tra le 150 e 200 paia di basi. (8)

La presenza del cfDNA nel sangue è stata per la prima volta descritta nel 1948, da parte di Mandel e Metais. Dopo circa 30 anni da tale scoperta, venne dimostrata la correlazione tra la quantità di ctDNA rilevato nei campioni di plasma soggetti ad analisi e la presenza della massa tumorale. In seguito, Leon e collaboratori dimostrarono che i pazienti oncologici presentano quantità di cfDNA in plasma superiori rispetto a pazienti privi di qualunque forma tumorale. (7)
Inoltre, grazie a diversi studi successivi, è stato possibile evidenziare come anche la presenza di infiammazioni multiple o infezioni possano contribuire ad aumentare in soggetti non oncologici la concentrazione totale del cfDNA presente nel plasma, confermando l'ipotesi che la rilevazione di una quantità di cfDNA maggiore rispetto ai livelli normali, non sia necessariamente conseguenza diretta della presenza di tumore. (7)
Dopo l'identificazione del ctDNA e la conferma della sua correlazione con lo sviluppo di neoplasia, si è pensato ad un suo possibile utilizzo come strumento diagnostico per rilevare la presenza di mutazioni tumore-specifiche.
Tuttavia, solo grazie all'introduzione di tecniche di biologia molecolare altamente sensibili, quali la Real-Time PCR (RT-PCR) e la Droplet Digital PCR (ddPCR) , si è potuto procedere con la rilevazione di tali alterazioni, che risultano in genere poco rappresentate in circolo. (6)

Agli inizi del primo decennio del 2000, la biopsia liquida è stata per la prima volta utilizzata per ricercare mutazioni nel gene *EGFR* in campioni di sangue prelevati da pazienti affetti da tumore del polmone avanzato. (6)
Successivi studi evidenziarono come il cfDNA, e più precisamente il ctDNA presente in pazienti oncologici e rilasciato dalle stesse cellule neoplastiche, poteva rappresentare un importante marcatore predittivo della progressione tumorale (8).
Diverse ricerche hanno, inoltre, dimostrato la correlazione presente tra il ctDNA e la cinetica di risposta al trattamento. (7)
In particolare, sfruttando la semplicità e la ridotta invasività della biopsia liquida, risulta possibile effettuare a pazienti affetti da neoplasia e sottoposti ad uno specifico trattamento terapeutico, prelievi ripetuti e ad intervalli regolari di sangue periferico, con il fine ultimo di analizzare il cfDNA presente nel plasma e in esso ricercare mutazioni tumore-correlate, in modo tale da ottenere informazioni sempre aggiornate su come il paziente sta rispondendo al trattamento e quindi valutare se

la terapia è efficace oppure se da essa non viene tratto nessun beneficio di tipo clinico. (6) [Figura 5]

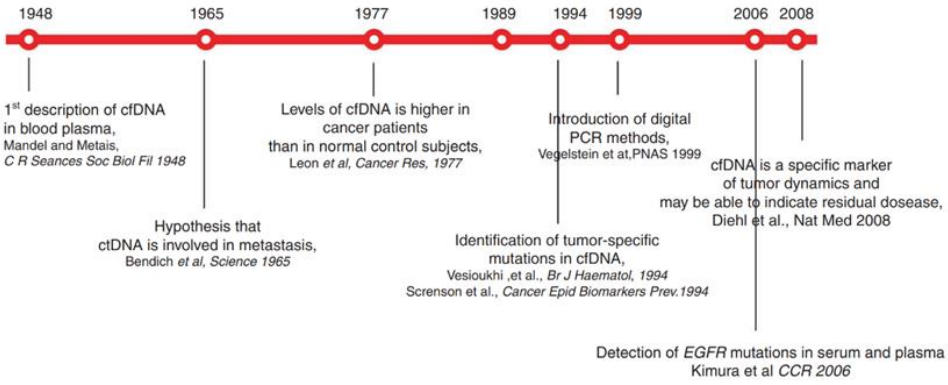

Fig. 5: Linea temporale che evidenzia le principali scoperte riguardo al cfDNA; *tratta da: [4]*

2.2 La biopsia liquida nella pratica clinica

La tecnica di elezione prevista nell'iter diagnostico di un paziente per la genotipizzazione del tumore al polmone è rappresentata dall'analisi del materiale genetico isolato da biopsia tissutale. (8)
Tuttavia, il tumore del polmone si trova spesso localizzato in zone poco accessibili per l'esecuzione di una adeguata biopsia tissutale. In aggiunta, considerando il fatto che la diagnosi di tumore al polmone viene spesso eseguita in un momento in cui la neoplasia è ormai in stadio avanzato, il paziente oncologico non risulta in condizioni di salute ottimali per sottoporsi a tale procedura. (7)
Inoltre, la caratterizzazione molecolare ottenuta dalla biopsia tissutale spesso non è eseguibile e le informazioni ottenute possono essere solo parziali, a causa della bassa quantità o della scarsa qualità del DNA tumorale isolato dal tessuto tumorale prelevato. (6) In tali situazione, la biopsia liquida rappresenta un interessante alternativa per la diagnostica genetica. (8)

La biopsia liquida consiste, infatti, in un semplice prelievo di sangue periferico, è facilmente ripetibile e, proprio per la sua scarsa complessità e minima invasività, viene ben accettata dal paziente. (6,7)
L'utilizzo clinico del cfDNA, approvato dalla food and drug administration (FDA) statunitense e dall'agenzia europea per i medicinali (EMA), è destinato, tutt'oggi, a pazienti che non possono sottoporsi a biopsia tissutale o che presentano resistenza acquisita agli inibitori della tirosinchinasi (TKI). (7)

Tuttavia, l'analisi del cfDNA mediante biopsia liquida presenta anche degli svantaggi: il DNA tumorale circolante, infatti, ha una emivita molto breve di circa 2,5 h ed inoltre, essendo in una concentrazione molto inferiore rispetto al cfDNA totale, esso risulta di difficile estrazione e la sua quantità è incerta. Per tale motivo, il cfDNA viene analizzato mediante tecniche di biologia molecolare molto sensibili. (6)

Per l'analisi del cfDNA e, più nello specifico, il ctDNA, sono necessarie tecniche di biologia molecolare altamente sensibili in quanto esso rappresenta solo una piccola frazione del DNA circolante. I metodi inizialmente più utilizzati per le analisi di mutazioni tumore-correlate nel cfDNA sono basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR-*based*): i principali metodi sono la Real Time PCR (rtPCR) e la *droplet digital* PCR (ddPCR), che consente la rilevazione di mutazioni con una ancor più alta sensibilità. (6)
I saggi basati sulla PCR hanno come bersaglio determinate alterazioni tumore-specifiche in singoli geni. Il successivo impiego del sequenziamento di nuova generazione (*next generation sequencing*, NGS) ha reso possibile l'analisi simultanea di differenti molecole di DNA, permettendo potenzialmente di individuare molteplici alterazioni genomiche, quali variazioni a singolo nucleotide, piccole delezioni e inserzioni (*InDel*), riarrangiamenti genici o amplificazioni geniche (*copy number variations, CNVs*) nel ctDNA. (7)

2.3 Analisi del cfDNA come strumento per monitorare la terapia

Attualmente, l'analisi del cfDNA è ampiamente sfruttata nella pratica clinica per l'indagine di mutazioni tumore-correlate che sono target della terapia a bersaglio molecolare. (7) Il suo potenziale utilizzo per monitorare la terapia immunitaria è invece oggetto di diversi studi. (7)
Un recente studio, eseguito dal laboratorio che ho frequentato per la stesura di questo elaborato di laurea, ha evidenziato come la biopsia liquida possa essere un utile strumento per il monitoraggio della risposta al trattamento in pazienti con tumore del polmone metastatico. (9) [Fig. 6; Fig. 7]

Il progetto si focalizza in un gruppo di pazienti arruolati nel contesto dello studio MAGIC-1 (*Monitoring Advanced NSCLC through plasma Genotyping during Immunotherapy: Clinical feasibility and application*). Questo studio ha previsto

l'arruolamento di tutti i pazienti con adenocarcinoma polmonare afferenti all'Istituto Oncologico Veneto di Padova, non mutati nei geni *EGFR, ALK* e *ROS1*, che avrebbero avviato un percorso di chemioterapia o immunoterapia.
Lo schema sperimentale del progetto prevedeva la caratterizzazione molecolare con biopsia tissutale del paziente alla diagnosi, e una serie di biopsie liquide ripetute, eseguite a punti temporali prestabiliti: all'inizio del trattamento (T1), dopo circa 3 o 4 settimane di trattamento (T2) e al momento della prima rivalutazione radiologica (eseguita, secondo la pratica clinica, per valutare la progressione della malattia, T3).

Lo scopo dello studio consiste nel valutare la sensibilità di mutazioni-tumore correlate, precedentemente identificate in biopsia tumorale tissutale, nel plasma di pazienti e nel correlarne la variazione quantitativa nel tempo durante la terapia con l'outcome clinico del paziente.
Lo studio pubblicato presenta le analisi eseguite in 58 pazienti risultati *KRAS* mutati in biopsia tissutale.
Ad ogni punto temporale è stato eseguito un prelievo di sangue di 20 mL, poi processato per l'estrazione del plasma e per la successiva analisi del cfDNA tramite ddPCR, al fine di valutare quantitativamente la presenza della mutazione tumore-specifica del gene *KRAS*. (9)
I risultati di biopsia liquida sono stati considerati sia come parametro statico (presenza o assenza di mutazione in *KRAS* in ogni punto temporale), sia come parametro dinamico (aumento o decremento della percentuale di allele mutato dal punto T1 al punto T2 o al T3) e correlati poi con l'esito clinico del paziente, in termini di risposta radiologica (*radiological response, RR*), tempo libero da progressione (*progression free survival, PFS*) e tempo di sopravvivenza (*overall survival, OS*). (9)

Lo studio ha evidenziato come il monitoraggio dinamico delle mutazioni tumore-correlate nel plasma permetta di anticipare l'esito clinico della terapia. In particolare, si è osservato che l'aumento della quantità di mutazioni presenti nel plasma tra il primo e secondo punto temporale o tra il primo ed il terzo, correlano con un tempo libero da progressione di malattia e sopravvivenza più breve, sia in pazienti trattati con chemioterapia, sia con immunoterapia.

Si riporta l'esempio di due pazienti trattati con immunoterapia, il paziente #17 ed il paziente #112 che, a seguito del trattamento, hanno mostrato rispettivamente iperprogressione e un beneficio clinico superiore a 6 mesi dall'inizio del trattamento.

Nello specifico, il paziente #17 rientra in quel 6-10% di pazienti ai quali si associa un quadro clinico di iperprogressione, a seguito del trattamento con immunoterapia. Per iperprogressione si intende che il paziente sottoposto ad un trattamento immunoterapico, prima delle 12 settimane, mostra un aumento di più del 50% della massa tumorale.
Mediante l'analisi del cfDNA eseguita con biopsia liquida si è osservato un notevole aumento della frazione allelica del gene KRAS dopo quattro settimane (la percentuale varia da 0% fino ad un valore di 10,8%). Tale aumento si associa, inoltre, al peggioramento delle condizioni cliniche del paziente stesso, come anche mostrato dalle immagini delle TAC, la cui analisi ha evidenziato la presenza di iperprogressione. Non è stato possibile effettuare il terzo prelievo T3, in quanto il paziente è deceduto. [Fig. 6] (9)
Il paziente #112, invece, nella valutazione radiologica eseguita a distanza di tre mesi dall'inizio del trattamento, ha mostrato una diminuzione della massa tumorale e ha presentato successivamente un beneficio clinico superiore a 6 mesi dall'inizio della terapia. Si è osservato, infatti, che la percentuale di KRAS mutato rilevata al primo punto temporale, si è ridotta drasticamente nel tempo, fino ad arrivare allo 0% in T3. [Fig.7] (9)

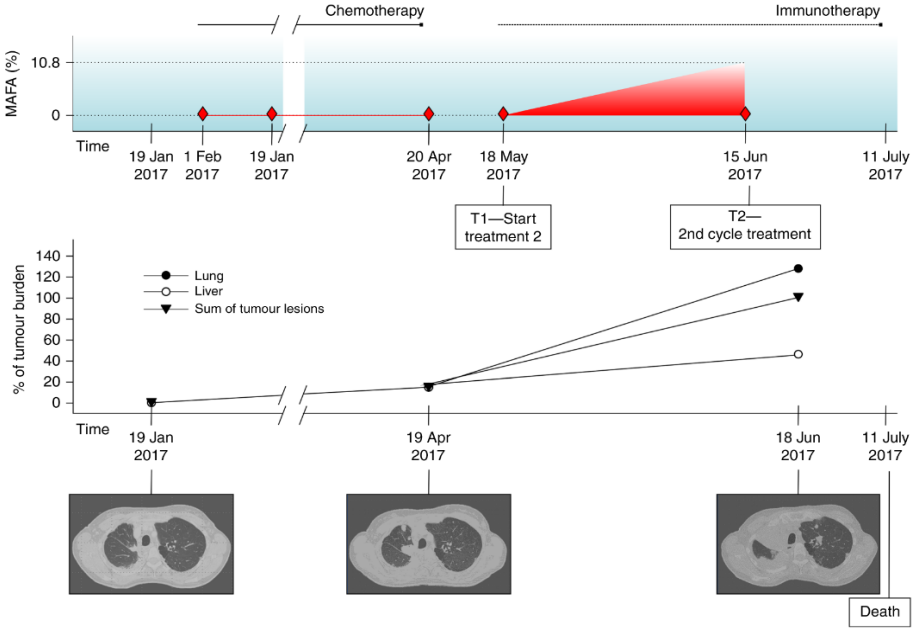

Fig. 6: paziente #17; valutazione mediante biopsia liquida del carico mutazionale del gene KRAS nel cfDNA. Il valore percentuale della mutazione varia dallo 0% al 10,8%, esito che corrisponde ad un paziente in iperprogressione di malattia. *Tratta da: [9]*

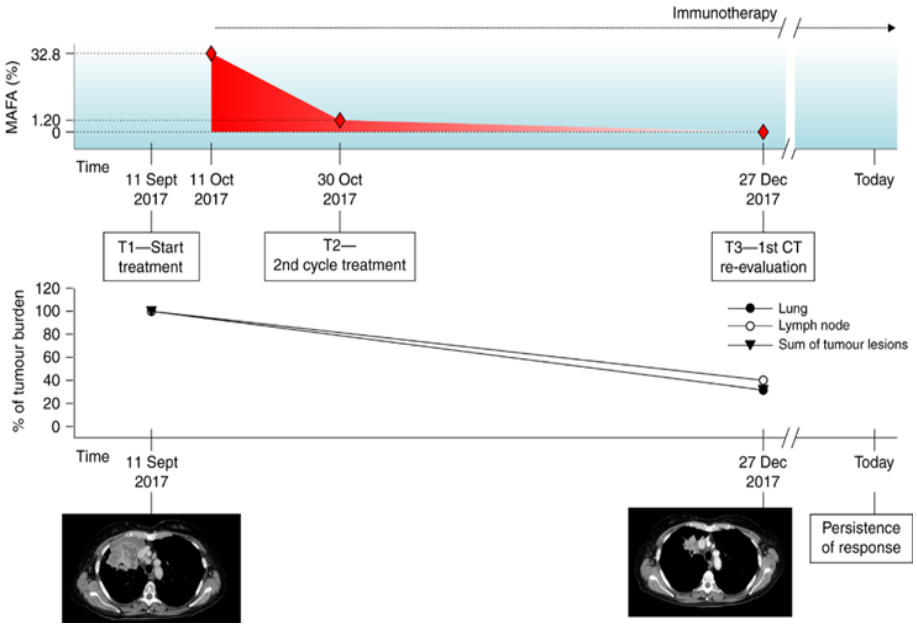

Fig. 7: paziente #112, valutazione mediante biopsia liquida del carico mutazionale del KRAS nel cfDNA. Il valore percentuale della mutazione varia da 32,8% in T1, a 1,20% in T2 e 0% in T3; l'esito risulta associato ad un paziente che sta riscontrando beneficio clinico dal trattamento. *Tratta da: [9]*

CAPITOLO 3 – L'APPROCCIO NGS IN BIOPSIA LIQUIDA

3.1 Sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing)

L'introduzione delle tecnologie di "sequenziamento di nuova generazione" (*Next Generation Sequencing*, NGS) ha offerto il vantaggio di analizzare contestualmente molteplici sequenze genetiche, aumentando notevolmente il numero di informazioni utili ai fini diagnostici-terapeutici. (10)
Il sequenziamento Sanger, ovvero il metodo di sequenziamento di prima generazione sviluppato nel 1977 da Fred Sanger, sfrutta l'attività di una DNA polimerasi, la quale catalizza l'aggiunta dei diversi deossinucleotidi (dNTPs) marcati con fluorocromi differenti ad un templato di DNA, durante diversi cicli di sintesi. I deossinucleotidi eccitati emettono fluorescenza e quindi, in base ad essa, si è in grado di risalire alla sequenza ordinata di nucleotidi che compongono il frammento di DNA di nostro interesse. Tuttavia, mediante tale tecnica, è possibile sequenziare un solo templato per volta, e di conseguenza, la produttività risulta alquanto limitata. (10)

Le tecniche NGS si basano sul metodo di sequenziamento di Sanger, ma, a differenza di quest'ultimo, permettono una massiva e parallela analisi di molteplici geni o dell'intero genoma. Grazie ad una maggiore sensibilità della tecnica, inoltre, è possibile rilevare varianti anche a bassa frequenza.
Tramite tali tecnologie di nuova generazione si è registrata una significativa riduzione dei costi di sequenziamento, in concomitanza con un elevata produttività, rendendo così possibile il completamento in alcune settimane di analisi che, con il metodo Sanger, avrebbero impiegato anni. (11)
Le tecnologie di sequenziamento di seconda generazione, quali Roche 404, Ion Torrent e piattaforme Illumina, sono tecniche di sequenziamento che permettono la lettura e l'allineamento di brevi di sequenze, attualmente ampiamente utilizzate. Tuttavia, si riscontrano, in caso di lettura su lunghi tratti di DNA, problemi riguardo la presenza di lacune di sequenza, problemi di allineamento o artefatti della PCR. (10,11)
In seguito, sono state sviluppate tecnologie di sequenziamento di terza generazione, le quali possono raggiungere lunghezze di lettura fino a 10 Kb, superando i problemi rilevati con le letture brevi. Anche per tali tecnologie, in realtà, vi sono

diversi limiti, in questo caso riguardo l'accuratezza delle letture, la quale comunque continua a migliorare con il tempo per merito dei continui progressi riguardo lo sviluppo di software di analisi. (10,11)

Grazie ai loro vantaggi, le tecniche NGS presentano un ampio spettro di applicazioni; vengono infatti utilizzate in diagnosi, nella prognosi, per selezionare l'opportuna terapia in caso di diverse patologie, inoltre, si sono rivelate un ottimo test anche nel campo dell'oncologia. (11)
Infatti, l'NGS può essere utilizzata per identificare diverse alterazioni genomiche comunemente osservate nel cancro, come varianti a singolo nucleotide (*single nucleotide variants*, SNVs), piccole inserzioni o delezioni (*InDel*), o varianti nel numero di copie (*copy number variants*, CNVs). (12) Sono, al momento, disponibili diversi pannelli NGS commerciali arricchiti di alcune regioni genomiche di interesse per specifici tipi di cancro. (13)

Nel contesto del tumore del polmone, come precedentemente argomentato, una diagnosi molecolare per verificare la presenza di mutazioni tumore-correlate in specifici geni è essenziale per poter avviare la strategia terapeutica più opportuna per il singolo paziente.
Le mutazioni rilevabili nel ctDNA, che rappresenta solo una piccola frazione del cfDNA totale, possono essere analizzate sia mediante PCR che NGS. Gli approcci PCR rilevano solo mutazioni note; l'NGS, invece, è in grado di coprire una più ampia gamma di mutazioni in molteplici geni di interesse. (13)
Diversi studi sono stati condotti per verificare le potenzialità del sequenziamento di nuova generazione, principalmente eseguiti su campioni di cfDNA provenienti da pazienti con NSCLC. Grazie ai diversi pannelli ad oggi disponibili, infatti, è possibile verificare la presenza di alterazioni in geni emergenti quali *BRAF*, *MET*, *RET*, *ERB2* e *KRAS*, nel caso in cui il test per le mutazioni nei geni standard (*EGFR, ALK e ROS1*) risultino negativi. (11)
Infine, è stato dimostrato da diversi studi, come l'analisi del ctDNA basata su NGS sia utile nel predire le risposte a terapie mirate; pertanto, è possibile affiancare alla biopsia liquida la tecnica NGS, al fine di analizzare più geni in un'unica seduta analitica per monitorare l'evoluzione della malattia e la risposta del paziente trattato con opportuna terapia. (13)

3.2 NGS e Biopsia liquida: esempio di applicazione per il monitoraggio del trattamento con immunoterapia in pazienti con NSCLC

Il laboratorio in cui ho svolto il mio internato di tesi segue diversi progetti di ricerca che studiano il possibile utilizzo di tale tecnica nel monitoraggio della risposta terapeutica.
Durante il mio internato di laurea ho seguito le analisi di due pazienti (paziente 1 e paziente 2), arruolati nel contesto dello studio MAGIC-1, precedentemente argomentato (paragrafo 2.3) ed entrambi trattati con immunoterapia.
Il primo paziente ha sviluppato iperprogressione a seguito del trattamento, seguito poi dal decesso, mentre il secondo paziente ha mostrato beneficio superiore ai 6 mesi. Per entrambi i pazienti la biopsia liquida eseguita prima dell'inizio del trattamento e la seconda biopsia liquida (T2) eseguita precocemente durante lo stesso, sono state analizzate mediante NGS, allo scopo di valutare il potenziale impiego di questa analisi per monitorare l'andamento della risposta terapeutica e quindi anticipare l'esito clinico del paziente.

Per ciascun paziente, sono stati raccolti 20 mL di sangue periferico in due provette di stabilizzazione del cfDNA (Streck corporate, La Vista, NE, USA), che sono state successivamente processate entro 72 ore, per l'isolamento del plasma. È stata prima eseguita una centrifugazione a 2000 x g per 10 minuti a 4°C in modo da ottenere il surnatante, che successivamente è stato sottoposto ad un'ulteriore centrifugata a 20.000 x g per 10 minuti. I campioni di plasma contenuti possono essere conservati a -80°C, fino alla loro analisi.
Il cfDNA è stato estratto da 5 mL di plasma, utilizzando il kit di isolamento AVENIO cfDNA (Roche Diagnostics, Basilea, Svizzera). Il cfDNA isolato è stato poi quantificato utilizzando QuBit dsDNA HS Assay kit con fluorimetro QuBit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e successivamente valutato nella sua qualità, utilizzando il kit HighSensitivity sullo strumento Agilent 4200 TapeStation, che permette di valutare la lunghezza dei frammenti di ctDNA, la quale dovrà essere di circa 170 basi.
Il cfDNA ottenuto ad entrambi i punti temporali T1 e T2, di entrambi i pazienti 1 e 2, è risultato quantitativamente e qualitativamente adeguato per l'analisi NGS. Nel primo paziente sono stati ottenuti 15.81 ng per ml di plasma al T1 e 84.80 ng per ml di plasma al T2; nel secondo paziente sono stati ottenuti 290.36 ng per mL di plasma al T1 e 32,92 ng per ml di plasma al T2. (Tabella 1).

Successivamente, le librerie sono state preparate utilizzando il kit AVENIO ctDNA Expanded (Roche); si tratta di un test NGS per biopsia liquida che analizza un pannello di 77 geni, in cui ritroviamo 60 diversi biomarcatori emergenti nel cancro del polmone e del colon-retto, oltre a 17 geni drivers del cancro contenuti nelle linee guida del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Questo pannello è in grado di valutare nella stessa seduta di analisi quattro classi di mutazioni: SNVs, fusioni, CNVs e InDels.

Per l'allestimento delle librerie, per tutti i campioni sono stati utilizzati 50 ng di cfDNA. Il protocollo prevede una prima reazione in cui le estremità del cfDNA vengono riparate, il successivo legame di un adattatore con barcode, che permetterà di identificare il campione in modo specifico in fase di analisi, ed infine 12 cicli di PCR per l'amplificazione.
Successivamente, venne eseguito l'arricchimento delle librerie per i geni target di interesse nel pannello e poi l'amplificazione, mediante 15 cicli di PCR. Infine, le librerie sono state purificate e poi sequenziate su cartuccia HighOutput 300 cicli su sequenziatore Illumina nextSeq 500.
Dopo il sequenziamento, l'allineamento è stato eseguito utilizzando il software di analisi del ctDNA AVENIO (Roche Diagnostics).

I dati riportati sono relativi ai risultati di sequenziamento dei due prelievi effettuati nei tempi T1 e T2, nei pazienti PT1 e PT2. Per ciascun paziente e a ciascun punto temporale, è stata valutata: la presenza di alterazioni geniche (Gene), la specifica variante genica (SNV) e la frequenza allelica di ogni gene mutato (VAF%). La VAF descrive la proporzione di molecole di DNA contenenti una mutazione, sul numero totale di molecole del gene.

				T1			T2	
Patient ID	**Clinical feature**	**Gene**	**SNV**	**VAF-1 (%)**	**[cfDNA]**		**VAF-2 (%)**	**[cfDNA]**
PT1	HPD	*KRAS*	p.Ala146Thr	4,75	15,81		16,53	84,80
		KEAP1	p.Gly378	6,32			21,75	
PT2	CB	*KRAS*	p.Gly12Ala	52,88	290,36		8,91	32,92
		TP53	p.Arg306*	41,22			5,79	
		MSH2	p.Arg621Leu	16,17			2,89	
		MTOR	p.Ala1792Pro	0,7			0	

Tabella 1: rilevazione di varianti nel cfDNA e il loro VAF in due pazienti con NSCLC

Il paziente #1 (PT1) è un paziente che è andato incontro a iperprogressione dopo trattamento con immunoterapia. L'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di due mutazioni nel gene *KRAS* e *KEAP1* al T1, con una VAF-1 (%) rispettivamente del 4,75% e del 6,32%. Entrambi i valori di VAF risultano aumentati al T2 (VAF-2 (%): troviamo un valore corrispondente dal 16,53% per il gene *KRAS* e di 21,75% per il gene *KEAP1*. Anche la quantità di cfDNA subisce un incremento, passando da un una concentrazione di 15,81 ng/mL di plasma a 84,80 ng/mL di plasma.
L'aumento dei valori di VAF (%) e della concentrazione totale di cfDNA sono risultati correlabili con l'esito clinico del paziente.

Il paziente #2 (PT2), trattato anch'esso con immunoterapia, ha invece riscontrato un beneficio clinico a seguito del trattamento. Da un punto di vista molecolare, si è osservata una diminuzione del carico di cfDNA tra il T1 e il T2: la concentrazione di DNA circolante è passata da 290,36 ng/mL di plasma, ad un valore nettamente inferiore di 32,92 ng/mL di plasma (Tabella 1).
Inoltre, l'analisi NGS ha identificato la presenza di 4 geni mutati al T1: *KRAS* (VAF-1 (%) = 52,88), *TP52* (VAF-1 (%) = 41,22), *MSH2* (VAF-1 (%) = 16,17) e *MTOR* (VAF-1 (%) = 0,7). Al secondo prelievo (T2) si sono riscontrate solo 3 mutazioni su quattro, ma tutte hanno presentato un valore di VAF(%) ridotto rispetto al punto precedente T1.
Tale riduzione, sia in termini di cfDNA, sia di VAF, è risultata correlata alla valutazione radiologica eseguita dopo 4 mesi dall'inizio del trattamento, che ha evidenziato una riduzione del carico tumorale.

Il grafico in figura 8 mostra le variazioni della VAF nei punti temporali T1 e T2 di ciascun gene risultato mutato nei pazienti PT1 e PT2. Nel grafico sono riportati in ascissa i punti temporali, T1 e T2, mentre inordinata i valori di VAF-1(%) e VAF-2 (%). I primi due grafici (da sinistra) sono relativi ai geni riscontrati mutati nel paziente 1, in iperprogressione, ed evidenziano l'aumento della quantità di mutazioni nel plasma. I grafici colorati in rosso sono invece relativi ai geni mutati nel paziente 2, che ha riscontrato un beneficio dall'immunoterapia: i geni analizzati mostrano una diminuzione della VAF nel tempo. [Figura 8]

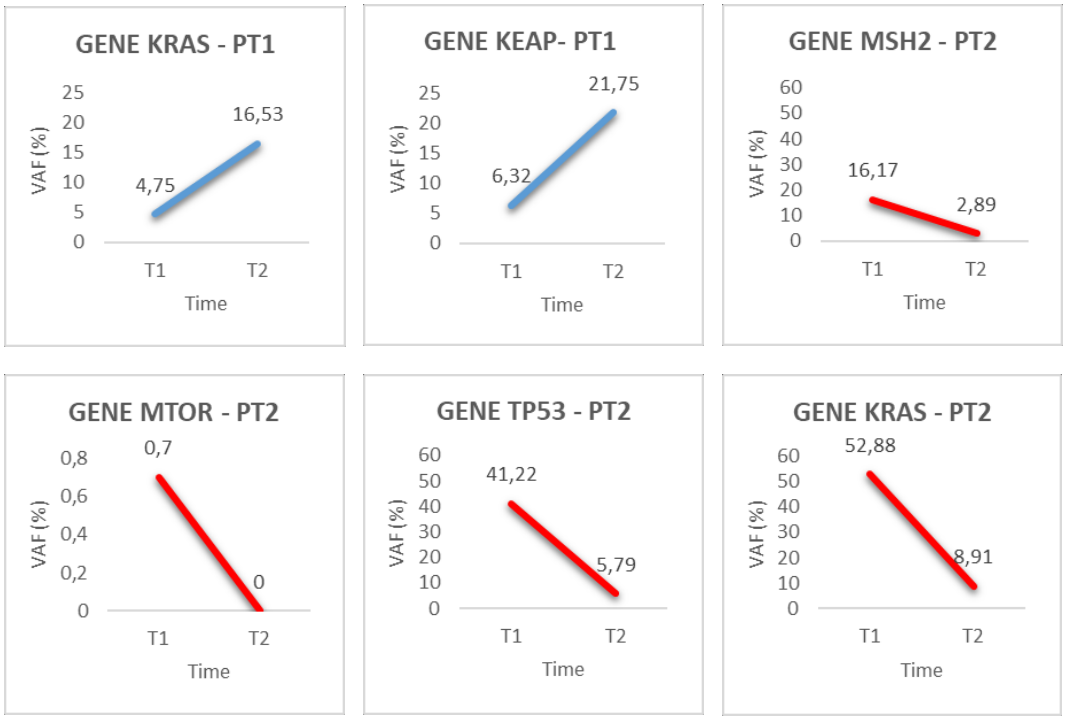

Figura 8: grafici a linee che mostrano l'incremento ed il decremento della VAF (%) rispetto ai punti temporali T1 e T2 nei diversi geni rilevati nel cfDNA dei pazienti PT1 e PT2.

CONCLUSIONI

Il tumore del polmone, uno fra le più aggressive forme di cancro, rappresenta da sempre una grande sfida per la diagnostica molecolare e la ricerca del trattamento terapeutico più efficace. Spesso, la sua localizzazione anatomica e i sintomi precoci scarsamente evidenti, rendono la diagnosi difficile in tempi precoci; pertanto, la maggior parte dei casi di tumore al polmone non a piccole cellule vengono diagnosticati in fase avanzata, quando la resezione chirurgica non risulta più possibile. (1,2)

Per motivi di localizzazione anatomica o condizioni cliniche del paziente, la diagnosi eseguita attraverso biopsia tissutale o immunoistochimica per una migliore caratterizzazione del tumore dal punto di vista fisiopatologico e molecolare, risultano in alcuni casi di difficile applicazione. (2,4) La biopsia liquida e in particolare l'analisi del cfDNA si sono rivelate un approccio alternativo per la caratterizzazione molecolare del tumore, consentendo di indirizzare un maggior numero di pazienti al trattamento con terapie molecolari mirate. (5)

Attualmente la biopsia liquida è protagonista di molteplici studi sperimentali, alcuni dei quali hanno come scopo quello di verificare se la rilevazione in tempi precoci, possibilmente prima della valutazione radiologica eseguita dopo 3 mesi dall'inizio dell'opportuno trattamento, di mutazioni tumore-correlate e quindi il loro valore quantitativo, possa predire l'esito della terapia, sia in termini di beneficio clinico, sia di progressione di malattia. (9)

Alcuni studi hanno infatti dimostrato come l'aumento o il decremento del carico mutazionale rilevato nel cfDNA di pazienti con NSCLC sottoposti a biopsie liquide in tempi precoci e prestabiliti, correli con l'outcome della terapia, in termini di valutazione radiologica, tempo di progressione di malattia e sopravvivenza. È possibile quindi, mediante l'impiego della biopsia liquida, predire la risposta al trattamento e l'andamento del paziente, in modo tale da intervenire precocemente in caso di terapia inefficace. (9)

Durante il mio internato di laurea ho seguito le analisi dei campioni di biopsia liquida di 2 pazienti con NSCLC trattati con immunoterapia. I 2 pazienti fanno parte di uno studio di ricerca più ampio atto a valutare il potenziale impiego della biopsia liquida associata all'analisi NGS nel monitoraggio della terapia immunoterapica. Nello specifico, lo studio prevede l'analisi di mutazioni tumore-specifiche in campioni di biopsia liquida eseguiti precocemente durante il trattamento, allo scopo di verificare se il variare, in termini di aumento o decremento di tali mutazioni

tumore-correlate nel tempo, correla con l'esito della terapia e il quadro clinico del paziente.

Il primo dei 2 pazienti di cui ho seguito l'analisi era andato incontro ad iperprogressione dopo immunoterapia, mentre il secondo aveva avuto beneficio clinico a seguito del trattamento: è stato interessante osservare come l'andamento delle mutazioni nel plasma correli con l'esito della terapia. I dati ottenuti, nonostante siano limitati a 2 soli pazienti, confermano l'ipotesi iniziale del progetto e andranno confermati in tutti i pazienti dello studio.

In conclusione, le mutazioni tumore-specifiche rilevabili nel cfDNA di pazienti con NSCLC e la loro variazione in termini di quantità in seguito al possibile avvio di un percorso di immunoterapia, potrebbero risultare dei buoni marcatori di predizione dell'esito del trattamento stesso.

BIBLIOGRAFIA

1. I numeri del cancro in Italia [Internet]. AIOM. [citato 21 luglio 2022]. Disponibile su: https://www.aiom.it/i-numeri-del-cancro-in-italia/

2. LINEE GUIDA NEOPLASIE DEL POLMONE [Internet]. AIOM. 2021 [citato 21 luglio 2022]. Disponibile su: https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2021-neoplasie-del-polmone/

3. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Ann Oncol. 1 ottobre 2018;29:iv192–237.

4. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature. gennaio 2018;553(7689):446–54.

5. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. Biochim Biophys Acta. 2015/08/19 ed. dicembre 2015;1856(2):189–210.

6. Bonanno L, Dal Maso A, Pavan A, Zulato E, Calvetti L, Pasello G, et al. Liquid biopsy and non-small cell lung cancer: are we looking at the tip of the iceberg? Br J Cancer. 9 marzo 2022;1–11.

7. Guibert N, Pradines A, Favre G, Mazieres J. Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc. 31 marzo 2020;29(155):190052.

8. Brozos-Vázquez EM, Díaz-Peña R, García-González J, León-Mateos L, Mondelo-Macía P, Peña-Chilet M, et al. Immunotherapy in nonsmall-cell lung cancer: current status and future prospects for liquid biopsy. Cancer Immunol Immunother CII. maggio 2021;70(5):1177–88.

9. Zulato E, Attili I, Pavan A, Nardo G, Del Bianco P, Boscolo Bragadin A, et al. Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. luglio 2020;123(1):81–91.

10. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol. 1 novembre 2021;82(11):801–11.

11. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. Ann Lab Med. gennaio 2021;41(1):25–43.

12. Zhang YC, Zhou Q, Wu YL. The emerging roles of NGS-based liquid biopsy in non-small cell lung cancer. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 23 ottobre 2017;10:167.

13. Zulato E, Tosello V, Nardo G, Bonanno L, Del Bianco P, Indraccolo S. Implementation of Next Generation Sequencing-Based Liquid Biopsy for Clinical Molecular Diagnostics in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients. Diagnostics. agosto 2021;11(8):1468.