

BIOPSIA LIQUIDA PER LO SCREENING DI DNA TUMORALE CIRCOLANTE (MUTAZIONI HOTSPOT) IN CAMPIONI DI SANGUE PERIFERICO

Il tumore e le mutazioni somatiche.

I tumori sono patologie dovute ad alterazioni genetiche in cui la componente cellulare non risponde correttamente ai fattori che normalmente ne controllano la proliferazione. Una singola alterazione genetica non è in genere sufficiente a provocare il cancro. Infatti, i tumori sono processi multifasici: la progressione neoplastica consiste in una serie successiva di alterazioni genetiche che si accumulano.

La maggior parte dei **tumori** è correlata in letteratura alla presenza di mutazioni geniche somatiche^{1,2}. Tali **mutazioni somatiche** si sviluppano in modo spontaneo potenzialmente in qualsiasi tipo di cellula. Queste alterazioni del DNA possono derivare da errori casuali durante la replicazione, o dall' esposizione a fattori ambientali mutageni accidentali, professionali, o dipendenti dallo stile di vita. A differenza delle varianti patogenetiche ereditabili (*germline mutations*) che sono presenti nella linea germinale, le mutazioni somatiche non sono trasmissibili alla progenie.

Migliaia di mutazioni somatiche, che possono influenzare l'insorgenza di un tumore, lo sviluppo di metastasi o la risposta/resistenza a un trattamento, sono state catalogate su database internazionali. L'identificazione e la comprensione di queste alterazioni del DNA nel tumore possono essere cruciali nella diagnosi del cancro e nella pianificazione del suo trattamento, dal monitoraggio della risposta alla terapia all'identificazione precoce della ripresa. Inoltre, durante la progressione di un tumore, il tessuto continua a sviluppare ulteriori nuove mutazioni e queste ultime possono influenzare la risposta agli agenti terapeutici innescando meccanismi di resistenza.

La diagnosi del cancro, richiede una serie di analisi, tra le quali la **biopsia tissutale** costituisce il gold standard. 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.

In passato la biopsia per il prelievo di un campione di tessuto, su cui eseguire lo studio delle risposte molecolari del tumore, era possibile solo mediante modalità invasive, come ad esempio l'agoaspirato o il prelievo intraoperatorio. Le procedure invasive spesso rappresentavano una fonte di comorbidità per il paziente. Il costo per eseguire biopsie sequenziali, per la valutazione dinamica della malattia residua e dei cambiamenti nella composizione genomica del tumore durante e dopo la terapia^{3,4}, era spesso proibitivo. Un limite della biopsia tissutale era inoltre rappresentato dal fatto che questa opzione poteva essere considerata solo quando erano noti i siti del tumore primario, o delle metastasi, e questi erano accessibili.

Onconext Liquid™ rappresenta un nuovo metodo di analisi delle mutazioni somatiche, conosciuto genericamente come "**biopsia liquida**", e studia il cell-free DNA (cfDNA), più specificamente il **DNA tumorale circolante (ctDNA)**, contenuto in un campione di sangue periferico. Lo studio del campione affianca, e sostituisce in fase di monitoraggio sequenziale dell'eterogeneità genomica del tumore, il tradizionale studio diretto del campione di tessuto tumorale prelevato mediante metodi invasivi, e rappresenta oggi una tecnologia ritenuta altamente sensibile e specifica nei confronti di mutazioni somatiche in vari tipi di cancro.³⁶⁻³⁹

Il ctDNA, infatti, porta in sé le caratteristiche patologiche del tumore originale come le mutazioni genetiche. Quindi, il ctDNA isolato dal plasma con tecniche non invasive potrebbe migliorare significativamente il sistema attuale della diagnosi del cancro o addirittura essere usato per identificare tumori allo stato iniziale.

Il DNA Tumorale Circolante (ctDNA).

Tutte le cellule, comprese le cellule tumorali, diffondono DNA nel sistema circolatorio³⁹. In pazienti affetti da cancro, ma anche da altre condizioni patologiche come l'insufficienza renale e l'infarto del miocardio, si rilevano spesso livelli maggiori di cfDNA rispetto a pazienti sani ³⁹. Il **ctDNA** è una frazione del cfDNA, diffusa nel sistema circolatorio in modo specifico dalle cellule tumorali⁴. I meccanismi, attraverso i quali le cellule tumorali rilasciano DNA nel sangue, non sono ancora stati completamente chiariti. Il ctDNA può entrare nel flusso sanguigno attraverso la secrezione diretta delle cellule tumorali vitali, come cfDNA, come vescicole dette esosomi, o in seguito a processi di apoptosi o necrosi delle cellule tumorali ^{39, 96-99}. Nel circolo ematico, il DNA persiste solo per un breve periodo di tempo (t1/2 di ~ 2 ore) ^{39, 100}. La maggior parte dei frammenti di cfDNA e di ctDNA hanno dimensioni comprese tra 180 e 200 paia di basi (bp) ^{39, 100-104}. Nel caso di tumori solidi il ctDNA può essere distinto dal resto del cfDNA, per la presenza di mutazioni somatiche, anche se ne rappresenta solo una piccola frazione (spesso <1%)^{100, 101, 105}. Quanto descritto non è valido in generale anche per le neoplasie ematologiche (ad esempio le leucemie), dove il sangue contiene percentuali di ctDNA molto più elevate. La frazione del ctDNA rispetto al cfDNA totale circolante aumenta proporzionalmente al progredire della malattia e il quantitativo rilevabile nei campioni può variare notevolmente tra i pazienti. ^{39, 100, 106}

La biopsia liquida.

Il termine "**biopsia liquida**" descrive una nuova metodica non invasiva, altamente sensibile ed economicamente vantaggiosa, per isolare e individuare frammenti di cfDNA circolante, tra cui **frammenti di DNA tumorale (ctDNA)**, da campioni di sangue di pazienti con cancro sospetto o diagnosticato. La biopsia liquida è utile ad ampliare la conoscenza, rispetto alle metodiche tradizionali, dell'eterogeneità genomica di un tessuto tumorale ^{5,6}. L'analisi del DNA eseguita su campione di sangue è utile per la scelta terapeutica e per il monitoring del tumore in fase di trattamento, progressione o remissione⁷⁻⁹.

La biopsia liquida offre uno strumento alternativo alla biopsia tradizionale con valutazione istologica poiché, nonostante sia ancora consigliato per la valutazione iniziale della malattia affiancare entrambe le tecniche (per il monitoraggio e i controlli dinamici dell'andamento della terapia, e della risposta del tumore) il ricorso alla biopsia liquida si conferma vantaggioso rispetto alle tecniche tradizionali (Tabella 1).

Per la definizione della terapia ottimale da adottare per il paziente, normalmente viene effettuata la caratterizzazione del profilo mutazionale del tumore primario, attraverso biopsia tradizionale, non sempre però la quantità e la qualità del materiale permette una corretta genotipizzazione, anche in considerazione della sua eterogeneità. Il ctDNA invece, rappresenta il tumore in tutta la sua eterogeneità, è facilmente ottenibile da un prelievo di sangue ed è ripetibile consentendo il monitoraggio nel tempo dello stato della malattia. Il ctDNA può anche fornire un quadro dell'evoluzione del tumore per identificare i cambiamenti genetici che possono avvenire, responsabili di ricadute, progressione e sviluppo di resistenza ai farmaci.

Inoltre, il ctDNA è in grado di offrire non solo informazioni relative al profilo genetico della lesione primaria, come avviene con la biopsia tradizionale (DNA tissutale), ma anche delle metastasi.

Alla luce di questi vantaggi, considerata la correlazione tra mutazioni nel tessuto tumorale e presenza di ctDNA, come riportato da molteplici studi, la biopsia liquida può rappresentare, in ambito clinico, un ottimo strumento di diagnosi e di prognosi per lo studio dei tumori solidi ^{39,96-99,107}. In letteratura è confermato che i tumori sono genomicamente eterogenei ¹⁰⁸⁻¹¹³ e la biopsia tradizionale del tessuto può solo fornire una "istantanea" di una porzione di tumore. Il prelievo di un campione di sangue è semplice e accessibile, e il ctDNA ivi contenuto deriva da tutti i siti tumorali fornendo il potenziale necessario per monitorare la malattia e la sua progressione in tempo reale^{39,96,97, 98, 99,110,112}. Il ctDNA è inoltre rilevabile in altri fluidi corporei come urina, liquido cerebrospinale e saliva, e l'analisi del ctDNA potrà in futuro essere eseguita utilizzando queste fonti.¹¹⁴

Tabella 1: 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

Utilità clinica dell'analisi del ctDNA nel monitoraggio della malattia tumorale e nella medicina di precisione

In letteratura è dimostrato che mutazioni somatiche in un determinato gruppo di geni sono spesso alla base dello sviluppo di diversi tipi di tumore (Tabella 2)¹. Questi geni includono BRAF, la famiglia del gene RAS, EGFR, PIK3CA, FOXL2, e TP53. Mutazioni somatiche nel gene BRAF sono comunemente associate al melanoma, al linfoma non-Hodgkin, al tumore del colon-retto, al carcinoma papillare della tiroide, al carcinoma del polmone non a piccole cellule, e all'adenocarcinoma del polmone, mentre mutazioni somatiche nel gene EGFR sono stati osservate nel tumore del polmone¹¹. Mutazioni nel gene PIK3CA sono più frequenti nel tumore del seno e del colon-retto¹². Mutazioni sul gene FOXL2 sono state osservate nei tumori della granulosa, e mutazioni del gene TP53 vengono rilevate in quasi tutti i tipi di cancro⁹.

L'osservazione di mutazioni hotspot può aiutare l'oncologo a consigliare un piano di trattamento personalizzato durante il quale eseguire il monitoraggio della risposta della malattia e il potenziale sviluppo di resistenza al farmaco. Per esempio, nei pazienti affetti da melanoma metastatico, se presente una specifica mutazione somatica sul gene BRAF (V600E), è spesso indicato il trattamento con inibitori di BRAF come dabrafenib, trametinib e vemurafenib, singolarmente o in combinazione¹³. Inoltre, gli inibitori di EGFR cetuximab e panitumumab si sono rivelati più utili nei pazienti con carcinoma polmonare in cui non sono presenti mutazioni sul gene KRAS (wild type) e in cui EGFR è espresso. Diversi studi clinici di rilievo hanno dimostrato che gli inibitori della tirosin-chinasi di EGFR (TKIs), afatinib e erlotinib, sono utili solo per il trattamento di pazienti i cui tumori presentano mutazioni attivanti nel dominio tirosin-chinasico del gene EGFR¹⁴.

Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare la biopsia liquida per monitorare le dinamiche del tumore. Diversi progetti hanno dimostrato che i risultati relativi alle mutazioni somatiche, identificate attraverso la biopsia liquida, concordano con quelli ottenuti mediante tecniche tradizionali sui medesimi pazienti^{15,16}. I dati sul ctDNA correlati con i risultati clinici e radiologici sembrano inoltre utili a scopo predittivo per la sopravvivenza del paziente^{12,13,15-17}. E' stato anche dimostrato che la ricomparsa, o livelli crescenti, di ctDNA possono essere osservati mesi prima

della ripresa della malattia. Pertanto, la rivalutazione seriale del ctDNA si è dimostrata essere utile come monitoraggio della progressione della malattia, e la comparsa di nuove mutazioni somatiche in fase di trattamento può essere associata allo sviluppo di resistenza ai farmaci in diversi tipi di tumore¹⁸. Un recente studio condotto da Perrone et al. (2014) ha mostrato risultati promettenti per l'applicazione dell'analisi del ctDNA come strumento di screening per gli individui ad alto rischio di sviluppare il tumore del colon-retto.⁴⁰

Inoltre, la quantità e il tipo di ctDNA osservati nel campione possono essere indicativi di stadio del tumore³⁹ e quindi potenzialmente utilizzati per la stadiazione.

Table 2 – Frequenza delle mutazioni somatiche per gene e tipo di tumore

Tipo di tumore	Gene	Frequenza delle mutazioni somatiche
Mammella	PIK3CA	26%
	TP53	23%
Colon-retto	BRAF	11%
	KRAS	36%
	NRAS	5%
	PIK3CA	14%
	TP53	45%
Endometrio	KRAS	14%
	PIK3CA	21%
	TP53	17%
Granulosa cell	FOXL2	97%
Head & Neck	EGFR	2%
	PIK3CA	7%
	TP53	38%
Tumore Renale	TP53	5%
Polmone	BRAF	1-4%
		1% in Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
	EGFR	29%
	KRAS	17%
	TP53	34%
Melanoma	BRAF	45%
	NRAS	18%
	TP53	12%
Tumore ovarico	BRAF	7%
	FOXL2	18%
	KRAS	12%
	PIK3CA	9%
	TP53	46%
Pancreas	BRAF	2%
	KRAS	57%
	PIK3CA	2%
	TP53	36%
Prostata	BRAF	1%
	EGFR	3%
	KRAS	4%
	PIK3CA	2%
	TP53	14%
Tumore testicolare	BRAF	2%
	FOXL2	2%
	KRAS	4%
	NRAS	2%
	TP53	5%
Tiroide	BRAF	41%
	GNAS	3%
	KRAS	2%
	NRAS	7%
	PIK3CA	3%
	TP53	6%

References: COSMIC database (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) accessed 07/28/2015¹⁹⁻²⁵.

Il test OncoNext Liquid™.

OncoNext Liquid™ è uno screening non invasivo finalizzato al rilevamento precoce dei tumori solidi, basato sull'analisi Next Generation Sequencing (NGS) del **DNA tumorale circolante (ctDNA)**.

Il test **OncoNext Liquid™** impiega le più recenti innovazioni tecnologiche sviluppate per la biopsia liquida. Grazie alla tecnologia di sequenziamento NGS oggi è possibile individuare in modo estremamente sensibile la presenza di mutazioni tumorali rilevabili anche da esigue quantità di ctDNA.

Il rilevamento contemporaneo di diverse mutazioni permette di comprendere al meglio il profilo genomico del tumore e adottare il trattamento più idoneo. I campioni di sangue possono essere prelevati al paziente prima, durante e / o dopo il trattamento mirato, o a intervalli regolari. La biopsia liquida permette il monitoraggio continuo e l'osservazione dinamica del comportamento della malattia.

Come viene effettuato il test OncoNext Liquid™.

Il test si esegue a partire da un **prelievo di sangue** (una provetta da **10 ml**). Il campione di sangue raccolto viene centrifugato per separare la componente plasmatica. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il cfDNA viene isolato ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento del DNA** mediante l'impiego di tecniche di **Next Generation Sequencing (NGS)**, si sequenziano ad elevata profondità di lettura le regioni geniche elencate in Tabella 3. Le sequenze geniche ottenute vengono successivamente analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per individuare eventuali mutazioni somatiche nei geni in esame. Le mutazioni vengono interrogate mediante il **database COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer)** capace di associare le mutazioni patologiche utilizzando i dati presenti nelle pubblicazioni scientifiche.

Potenziali indicazioni per il test OncoNext Liquid™ Scan.

OncoNext Liquid™ Scan è stato progettato per l'individuazione precoce di specifiche mutazioni somatiche (prima che il tumore possa essere rilevato con tecniche tradizionali), conosciute come driver del cancro, in popolazioni ad alto rischio, come strumento aggiuntivo nei programmi di sorveglianza personalizzata.

La **diagnosi precoce**, in individui asintomatici, può consentire trattamenti più efficaci con un conseguente innalzamento del tasso di sopravvivenza dal cancro e della sopravvivenza a lungo termine. Infatti, molti tipi di tumore, sviluppandosi senza sintomi e a invasività locale, sono clinicamente impercettibili fino al raggiungimento di una considerevole massa e potrebbero venire diagnosticati solo quando si trovano in uno stadio avanzato o non operabile. Con la biopsia liquida, invece, è possibile individuare ctDNA rilasciato in circolo sanguigno anche da lesioni di piccolissime dimensioni, e quindi essere individuabili al test **OncoNext Liquid™ Scan**.

Esempi di popolazioni ad alto rischio:

- Significativa **storia familiare di tumore** correlato in letteratura a mutazioni sui geni presenti nel pannello indagato
- Nota **predisposizione genetica (germline mutation)** per un tumore ereditario
- Storia personale di **fumo**, o esposizione prolungata al fumo passivo
- Esposizione prolungata ad **agenti cancerogeni**, come inquinamento, fumo, radiazioni, raggi UV e manipolazione di antiblastici.
- **Trattamenti prolungati con terapie ormonali** (farmaci per la fertilità, terapie ormonali sostitutiva contenenti progesterone)
- **Malattie infettive o croniche** predisponenti allo sviluppo tumorale.

Regioni geniche investigate.

Il test **OncoNext Liquid™ Scan** è stato progettato per il rilevamento di mutazioni somatiche hotspot in **23 geni** coinvolti in diversi tumori: AKT1, ALK, AR, BRAF, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ESR1, FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MEK1 (MAP2K1), MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RET, ROS1, SMAD4, TP53 (tabella 3).

La selezione dei geni è stata eseguita a partire dal consenso scientifico attribuito ai geni inseriti nel pannello da organizzazioni come il National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁵⁹ e la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO)⁶⁰. Il pannello comprende geni, regioni geniche incluse le varianti a singolo nucleotide (SNV), e inserzioni/delezioni (indels) che si sono dimostrate utili nello studio molecolare del tessuto tumorale.

Tabella 3: Geni investigati e principali tipi di tumore associati

Gene	Tipi di tumore associati
AKT1	Mammella, Polmone, Colon-Retto*
ALK	Polmone, Neuroblastoma, Rhabdomyosarcoma
AR	Prostata
BRAF	Melanoma*, Colon-Retto* Polmone, Ovarico, Gastrico, Glioma, Tiroide, Pancreas, Prostata
CTNNB1	Melanoma
EGFR	Polmone*; Head & Neck, Prostata
ERBB2	Mammella, Polmone
ESR1	Mammella
FOXL2	Ovarico
GNA11	Melanoma
GNAQ	Melanoma
KIT	Gastrico, Melanoma*, Carcinoma Timico
KRAS	Colon-Retto*, Gastrico, Polmone*, Ovarico, Tiroide, Endometrio, Pancreas, Prostata
MEK1 (MAP2K1)	Melanoma, Polmone, Ovarico, Colon-Retto,
MET	Polmone*, Colon-Retto, Gastrico
NRAS	Colon-Retto*, Polmone, Melanoma, Tiroide
PDGFRA	Gastrico, Melanoma,
PIK3CA	Polmone, Mammella, Prostata, Colon-Retto, Ovarico, Head & Neck, Pancreas, Tiroide
PTEN	Mammella, Polmone,
RET	Polmone*, Tiroide
ROS1	Polmone
SMAD4	Colon-Retto
TP53	Polmone, Melanoma, Ovarico, Colon-Retto, Mammella; Endometrio, Head & Neck, Rene, Pancreas, Prostata, Tiroide

* Linee guida NCCN per tipo di tumore.

Risultati ottenibili con il test OncoNext Liquid™ Scan.

Il test **OncoNext Liquid™ Scan** fornisce informazioni relative alla assenza o alla presenza nel campione analizzato di ciascuna delle mutazioni hotspot elencate in tabella 4.

- **Risultato "POSITIVO" – Presenza di una o più mutazioni:** indica che il test ha rilevato, nel DNA estratto dal campione ematico, una o più mutazioni somatiche a livello di uno (o più) geni. Le mutazioni riscontrabili tramite il test **OncoNext Liquid™ Scan** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:
 - con **significato patologico noto**;
 - con **significato benigno** in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico;

- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

L'identificazione di tale/i mutazione/i può avere diverse implicazioni, in relazione alla/e variante/i rilevata/e. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, indirizzando il paziente ad una successiva consulenza con lo specialista oncologo. **OncoNext Liquid™ Scan** è un test di screening e non ha finalità diagnostiche per il tumore. In caso di test con risultato positivo, sono consigliabili, come follow-up, per il paziente specifici approfondimenti, inclusa la diagnostica per immagini (TAC, Risonanza Magnetica, etc.).

- **Risultato "NEGATIVO" - Assenza di mutazioni:** indica che il test non ha rilevato, nel DNA estratto dal campione ematico, nessuna delle mutazioni somatiche ricercate. Tale risultato non significa che non sia presente un tumore o che non vi sia il rischio, in futuro, che possa insorgere un tumore.
- Occasionalmente, il test potrebbe produrre un **risultato non ottimale** o **non conclusivo**, perché il campione non soddisfa i requisiti minimi di qualità necessari per poter considerare il risultato ottenuto ottimale e, quindi, poter procedere alla relativa emissione del referto. In tal caso, verrà richiesto il prelievo di un nuovo campione ematico al fine di ripetere l'esame.

Sul referto sarà riportato il numero totale di copie mutanti di ctDNA presenti. Le quantità di cfDNA e ctDNA presenti in un campione sono variabili. Ogni variante è associata a una percentuale minima di ctDNA, rispetto al DNA totale, che ne rappresenta il **limite di rilevabilità (LOD)**. L'interpretazione del risultato viene personalizzata sulla base della storia clinica del paziente e, opzionalmente, può essere fornita un'indicazione sulla possibilità di inclusione di un paziente in un trial clinico sulla base dei risultati del test **OncoNext Liquid™ Scan**.

Utilità clinica del test OncoNext Liquid™ Scan.

In un ampio studio su diverse tipologie di tumore²⁶ è stato mostrato che una frazione di ctDNA è rilevabile in più del 75% dei pazienti con malattia metastatica (pancreas, ovaie, colon-retto, vescica, stomaco, mammella, melanoma, fegato e testa/collo) e in meno del 50% dei pazienti con malattia solo allo stadio primario (cervello, rene, prostata e tiroide). In un gruppo separato di 206 pazienti con carcinoma coloretale metastatico, gli autori hanno mostrato alta sensibilità e specificità della rilevazione ctDNA per mutazioni del gene KRAS clinicamente rilevanti (87,2% e 99,2%, rispettivamente).

Un altro studio⁸ ha rilevato mutazioni somatiche nel 68% dei pazienti, affetti da cancro del colon-retto (n = 38), sottoposti al test di biopsia liquida per un pannello di 46 mutazioni tra cui quelle relative ai geni BRAF, KRAS, EGFR e PIK3CA. In tale studio i pazienti positivi alla ricerca di mutazioni somatiche era diviso nel seguente modo: il 54% in stadio precoce (I-III) e il 93% in stadio avanzato (Stadio IV). Per quanto concerne le mutazioni e i geni coinvolti, il 50% dei pazienti ha mostrato mutazioni su KRAS, il 16% su PIK3CA e l'8% su BRAF. Nessuna mutazione su EGFR è stata rilevata nei pazienti appartenenti allo studio. I dati ottenuti hanno confermato la correlazione tra i tumori e le relative mutazioni associate in letteratura. Nei pazienti sottoposti a chirurgia per metastasi al fegato i livelli di ctDNA si sono dimostrati maggiormente utili a scopo predittivo precoce di recidiva rispetto alle tecniche di imaging o alla ricerca dell'antigene carcinoembrionario (CEA). Quattro dei soggetti sani (n = 47), inoltre, hanno presentato valori al limite della rilevabilità di ctDNA.

In uno dei più grandi trial clinici multicentrici (CORRECT)¹⁸, l'effetto di un inibitore delle chinasi (regorafenib) è stato valutato sui livelli ctDNA in pazienti con cancro coloretale metastatico. L'analisi delle mutazioni è stata condotta su un totale di 760 pazienti, che ne comprendeva 505 trattati con il principio attivo e 255 trattati con placebo. Il confronto tra campioni solidi tumorali archiviati e campioni di plasma fresco ha mostrato concordanza di risultati dal 76% - 97% per i tre geni analizzati. Mutazioni su KRAS sono state identificate nel 69% dei pazienti, le mutazioni su PIK3CA nell' 84% dei pazienti e mutazioni su BRAF nel 3% dei pazienti. Nel gruppo trattato con regorafenib, i

pazienti con mutazioni su KRAS hanno mostrato una riduzione del periodo di *progression free survival* rispetto ai pazienti trattati con placebo. È interessante notare inoltre che nel gruppo dei pazienti trattati con placebo, i pazienti con più alta quantità di ctDNA avevano già una scarsa overall e *progression free survival*. Lo studio supporta quindi l'uso del ctDNA per stabilire i genotipi tumorali prima della scelta del trattamento.

Uno studio condotto nel 2015²⁷ sottolinea che i pazienti positivi, in stadio precoce da I a III per carcinoma mammario (n = 313), per mutazioni su PIK3CA mostrano dati di RFS (*recurrence free survival*) significativamente più bassi rispetto ai pazienti negativi per le medesime mutazioni. I pazienti con maggiori quantità di PIK3CA mutato (> 29 alleli) hanno mostrato RFS significativamente più bassa. Beaver et al (2014)²⁸ ha rilevato mutazioni su PIK3CA in 12 di 29 pazienti affetti da cancro al seno (pazienti di stadio I-III). Pazienti con ctDNA persistente anche dopo il trattamento si sono dimostrati più soggetti allo sviluppo di metastasi clinicamente evidenti dopo 23 mesi.

Dawson e collaboratori (2013)²⁹ hanno rilevato la presenza di ctDNA in quasi il 97% dei pazienti con carcinoma metastatico della mammella, e hanno mostrato una maggiore sensibilità e specificità del ctDNA, rispetto ai livelli di CTC e CA 15-3, nella rilevazione del tumore.

Janku e collaboratori (2015)¹⁷ hanno testato 21 mutazioni sui geni BRAF, EGFR, KRAS e PIK3CA in 157 pazienti con tumori avanzati (tra cui colon-retto, melanoma, NSCLC, cancro appendicolare, ovario e utero) in grado di migliorare il trattamento sistemico. Gli autori hanno dimostrato la concordanza tra le mutazioni nei campioni di tessuto in archivio e quelle rilevate nel ctDNA da campioni ematici. Lo stesso studio mostra che la sopravvivenza media di 41 pazienti con più dell'1% di KRAS mutato è stata in media più breve rispetto a quella di 20 pazienti con ≤ 1% di KRAS mutato (4,8 vs. 7,3 mesi, p = 0,008). Allo stesso modo, 67 pazienti con >1% di cfDNA mutato (BRAF, EGFR, KRAS, o PIK3CA) hanno avuto una sopravvivenza media più breve rispetto ai 33 pazienti con ≤ 1% di cfDNA mutato (5,5 vs 9,8 mesi, p = 0,001).

Zill et al. ¹⁶, in uno studio del 2015, hanno ricercato mutazioni in un set di 54 geni, trovando KRAS e TP53 come i geni più comunemente mutati, seguiti da APC, SMAD4, GNAS, FBXW7, e BRAF anche essi ricorrentemente mutati. Durante lo studio di questi cinque geni (KRAS, TP53, APC, FBXW7, e SMAD4) la sensibilità media è stata 92,3%, la specificità 100%, e l'accuratezza diagnostica media 97,7%. Gli autori hanno anche identificato mutazioni rilevabili durante il follow-up dei pazienti, altrimenti non osservabili per le limitazioni intrinseche della metodica della biopsia del tessuto del tumore primario.

Le crescenti evidenze nel campo della biopsia liquida suggeriscono che questo tipo di analisi può essere applicato a pazienti con i più diversi tipi di cancro ^{8, 9, 16, 17, 26, 27, 29-35}. Molti degli studi clinici al momento utilizzano la biopsia liquida come strumento di valutazione diagnostica, predittiva, prognostica, e di risposta del tumore al trattamento (www.clinicaltrials.gov).

Accuratezza del test.

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99%. Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

Limiti del test OncoNext Liquid™ Scan

- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** è un test che effettua uno screening e non una diagnosi di cancro.
- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** non rileva tutti i tumori e non può essere sostitutivo dei test che attualmente sono il gold standard per la diagnosi di cancro.
- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** analizza solo le mutazioni più frequenti dei geni investigati. In caso di tumori che, al momento del test, non abbiano sviluppato le mutazioni specifiche ricercate,

queste ultime non saranno rilevate. E' quindi possibile che mutazioni in geni non testati da **OncoNext Liquid™ Scan** possano essere causa di malattia del paziente.

- L'esame non è in grado di evidenziare:
 - mutazioni localizzate nelle regioni geniche non specificamente investigate;
 - delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 25 bp.
- Un risultato "NEGATIVO" - **Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità che siano presenti mutazioni localizzate in regione del genoma non investigate dall'esame.
- Un risultato positivo deve essere interpretato nel contesto della storia clinica del paziente e correlato allo stadio della malattia, ai risultati di imaging, ai dettagli terapeutici, e ad altri dati di laboratorio.
- In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.
- L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.
- Alcune di queste varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.
- Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di *coverage* per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.
- In caso di tumori che non abbiano ancora rilasciato DNA tumorale nel flusso sanguigno al momento del test, le mutazioni ricercate non saranno rilevate.
- Mutazioni somatiche non incluse nell'esame non saranno rilevate.
- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** non è finalizzato all'individuazione della predisposizione ereditaria allo sviluppo dei tumori, ma rileva solo le mutazioni somatiche nel ctDNA
- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** non è stato progettato come strumento diagnostico per il cancro, ma il suo utilizzo deve essere sempre affiancato da un'attenta valutazione del paziente anche attraverso metodiche tradizionali quali ad esempio biopsia tissutale e tecniche di imaging
- Il test **OncoNext Liquid™ Scan** non può sostituire la valutazione clinica di un medico, gli studi di imaging, o la biopsia tradizionale dei tessuti considerata ancora il gold standard per la diagnosi del cancro.

Target coverage.

Si intende per **Target Coverage**, il numero medio di letture (reads) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. In generale, più è profonda la copertura di una regione più sensibile e affidabile è l'analisi. Per le varianti analizzate è necessaria una copertura di **25.000x** per il rilevamento di mutazioni di frequenza fino allo **0.1%**. I requisiti interni di controllo di qualità (QC) per il test **OncoNext Liquid™** impongono una **copertura maggiore di 25.000x** su più del 99% delle basi target previste per l'analisi.

Alcune varianti target (mutazioni hot-spot) con la relativa profondità di sequenziamento (numero di reads) sono riportate in Tabella 4.

Frequenza dell'allele mutato (MAF).

La frequenza dell'allele mutato è la frequenza identificata nel campione riportata per le diverse mutazioni (sostituzioni, inserzioni e delezioni).

Specifiche di performance del test

Mutant Allele Frequency (MAF) / Tumor Fraction	Sensibilità	Valore predittivo positivo (PPV)
>0.1%	99.3% (98.3%-100%)*	99.9% (99.5%-100%)*

*95% Intervallo di confidenza

Disclaimer.

I dati presentati nella relazione tecnica e nei referti sono destinati all'uso esclusivo di personale sanitario qualificato. Ogni diagnosi, consulenza, o prescrizione di trattamento in relazione ai dati contenuti nella presente relazione tecnica, o nei referti, deve essere eseguita da un operatore sanitario qualificato che tenga conto della storia clinica del singolo paziente, compresi gli esiti dei altri metodi d'analisi tradizionali (es. biopsia tumorale dei tessuti e tecniche di imaging). Le informazioni contenute nei referti e nella presente relazione tecnica sono riferibili alla data in cui gli stessi sono stati emessi; si consiglia all'operatore sanitario che prende in carico il paziente di rivalutare in un eventuale futuro la situazione emersa secondo la più recente letteratura disponibile.

Tabella 4: Mutazioni hotspot ricercate nel test OncoNext Liquid™ Scan 23 geni

Gene	Mutazione	Esone	Variazione Nucleotidica
AKT1	E17K	3	c.49 G>A
ALK	D1091N	20	c.3271G>A
ALK	I1171N	22	c.3512T>A
ALK	I1151M	22	c.3452C>T
ALK	F1174C	23	c.3521T>G
ALK	F1174I	23	c.3520T>A
ALK	F1174L	23	c.3522C>A
ALK	F1174V	23	c.3520T>G
ALK	D1225N	24	c.3673G>A
ALK	F1245C	24	c.3734T>G
ALK	F1245L	24	c.3735C>G
ALK	F1245V	24	c.3733T>G
ALK	R1275Q	25	c.3824G>A
ALK	Y1278S	25	c.3833A>C
ALK	1151Tins		
ALK	C1156Y		
ALK	G1202R		
ALK	G1269A		
ALK	L1152R		
ALK	L1196M		
ALK	L1198F		
ALK	S1206Y		
AR	L702H	4	c.2105T>A
AR	W742C	5	c.2226G>T
AR	H875Y	8	c.2623C>T
AR	F877L	8	c.2631C>A
AR	T878A	8	c.2632A>G
BRAF	G466V	11	c.1397G>T
BRAF	G469A	11	c.1406G>C
BRAF	G469E	11	c.1406G>A
BRAF	G469L	11	c.1405_1406delGGinsTT
BRAF	G469V	11	c.1406G>T
BRAF	Y472C	11	c.1415A>G
BRAF	D594E	15	c.1782T>A
BRAF	D594E	15	c.1782T>G
BRAF	D594G	15	c.1781A>G
BRAF	D594H	15	c.1780G>C
BRAF	D594N	15	c.1779_1780delTGinsGA
BRAF	D594N	15	c.1780G>A
BRAF	D594V	15	c.1781A>T
BRAF	G596R	15	c.1786G>C
BRAF	K601E	15	c.1801A>G
BRAF	L597Q	15	c.1790T>A
BRAF	L597R	15	c.1790T>G
BRAF	L597S	15	c.1789_1790delCTinsTC
BRAF	L597V	15	c.1789C>G
BRAF	V600D	15	c.1799_1800delTGinsAT

BRAF	V600E	15	c.1799T>A
BRAF	V600E	15	c.1799_1800delTGinsAA
BRAF	V600G	15	c.1799T>G
BRAF	V600K	15	c.1798_1799delGTinsAA
BRAF	V600M	15	c.1798G>A
BRAF	V600R	15	c.1798_1799delGTinsAG
CTNNB1	S37F	3	c.110C>T
CTNNB1	S37Y	3	c.110C>A
CTNNB1	S45P	3	c.133T>C
CTNNB1	S45F	3	c.134C>T
CTNNB1	S45Y	3	c.134C>A
EGFR	G719A	18	c.2156G>C
EGFR	G719C	18	c.2155G>T
EGFR	G719S	18	c.2155G>A
EGFR	Exon 19 Deletions	19	
EGFR	Exon 19 Insertions	19	
EGFR	A763_Y764insFOEA	20	c.2290_2291ins
EGFR	Exon 20 Insertions	20	
EGFR	S768I	20	c.2303G>T
EGFR	T790M	20	c.2369C>T
EGFR	L858R	21	c.2573T>G
EGFR	L861Q	21	c.2582T>A
EGFR	E746_A750>IP		c.2235_2248delGGAATTAAGAGAAGinsA ATTC
EGFR	E746_A750del		c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC
EGFR	E746_A750del		c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA
EGFR	E746_P753>VS		c.2237_2257del21insTCT
EGFR	E746_S752>A		c.2237_2254del18
EGFR	E746_S752>D		c.2238_2255del18
EGFR	E746_S752>I		c.2235_2255delinsAAT
EGFR	E746_S752>V		c.2237_2255delinsT
EGFR	E746_T751>A		c.2237_2251del15
EGFR	E746_T751>I		c.2235_2252delinsAAT
EGFR	E746_T751>IP		c.2235_2251delinsAATTC
EGFR	E746_T751>V		c.2237_2252delinsT
EGFR	E746_T751>VA		c.2237_2253delinsTTGCT
EGFR	E746_T751del		c.2236_2253del18
EGFR	K745_E749del		c.2233_2247del15)
EGFR	L747_A750>P		c.2238_2248delATTAAGAGAAGinsGC
EGFR	L747_A750>P		c.2239_2248delTTAAGAGAAGinsC
EGFR	L747_E749del		c.2239_2247delTTAAGAGAA
EGFR	L747_P753>Q		c.2239_2258delinsCA
EGFR	L747_S752>Q		c.2239_2256delinsCAA
EGFR	L747_S752del		c.2239_2256del18
EGFR	L747_T751>Q		c.2238_2252delinsGCA
EGFR	L747_T751>S		c.2240_2251del
EGFR	L747_T751del		c.2238_2252del
ERBB2(HER2)	G309A	8	c.926G>C
ERBB2(HER2)	D769H	19	c.2305G>C
ERBB2(HER2)	D769Y	19	c.2305G>T
ERBB2(HER2)	G776S	19	c.2326 G>A
ERBB2(HER2)	L755_T759del	19	c.2264_2278del
ERBB2(HER2)	L755S	19	c.2264T>C
ERBB2(HER2)	Exon 20 Insertions	20	
ERBB2(HER2)	G778_P780dup	20	c.2339_2340ins
ERBB2(HER2)	V777L	20	c.2329G>T
ERBB2(HER2)	V842I	21	c.2524G>A
ERBB2(HER2)	R896C	22	c.2686C>T
ERBB2(HER2)	c.2263_2264delTTinsCC		c.2263_2264delTTinsCC
ERBB2(HER2)	c.2322_2334dupATACGTGATGGC		c.2322_2334dupATACGTGATGGC
ERBB2(HER2)	c.2328_2336dupTGTGGGCTC		c.2328_2336dupTGTGGGCTC
ESR1	S463P		
ESR1	V534E		

ESR1	P535H		
ESR1	L536Q		
ESR1	L536R		
ESR1	Y537C		
ESR1	Y537S		
ESR1	Y537N		
ESR1	D538G		
FOXL2	C134W	1	c.402 C>G
GNA11	R183C	4	c.546_547delCCinsTT
GNA11	R183C	4	c.547C>T
GNA11	Q209L	5	c.626A>T
GNA11	Q209P	5	c.626A>C
GNAQ	R183Q	4	c.548G>A
GNAQ	Q209L	5	c.626A>T
GNAQ	Q209P	5	c.626A>C
GNAQ	Q209R	5	c.626A>G
KIT	A502-Y503insFA	9	c.1507_1508insTTGCCT
KIT	E490K	9	c.1468G>A
KIT	Exon 9 Mutation	9	
KIT	F504L	9	c.1510T>C
KIT	556 ins L	11	
KIT	575 ins PE	11	
KIT	Del 554-558	11	
KIT	Del 554-559	11	
KIT	Del 566-572	11	
KIT	Del 566-574	11	
KIT	Del 579	11	
KIT	Del V559	11	
KIT	E583_E589dupPYDHKWE	11	
KIT	Exon 11 Mutation	11	
KIT	G565V	11	
KIT	K550N	11	
KIT	K558N	11	
KIT	L576P	11	c.1727T>C
KIT	N566D	11	
KIT	P577_D579del	11	c.1730_1738del
KIT	V559A	11	c.1676T>C
KIT	V559D	11	c.1676T>A
KIT	V559G	11	
KIT	V560A	11	
KIT	V560D	11	c.1727T>C (V560D)
KIT	V560del	11	c.1679_1681del
KIT	V560G	11	
KIT	V569G	11	
KIT	W557R	11	c.1669T>A
KIT	W557R	11	c.1669T>C
KIT	Y553N	11	c.1657T>A
KIT	Exon 13 Mutation	13	
KIT	K642E	13	c.1924A>G
KIT	N655	13	
KIT	N655S	13	
KIT	R634W	13	
KIT	V654A	13	
KIT	Exon 14 Mutation	14	
KIT	H697Y	14	c.2089C>T
KIT	D816H	17	c.2446G>C
KIT	D816V	17	
KIT	D820E	17	c.2460T>A
KIT	D820V	17	
KIT	D820Y	17	
KIT	Exon 17 Mutation	17	
KIT	N822I	17	
KIT	N822K	17	

KIT	N822Y	17	
KIT	Y823D	17	
KIT	A829P	18	
KIT	I841V	18	
KIT	S864F	18	
KIT	Other KIT mutations		
KRAS	G12A	2	c.35G>C
KRAS	G12C	2	c.34G>T
KRAS	G12D	2	c.35G>A
KRAS	G12R	2	c.34G>C
KRAS	G12S	2	c.34G>A
KRAS	G12V	2	c.35G>T
KRAS	G13A	2	c.38G>C
KRAS	G13C	2	c.37G>T
KRAS	G13D	2	c.38G>A
KRAS	G13R	2	c.37G>C
KRAS	G13S	2	c.37G>A
KRAS	G13V	2	c.38G>T
KRAS	Q22K	2	c.64C>A
KRAS	Q61H	3	c.183A>C
KRAS	Q61H	3	c.183A>T
KRAS	Q61H	3	c.183A>C
KRAS	Q61K	3	c.181C>A
KRAS	Q61L	3	c.182A>T
KRAS	Q61P	3	c.182A>C
KRAS	Q61R	3	c.182A>G
KRAS	A146P	4	c.436G>C
KRAS	A146T	4	c.436G>A
KRAS	A146V	4	c.437C>T
KRAS	K117N	4	c.351A>C
KRAS	K117N	4	c.351A>T
MEK1 (MAP2K1)	D67N	2	c.199G>A
MEK1 (MAP2K1)	F53L	2	c.157T>C
MEK1 (MAP2K1)	K57N	2	c.171G>T
MEK1 (MAP2K1)	Q56P	2	c.167A>C
MEK1 (MAP2K1)	C121S	3	c.362G>C
MEK1 (MAP2K1)	E203K	3	c.607G>A
MEK1 (MAP2K1)	I111S	3	c.332T>G
MEK1 (MAP2K1)	N382H	3	c.1144A>C
MEK1 (MAP2K1)	P124L	3	c.371C>T
MEK1 (MAP2K1)	P124S	3	c.370C>T
MEK1 (MAP2K1)	P264S	3	c.790C>T
MET	c.2888-6_29del	14	c.2888-6_29del
MET	c.3028G>C	14	c.3028G>C
MET	c.2887-18_2887-7del12	14	c.2887-18_2887-7del12
MET	c.2888delA	14	c.2888delA
MET	c.3001_3021delGTAGACTACCGAGCTA CTTTT	14	c.3001_3021delGTAGACTACCGAGCTA CTTTT
MET	c.3024_3028+7delAGAAGGTATATT	14	c.3024_3028+7delAGAAGGTATATT
MET	c.3028+1G>T	14	c.3028+1G>T
MET	c.3028G>A	14	c.3028G>A
MET	c.3028G>T	14	c.3028G>T

MET	L1213V	18	c.3637 C>G
MET	V1206L	18	c.3616 G>T
NRAS	G12A	2	c.35G>C
NRAS	G12C	2	c.34G>T
NRAS	G12D	2	c.35G>A
NRAS	G12R	2	c.34G>C
NRAS	G12S	2	c.34G>A
NRAS	G12V	2	c.35G>T
NRAS	G13A	2	c.38G>C
NRAS	G13C	2	c.37G>T
NRAS	G13D	2	c.38G>A
NRAS	G13R	2	c.37G>C
NRAS	G13V	2	c.38G>T
NRAS	Q61E	3	c.181C>G
NRAS	Q61H	3	c.183A>C
NRAS	Q61H	3	c.183A>T
NRAS	Q61H	3	c.183A>T
NRAS	Q61K	3	c.181C>A
NRAS	Q61L	3	c.182A>T
NRAS	Q61L	3	c.182_183delAAinsTG
NRAS	Q61P	3	c.182A>C
NRAS	Q61R	3	c.182A>G
NRAS	Q61R	3	c.182_183delAAinsGG
PDGFRA	c.1679_1693delGGGTCATTGAATCAA		
PDGFRA	c.1681_1682insAGAGGG		
PDGFRA	c.1696_1713delI18		
PDGFRA	c.2526_2537delCATCATGCATGA		
PDGFRA	c.2533_2544delCATGATTCGAAC		
PDGFRA	D842V	18	c.2525 A>T
PDGFRA	D846Y (c.2536 G>T)	18	
PDGFRA	Exon 12 Mutation	12	
PDGFRA	Exon 14 Mutation	14	
PDGFRA	Exon 18 Mutation	18	
PDGFRA	V561D (c.1682 T>A)		
PDGFRA	Y555C (c.1664 A>G)		
PIK3CA	D549N	9	c.1645G>A
PIK3CA	E542K	9	c.1624G>A
PIK3CA	E545G	9	c.1634A>G
PIK3CA	E545K	9	c.1633G>A
PIK3CA	E545Q	9	c.1633G>C
PIK3CA	E545V	9	c.1634A>T
PIK3CA	Q546E	9	c.1636C>G
PIK3CA	Q546K	9	c.1636C>A
PIK3CA	Q546L	9	c.1637A>T
PIK3CA	Q546P	9	c.1637A>C
PIK3CA	Q546R	9	c.1637A>G
PIK3CA	H1047R	20	c.3140A>G
PIK3CA	H1047L	20	c.3140A>T
PIK3CA	H1047Y	20	c.3139C>T
PIK3CA	M1043I	20	c.3129G>A
PTEN	R130*	5	c.388C>T
PTEN	R130fs*4	5	c.389delG
PTEN	R130G	5	c.388C>G
PTEN	R130Q	5	c.389G>A
PTEN	R159S	6	c.477G>T
PTEN	K267fs*9	7	c.800delA
PTEN	P248fs*5	7	c.741dupA
PTEN	R233*	7	c.697C>T
PTEN	N323fs*2	8	c.968supA
PTEN	N323fs*21	8	c.968delA
RET	C634 Mutations	11	
RET	M918I	16	
ROS1	G2032R		

ROS1	D2033N	
ROS1	L2155S	
SMAD4	E330A	c.989A>C
SMAD4	D351H	c.1051G>C
SMAD4	D351N	c.1051G>A
SMAD4	D355E	c.1065C>A
SMAD4	R361C	c.1081C>T
SMAD4	R361S	c.1081C>A
SMAD4	R361H	c.1082G>A
SMAD4	D537Y	c.1609G>T
TP53	Whole coding region	Exons 2-11

Bibliografia.

- Greenman, C., et al., Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 2007. 446(7132): p.153-8.
- Stephens, P.J., et al., The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, 2012. 486(7403): p. 400-4.
- Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli, Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 2014. 32(6): p. 579-86.
- Heitzer, E., P.Ulz, and J.B. Geigl, Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 2015. 61(1): p. 112-23.
- Lebofsky, R., et al., Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol*, 2015. 9(4): p. 783-90.
- Esposito, A., et al., Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev*, 2014. 40(5): p. 648-55.
- Newman, A.M., et al., An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*, 2014. 20(5): p. 548-54.
- Kidess, E., et al., Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget*, 2015. 6(4): p. 2549-61.
- Forshev, T., et al., Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*, 2012. 4(136): p. 136ra68.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015. 65(1): p. 5-29.
- Davies, H., et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002. 417(6892): p. 949-54.
- Romero, A., et al., Identification of E545k mutation in plasma from a PIK3CA wild-type metastatic breast cancer patient by array-based digital polymerase chain reaction: Circulating-free DNA a powerful tool for biomarker testing in advance disease. *Transl Res*, 2015.
- Ascierto, P.A., et al., Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 2013. 31(26): p. 3205-11.
- Rothschild, S.I., Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer-Beyond EGFR and ALK. *Cancers (Basel)*, 2015. 7(2): p. 930-49.
- Heidary, M., et al., The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2014. 16(4): p. 421.
- Zill, O.A., et al., Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov*, 2015.
- Janku, F., et al., Actionable mutations in plasma cell-free DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*, 2015. 6(14): p. 12809-21.
- Tabernero, J., et al., Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol*, 2015.
- Forbes, S.A., et al., COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(Database issue): p. D805-11.
- Shah, S.P., et al., Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med*, 2009. 360(26): p.2719-29.
- Schirripa, M., et al., Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2015. 136(1): p. 83-90.
- Janku, F., et al., PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22769.
- Kalfa, N., et al., Activating mutations of Gsalpha in kidney cancer. *J Urol*, 2006. 176(3): p. 891-5.
- Fecteau, R.E., et al., GNAS mutations identify a set of right-sided, RAS mutant, villous colon cancers. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e87966.
- Sparks, A.B., et al., Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1998. 58(6): p. 1130-4.
- Bettegowda, C., et al., Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 2014. 6(224): p. 224ra24.
- Oshiro, C., et al., PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. 150(2): p. 299-307.
- Beaver, J.A., et al., Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2014. 20(10): p. 2643-50.
- Dawson, S.J., et al., Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 2013. 368(13): p. 1199-209.
- Ignatiadis, M. and S.J. Dawson, Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality? *Ann Oncol*, 2014. 25(12): p. 2304-13.
- Murtaza, M., et al., Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 2013. 497(7447): p. 108-12.
- Mohamed Suhaimi, N.A., et al., Non-invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Mol Oncol*, 2015.

33. Sanmamed, M.F., et al., Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digitalPCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*, 2015;61(1):p.297-304.
34. Siravegna, G., et al., Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*, 2015.
35. Roschewski, M., et al., Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*, 2015.
36. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical chemistry*. 2015;61:112-23.
37. Lebofsky R, Decraene C, Bernard V, et al. Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Molecular oncology*. 2015;9:783-90.
38. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al. Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer treatment reviews*. 2014;40:648-55.
39. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32:579-86.
40. Perrone F, Lampis A, Bertan C, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*. 2014;100:115-21.
41. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic acids research*. 2015;43:D789-98.
42. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic acids research*. 2015;43:D805-11.
43. Ascierto PA, Minor D, Ribas A, et al. Phase II trial (BREAK-2) of the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31:3205-11.
44. Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene*. 2009;28:85-94.
45. Homet Moreno B, Ribas A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. *British journal of cancer*. 2015;112:1421-7.
46. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*. 2015;26:731-6.
47. Zill OA, Greene C, Sebisano D, et al. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer discovery*. 2015;
48. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nature medicine*. 2015;21:560-2.
49. Karachaliou N, Mayo-de Las Casas C, Queralt C, et al. Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA oncology*. 2015;1:149-57.
50. Shah SP, Köbel M, Senz J, et al. Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *The New England journal of medicine*. 2009;360:2719-29.
51. De Stefano A, Carlomagno C. Beyond KRAS: Predictive factors of the efficacy of anti-EGFR monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20:9732-43.
52. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine*. 2015;21:795-801.
53. Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2015;136:83-90.
54. Wong AL, Lim JS, Sinha A, et al. Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *Journal of translational medicine*. 2015;13:57.
55. Rodon J, Braña I, Siu LL, et al. Phase I dose-escalation and -expansion study of buparlisib (BKM120), an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*. 2014;32:670-81.
56. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Science translational medicine*. 2012;4:136ra68.
57. Madic J, Kialainen A, Bidard FC, et al. Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2015;136:2158-65.
58. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014;6:224ra24.
59. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site) Accessed 15 June 2015.
60. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D; ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii1-9.
61. Higgins MJ, Baselga J (2011) Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest* 121(10):3797-803.
62. Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511(7511):543-50.
63. Swanton C, Futreal A, Eisen T (2006) Her2-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 2):4377s- 4383s.
64. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, et al. (2005) Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer* 103(9):1865-73.
65. Tan D, Deeb G, Wang J, et al. (2003) HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 12(4):201-11.
66. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92.

67. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. (2010) Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376(9742):687-97.
68. Chumsri S, Weidler J, Ali S, et al. (2015) Prolonged Response to Trastuzumab in a Patient With HER2-Nonamplified Breast Cancer With Elevated HER2 Dimerization Harboring an ERBB2 S310F Mutation. *J Natl Compr Canc Netw* 13(9):1066-70.
69. Cappuzzo F, Bemis L, Varella-Garcia M (2006) HER2 mutation and response to trastuzumab therapy in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 354(24):2619-21.
71. Falchook GS, Janku F, Tsao AS, et al. (2013) Non-small-cell lung cancer with HER2 exon 20 mutation: regression with dual HER2 inhibition and anti-VEGF combination treatment. *J Thorac Oncol* 8(2):e19-20.
72. Mazieres J, Peters S, Lepage B, et al. (2013) Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 31(16):1997-2003.
73. Baselga J, Cortés J, Kim SB, et al. (2012) Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 366(2):109-19.
74. Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. (2015) Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 372(8):724-34.
75. Verma S, Miles D, Gianni L, et al. (2012) Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 367(19):1783-91.
76. Cameron D, Casey M, Oliva C, et al. (2010) Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist* 15(9):924-34.
77. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355(26):2733-43.
78. Serra V, Vivancos A, Puente XS, et al. (2013) Clinical response to a lapatinib-based therapy for a Li-Fraumeni syndrome patient with a novel HER2V659E mutation. *Cancer Discov* 3(11):1238-44.
79. Ali SM, Alpaugh RK, Downing SR, et al. (2014) Response of an ERBB2-Mutated Inflammatory Breast Carcinoma to Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted Therapy. *J Clin Oncol ePub Feb 2014*.
80. Lin NU, Winer EP, Wheatley D, et al. (2012) A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 133(3):1057-65.
81. Schwab CL, Bellone S, English DP, et al. (2014) Afatinib demonstrates remarkable activity against HER2-amplified uterine serous endometrial cancer in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 111(9):1750-6.
82. De Grève J, Teugels E, Geers C, et al. (2012) Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung Cancer* 76(1):123-7.
83. De Grève J, Moran T, Graas MP, et al. (2015) Phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in demographically and genotypically defined lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 88(1):63-9.
84. Gandhi L, Bahleda R, Tolaney SM, et al. (2014) Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* 32(2):68-75.
85. Ben-Baruch NE, Bose R, Kavuri SM, et al. (2015) HER2-Mutated Breast Cancer Responds to Treatment With Single-Agent Neratinib, a Second-Generation HER2/EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Natl Compr Canc Netw* 13(9):1061-4.
86. Kris MG, Camidge DR, Giaccone G, et al. (2015) Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol ePub Apr 2015*.
87. Takada M, Higuchi T, Tozuka K, et al. (2013) Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 13:241.
88. Jensen JD, Knoop A, Laenkholm AV, et al. (2012) PIK3CA mutations, PTEN, and pHER2 expression and impact on outcome in HER2-positive early-stage breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 23(8):2034-42.
89. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. (2007) A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12(4):395-402.
90. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, et al. (2011) Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol* 29(2):166-73.
91. Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, et al. (2014) PIK3CA Mutations Are Associated With Lower Rates of Pathologic Complete Response to Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) Therapy in Primary HER2-Overexpressing Breast Cancer. *J Clin Oncol ePub Sep 2014*.
92. Barbareschi M, Cuorvo LV, Girlando S, et al. (2012) PIK3CA mutations and/or PTEN loss in Her2-positive breast carcinomas treated with trastuzumab are not related to resistance to anti-Her2 therapy. *Virchows Arch* 461(2):129-39.
93. Guarneri V, Generali DG, Frassoldati A, et al. (2014) Double-blind, placebo-controlled, multicenter, randomized, phase IIb neoadjuvant study of letrozole-lapatinib in postmenopausal hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, operable breast cancer. *J Clin Oncol* 32(10):1050-7.
94. Jones KL, Buzdar AU (2009) Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol* 10(12):1179-87.
95. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, et al. (2013) Hsp90 inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Breast* 22(5):569-78.
96. Aarthy, R., Mani, S., Velusami, S. et al. *Mol Diagn Ther* (2015) 19: 339. doi:10.1007/s40291-015-0167-y
97. Chaudhuri AA, Binkley MS, Osmundson EC, Alizadeh AA, Diehn M. Predicting radiotherapy responses and treatment outcomes through analysis of circulating tumor DNA. *Seminars in radiation oncology*. 2015;25(4):305-312. doi:10.1016/j.semradonc.2015.05.001.

98. Michail Ignatiadis, Mark Lee and Stefanie S. Jeffrey, Clin Cancer Res November 1 2015 (21) (21) 4786-4800; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1190
99. Jiri Polivka Jr, Martin Pesta, and Filip Janku, [Expert Review Of Molecular Diagnostics](#) Vol. 15 , Iss. 12,2015
100. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*. 2008;14(9):985-990. doi:10.1038/nm.1789.
101. Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16368-16373. doi:10.1073/pnas.0507904102.
102. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16266-16271. doi:10.1073/pnas.0808319105.
103. Sabine Jahr, Hannes Hentze, Sabine Englisch, Dieter Hardt, Frank O. Fackelmayer, Rolf-Dieter Heschand Rolf Knippers, *Cancer Res* February 2 2001 (61) (4) 1659-1665
104. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. Lee T, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e23418. doi:10.1371/journal.pone.0023418.
105. Holdhoff et al., *JNCI J Natl Cancer Inst* (2009) 101(18): 1284-1285. doi: 10.1093/jnci/djp240
106. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*. 2014;20(5):548-554. doi:10.1038/nm.3519.
107. Cécile Jovelett et al., *Clin Cancer Res* June 15 2016 (22) (12) 2960-2968
108. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *The New England journal of medicine*. 2012;366(10):883-892. doi:10.1056/NEJMoa1113205.
109. Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, Swanton C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biology*. 2014;15(8):453. doi:10.1186/s13059-014-0453-8.
110. Ichihara E, Lovly CM. Shades of T790M – intratumor heterogeneity in EGFR mutant lung cancer. *Cancer discovery*. 2015;5(7):694-696. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0616.
111. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The Life History of 21Breast Cancers. *Cell*. 2012;149(5):994-1007. doi:10.1016/j.cell.2012.04.023.
112. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third Generation EGFR Inhibitor. *Cancer discovery*. 2015;5(7):713-722. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0399.
113. Wang Y, Waters J, Leung ML, et al. Clonal Evolution in Breast Cancer Revealed by Single Nucleus Genome Sequencing. *Nature*. 2014;512(7513):155-160. doi:10.1038/nature13600.
114. Patel eTsui, 2015, *Clinical Biochemistry*, Volume 48, Issue 15, October 2015, Pages 957–961