

I CONVEGNO
NAZIONALE SITLaB



MATERA, 3 - 4 OTTOBRE 2018
CASA DI SPIRITUALITÀ SANT'ANNA



Anatomia patologica: La biopsia liquida

Domenico Dell'Edera

4 ottobre 2018 : 11.15 – 11.40

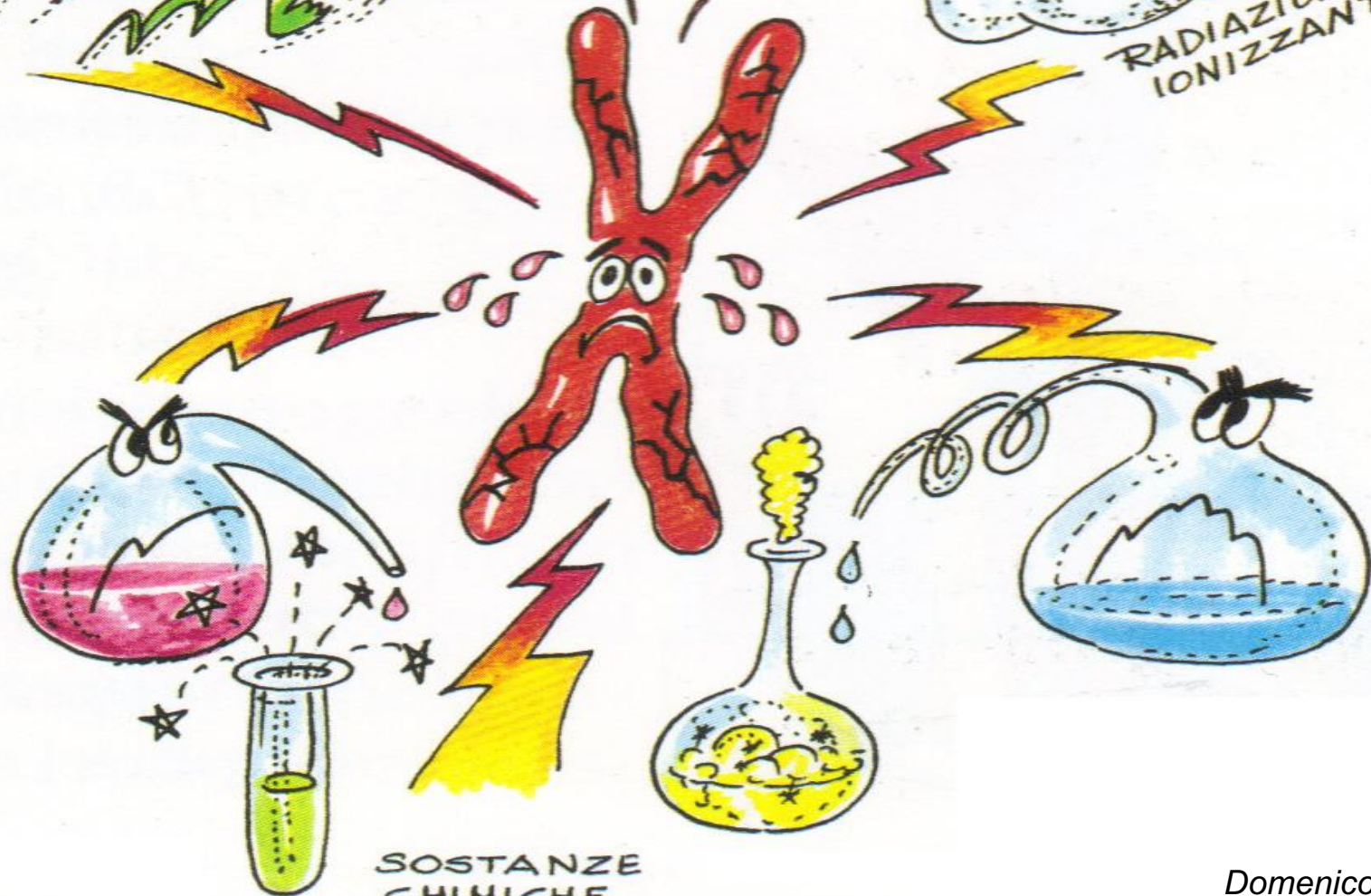
**Arianna Allegretti
Francesca Simone
Vittorio Falcone
Antonietta Sardella
Angela Mitidieri**

**UOD Laboratorio di Genetica
Medica**

**P.O. "Madonna delle Grazie"
- MATERA -**

INFEZIONI
VIRALI

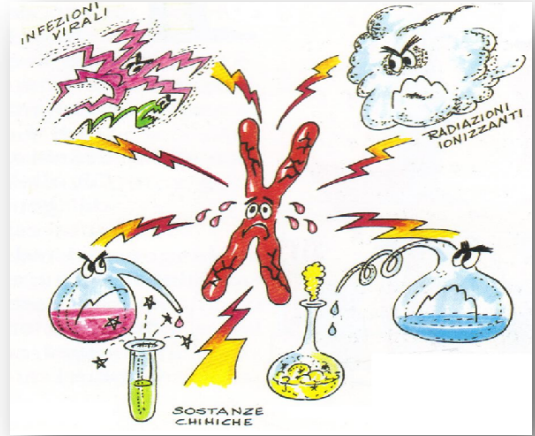
RADIAZIONI
IONIZZANTI



SOSTANZE
CHIMICHE

Quando il DNA è danneggiato che cosa succede?

Danno al DNA



Attivazione sensori che rilevano il danno

DANGER

Blocco del ciclo cellulare (checkpoint)

Attivazione di sistemi atti a riparare il danno



Danno riparato?

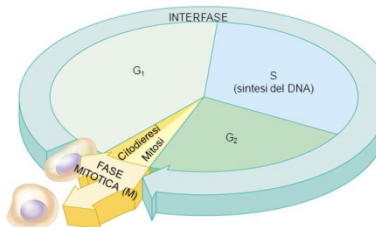
No

Morte cellulare (apoptosi)



Si

Continuare il ciclo cellulare

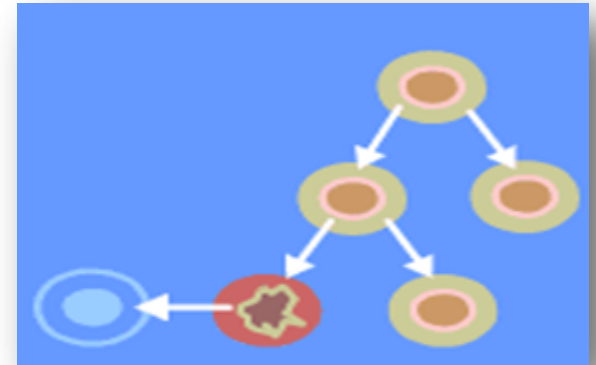
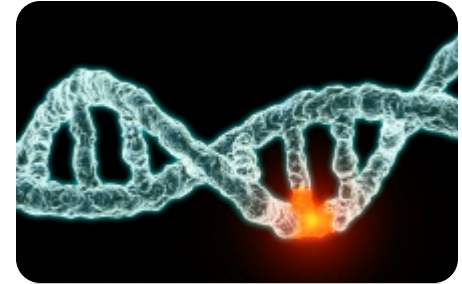


Origine della cellula tumorale

Nel corpo umano, quotidianamente si verificano delle mutazioni, le quali vengono intercettate e riparate.

Il problema nasce quando una mutazione dona ad una cellula un **vantaggio selettivo** diventando il fondatore di un clone mutante, con la facoltà di duplicarsi più velocemente delle cellule vicine.

Il cancro è una malattia che si sviluppa a partire da questi **cloni mutanti**, che proliferano nell'organismo comportandone la distruzione.



Fattori che influenzano l'insorgenza del tumore

Per quanto concerne lo sviluppo di una neoplasia sono necessarie le seguenti **concause**:

Fattori ambientali

Stile di vita: fattori comportamentali

Predisposizione genetica

ecomalattia

Fattori che influenzano l'insorgenza del tumore

Per quanto concerne lo sviluppo di una neoplasia sono necessarie le seguenti concause:

Fattori ambientali

Stile di vita: fattori comportamentali

Predisposizione genetica

ecomalattia



Fattori ambientali: Amianto

Il termine “**ASBESTO**” compare per la prima volta in alcune iscrizioni in lingua greca su testi del 1° secolo a.C. e significa :

“INCORRUTTIBILE”



- Materiale di origine minerale.
- Struttura microcristallina fibrosa.

Principali impieghi dell'Amianto in Italia

Cemento-amianto	69%
Coibentazioni	10%
Cartoni	7%
Freni e frizioni	3%
Tessuti	2%
Altro	9%

Periodo di utilizzo maggiore: anni 60'-70'.

Fattori ambientali: Amianto

Principali malattie dovute all'Asbesto

ORGANO INTERESSATO: POLMONE

Fibrosi polmonare (1° caso: 1909).

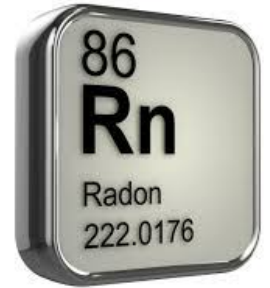
Fibrosi Pleurica

Cancro polmonare (1° caso: 1935).

Mesotelioma pleurico (1° caso: 1960).

Rischio oncogeno ambientale

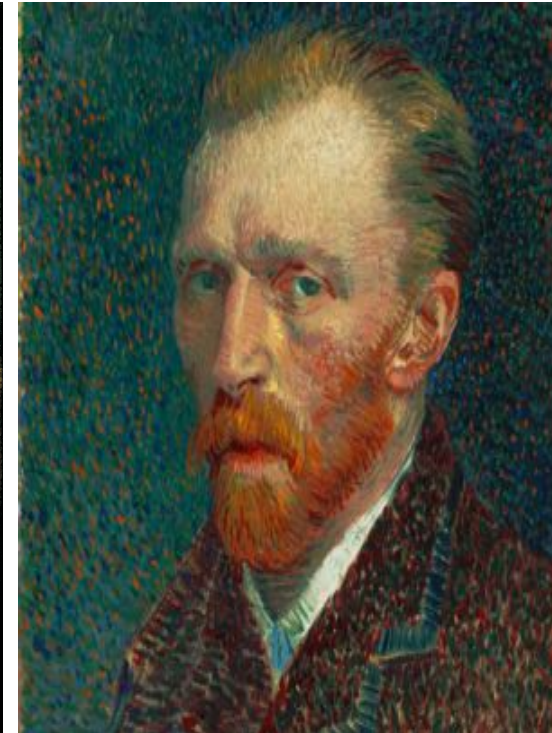
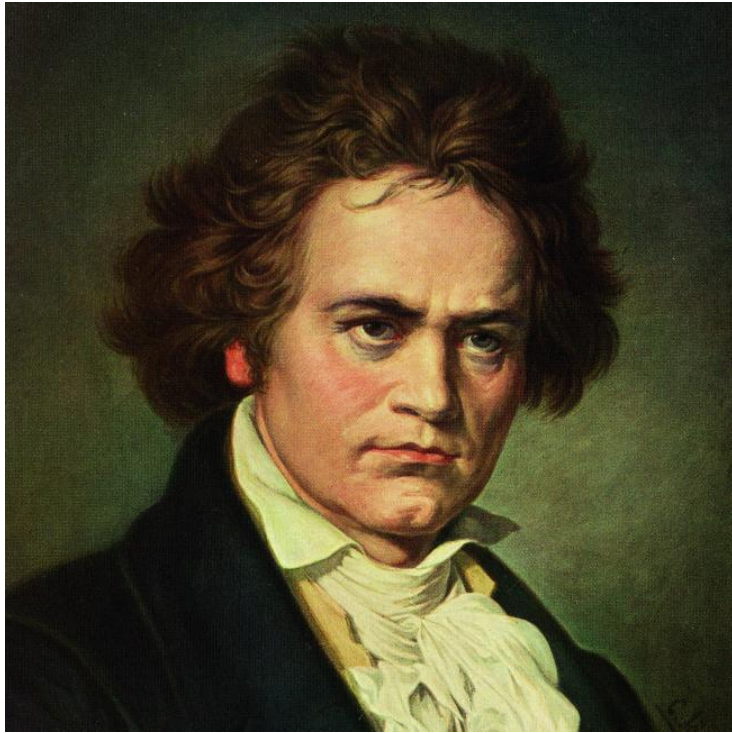
Il **RADON (Rn)** (gas nobile), che si trova nelle rocce e nel suolo deriva, sotto forma di *particelle α* , dal decadimento dell'uranio 238 emettendo radiazioni nell'ambiente soprattutto se in questo il ricambio d'aria è scarso, come nelle cantine.



È la seconda causa di tumore al polmone.

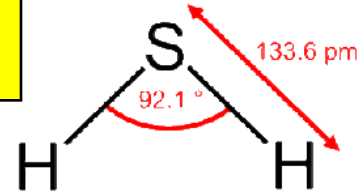


Fattori ambientali: Saturnismo, intossicazione da piombo



La morte di personaggi famosi come **Beethoven**, **Goya** e **Van Gogh** è stata attribuita al saturnismo. Per i pittori si assume che l'intossicazione cronica sia dovuta al loro contatto con i colori: **Goya** inumidiva i pennelli con la bocca.

Fattori ambientali: Idrogeno Solforato H₂S

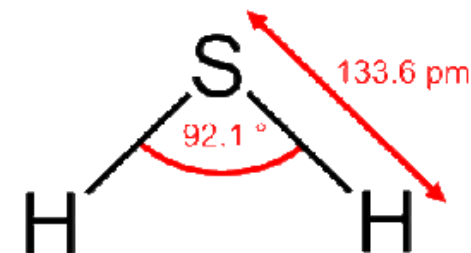


l'idrogeno solforato è coinvolto in tutte le operazioni di:

- Estrazione.
- Trattamento.
- Lavorazione.
- Trasporto del petrolio e del gas naturale.

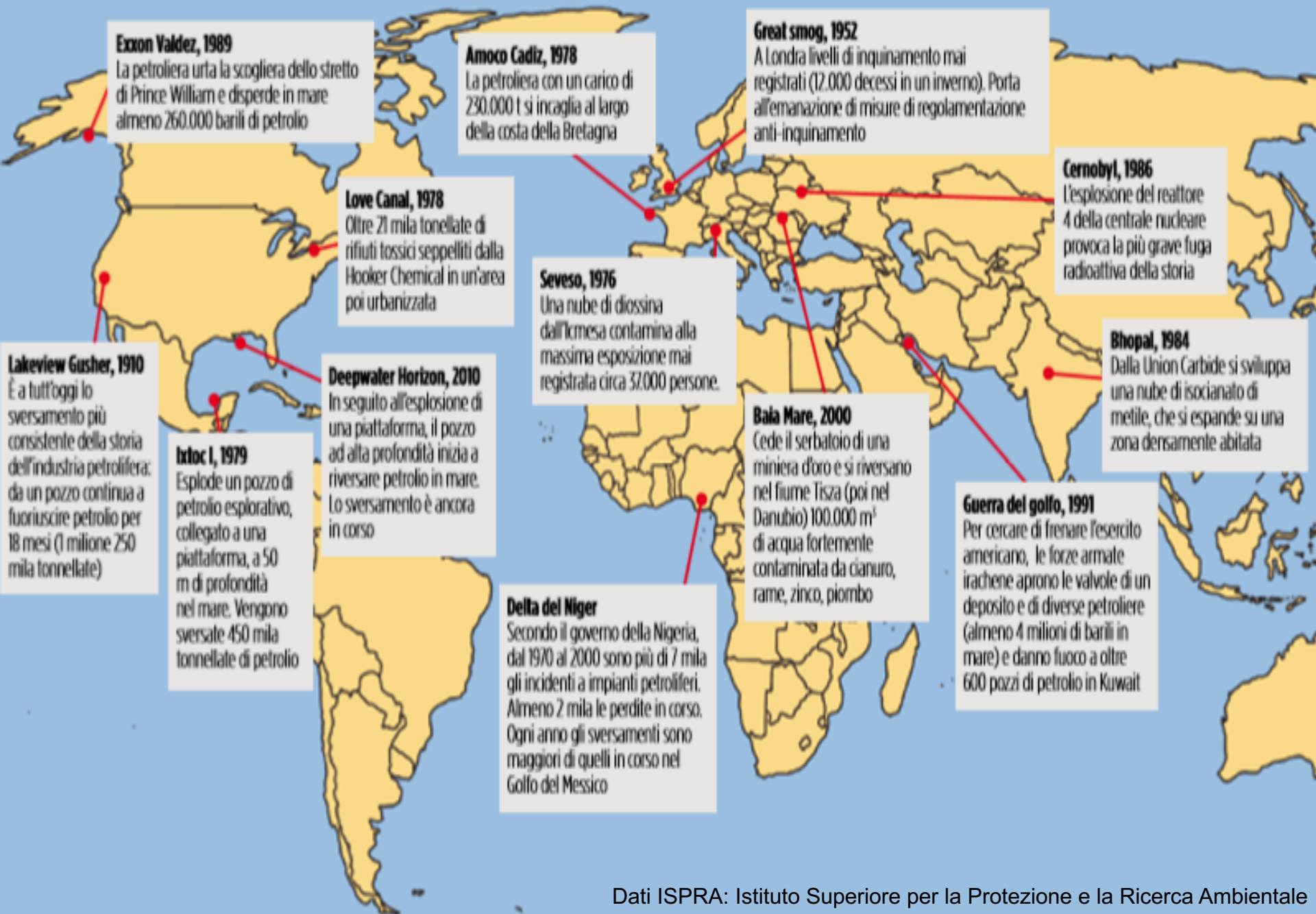
L'acido solfidrico è considerato un veleno ad ampio spettro, ossia può danneggiare diversi sistemi del corpo (simile al cianuro).

Principali effetti dell'H₂S nell'uomo



EFFETTI DELL'H₂S	CONCENTRAZIONE
Soglia dell' attivazione dell'odorato	0.05 ppm (50 ppb)
Odore offensivo	3 ppm
Soglia dei danni alla vista	50 ppm
Paralisi olfattoria	100 ppm
Edema polmonare, intossicazione acuta	300 ppm
Danni al sistema nervoso, apnea	500 ppm
Collasso, paralisi, morte immediata	1000 ppm

I peggiori disastri ambientali causati dall'uomo



Fattori che influenzano l'insorgenza del tumore

Per quanto concerne lo sviluppo di una neoplasia sono necessarie le seguenti concause:

Fattori ambientali

Stile di vita: fattori comportamentali

Predisposizione genetica

ecomalattia



Stili di vita

Alcool, virus,
farmaci



Correlazione geografica: abitudini alimentari

È stato evidenziato che le popolazioni che migrano, **adottano lo schema d'incidenza del cancro** più frequente del paese in cui si sono trasferiti.

I nigeriani che vivono in Africa hanno meno tumori del colon di quelli emigrati negli Stati Uniti.



Fattori che influenzano l'insorgenza del tumore

Per quanto concerne lo sviluppo di una neoplasia sono necessarie le seguenti concause:

Fattori ambientali

Stile di vita: fattori comportamentali

Predisposizione genetica

ecomalattia



I PRINCIPALI TUMORI EREDITARI

Tumori sempre ereditari



- Retinoblastoma (100%)
- Tumori di Wilms (100%)
- MEN1 e 2 (100%)
- Neurofibromatosi 1 e 2 (100%)
- Sindrome di Li-Fraumeni (100%)
- Sindrome di Turcot (100%)
- Sindrome di Peutz-Jeghers (100%)
- Sindrome di Muir-Torre (100%)
- Poliposi Familiare (100%)

Tumori ereditari in una parte dei casi



- Cancro del Colon (2-3%)
- Cancro della Mammella (3-5%)
- Cancro della Prostata (1-2%)
- Cancro dello Stomaco (1%)
- Melanomi (1-2%)
- Cancro del Pancreas (1-3%)

PRINCIPALI GENI COINVOLTI NEI TUMORI EREDITARI

- BRCA1 e 2** → cancro ereditario della Mammella (e dell'ovaio);
- MSH2, MLH1, MSH6, PMS2** → Sindrome di Lynch o cancro coloretale ereditario;
- APC, MUTYH** → Poliposi Familiare classica ed attenuata;
- STK/LKB** → Sindrome di Peutz-Jeghers;
- p53** → Sindrome di Li-Fraumeni;
- CDK4, CDKM2A** → Melanoma ereditario; Sindrome nevo displastico
- Kit** → Tumori stromali gastrointestinali;
- Ret** → Tumori midollari della tiroide, MEN;

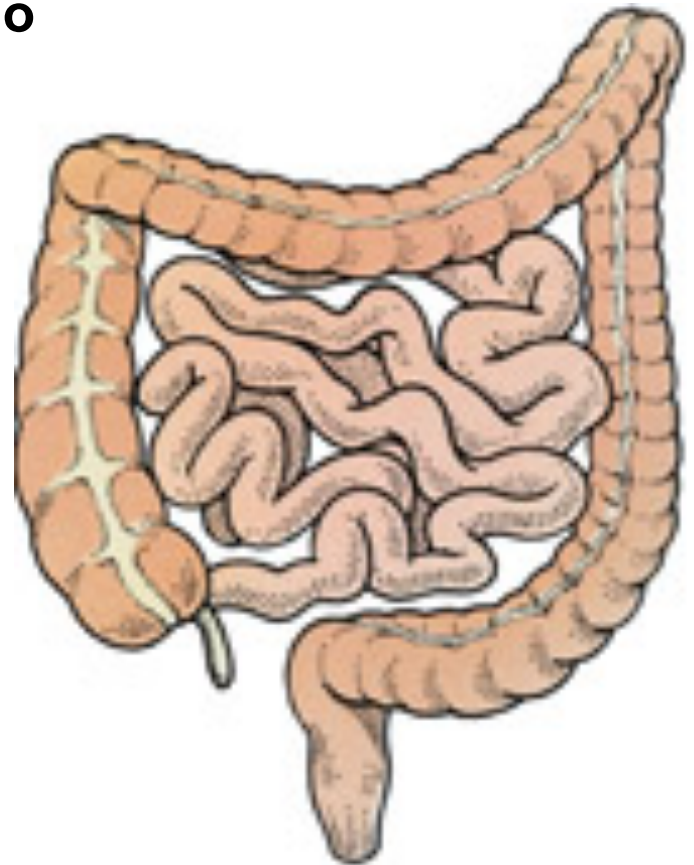
Il Cancro è una Malattia...

- dei **geni** - le lesioni di particolari geni (proto-oncogeni e geni oncosoppressori) sono causa del cancro;
- della **cellula** - il tumore si sviluppa da una singola cellula che inizia a proliferare fuori controllo (processo microevolutivo clonale);
- dei **tessuti** - il tumore si sviluppa attraverso vari stadi (progressione neoplastica) che sovvertono gradualmente l'organizzazione del tessuto. La malignità coincide con l'invasività e la metastasi.

Cancerogenesi: multifasica

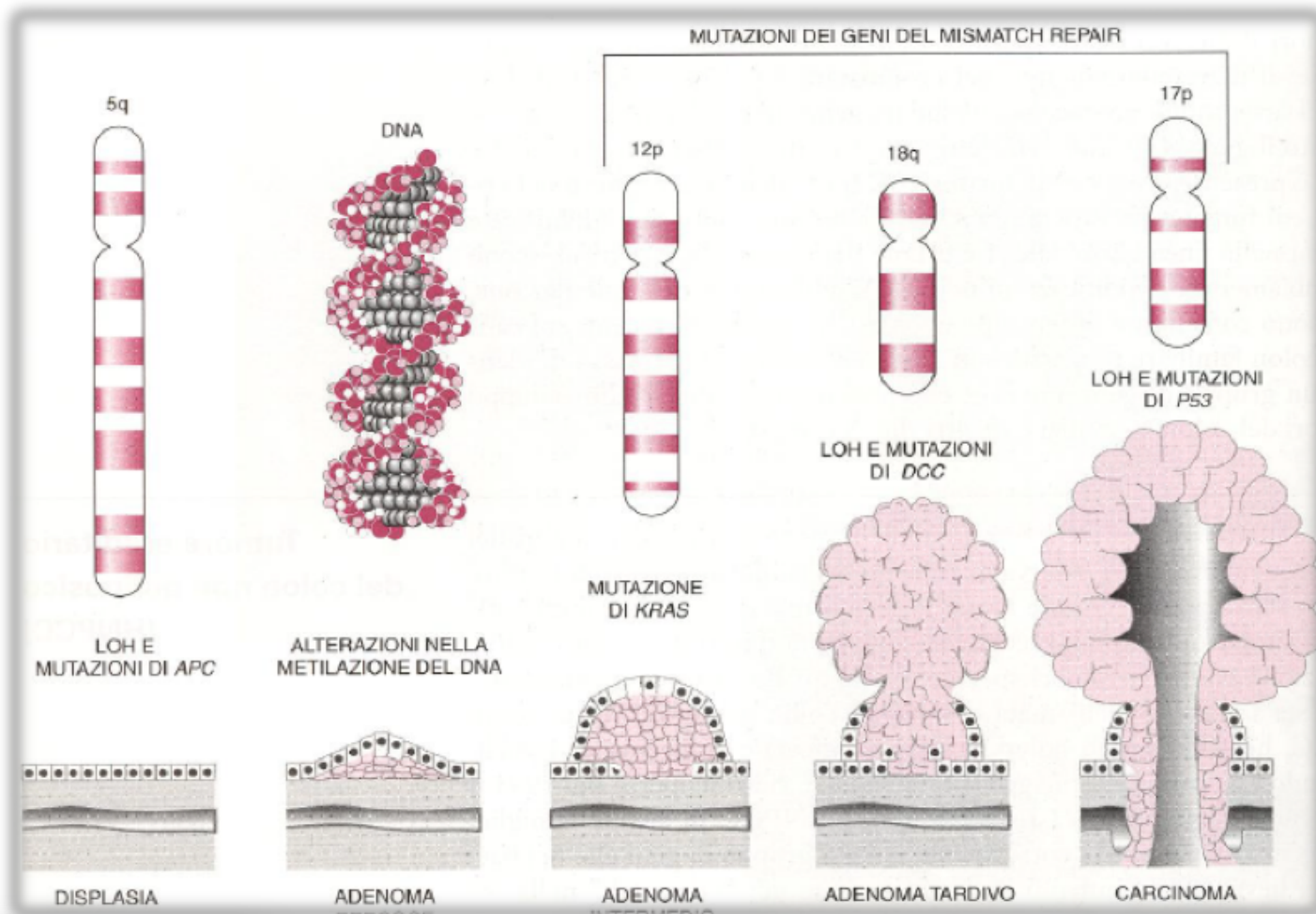
La progressione neoplastica consiste in una serie successiva di alterazioni genetiche che si accumulano

Il cancro del colon retto costituisce il modello meglio conosciuto di cancerogenesi multifasica.



**geni mutatori
MSH2, MLH1, ecc.**

Le mutazioni in MSH2, MLH1 ed altri geni mutatori non giocano un ruolo diretto ma aumentando il tasso di mutazione complessivo, rendono più probabile il verificarsi di ciascuna transizione



perdita o mutazione del gene TS APC (5q)

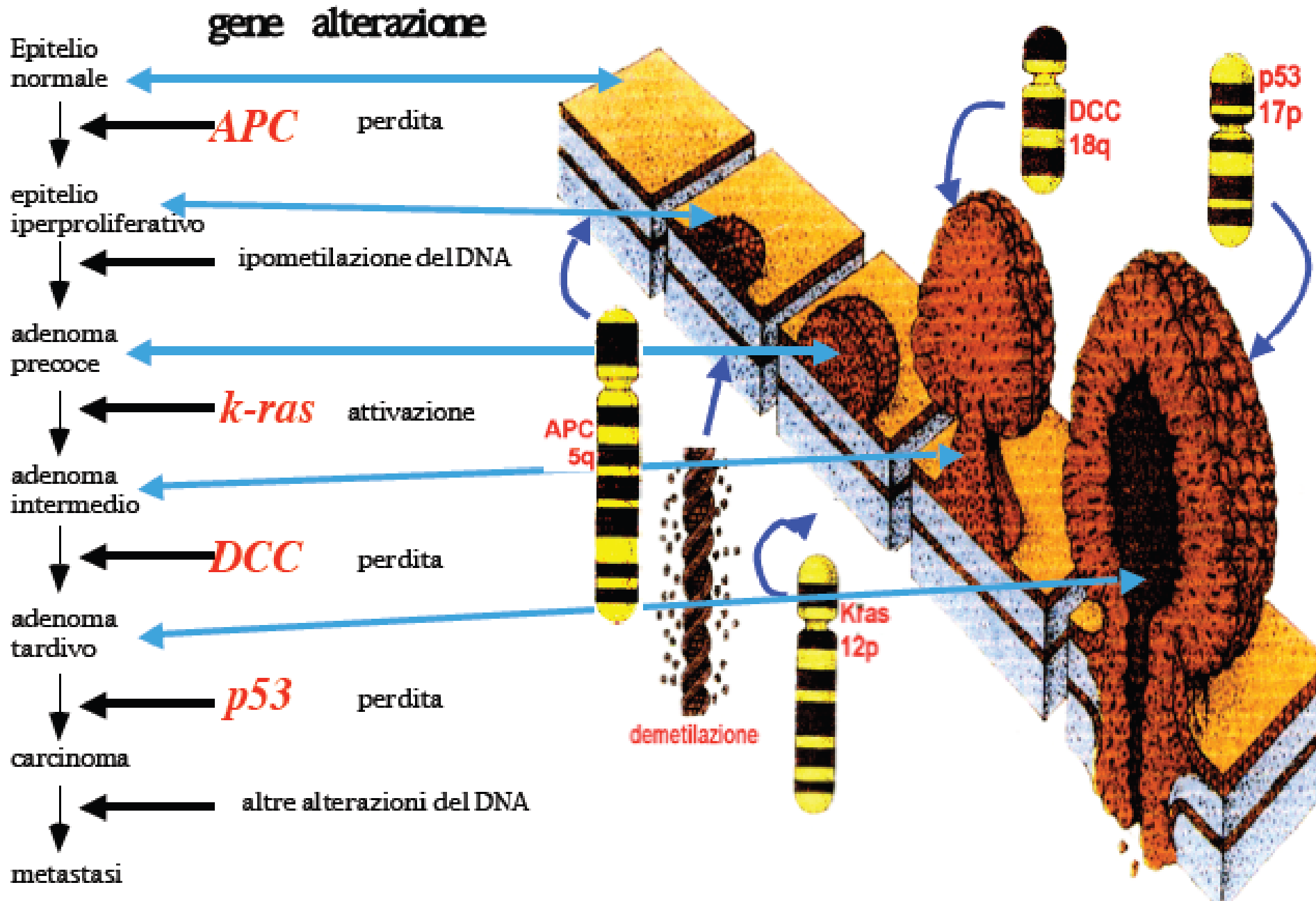
ipometilazione del DNA

attivazione dell'oncogene KRAS (12p)

perdita o mutazione del gene TS DCC (18q)

perdita o mutazione del gene TS TP53 (17p)

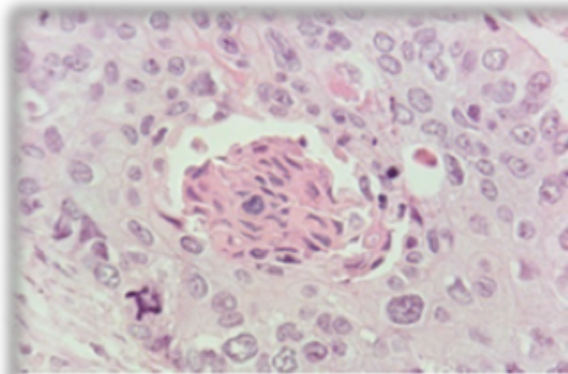
Modello genetico della tumorigenesi del colon



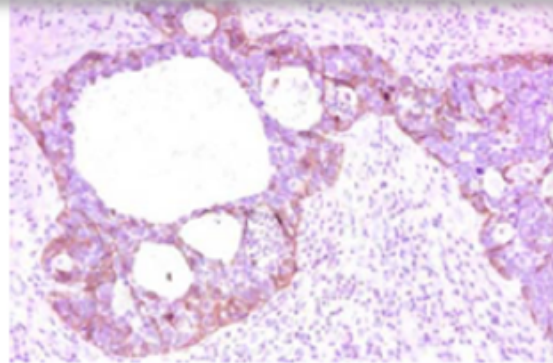
La diagnosi di cancro

Richiede:

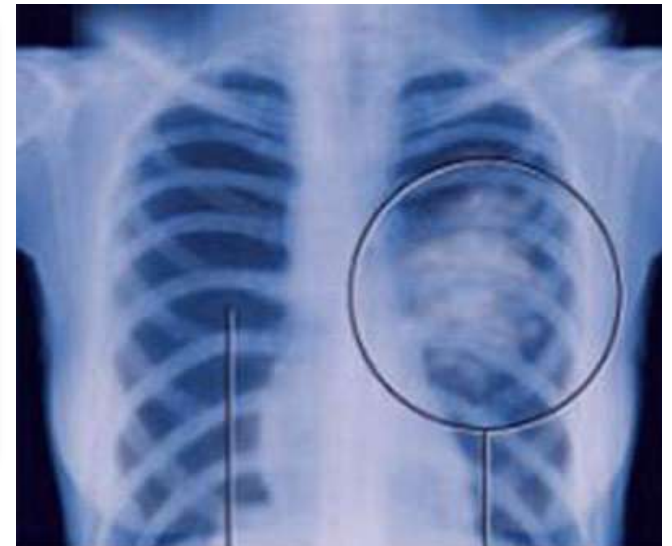
- **Esami ematici.**
- **Biopsia tissutale:** rappresenta il gold standard.
- **Esami strumentali,** quali TAC, RMN, PET, mammografia, ecc. Per la stadiazione del tumore.



*Istologia di carcinoma
a cellule squamose*



*Variante basaloide di carcinoma
a cellule squamose*

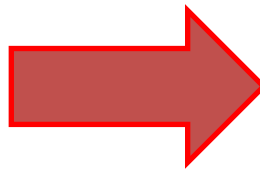


Polmone normale

Tumore polmonare

La diagnosi di cancro

La strategia terapeutica



Controllo della risposta terapeutica

Diagnostica per immagini



ed alla caratterizzazione istomolecolare del tessuto neoplastico

La strategia terapeutica contro il cancro, e il controllo della risposta terapeutica, sono convenzionalmente decisi attraverso un approccio analitico che associa la diagnostica per immagini alla caratterizzazione patologica della biopsia del tessuto.

BIOPSIA TISSUTALE

La biopsia tissutale è l'unica metodica che consente di effettuare la diagnosi istologica di tumore.

Il materiale ottenuto con le biopsie, più spesso dal tumore primitivo e meno frequentemente da una metastasi a distanza, viene utilizzato anche per la **caratterizzazione molecolare del tumore**, che tuttavia è espressione di un singolo momento “biologico” della malattia, precedente all'inizio del trattamento.

In virtù dell'eterogeneità tumorale, il materiale ottenuto al tempo zero potrebbe non fornire una reale rappresentazione del profilo molecolare della malattia.

BIOPSIA TISSUTALE

Il campione bioptico può a volte risultare inadeguato dal punto di vista qualitativo e/o quantitativo per l'analisi molecolare.

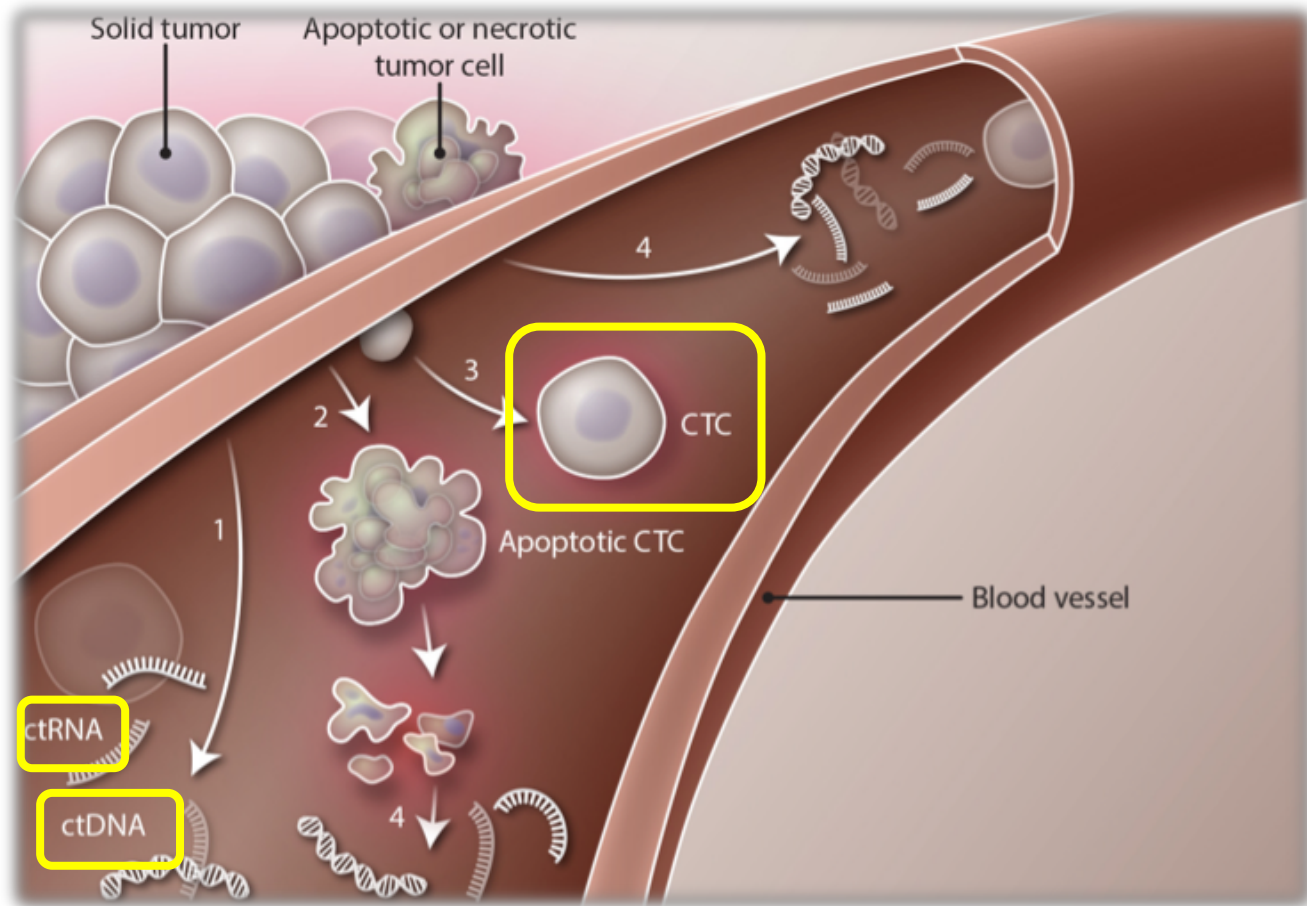
In questi casi, è richiesta la ripetizione della biopsia che può tuttavia presentare problematiche legate alla:

- ***difficoltà di raggiungere la sede tumorale.***
- ***al dolore procedurale.***
- ***al tempo necessario all'ottenimento dei risultati.***
- ***alla percentuale di falsi negativi.***
- ***ai costi e al rischio di complicanze legate alla metodica.***

BIOPSIA LIQUIDA

Man mano che il tumore si accresce una parte delle sue cellule muore versando le proprie particelle nel circolo sanguigno.

- **Cellula Tumorale Circolante (CTC).**
- **DNA tumorale circolante (ctDNA).**
- **RNA tumorale circolante (ctRNA).**



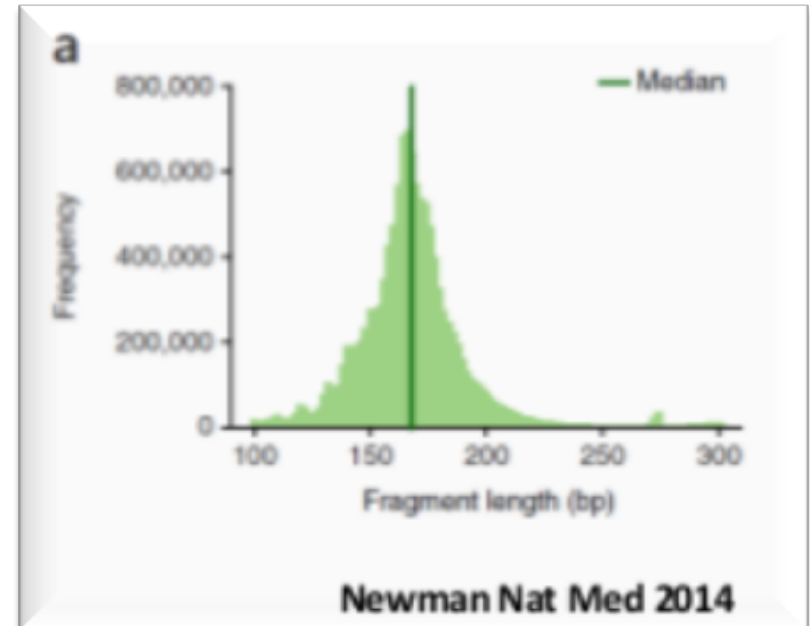
DNA tumorale circolante (ctDNA)

Il **profilo molecolare** del tumore può essere studiato analizzando il ctDNA rilevabile nella maggior parte dei tumori.

Il ctDNA può essere distinto dal cfDNA in quanto esso possiede le **stesse aberrazioni genetiche ed epigenetiche tumore-specifiche**.

Il ctDNA presente in circolo sanguigno sono formati da frammenti di DNA da 180bp a 200 bp derivati da processi apoptotici e necrotici delle cellule tumorali.

Correlazione tra i livelli di ctDNA e stadio della malattia: **valore medio per tumori in stadio avanzato 17 ng di ctDNA/ml di plasma.**

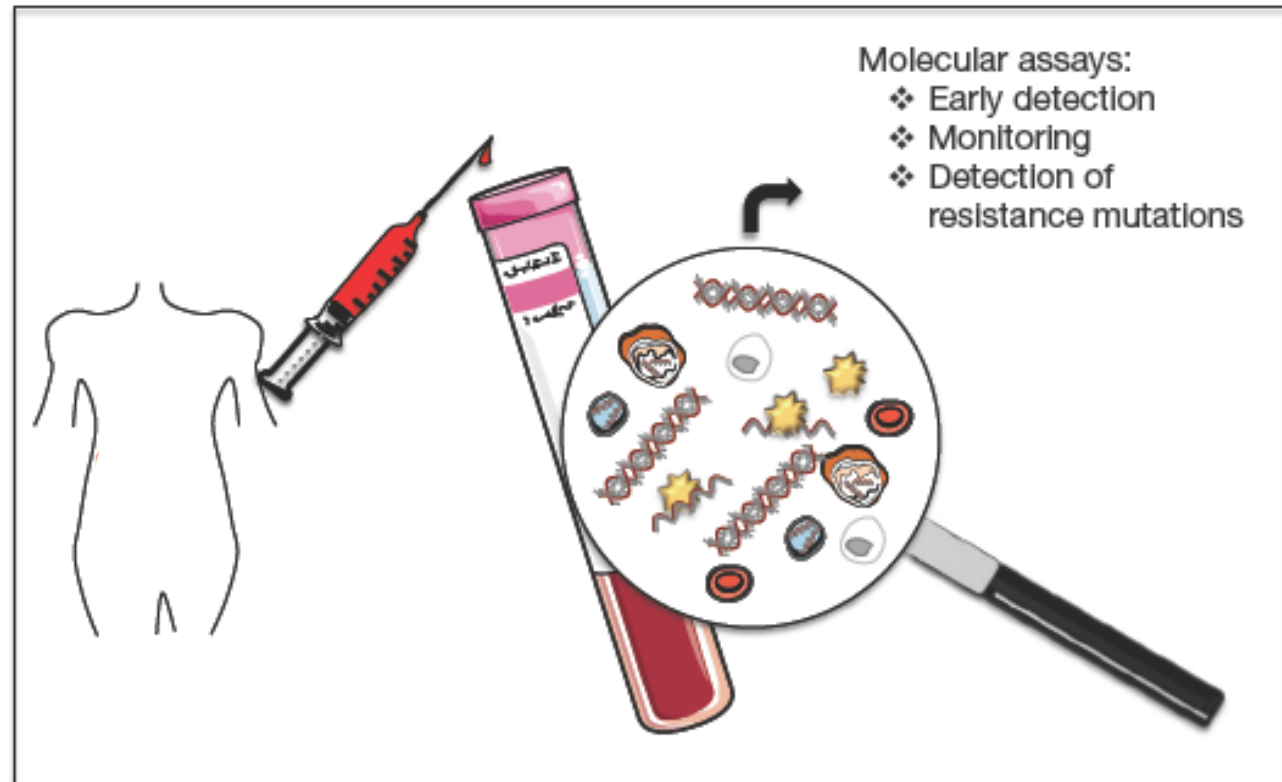


BIOPSIA LIQUIDA

Oggi viene considerata come una metodica a **integrazione** delle tecniche biotiche tradizionali.

È un metodo diagnostico a ridotta invasività che consente di eseguire in tempi rapidi diverse indagini molecolari.

-  DNA circolante
-  Piastrine
-  Globuli Bianchi
-  Globuli Rossi
-  RNA circolante
-  RNA circolante
-  Microvescicole (esosomi)



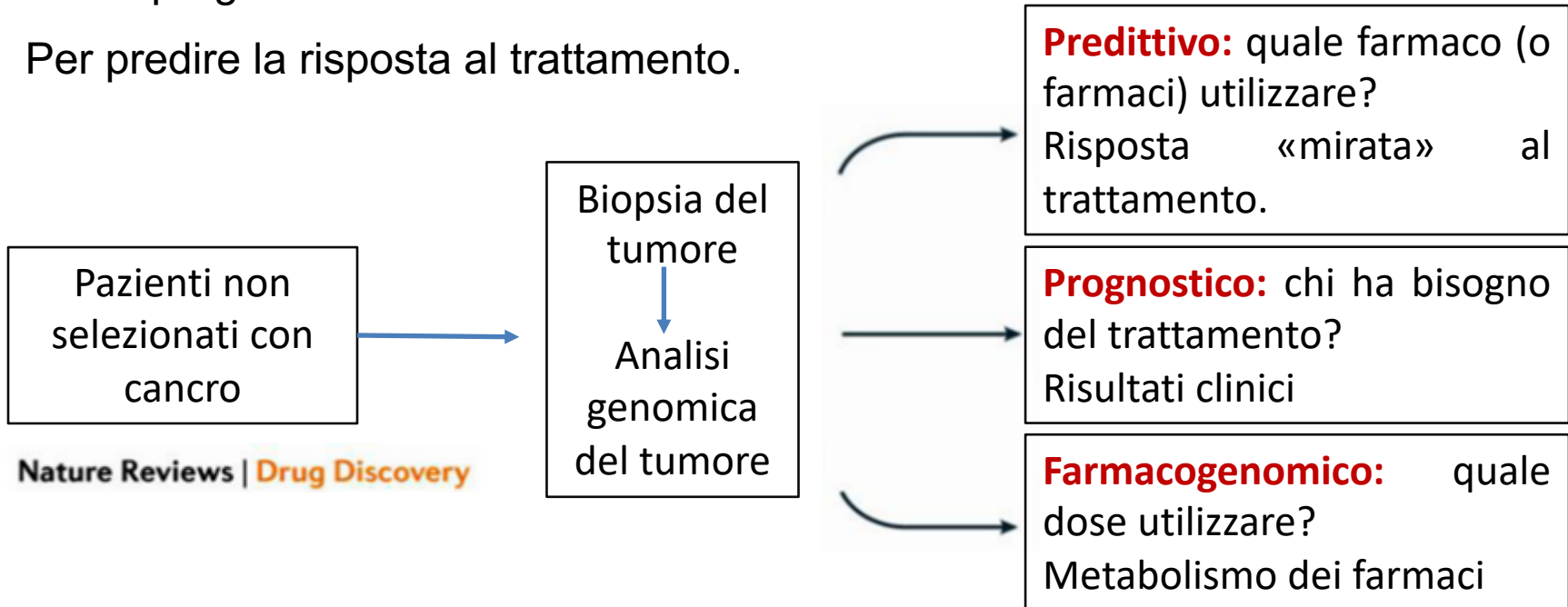
Vantaggi della Biopsia liquida vs la Biopsia tissutale

Biopsia tissutale	Biopsia liquida
<ul style="list-style-type: none">• Invasiva e costosa	<ul style="list-style-type: none">• Non invasiva con buon rapporto costo/beneficio
<ul style="list-style-type: none">• Fortemente influenzata dalla sede del tumore: specifica quando il sito del tumore è localizzato	<ul style="list-style-type: none">• Indipendente dalla sede del tumore
<ul style="list-style-type: none">• Valutazione limitata dall'eterogeneità	<ul style="list-style-type: none">• Rileva anche l'eterogeneità
<ul style="list-style-type: none">• Prelievo bioptico talvolta difficile	<ul style="list-style-type: none">• Prelievo ematico semplice e sempre accessibile
<ul style="list-style-type: none">• Non utilizzabile se il tumore primario è stato rimosso	<ul style="list-style-type: none">• Accessibile in assenza di tumore primario percepibile o metastasi
<ul style="list-style-type: none">• Non applicabile come <i>follow-up</i> dopo la chirurgia	<ul style="list-style-type: none">• Applicabile come <i>follow-up</i> dopo la chirurgia per monitoraggio dinamico di eventuale malattia residua
<ul style="list-style-type: none">• La ripetizione del prelievo bioptico non è ben tollerata	<ul style="list-style-type: none">• La ripetizione del prelievo di sangue è tollerata
	<ul style="list-style-type: none">• Monitoraggio dinamico della risposta alle terapie
	<ul style="list-style-type: none">• Monitoraggio dinamico dello sviluppo di resistenza
	<ul style="list-style-type: none">• Utile strumento per la diagnosi precoce della ripresa della malattia

Determinazione del profilo molecolare dei tumori

La caratterizzazione molecolare del tumore è utile:

- Per classificare il tumore.
- Nella diagnosi differenziale.
- Per la prognosi.
- Per predire la risposta al trattamento.



Prelievo e preparazione del plasma



- 2 campioni di sangue, da 5 ml ciascuno BD VACUTAINER® PPT™ K2Edta 9.0 mg a TA

Invertire delicatamente per almeno 15 volte

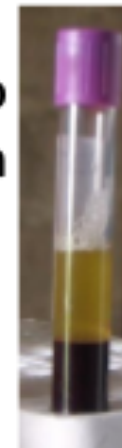
- Centrifugazione 15 minuti a 1.100 RCF entro max 30 min dal prelievo

Trasferire del plasma in un singolo tubo falcon da 15 ml

- Seconda centrifugazione 10 minuti a 1.500 RCF senza freno

- Recuperare il plasma e scartare il pellet piccolo sul fondo della provetta. Aliquotare il plasma in volumi di 2000 µl in eppendorf da congelamento

- Congelamento a -80 °C



Estrazione del DNA dal plasma: kit QIAamp Circulating Nucleic Acid e QIAvac 24 Plus

▪ La procedura dell'estrazione del DNA circolante viene effettuata utilizzando le colonne QIAamp Mini con silice, un collettore ed una pompa che genera il vuoto

▪ 24 campioni in meno di 2 ore

▪ 2 ml di plasma per ciascun campione (fino a 5 ml)

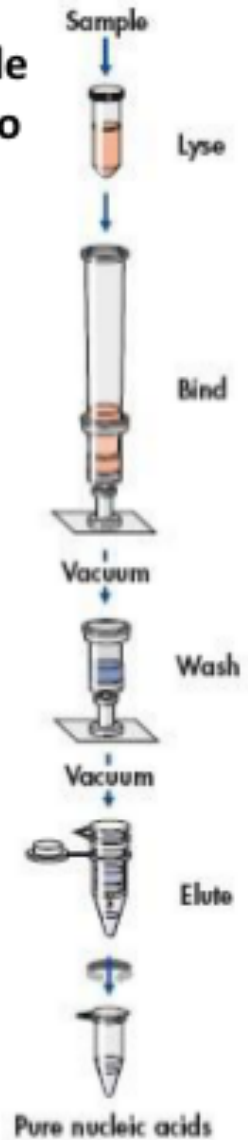
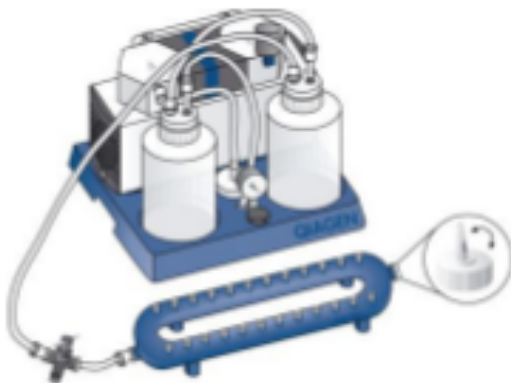
▪ Comprende 4 fasi

Lisi

Legame

Lavaggio

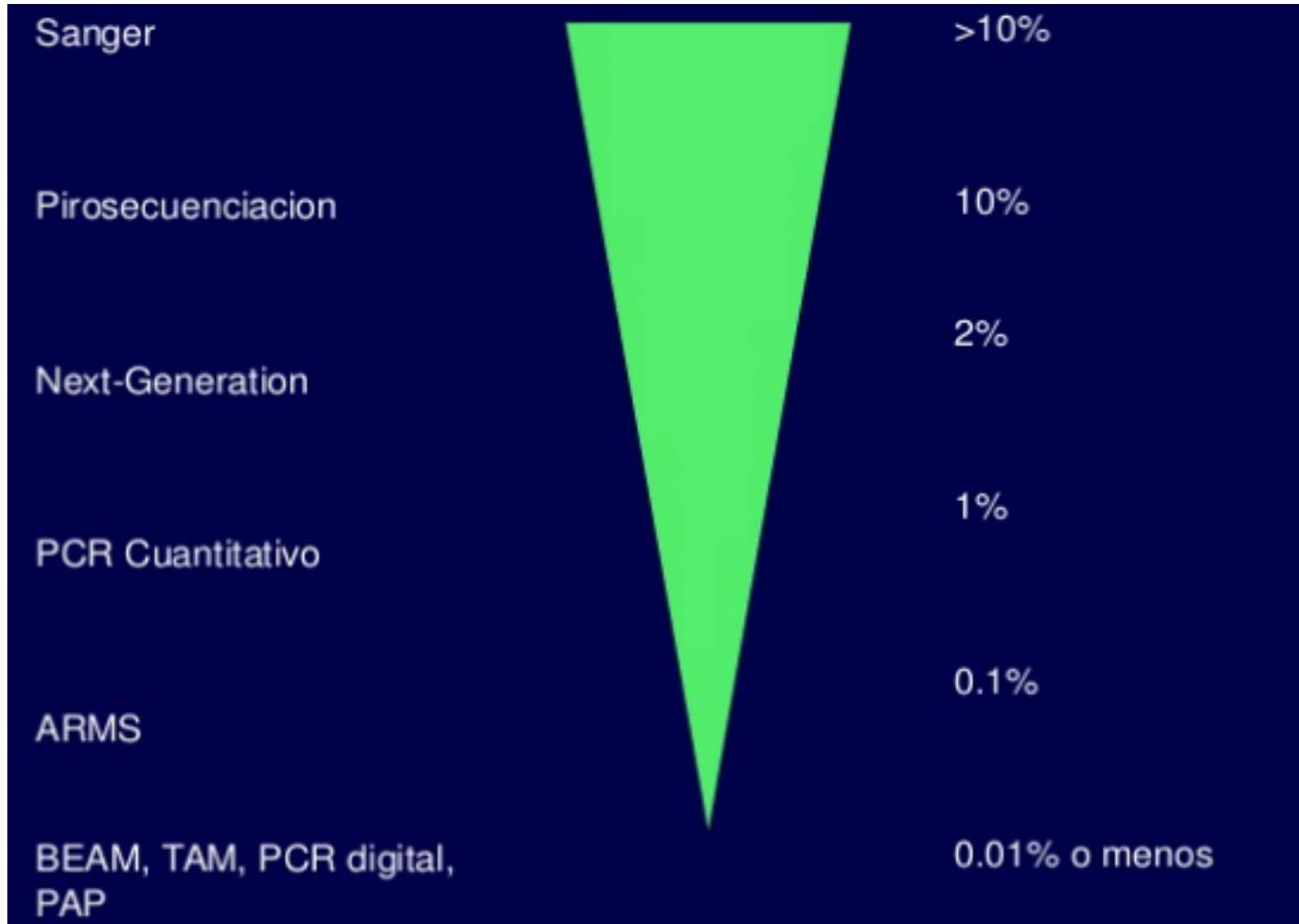
Eluizione 20 ul- 150 ul



Rilevazione del ctDNA nel sangue necessita di tecnologie ad elevata sensibilità

METODICA

PERCENTUALE



Prima della NGS



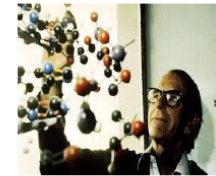
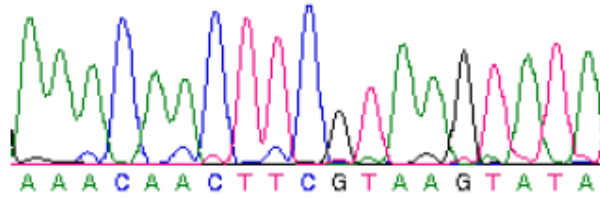
1 capillary



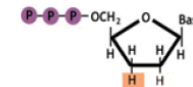
16 capillaries



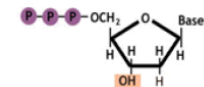
96 capillaries



Chain Termination Method [Frederick Sanger](#) - 1975

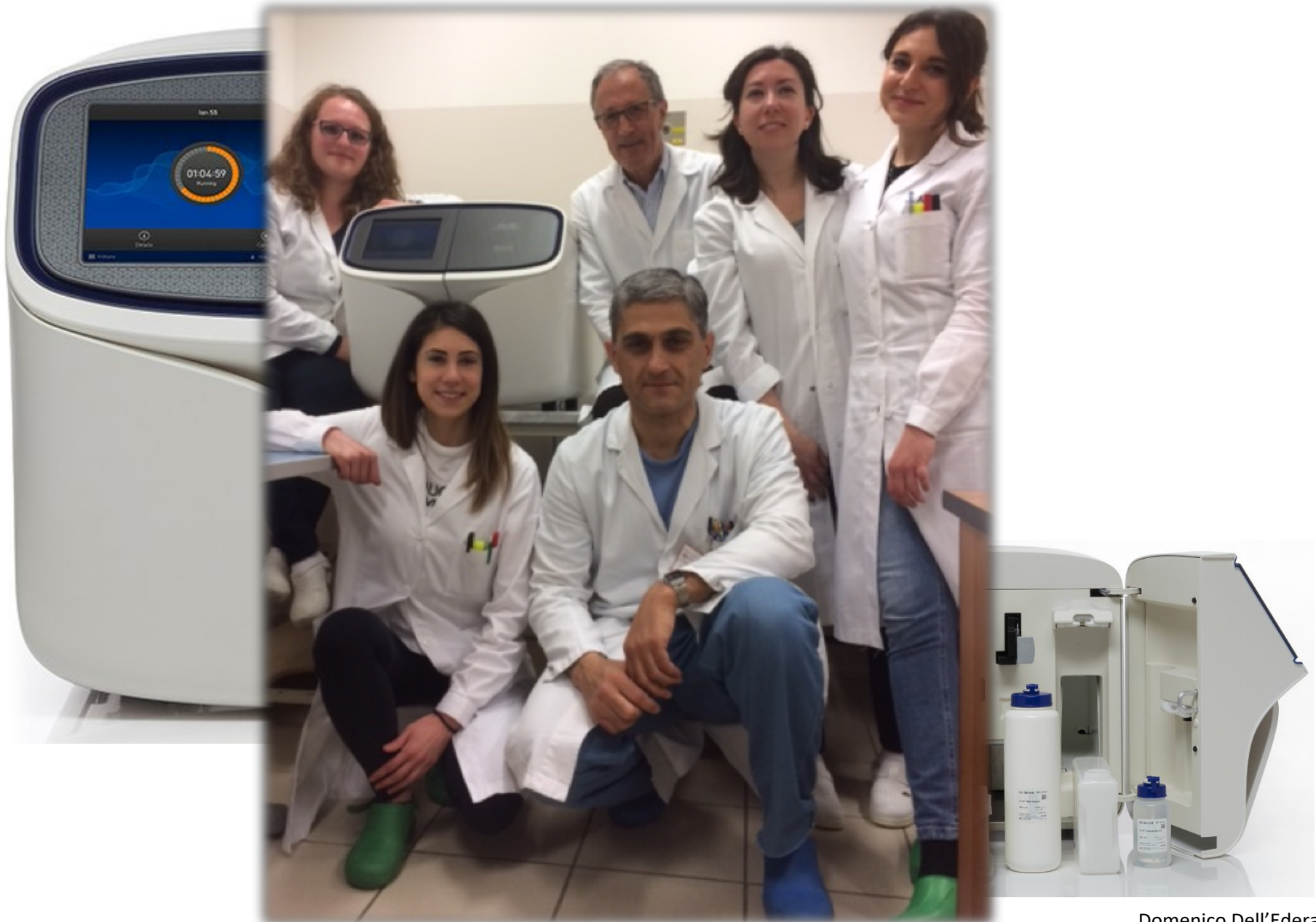


dideoxynucleotide (ddNTP)



deoxynucleotide (dNTP)

Next generation sequencing (NGS) : sequenziatore massivo parallelo

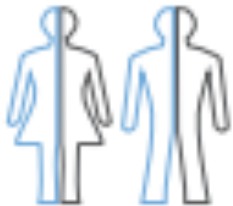




Più geni/pazienti in un singolo esperimento.

Sequenziamento di centinaia di Mb (milioni di bp) in un'unica seduta analitica.

Diagnosi: incremento delle potenzialità dei test genetici nella identificazione della causa molecolare della patologia.



Stato del portatore

—



Ricerca genetica preimpianto

—



Rilevazione delle aneuploidie

—



Anomalie neonatali

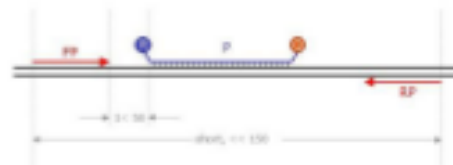
—



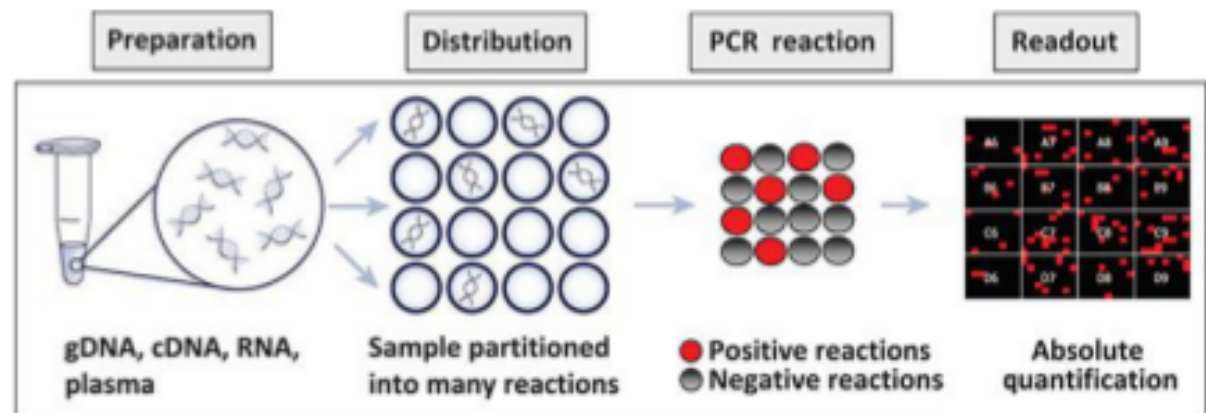
Ricerca sulla malattia ereditaria

Digital PCR QuantStudio™ 3D Digital PCR System

- Quantificazione assoluta PCR End-point
- Quantità minima di DNA (2ng)
- Fino a 24 campioni per seduta analitica
- Sensibilità 0.01%
- Sonde Taqman

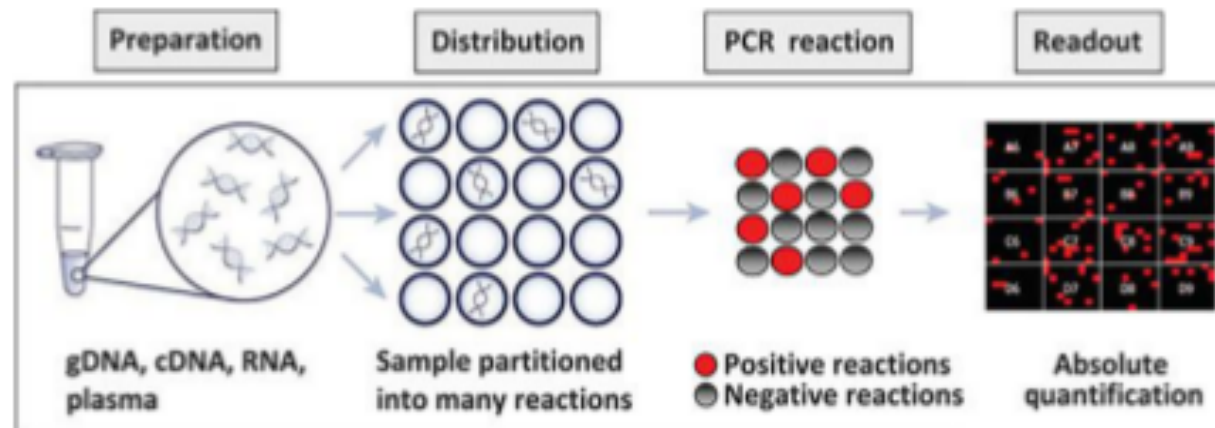


QuantStudio™ 3D Adapter Kit For GeneAmp® PCR System 9700



Digital PCR

- Digital PCR funziona per partizionamento di un campione di DNA o cDNA (1-2 molecole) in singoli pozzetti di dimensione nell'ordine dei micrometri (20.000 pozzetti)
- In ogni cella/pozzetto viene fatta avvenire la reazione di PCR con sonde taqman fluorescenti e solo alla fine della reazione si va a misurare la fluorescenza ottenuta (PCR end-point)
- L'utilizzo di un chip nanofluidico fornisce un meccanismo comodo e semplice per eseguire migliaia di reazioni PCR in parallelo
- Ogni pozzetto è analizzato singolarmente per rilevare la presenza (positivo) o assenza (negativo) di un segnale di fluorescenza endpoint. Quando nessuna sequenza bersaglio è presente, nessun segnale si accumula.
- i risultati vengono sottoposti ad un calcolo di distribuzione statistica (distribuzione di Poisson), la frazione di reazioni negative viene utilizzato per generare il conteggio assoluto del numero di molecole bersaglio nel campione, senza la necessità di controlli endogeni, si risale al numero di molecole di DNA target espresso in copie/uL



Utilizzo dei miRNA nella diagnosi precoce di tumore ovarico

Il tumore dell'ovaio è ancora oggi difficile da identificare precocemente.

Grazie all'analisi del DNA è oggi possibile individuare le donne che presentano un rischio aumentato: tramite la ricerca delle mutazioni nei **geni BRCA**.

Una ricerca italiana da poco pubblicata su ***Cancer Letter*** ha individuato in alcuni **microRNA** la possibile spia della presenza del tumore. Un'arma in più per arrivare ad una **diagnosi precoce**.

Utilizzo dei miRNA nella diagnosi precoce di tumore ovarico

MiROvar (Predict the risk of Ovarian Cancer)

Il sistema si basa sull'analisi di 35 miRNA, ed è stato messo alla prova in tre diverse coorti di pazienti (263, 452 e 263 campioni).

Il risultato, pubblicato su Lancet Oncology, è stato una chiara conferma: il miROvar permette di distinguere le donne in due popolazioni: **alto rischio** e **basso rischio** di sviluppare un carcinoma ovarico e di predire il rischio di recidive e progressione.

Occorreranno ulteriori studi, ma tutto lascia sperare che questo test giunga presto in clinica, per anticipare le mosse di un tumore che, nelle sue fasi avanzate, è ancora sfuggente alle terapie, e non di rado scoperto quando è in fase già avanzata.

[Circulating tumour DNA: Current detection methods, use in radiotherapy and future development].

[Article in French]

[Castelli J](#)¹, [Cabel L](#)², [Bidard FC](#)², [Duvergé L](#)³, [Bachet JB](#)⁴.

⊕ Author information

Abstract

Recent technological developments enable the detection and quantification of circulating tumour DNA in the blood, with potentially major clinical implications, particularly for cancers treated with curative intent. Circulating tumour DNA has a potential impact before, during and after treatment. If limitations of this approach remain, requiring further development, it is important to know the principles and applications in view of the potential impact on the clinical practice. In this review, we will discuss the current detection methods, then the place of circulating tumour DNA in oncology and more particularly in radiotherapy.

[The liquid biopsies: What is their contribution to the management of cancer?]

[Article in French]

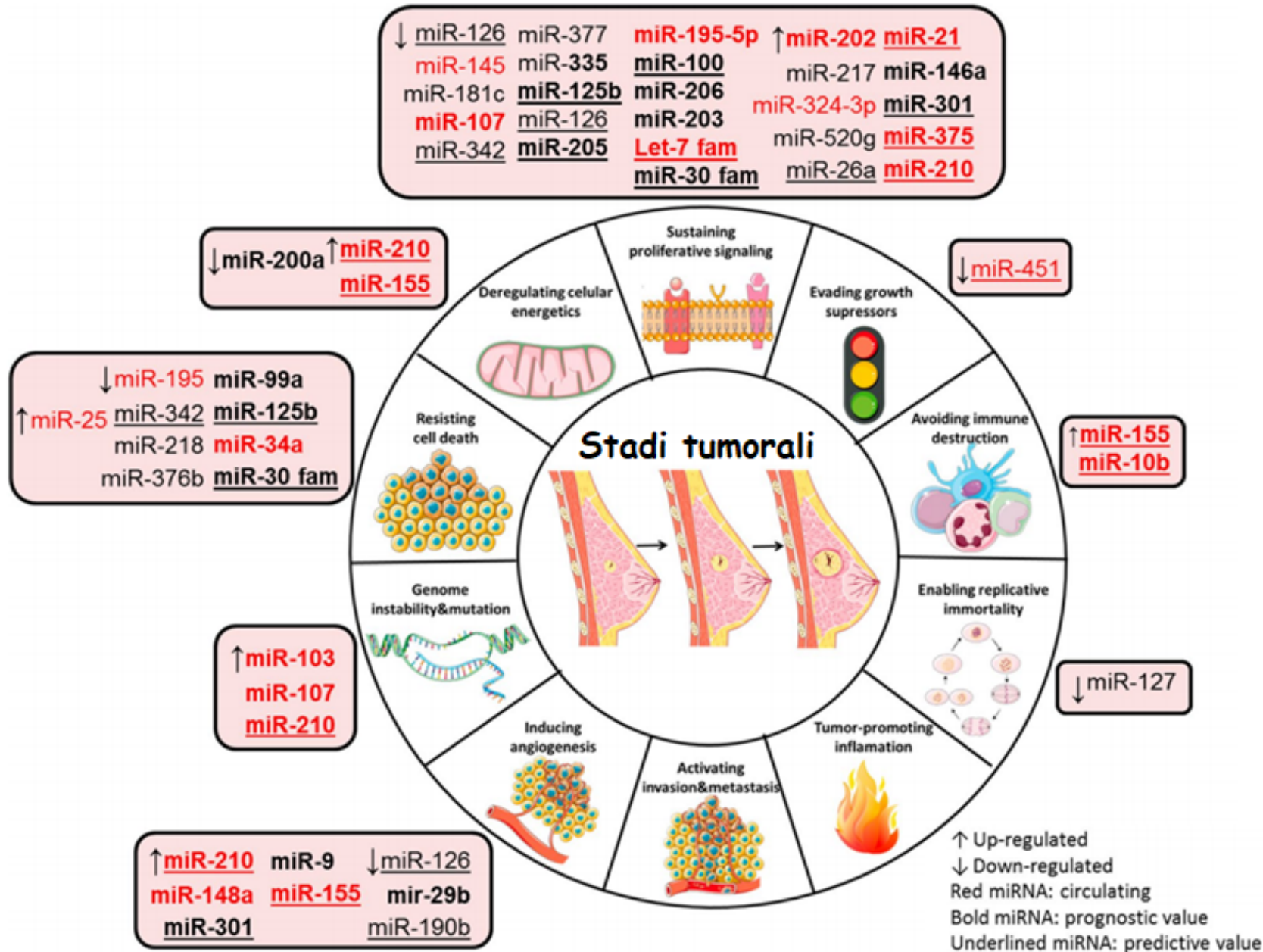
[Wechsler J](#)¹.

⊕ Author information

Abstract

The « liquid biopsies » are samples of liquids such as blood, urine, spinal fluid that can contain tumor material. Clinical assays have been mainly focused on the peripheral blood containing circulating tumor cells and circulating tumor DNA. The circulating tumor cells are cancer cells released from the primary tumor or recurrences or metastases. They enter into the bloodstream after passing through the vessel wall. It is possible to analyze the circulating tumor cells by means of all cytologic and biomolecular techniques. The free circulating tumor DNA is made of fragments of DNA released by living or necrotic tumor cells proceeded from any place of the organism. The free circulating tumor DNA and DNA from circulating tumor cells show structural rearrangements among which some are therapeutic targets. Many studies showed that circulating tumor cells and circulating tumor DNA analyses are useful in revealing recurrences and tracking therapeutic targets.

MicroRNA e Tumore della mammella



RNA non-coding: NUOVO BERSAGLIO TERAPEUTICO

Amorim et al. *J Transl Med* (2016) 14:265
DOI 10.1186/s12967-016-1025-3

Journal of
Translational Medicine

REVIEW

Open Access



Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers

Maria Amorim^{1,2}, Sofia Salta^{1,2}, Rui Henrique^{1,3,4} and Carmen Jerónimo^{1,4*} 

Abstract

Although important advances in the management of breast cancer (BC) have been recently accomplished, it still constitutes the leading cause of cancer death in women worldwide. BC is a heterogeneous and complex disease, making clinical prediction of outcome a very challenging task. In recent years, gene expression profiling emerged as a tool to assist in clinical decision, enabling the identification of genetic signatures that better predict prognosis and response to therapy. Nevertheless, translation to routine practice has been limited by economical and technical reasons and, thus, novel biomarkers, especially those requiring non-invasive or minimally invasive collection procedures, while retaining high sensitivity and specificity might represent a significant development in this field. An increasing amount of evidence demonstrates that non-coding RNAs (ncRNAs), particularly microRNAs (miRNAs) and long noncoding RNAs (lncRNAs), are aberrantly expressed in several cancers, including BC. miRNAs are of particular interest as new, easily accessible, cost-effective and non-invasive tools for precise management of BC patients because they circulate in bodily fluids (e.g., serum and plasma) in a very stable manner, enabling BC assessment and monitoring through liquid biopsies. This review focus on how ncRNAs have the potential to answer present clinical needs in the personalized management of patients with BC and comprehensively describes the state of the art on the role of ncRNAs in the diagnosis, prognosis and prediction of response to therapy in BC.

Keywords: Biomarkers, microRNA, Long noncoding RNA, Diagnostic, Prognostic

UTILITÀ CLINICHE BIOPSIA LIQUIDA (I)

- Identificazione del profilo genetico del tumore a scopo diagnostico e prognostico.
- Caratterizzazione delle metastasi.
- Monitoraggio della carica tumorale e **valutazione della Malattia Minima Residua (MMR)** in pazienti che mostrano di aver conseguito una risposta terapeutica completa.

UTILITÀ CLINICHE (II)

Valutazione della risposta terapeutica del paziente

Prelievi di sangue ad intervalli più frequenti **consentono di monitorare la resistenza al trattamento** e di decidere tempestivamente di modificare l'iter terapeutico o accelerare la calendarizzazione degli esami di diagnostica per immagini (PET o TAC).

LIMITI

- La maggior parte dei Tumori Solidi rilascia DNA nel plasma ma la quantità varia nei diversi pazienti.
- Allo stadio iniziale alcuni pazienti potrebbero non avere una quantità sufficiente di cfDNA per consentire un'analisi accurata.
- In alcuni casi il cfDNA di origine tumorale rappresenta meno dell'1% del DNA libero circolante.

Quali sono le attuali applicazioni della biopsia liquida?

Attualmente la biopsia liquida è utilizzata per l'analisi del gene EGFR nel ctDNA in caso di **tumore polmonare non a piccole cellule con metastasi a distanza**, quando il materiale proveniente dalla biopsia tradizionale non sia sufficiente per effettuare tale esame.



Quali sono le attuali applicazioni della biopsia liquida?

È importante avere informazioni relative al gene dell'EGFR sia prima dell'inizio della terapia antitumorale che durante il trattamento.

Se alla diagnosi sono presenti specifiche mutazioni a carico di questo gene, il trattamento più efficace è rappresentato da farmaci inibitori di EGFR e non dalla chemioterapia tradizionale.

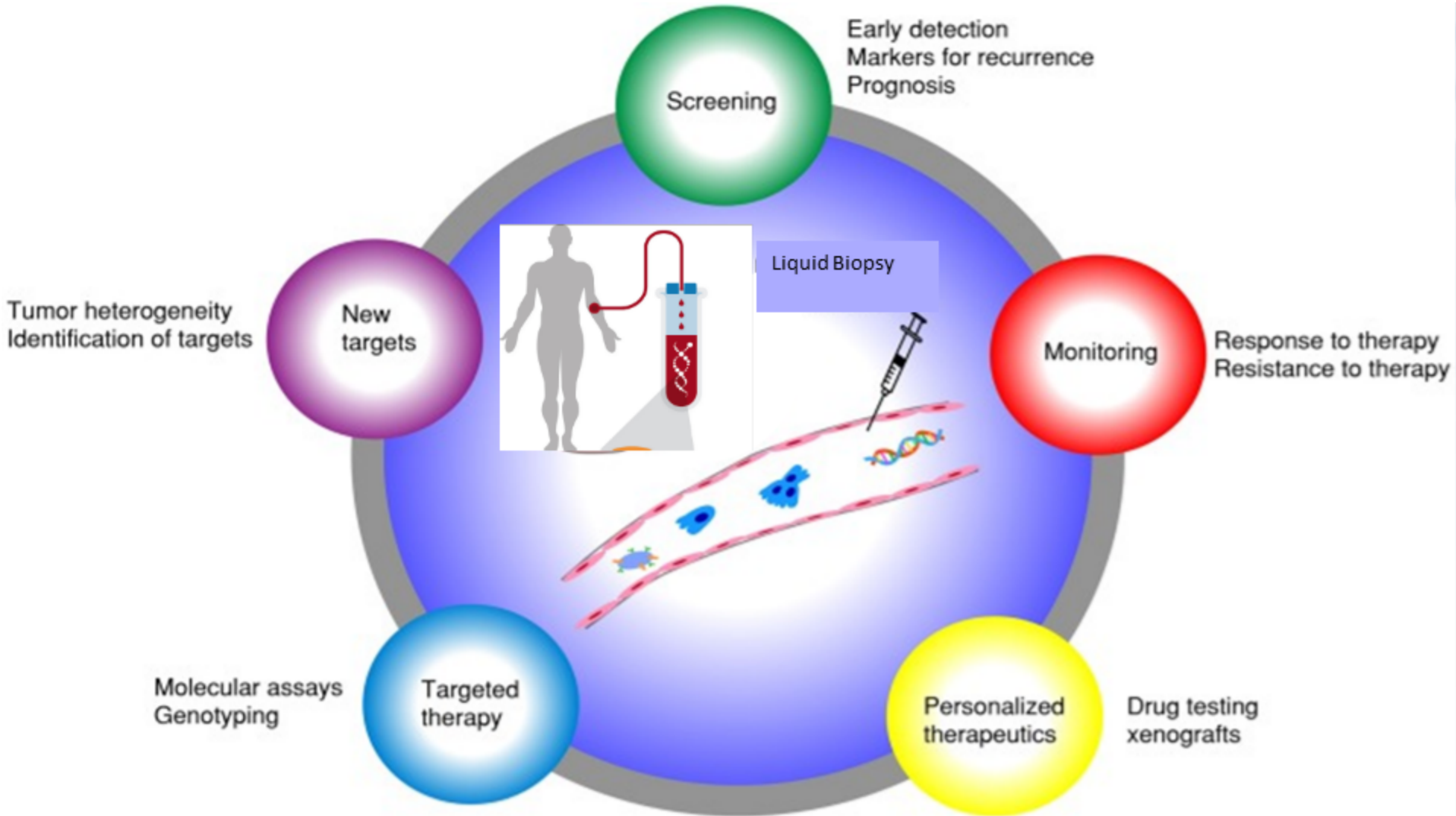
Inoltre, nel corso del trattamento con i farmaci inibitori di EGFR, il tumore può diventare resistente alla terapia ed in circa il 50% dei casi la resistenza è dovuta all'emergenza di una ulteriore mutazione del gene EGFR, **nota come mutazione di resistenza T790M**. Oggi esistono dei farmaci denominati inibitori di EGFR di nuova generazione che sono efficaci anche contro tumori che abbiano sviluppato questa mutazione.



Prospettive future

Sebbene le attuali applicazioni della biopsia liquida siano limitate alle neoplasie polmonari, è probabile che grazie alla ricerca in tale ambito il ruolo della biopsia liquida possa essere esteso in un prossimo futuro alla scelta del trattamento ed al monitoraggio della terapia in altri tumori (colon, mammella, ovaio, melanoma).

CONCLUSIONI





**KEEP
CALM
AND**

**SEE YOUR
LIQUID BIOPSY**