

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato

Scienze Fisiopatologiche e
neuropsicobiologiche e assistenziali del ciclo
della vita - *Ciclo XXV*

**Cellule Staminali: nuove applicazioni in
Chirurgia Toracica**

Tesi di Dottorato di

Simone Furia

Tutor: Prof Luigi Santarnbrogio

Dott. Ugo Pastorino

Direttore: Prof. Roberto Weinstein



Anno Accademico 2012

INDICE

Introduzione e Razionale	3
Sperimentazione Preclinica	14
Applicazione Clinica	35
Cancer Stem Cells e Nuove Linee di Ricerca	57
Bibliografia	69

Introduzione e Razionale

Le procedure di riparazione dei tessuti in Chirurgia Toracica coinvolgono strutture diverse, come polmoni, vasi mediastinici e parete toracica. Negli anni, l'interesse crescente intorno a tecnologie sempre più avanzate, in grado di produrre materiali che riescano a simulare le caratteristiche meccaniche e fisiologiche del tessuto danneggiato, ha portato all'introduzione nella pratica clinica di diversi prodotti sintetici. In particolare nella chirurgia resettiva polmonare, che rappresenta la maggior parte dell'attività chirurgica, i sigillanti sintetici sono comunemente utilizzati per controllare le perdite di aria intra- e postoperatorie. Le perdite aeree vengono descritte come la complicanza più frequente dopo l'intervento chirurgico al polmone (8-20%)¹⁻⁶; esse sono originate dall'interruzione della pleura viscerale che crea una comunicazione diretta tra gli alveoli e la cavità pleurica tale da generare delle vere e proprie microfistole alveolo-pleuriche. Il tessuto polmonare traumatizzato dopo una resezione può presentare perdite aeree post-operatorie che si sviluppano nelle aree di dissezione o lungo le linee di chiusura parenchimale con punti di sutura o graffette.

Queste perdite di aria parenchimali di solito sono complicanze minori e si risolvono in pochi giorni spontaneamente. Tuttavia, quando si creano le condizioni perché la pervietà di queste microfistole venga mantenuta ad ogni atto respiratorio, impedendo la chiusura spontanea, esse possono essere responsabili di lunghe degenze post-operatorie e della necessità di mantenere il tubo di drenaggio toracico fino a richiedere, in alcuni casi, un nuovo intervento chirurgico di revisione dell'aerostasi. Attualmente in considerazione dei tempi medi di degenza dopo un intervento chirurgico di lobectomia polmonare, molti autori sono concordi

nel definire prolungate, le perdite aeree responsabili di una degenza postoperatoria che supera i 7 giorni^{7, 8, 9}.

Pur essendo complicanze minori, per il loro tasso di incidenza hanno un impatto negativo sul sistema sanitario in tutti i paesi. I dati raccolti su 4.979 lobectomie polmonari effettuate da gennaio 2002 a giugno 2006 dal Society of Thoracic Surgeons (STS) database³ documentano che l'incidenza delle perdite aeree è del 9.9% (497 pazienti). Tra questi, 128 pazienti (25,7%) hanno avuto una degenza prolungata in ospedale (più di 14 giorni).

Tuttavia, i prodotti sigillanti disponibili (ad esempio colla di fibrina, glicole polietilene derivati) non appaiono soddisfacenti, a causa dei costi e dei risultati incostanti e di breve durata. Due review Cochrane^{10, 11} sull'uso di sigillanti chirurgici, hanno analizzato sedici studi clinici randomizzati controllati. Complessivamente, 1642 pazienti sono stati randomizzati al momento dell'intervento chirurgico in due gruppi: il primo gruppo di pazienti ha usufruito di tecniche di sutura standard, sul secondo gruppo sono state utilizzate le stesse tecniche di chiusura standard combinate con un sigillante chirurgico. Sono stati utilizzati diversi sigillanti chirurgici:

- derivato di colla di fibrina: il sigillante è costituito da una soluzione di fibrinogeno, fattore XIII, fibronectina, aprotinina, plasminogeno e una soluzione di trombina (trombina e cloruro di calcio).
- sigillante sintetico costituito da polietilenglicol, trimetilencarbonato e acrilato.
- sigillante polimerico biodegradabile (polietilenglicole-based cross-linker, funzionalizzata con gruppi succinato ([PEG-(SS) 2]) con albumina sierica umana-USP).

- patch assorbibile costituito da un equino-collagene rivestito con fibrinogeno umano e trombina umana.

Il tempo medio per la rimozione del tubo toracico è risultato significativo in tre studi e la maggiore differenza registrata è stata di 3,5 giorni nel gruppo di trattamento e di 5 giorni nel gruppo di controllo, tuttavia in nove studi non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa e quattro studi non riportavano dati in merito. In tre studi il guadagno sulla durata della degenza ospedaliera è stato di un giorno (6 vs 7), in undici lavori non è stata rilevata una differenza significativa e due non riportavano dati. La conclusione dell'analisi evidenzia che l'utilizzo sistematico di sigillante non è al momento raccomandato per l'attività chirurgica di routine.

Nella nostra Unità di Chirurgia Toracica, è stato condotto uno studio prospettico, disegnato per confrontare tecniche standard di chiusura dei tessuti (gruppo di controllo retrospettivo) a tecniche standard della chiusura dei tessuti più il sistema sigillante (gruppo di studio prospettico) per il controllo delle perdite d'aria intra-e post-operatorie, il dispositivo utilizzato era un idrogel sintetico, composto da un glicole polietilenico (PEG) e una soluzione di estere ammino-trilisinico. La nostra esperienza, seppur limitata a un gruppo di 20 casi, ci ha mostrato che l'applicazione di sigillanti sulla pleura viscerale, ha portato ad una riduzione della perdita aerea intraoperatoria, mentre sul lungo periodo i risultati non sono stati soddisfacenti.

Infatti, immediatamente dopo l'applicazione, la colla polietilenica è risultata provvista di una buona attività sigillante sulla pleura viscerale, si è osservato infatti come l'applicazione del prodotto abbia consentito una riduzione del grado di perdite aeree associata ad un decremento delle perdite di volume corrente registrate dagli anestesisti a fine intervento.

E' stato inoltre registrato che 16 su 20 pazienti durante l'intervento chirurgico, sono risultati completamente privi di perdite aeree alla prova dell'aerostasi dopo l'applicazione del prodotto. Tuttavia non abbiamo documentato una buona performance nel lungo periodo di osservazione. Infatti durante il decorso postoperatorio in 7 pazienti è stata registrata la comparsa di perdite aeree tardive, la valutazione è stata effettuata dal momento del posizionamento dei drenaggi pleurici e monitorata grazie a sistemi di misurazione digitale applicati al drenaggio pleurico. Di questi, in 6 pazienti le perdite aeree si sono protratte oltre 5 giorni: in 2 pazienti le perdite aeree si sono poi risolte; in 4 pazienti si è ricorso all'utilizzo della valvola di Heimlich rispettivamente per 19, 11, 10, 7 giorni; al momento della rimozione del tubo di drenaggio è stata documentata dalla radiografia del torace la persistenza di un minimo livello di pneumotorace in 3 dei 4 soggetti.

I risultati a lungo termine sull'efficacia del sigillante hanno evidenziato quindi un calo nella tenuta del sigillante sul tessuto polmonare.

Abbiamo effettuato uno studio retrospettivo per valutare se l'efficacia a lungo termine dei vari tipi di sigillanti chirurgici fosse in qualche modo correlata alla natura del prodotto e alla sua modalità di applicazione, mettendo a confronto patch riassorbibili e colle adesive.

In quattro anni, dal 2006 al 2010, nella nostra U.O. di Chirurgia Toracica, sono stati utilizzati tre diversi sigillanti. Due di loro, TachoSil e Quixil, sono derivati di trombina e fibrina umana, e svolgono la loro azione attivando le ultime fasi della cascata di coagulazione sul sito di applicazione, per questo motivo, sono state inizialmente prodotte per il controllo della emostasi intraoperatoria. Successivamente, espandendo le indicazioni per l'uso, sono stati proposti per la chirurgia toracica per sfruttare la capacità di formare

coaguli sulle aree di resezione parenchimale ed avere, allo stesso tempo, un effetto sigillante sulla perdita aerea intraoperatoria¹²⁻¹⁷.

Il Tachosil viene prodotto sottoforma di patch riassorbibile di collagene con una superficie a nido d'ape rivestita da fattori della coagulazione, fibrinogeno umano e trombina umana.

Il Quixil è commercializzato sotto forma di colla adesiva ed è un concentrato di fattori della coagulazione e trombina prodotti da plasma umano.

Un terzo sigillante, la colla di glicole polietilenica (PEG), è stata espressamente prodotta per l'applicazione sul tessuto polmonare, può adattarsi ai movimenti respiratori sul polmone perché non forma legami covalenti sulla superficie polmonare. È riassorbibile ed è commercializzato con due componenti in forma di precursori che devono essere miscelati tra loro per formare il prodotto sigillante¹⁸⁻²².

Lo studio ha valutato in modo retrospettivo 695 fra lobectomie e segmentectomie polmonari per cancro, eseguite nel periodo 2006-2010, mettendo a confronto il rendimento del patch riassorbibile e delle colle adesive, in termini di durata della degenza, perdite aeree prolungate, durata dei drenaggi e uso della valvola di Heimlich. I sigillanti chirurgici sono stati utilizzati in 158 procedure, in presenza di perdite di aria intraoperatorie. Tra questi, 86 pazienti hanno ricevuto un patch di collagene (Gruppo A), 72 pazienti sono stati trattati con i due diversi tipi di colla (Gruppo B). Questi due gruppi sono stati confrontati utilizzando il propensity score in base alle caratteristiche preoperatorie (sesso, età), la funzione polmonare e lo stadio del tumore²³. Dopo il calcolo del propensity score, due gruppi di 30 pazienti sono stati confrontati in base alle caratteristiche cliniche.

Nel decorso post-operatorio un paziente nel gruppo A è deceduto per tromboembolismo acuto. Due interventi di revisione dell'emostasi sono stati eseguiti per fermare un'emorragia

intrapleurica. Nel gruppo B, si è reso necessario eseguire un reintervento chirurgico di revisione dell'aerostasi su un paziente. In questo caso dopo due applicazioni di PEG, la perdita di volume insufflato registrata al termine dell'intervento era di 300cc/min con perdita aerea di grado 1 secondo Macchiarini²⁴. Nel decorso postoperatorio la perdita è divenuta persistente. Un picco di flusso d'aria di 185ml/min è stato registrato alla 3° ora post-operatoria e il flusso d'aria non si è mai arrestato fino alla revisione chirurgica della cavità pleurica in 27° giornata post-operatoria.

Per ciò che riguarda gli outcomes postoperatori non abbiamo trovato risultati statisticamente significativi in termini di rimozione del drenaggio e della degenza ospedaliera. Tuttavia è interessante notare che i valori mediani per la lunghezza della degenza ospedaliera e la durata dei drenaggi sono più alti nel gruppo trattato con le colle.

L'uso della valvola di Heimlich collegata al drenaggio pleurico per la dimissione dei pazienti con perdite di aria prolungate non era statisticamente differente tra i gruppi. Tuttavia un uso due volte superiore della valvola di Heimlich è stato osservato quando sono state applicate le colle adesive.

Sulla base dei risultati dei nostri studi, la necessità di materiali alternativi all'utilizzo dei sigillanti chirurgici, dal basso rendimento a fronte degli elevati costi per la Struttura Ospedaliera, ci ha spinto verso un campo di ricerca sempre più promettente, focalizzando l'attenzione sulla applicazione di nuove procedure per sfruttare il potere riparativo del tessuto adiposo autologo.

Nel campo dell'ingegneria tissutale, approfondendo gli studi sulla stimolazione dei meccanismi di guarigione delle ferite, i ricercatori hanno individuato nel tessuto adiposo la presenza di cellule staminali multipotenti²⁵⁻²⁸. In condizioni appropriate le cellule staminali

adipose sono in grado di rilasciare una moltitudine di fattori di crescita in grado di avviare la proliferazione cellulare, la differenziazione e la migrazione delle cellule mesoteliali e sub mesoteliali che circondano una lesione, accelerando la cascata di eventi che porta alla deposizione di tessuto fibroso e alla formazione della cicatrice²⁹⁻³². Per questo, il lipofilling e le tecniche che propongono l'utilizzo delle cellule staminali adipose, hanno trovato applicazione in Chirurgia Plastica e Ricostruttiva in cui vengono utilizzati gli innesti di grasso autologo al fine di aumentare il volume a livello dei tessuti molli per correggere deformità post-mastectomia o per le medicazioni complesse di lesioni croniche post-attiniche³³⁻³⁸. Applicando alla Chirurgia Toracica le tecniche consolidate del lipofilling^{39, 40}, abbiamo progettato una nuova procedura per la raccolta intra-operatoria, mediante lipoaspirazione e centrifugazione, di un graft autologo di grasso da applicare sulla superficie della resezione polmonare, con l'obiettivo di migliorare la guarigione delle lesioni e la rigenerazione dei tessuti attraverso le cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ASC). L'ipotesi è che le proprietà rigenerative delle ASC stimolino il processo di guarigione sulle fonti di perdita aerea, in modo da ridurre la durata dei tubi di drenaggio nel decorso post-operatorio, riducendo il disagio del paziente e i costi di degenza ospedaliera. Un'altra caratteristica importante di questa tecnica è che i meccanismi biologici di riparazione tissutale possono preservare il tessuto polmonare sano, evitando le distorsioni parenchimali causate dalle suture, al fine di garantire una migliore riespansione del polmone residuo e una buona funzionalità respiratoria dopo l'intervento. I biomateriali di derivazione autologa inoltre possono modulare la risposta infiammatoria postchirurgica, che si manifesta in presenza di corpi estranei nella cavità pleurica, riducendo la frequenza e la gravità delle complicanze post-operatorie.

La possibilità di evitare l'uso di suturatrici meccaniche, sigillanti sintetici o altri dispositivi chirurgici, migliorando la biocompatibilità dei materiali, si traduce in un abbattimento dei costi del materiale di Sala Operatoria ed in una riduzione delle aderenze postchirurgiche, che di per sé rappresentano un importante fattore di rischio nell'eventualità di un re-intervento chirurgico⁴¹.

Il progetto di ricerca sull'applicazione delle cellule staminali in Chirurgia Toracica si è quindi sviluppato in tre fasi di studio: una fase preclinica, una fase clinica e infine una terza fase di analisi sulle nuove prospettive di ricerca nell'ambito della funzione biologica delle cellule staminali tumorali.

Fase preclinica.

Abbiamo creato due linee di ricerca con saggi in vitro/vivo per valutare i punti critici di questa nuova tecnica, nella fase di sperimentazione preclinica sono stati analizzati i seguenti aspetti:

- 1) *la stimolazione e l'accelerazione dei processi di "guarigione" sul tessuto polmonare danneggiato come conseguenza dell'esposizione al lipoaspirato contenente cellule staminali di derivazione adiposa.* Sono stati utilizzati diversi modelli cellulari tra cui fibroblasti embrionali e adulti, cellule epiteliali bronchiali e linee cellulari derivate, geneticamente modificate. L'analisi è stata condotta sulla cinetica di crescita in saggi di proliferazione e sulla velocità di migrazione di fibroblasti responsivi ai fattori di crescita delle cellule staminali; sono stati inoltre indagati gli effetti delle ASC sui meccanismi

molecolari di sintesi e formazione della matrice extracellulare coinvolti nei processi di riparazione tissutale.

2) *Il supposto effetto pro-oncogeno dovuto alla stimolazione da parte delle ASC del potenziale neoplastico di eventuali depositi residui presenti nel tessuto adiposo dei pazienti metastatici*⁴²⁻⁴⁴. Lo studio è stato effettuato mediante l'utilizzo di un modello di adenocarcinoma polmonare (A549), in grado di formare degli agglomerati cellulari con proprietà simili alle cellule staminali ad alto potenziale tumorigenico⁴⁵. Sono stati allestiti saggi di proliferazione in vitro per monitorare la cinetica di crescita di A549 dopo trattamento con campioni diversi di lipoaspirato. La crescita tumorale in vivo è stata valutata sottoponendo topi nudi al co-inoculo di cellule A549 in combinazione con lipoaspirati in un volume 1:1.

Fase clinica

L'applicazione delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo autologo per la riparazione del polmone umano dopo resezione chirurgica rappresenta una tecnica del tutto nuova nel campo della Chirurgia Toracica.

Lo studio, eseguito in venti interventi di metastasectomia polmonare, è stato disegnato per testare la fattibilità dell'applicazione delle cellule staminali (ASC) in combinazione con l'utilizzo di un'apparecchiatura laser di nuova generazione di 2010nm di lunghezza d'onda⁴⁶⁻⁴⁸. Nessun materiale sintetico è stato utilizzato negli interventi dello studio clinico.

In questo modo si è tentato di preservare al massimo il tessuto polmonare sano, sfruttando i meccanismi autologhi di riparazione tissutale ed evitando la distorsione del parenchima causato dalla sutura o dalle graffette metalliche comunemente usate nelle più comuni tecniche di resezione. Per questi aspetti, nella nostra ricerca, i siti di metastasectomia eseguita con il laser 2010nm non sono stati suturati, ma ricoperti di cellule staminali adipose mediante aspersione. Abbiamo scelto di applicare questa tecnica in questo tipo di interventi per una serie di considerazioni. Nelle metastasectomie polmonari, le resezioni sono spesso molteplici e le lesioni possono essere anche voluminose e situate in profondità nel parenchima; a seconda dell'estensione delle resezioni e delle tecniche utilizzate, questi fattori possono essere responsabili dell'aumento delle perdite aeree postoperatorie e causare una diminuzione della funzionalità respiratoria. Inoltre per l'elevato rischio di recidiva, sono necessari talvolta interventi reiterati; la presenza delle aderenze pleuriche, che si formano dopo l'intervento a seguito della risposta infiammatoria contro i materiali sintetici, è un fattore di rischio per l'insorgenza di complicanze nel decorso postoperatorio.

L'efficacia della procedura è stata valutata sulla base dell'incidenza delle complicanze postoperatorie correlate alla perdita aerea, e in termini di conservazione della funzionalità respiratoria dopo l'intervento chirurgico. La procedura di prelievo del tessuto adiposo autologo costituisce una caratteristica originale dello studio ed è stata eseguita nello strato sottocutaneo a livello della toracotomia in modo da poter essere effettuata durante l'intervento chirurgico senza gravare sulla normale tempistica operatoria.

Le cellule staminali tumorali e le future prospettive di ricerca.

Negli ultimi anni è stato proposto un nuovo modello di sviluppo tumorale per spiegare i meccanismi di crescita e proliferazione delle neoplasie. Al centro di queste teorie è stata posta una popolazione cellulare con caratteristiche simil-staminali, che sarebbe coinvolta nei processi di self-renewal, responsabili del differenziamento delle cellule mutate e dello sviluppo di fenomeni di resistenza alla chemioterapia^{49,50}. Lo studio di queste cellule staminali tumorali (CSC) promette di chiarire le dinamiche di signaling intra- e intercellulare e delle alterazioni nella regolazione del ciclo cellulare, oltre che fornire nuove prospettive terapeutiche^{51,52}. In particolare, EpCAM, una proteina di membrana con funzione di adesione cellulare, è presente ubiquitariamente nei tessuti sani e, in forma aberrante sulle CSC, e sembra essere correlata alla progressione neoplastica in diversi tumori di origine epiteliale^{53,54,55}. Le funzioni biologiche di EpCAM sono implicate nella trasduzione del segnale generato dal contatto cellulare dalla membrana verso il nucleo ed hanno un ruolo nella modulazione del ciclo cellulare e nella sintesi proteica. Sulla base dell'ubiquitariet  di EpCAM si sono sviluppate diverse linee di ricerca per chiarire i rapporti che legano questa molecola ai processi di attivazione della replicazione cellulare delle CSC⁵⁶⁻⁵⁹. Essendo iperespressa sulle cellule tumorali, questa molecola pu  diventare un utile strumento diagnostico per rilevare metastasi occulte e cellule tumorali circolanti ed inoltre rappresenta il bersaglio ideale per la sperimentazione di nuovi farmaci^{60,61,62}.

Sperimentazione Preclinica

E' stato dimostrato che cellule staminali adulte derivate da tessuto adiposo (Adipose-derived stem cells, ASCs) hanno la capacità di riparare, rigenerare e mantenere l'integrità dei tessuti^{63,64}. Le cellule staminali adipose (adipose stem cells) ASC hanno la proprietà di rilasciare diversi fattori di crescita come il fattore trasformante (TGF)²⁹, il fattore di crescita derivato dalle piastrine factor (PDGF)³⁰, il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)³¹, fattore di crescita epatocitario (HGF)³² e membri della famiglia di fattori di crescita epidermico (EGF), in grado di indurre la proliferazione cellulare, la differenziazione e la migrazione di una varietà di tipi cellulari, quali fibroblasti, cellule endoteliali ed epiteliali, che insieme contribuiscono all'effetto rigenerativo in vari organi.

Il tessuto adiposo umano rappresenta una fonte facilmente accessibile di cellule staminali mesenchimali e la sua applicazione è ormai largamente utilizzata nel campo della chirurgia plastica e ricostruttiva, in particolare laddove sia necessario stimolare la produzione di nuovo tessuto per sopperire a perdite di sostanza che coinvolgano epidermide, derma e anche tessuto muscolare, come dopo interventi chirurgici particolarmente demolitivi^{35,65} oppure di fronte a ulcere cutanee post-attiniche³³. In particolare nell'ambito della Chirurgia Toracica l'applicazione di ASC rappresenta uno scenario del tutto nuovo. Sfruttando le capacità rigenerative delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo autologo, si possono stimolare e accelerare i processi di guarigione del parenchima polmonare soprattutto sulle aree di resezione dove è più frequente la formazione di micro fistole alveolo-pleuriche,

potenziali responsabili di complicanze postoperatorie come le perdite aeree prolungate. Le cellule staminali applicate sulle aree di resezione polmonare potrebbero presentare importanti vantaggi clinici: essendo derivati da tessuto autologo, sono prive di tossicità ed escluderebbero possibili reazioni collaterali di natura allergica, inoltre sono completamente riassorbibili nell'arco di pochi giorni e potrebbero sostituire i sigillanti artificiali che, oltre ad avere un costo elevato, non risultano al momento, essere soddisfacenti in termini di risultati a lungo termine. In questo studio sono descritti i risultati di studi preclinici effettuati con modelli in vitro e in vivo per valutare la capacità di riparazione del tessuto adiposo su campioni di parenchima polmonare raccolti da 20 pazienti sottoposti a resezione polmonare (metastasectomia). L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di chiarire l'effetto dei lipoaspirati per accelerare e migliorare i processi di guarigione delle "ferite" a livello del tessuto polmonare al fine di ridurre le perdite aeree dopo resezione del parenchima polmonare. Sono stati utilizzati diversi modelli cellulari tra cui, fibroblasti embrionali e adulti, e cellule epiteliali bronchiali e le loro varianti geneticamente modificate. Per chiarire l'impatto che l'applicazione del lipoaspirato può avere sui meccanismi molecolari che regolano le diverse fasi di ripristino del tessuto abbiamo valutato l'effetto sulla sintesi e sulla deposizione di matrice extracellulare da parte dei fibroblasti, che rappresenta il passaggio critico nella cascata di eventi che portano alla formazione della chiusura della ferita⁶⁶.

Il lavoro di ricerca è rivolto inoltre al chiarimento di alcune importanti criticità sulle cellule di derivazione adiposa. In particolare studi recenti nell'ambito del tumore della mammella e della prostata hanno evidenziato un potenziale effetto oncogenico delle cellule staminali di derivazione adiposa dovuto alla creazione di un microambiente pronò alla progressione tumorale⁴²⁻⁴⁴ di eventuali cellule metastatiche residue nel paziente dopo l'intervento

chirurgico. Infatti, insieme agli adipociti, il tessuto adiposo contiene una miscela complessa di cellule vascolari e stromali denominata frazione stromale-vascolare o SVF⁶⁷, che potrebbe contribuire a creare un microambiente tumorale. Tuttavia questo aspetto rimane controverso in quanto due recenti studi clinici di grandi dimensioni in pazienti con tumore alla mammella trattati con lipofilling, non hanno mostrato aumento del rischio di recidiva locale del tumore o sviluppo di un nuovo tumore dopo iniezione di lipoaspirato^{34,68}.

Il potenziale pro-tumorigenico del tessuto adiposo in quanto fonte di cellule staminali adipose è stato analizzato su un modello di adenocarcinoma polmonare (A549), allestendo dei saggi in vitro e in vivo. Queste cellule, cresciute in un particolare terreno di coltura danno luogo a sfere con proprietà simili a cellule staminali (vengono infatti denominate A549s) e sono altamente tumorigeniche, costituendo un buon modello per lo studio della tumorigenesi in vivo.

Prelievo di tessuto adiposo

I campioni di tessuto adiposo (lipoaspirate, LA) sono stati raccolti da 20 pazienti arruolati in uno studio clinico pilota e sottoposti a metastasectomia polmonare tra marzo e settembre 2010 presso la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori (Milano). I lipoaspirati sono stati ottenuti dallo strato adiposo sottocutaneo durante la toracotomia. Nella fase intra-operatoria, un campione di tessuto adiposo di 40-120cc è stato raccolto con una siringa in aspirazione a bassa pressione. Il campione è stato poi centrifugato a 3000 rpm per 3 minuti per ottenere una separazione di tre strati in base alla densità gradiente: lo strato superiore, contenente le cellule danneggiate del supernatante, il livello intermedio, costituito da tessuto

adiposo concentrato contenente cellule staminali, e uno strato inferiore composto principalmente di componenti del sangue concentrati. All'arrivo in laboratorio, i campioni di tessuto adiposo concentrati sono stati digeriti con collagenasi e la resa cellulare è stata calcolata sulla base del numero di cellule stromali-vascolari ottenuto per millilitro di tessuto biotico. All'interno della frazione stromale-vascolare (SVF) la concentrazione di cellule con proprietà staminali, definite come cellule staminali derivate da tessuto adiposo (ASC), è stato stimato utilizzando la citometria a flusso multi-parametrica. Le ASC sono state caratterizzate mediante l'espressione dei seguenti antigeni di superficie CD45-CD90 + CD73 + CD271 + CD34bright CD146 + / -. Per tre pazienti i lipoaspirati non sono risultati disponibili e in due pazienti la concentrazione di cellule staminali riuscita non si è potuta valutare. Le caratteristiche cliniche dei pazienti e il numero di cellule staminali contenuto nei lipoaspirati sono descritte nella TAB 1. Per gli esperimenti in vivo, i lipoaspirati sono stati diluiti 1:4 con mezzo privo di siero (RPMI), meccanicamente digerito e immediatamente inoculate nei topi.

Per gli esperimenti in vitro i campioni sono stati centrifugati e conservati a -20°C.

Linee cellulari e colture

Le cellule A549 di adenocarcinoma del polmone (American Type Culture Collection, ATCC) sono state propagate in terreno RPMI con 10% siero fetale bovino e trasdotte con un vettore lentivirale carrier di un transgene GFP per ottenere A549-GFP. Le cellule aderenti di A549 sono state piastrate in terreno privo di siero DMEM/F12 (Lonza), integrato con mix di ormone commerciale, B27 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA),

EGF (20 ng / ml, Peprotech CE, London, UK), bFGF (10 ng / ml, Peprotech) ed eparina 2 µg / ml. In queste condizioni sotto lo stimolo di fattori di crescita, le cellule chiamate A549S crescono in sospensione dando luogo a sfere con caratteristiche di staminalità e con elevato potere tumorigenico⁴⁵.

Le cellule epiteliali bronchiali normali - HBEC-KT - sono state immortalizzate con hTERT e CDK4⁶⁹. HBEC-KT e la loro variante non oncogenica geneticamente modificata HBEC-KT p53/KRASG12V⁷⁰ (con down-regolazione di p53 ed espressione esogena di KRAS mutante) sono state coltivate in KSFM media (Invitrogen) con EGF (0,2 ng / ml) e BPE (20 µg / ml). La linea cellulare di fibroblasti WI-38 derivati da cellule embrionali normali (3 mesi di gestazione) di tessuto polmonare, sono state ottenute da ATCC e coltivate in EMEM con 10% di siero fetale bovino. Le linee WI-38 e HBEC-KT sono state entrambe trasdotte con un vettore lentivirale contenente un gene reporter GFP per ottenere i derivati fluorescenti (WI-38-GFP, HBEC-KT-GFP) utilizzati in saggi di “scratch” e studi di proliferazione. Due colture di fibroblasti normali sono state isolate mediante digestione enzimatica con collagenasi dal tessuto polmonare normale dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica e sono state coltivate in terreno RPMI con 10% FBS.

Migrazione cellulare e saggi scratch-wound

Le proprietà chemoattrattive dei lipoaspirati sono state valutate mediante un saggio di migrazione cellulare che utilizza piastre transwell (pori con 8µm di diametro). 1×10^5 cellule (WI-38 o HBEC-KT) è stata seminata nella camera superiore mentre i lipoaspirati provenienti dai diversi pazienti sono stati collocati nel vano inferiore. Dopo 48h i filtri sono

stati rimossi e colorati con DAPI e le cellule migranti sono state contate in tre campi scelti casualmente. Per gli scratch test, i fibroblasti embrionali WI38-GFP o le normali cellule epiteliali bronchiali (HBEC-KT-GFP), sono state seminate in 12 pozzetti e fatte crescere in monostrato. Il monostrato è stato inciso e diviso in due parti con un puntale e lavato con PBS per rimuovere cellule non aderenti. I differenti lipoaspirati sono stati poi aggiunti (1:20 diluizione nel mezzo di coltura) mentre il medium contenente 10% FBS è stato utilizzato come controllo. La larghezza dello scratch-wound è stata stimata con un lettore di micropiastre (Infinite M1000, Tecan) mediante fluorescenza, a 1, 3, 6 giorni dall'allestimento, la chiusura dello scratch come indice della migrazione cellulare.

Real Time PCR

Esperimenti di real time PCR sono stati effettuati su campioni di RNA estratti, sia dai fibroblasti migrati all'interno dello scratch-, sia da quelli rimasti al di fuori del monostrato. Tutte le valutazioni sono state eseguite su un sistema 7900 Sequence Detection GeneAmpR utilizzando TaqMan® technology (Applied Biosystems). Primer e sonde per i geni sono disponibili come Assays-on-Demand. La Real-Time-PCR è stata eseguita in triplice copia in un volume di 20µl e i saggi sono stati ripetuti in diluizioni diverse se necessario.

Due diversi controlli endogeni (HPRT, B2M) sono stati utilizzati come riferimento per normalizzare i campioni differenti e per la quantificazione relativa dell'espressione genica.

I dati sono stati analizzati con il metodo comparativo Ct (Δ Ct).

Saggi di Proliferazione

Le linee cellulari A549-GFP o HBEC-KT-GFP sono state piastrate su piastre di polistirene a 96 pozzetti ($1,0 \times 10^5$ cellule/pozzetto) e poi trattate con diversi lipoaspirati diluiti 1:20 con medium appropriato. La valutazione della cinetica di crescita è stata stimata mediante l'intensità di fluorescenza (eccitazione a 480 nm, rilevamento emissione a 530nm) con un lettore di micropiastre (Infinite M1000, Tecan). La fluorescenza per i diversi campioni è stata misurata nei giorni 1, 3 e 6 del periodo di coltura.

Esperimenti in vivo

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in topi nudi femmina CD-1 o topi SCID, di 7-10 settimane (Charles River Laboratories). I topi sono stati mantenuti in camere a flusso laminare, con temperatura e umidità costante. I topi avevano libero accesso a cibo e acqua. Gli esperimenti sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, secondo le linee guida istituzionali. Iniezioni sottocutanee di 10^4 cellule A549S mescolate con i diversi lipoaspirati previamente digeriti sono state eseguite in entrambi i fianchi su due topi nudi per ottenere quattro misure per gruppo. Le cellule sono state risospese in 50 μ l di medium RPMI privo di siero, e mescolate con 50 μ l di lipoaspirato e 100 μ l di Matrigel™, ed iniettati per via sottocutanea. Le cellule A549S e lipoaspirati puri sono stati risospesi nello stesso volume di RPMI medio e Matrigel™ e sono stati usati come controlli positivi e negativi rispettivamente. I topi sono stati monitorati ogni settimana per 3 mesi per valutare lo sviluppo tumorale, la cui cinetica

di crescita è stata confrontata con quella di noduli tumorali stabilizzati. Il volume del tumore basato su successive misurazioni del calibro dei noduli è stata calcolata con la formula modificata ellissoidale ($\text{Volume del tumore} = 1/2(\text{lunghezza} \times \text{larghezza}^2)$).

Analisi statistica

I dati sono presentati come $\text{media} \pm \text{SD}$. Le medie sono state confrontate con il test t di Student. I valori di probabilità di p inferiori a 0,05 sono stati interpretati per indicare la significatività statistica.

Risultati

1. **Il tessuto adiposo stimola la guarigione delle ferite e la migrazione dei fibroblasti polmonari normali.** Per verificare se il tessuto adiposo ha la capacità di promuovere la riparazione del tessuto polmonare danneggiato abbiamo studiato gli effetti di diversi lipoaspirati sulla migrazione di WI-38 fibroblasti embrionali, trasdotti con un vettore lentivirale contenente il transgene GFP, usando un transwell assay. Le cellule sono state seminate nella camera superiore e campioni di lipoaspirato sono stati utilizzati come fattore chemiotattico nella camera inferiore. Le cellule migrate nella camera inferiore sono state colorate con DAPI e contate (Fig. 1A). Per la maggior parte dei lipoaspirati (6/8, 75%) si è evidenziato a 48 ore un aumento significativo della migrazione rispetto al medium di controllo (Fig. 1B). Per valutare l'effetto di stimolazione dei lipoaspirati sulla migrazione di fibroblasti prelevati dai pazienti arruolati nel protocollo clinico, abbiamo trattato con

lipoaspirati differenti le colture cellulari stabilizzate di fibroblasti polmonari derivati dal tessuto normale di due dei 20 pazienti.

Si è potuto constatare che il tasso di migrazione basale di fibroblasti adulti era inferiore rispetto ai WI-38 (fibroblasti embrionali) e l'aggiunta di lipoaspirati non ha provocato incrementi nella migrazione rispetto al controllo (Fig. 2A, B), suggerendo che l'esposizione al lipoaspirato potrebbe essere più efficace nell'indurre la migrazione di cellule dotate di maggiore potenziale rigenerativo come ad esempio cellule progenitrici tessuto-specifiche (fibroblasti embrionali WI-38) piuttosto che di fibroblasti adulti maturi. In effetti, il confronto diretto in termini di espressione dei geni correlati alle caratteristiche di staminalità (NANOG, OCT-4, FN1, vimentina) ha confermato che WI-38 sotto il profilo trascrizionale è più simile a cellule staminali mesenchimali rispetto ai fibroblasti adulti (dati non riportati). Inoltre poiché la migrazione gioca un ruolo essenziale nella guarigione delle ferite, abbiamo anche effettuato degli scratch-test per determinare la capacità dei lipoaspirati di stimolare la chiusura della ferita da parte dei fibroblasti WI-38-GFP. Cinque su sette (71%) campioni di lipoaspirati erano in grado di indurre la chiusura della ferita più efficacemente rispetto ai controlli, indicando un effetto positivo sulla capacità di riparazione della ferita. L'accelerazione dei tempi di chiusura dello scratch era già osservato a 1 giorno post-trattamento e persisteva a 3 e 6 giorni (Fig. 3, Panel A, B). Infine, un leggero aumento, ma non significativo, del tasso di proliferazione di WI-38-GFP è stato rilevato nella maggior parte dei campioni, a supporto ulteriore dell'ipotesi secondo cui il tessuto adiposo e le cellule staminali in esso contenute possano potenzialmente giocare un ruolo nella stimolazione della proliferazione delle cellule progenitrici nel sito del tessuto danneggiato

(Fig. 4). È interessante notare che nel complesso non è stata trovata alcuna correlazione tra effetto dei lipoaspirati e la quantità di cellule staminali mesenchimali (dati non mostrati).

2. **Il tessuto adiposo stimola la migrazione dei fibroblasti polmonari con aumentata espressione di componenti della matrice extracellulare.** Per chiarire meglio l'effetto sulla chiusura delle ferite, abbiamo valutato la modulazione, indotta dal lipoaspirato, dell'espressione di geni correlati alla matrice extracellulare sui fibroblasti migrati nella zona ferita rispetto ai fibroblasti rimasti al di fuori di tale zona. A questo scopo è stato eseguito uno scratch test su cellule di fibroblasti WI-38 dopo trattamento con lipoaspirato o medium di controllo. Le cellule migrate all'interno dello scratch e le cellule rimaste fuori sono state raccolte separatamente e mediante Real Time PCR è stato valutato il livello di espressione di componenti della matrice extracellulare, come il collagene 1, la fibronectina o le fibre componenti elastina (elastina, fibrillina, fibulin). I livelli di espressione di questi geni, sono stati analizzati confrontando i due gruppi di fibroblasti migrati e non migrati. L'analisi ha evidenziato che 7/10 (70%) geni associati della matrice extracellulare erano differenzialmente espressi. In particolare i fibroblasti migrati hanno mostrato alti livelli di espressione di FN1 ($p = 0.006$), FBN1 ($p = 0,0004$), FBNL1 ($P = 0.04$), FBNL5 ($p = 0.002$), ITG-4 ($p = 0.01$), ITG-6 ($p = 0.01$), ELN ($p = 0,003$) (Fig. 5). Questo fenotipo attivato è stato anche osservato anche nel campione di cellule trattate con il medium di controllo, mche erano tuttavia in numero significativamente inferiore rispetto al campione di cellule trattate con il lipoaspirato (Fig. 3). Questi risultati indicano quindi che l'esposizione al lipoaspirato ha un effetto di marcata induzione sulla migrazione dei fibroblasti con capacità di sintesi di componenti della matrice extracellulare.

3. **Il tessuto adiposo aumenta la proliferazione delle normali cellule epiteliali bronchiali.** Un' interazione coordinata e regolata tra le cellule epiteliali e cellule mesenchimali dovrebbe essere richiesta per l'attivazione del processo di riparazione del polmone danneggiato. Per determinare se l'esposizione al lipoaspirato ha un effetto positivo anche sulla migrazione delle cellule epiteliali verso la zona danneggiata, abbiamo eseguito uno scratch test, utilizzando come substrato le linee di cellule epiteliali bronchiali HBEC-KT-GFP (HBEC-1) e HBEC-KT-p53-/KRASG12V-GFP (HBEC-6). Dopo il trattamento con lipoaspirato i monostrati cellulari "hanno chiuso la ferita" riempiendo lo spazio dello scratch, nell'arco di 24-72h.

Tuttavia, la maggior parte dei lipoaspirati(4/5, 80%) ha incrementato soltanto lievemente il tasso di migrazione di entrambe le linee cellulari epiteliali HBEC-KT-GFP e HBEC-KT-p53-/ KRASG12V-GFP rispetto ai campioni di controllo (Fig. 6A). Viceversa, il tasso di proliferazione delle cellule HBEC-KT-GFP e la loro variante era significativamente aumentato dopo l'esposizione a tutti campioni di lipoaspirato (7/7) (Fig. 6B).

4. **I lipoaspirati non influenzano la proliferazione cellulare in vitro e la crescita tumorale in vivo della linea cellulare di tumore polmonare A549** Per valutare se il trattamento con lipoaspirati in vitro associato ad un aumento del potenziale di proliferazione delle cellule tumorali, il modello cellulare di adenocarcinoma polmonare A549-GFP è stato trattato con i diversi campioni di lipoaspirato per 1 settimana e la cinetica di crescita è stata valutata a 1, 3 e 6 giorni. I risultati dei test condotti hanno evidenziato che la maggior parte dei lipoaspirati (7/9, 77%) non ha aumentato il tasso di

proliferazione delle cellule A549-GFP (Fig. 7A) rispetto al tasso di crescita delle cellule trattate con solo terreno di controllo.

Per valutare se i lipoaspirati favoriscono la crescita tumorale in vivo, 10^4 cellule A549S sole (controllo) e in combinazione con lipoaspirati con un volume 1:1 sono state inoculate per via sottocutanea (sc) in topi nudi. I campioni di lipoaspirato da solo sono stati usati come controlli negativi. testato sono stati testati 10 campioni di lipoaspirato prelevato dai pazienti. Nessuno dei topi sottoposto al co-inoculo di A549 e lipoaspirati (0/10), ha mostrato un aumento delle dimensioni tumorali rispetto ai controlli con le sole A549s (Fig. 7B); queste osservazioni suggeriscono che il trattamento con tessuto adiposo autologo non favorisce l'attecchimento e/o la progressione delle cellule tumorali in vivo.

Conclusioni

Il tessuto adiposo è considerato una fonte abbondante e facilmente accessibile di cellule staminali mesenchimali autologhe la cui capacità rigenerativa è stata dimostrata in diversi campi della medicina⁷¹. Anche se le applicazioni cliniche in chirurgia toracica sono limitate, l'uso di tessuto adiposo contenente cellule staminali mesenchimali potrebbe aprire nuove prospettive per la riparazione tissutale con l'obiettivo di evitare le complicanze postoperatorie dopo resezione polmonare.

Il presente studio⁷² è stato progettato per supportare, attraverso modelli in vivo e in vitro, il potenziale uso clinico del tessuto adiposo per migliorare la cicatrizzazione della superficie del parenchima dopo metastasectomia chiarendo il possibile effetto pro-oncogeno del tessuto adiposo su cellule tumorali residue nell'area di resezione.

Nella valutazione del ruolo delle cellule staminali mesenchimali, usato sono stati utilizzati in tutti gli esperimenti integralmente i campioni di lipoaspirato, senza purificazione delle frazioni di cellule adipose. Per studiare il meccanismo di riparazione dopo aver allestito il modello di scratch wound utilizzato sono stati utilizzati diversi modelli cellulari come fibroblasti embrionali, colture di fibroblasti normali adulti prelevati dai pazienti e linee di cellule epiteliali bronchiali che ci hanno permesso di mostrare il coinvolgimento di diversi tipi di linee cellulari nel processo di riparazione. E' stato osservato che che il trattamento con i diversi lipoaspirati ha un effetto nella promozione della migrazione di fibroblasti polmonari. I risultati dei saggi di migrazione in piastre transwell hanno mostrato che il numero di fibroblasti che migrano attraverso le membrane è aumentato nei saggi trattati con lipoaspirato, a testimonianza del fatto che è presente uno stimolo chemoattraente. È interessante notare che non e' stata osservata alcuna correlazione tra l'effetto biologico del lipoaspirato e la quantità di cellule staminali derivate dal tessuto adiposo, suggerendo che il meccanismo di riparazione non è legato ai componenti cellulari del lipoaspirato ma è associato ad un'interazione tra lipoaspirato e fibroblasti residenti o, ancora più importante, per il reclutamento di progenitori dal midollo osseo. Lo scratch wound test ha mostrato una più efficiente attività di chiusura della ferita da parte dei fibroblasti embrionali nei rispetto alle cellule epiteliali normali HBEC KT. Tuttavia, cellule epiteliali bronchiali proliferazione proliferavano maggiormente dopo trattamento con i lipoaspirati rispetto ai fibroblasti. Questi risultati suggeriscono che l'attivazione dei fibroblasti può verificarsi nelle prime fasi dopo la lesione polmonare, mentre la proliferazione della popolazione di cellule epiteliali potrebbe essere più rilevante in una fase successiva di ripopolamento e rimodellamento dei tessuti. Si e' riusciti inoltre a dimostrare che che i geni associati alla matrice extracellulare,

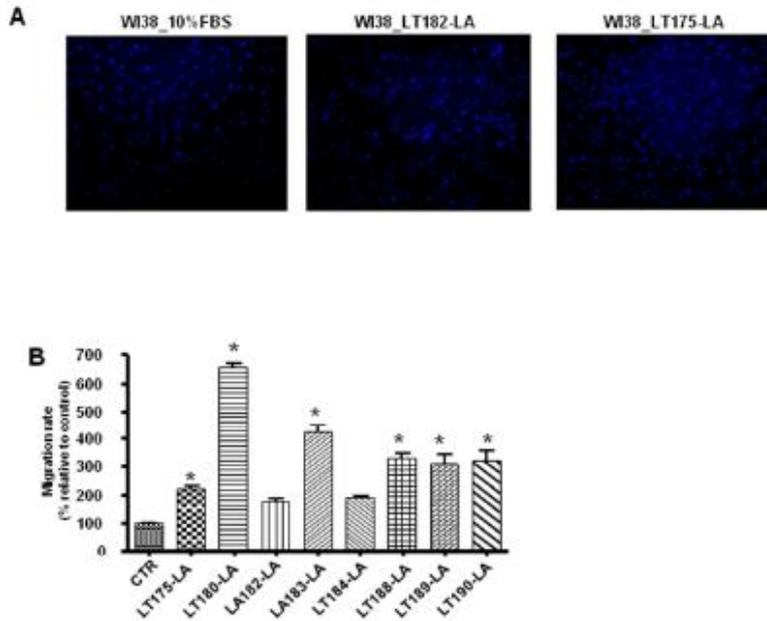
come fibronectina, collagene, fibulina, fibrillina ed elastina sono stati altamente espressi nei fibroblasti migrati rispetto ai fibroblasti non migrati, suggerendo che il lipoaspirato stimola il rimodellamento della matrice extracellulare.

Come già dimostrato in altri contesti biologici^{73,74}, le cellule progenitrici (i.e.WI-38) potrebbero essere il tipo cellulare più coinvolto nel meccanismo di riparazione. Infatti, la migrazione indotta dal lipoaspirato nei fibroblasti normali adulti non è stata così efficiente come quella osservata nei fibroblasti embrionali. Inoltre, la stimolazione alla proliferazione delle cellule epiteliali bronchiali HBEC-KT, potrebbe essere correlato alla espressione di p63, una proteina p53-omologa essenziale per il processo di rigenerazione epiteliale⁶⁹.

Nonostante vi siano molti lavori in letteratura che dimostrano che le cellule staminali adipose potrebbero creare un microambiente incline a favorire la crescita di cellule tumorali^{42,75,76}, non esistono studi sull'attività biologica del tessuto adiposo utilizzato per intero. Testare se il tessuto adiposo è conduttivo per l'espressione del potenziale neoplastico da cellule tumorali residue è particolarmente rilevante nel contesto delle resezioni polmonari per cancro del polmone⁴²⁻⁴⁴. A questo scopo è stato utilizzato un modello originale di cellule di adenocarcinoma del polmone che sono sensibili agli effetti pro-tumorigenici di linee cellulari primarie di fibroblasti isolati da pazienti affetti da tumore ai polmoni quando co-iniettata a basse dosi in topi nudi. In questo studio i campioni di lipoaspirato intero ottenuti da dieci pazienti, co-iniettati in topi nudi con queste cellule di adenocarcinoma polmonare non hanno mostrato alcuna stimolazione della crescita tumorale. Saranno necessari ulteriori studi clinici per confermare la sicurezza e l'efficacia dei meccanismi rigenerativi delle cellule staminali adipose nelle resezioni polmonari, tuttavia nell'insieme questi risultati forniscono delle prove per valutare l'attività biologica del tessuto adiposo

nell'induzione della riparazione dei tessuti del polmone mediante modelli cellulari diversi senza promuovere la proliferazione tumorale in vitro e la cancerogenesi in vivo, e convincono a sostenere che è possibile percorrere la strada di un potenziale uso clinico in chirurgia toracica.

Figure 1



254x190mm (96 x 96 DPI)

Figura 1. Fibroblasti embrionali WI-38 trattati con lipoaspirato mostrano un maggiore potenziale di migrazione in vitro.

Panel A. Esempi di colorazione con DAPI di cellule migrate. Il numero di cellule aderenti sulle membrane è rappresentato nel grafico.

Panel B. migrazione di fibroblasti embrionali WI-38 trattati con lipoaspirati diversi. Un numero elevato (* $p < 0,05$) di cellule migrano attraverso le membrane transwell a 48h in 6 su 8 dei lipoaspirati testati, rispetto al gruppo di controllo. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte.

Figure 2

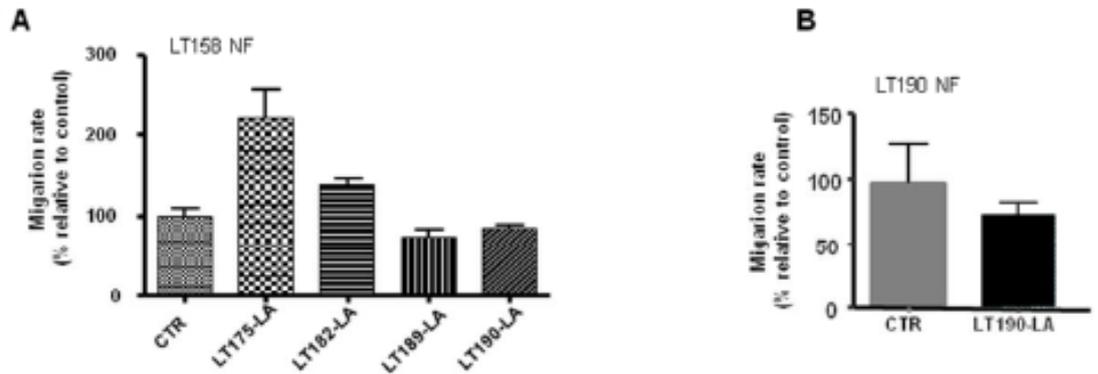


Figura 2. Fibroblasti adulti normali non sono sensibili ai lipoaspirati.

Trattamento con lipoaspirato di due linee cellulari normali fibroblasti isolati da due pazienti (LT158NF, LT190NF).

Panel A. Due serie di esperimenti in cui è stata trattata la stessa linea cellulare (LT158NF) con lipoaspirati diversi. In questo caso non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra i campioni e il controllo.

Panel B. Una normale linea cellulare di fibroblasti (LT190NF) trattati con lipoaspirato autologo non ha mostrato una differenza significativa tra controllo e cellule trattate.

Figure 3

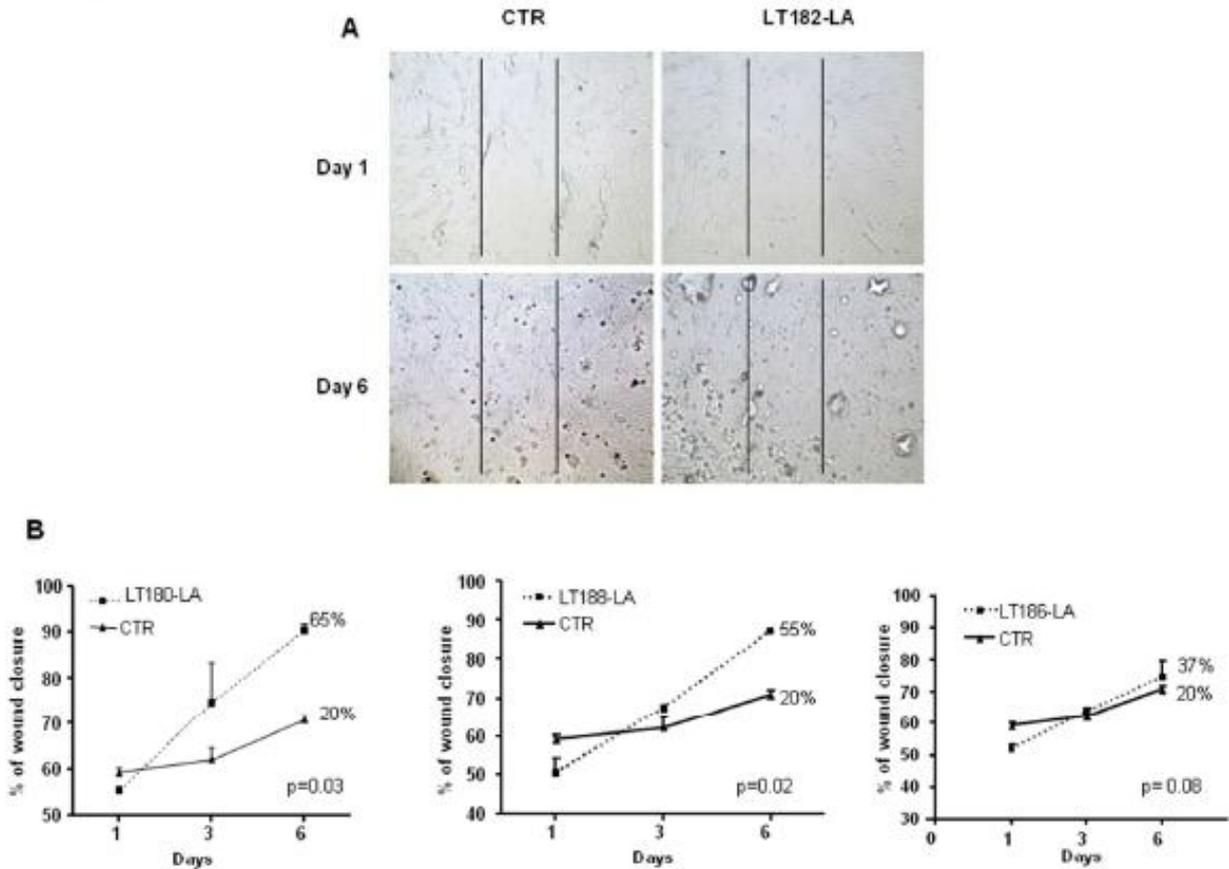


Figura 3. L'esposizione al lipoaspirato di fibroblasti WI38-GFP aumenta il tasso di guarigione delle ferite.

Panel A. Immagini a contrasto di fase del test di scratch in cellule trattate con lipoaspirato e nel saggio di controllo al giorno 1 e al giorno 6.

Panel B. Scratch wound test e valutazione della chiusura della ferita dopo trattamento con lipoaspirato o solo terreno. La maggior parte dei lipoaspirati (5/7) induce una percentuale significativamente maggiore di chiusura della ferita rispetto al solo terreno. Esempi rappresentativi di aumento (pannello di sinistra e centrale) o di stabilità (pannello di destra) del tasso di chiusura sono indicati.

Figure 4

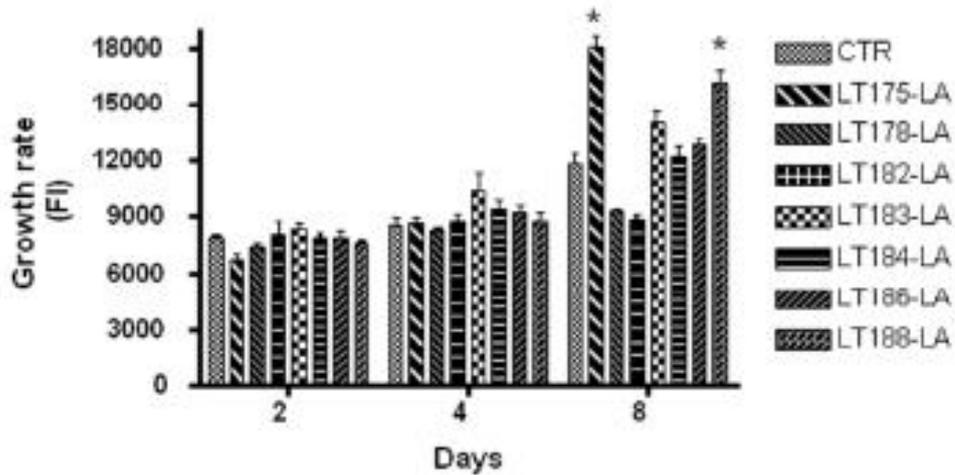


Figura 4. I lipoaspirati inducono un leggero aumento del tasso di proliferazione delle linee cellulari WI-38.

Risultati del test di proliferazione in WI-38 linea di cellule GFP trattati con diversi lipoaspirati.

Nessuna differenza significativa tra cellule trattate con lipoaspirati e controlli è stato osservato, ad eccezione di due campioni (LT175-LA, LT188-LA) valutati dopo giorni 2, 4 e 8. Il tasso di crescita è espresso come misura dell'intensità di fluorescenza (FI).

Figure 5

A

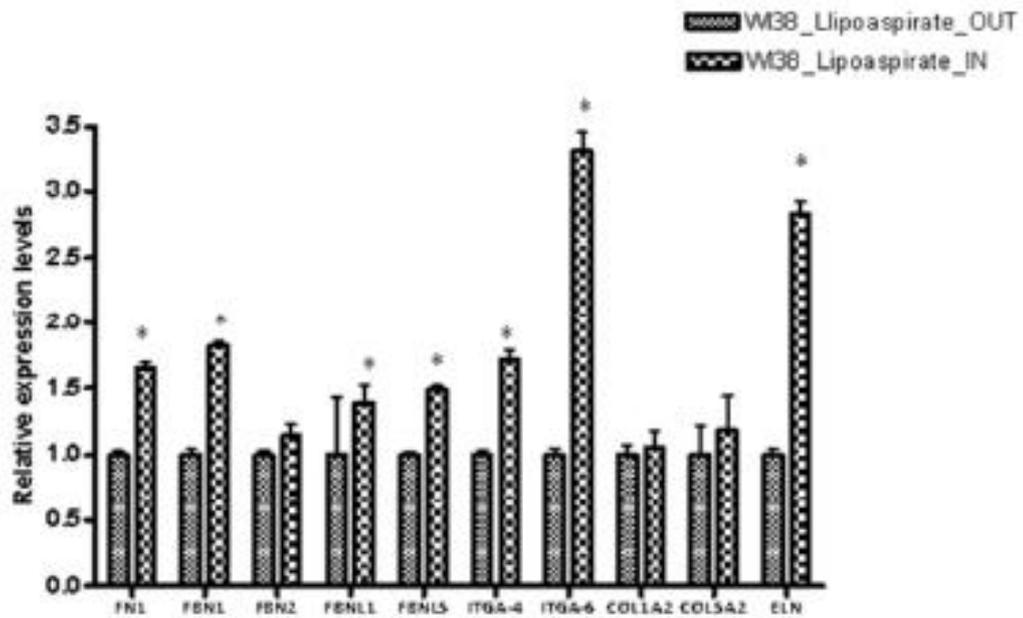


Figura 5. L'espressione dei geni della matrice extracellulare correlate in fibroblasti migrati.

Livelli di espressione di un sottoinsieme di geni della matrice extracellulare in fibroblasti migrati nella zona ferita rispetto fibroblasti fuori la ferita. * $p < 0,05$ per le differenze tra i due gruppi

Figure 6

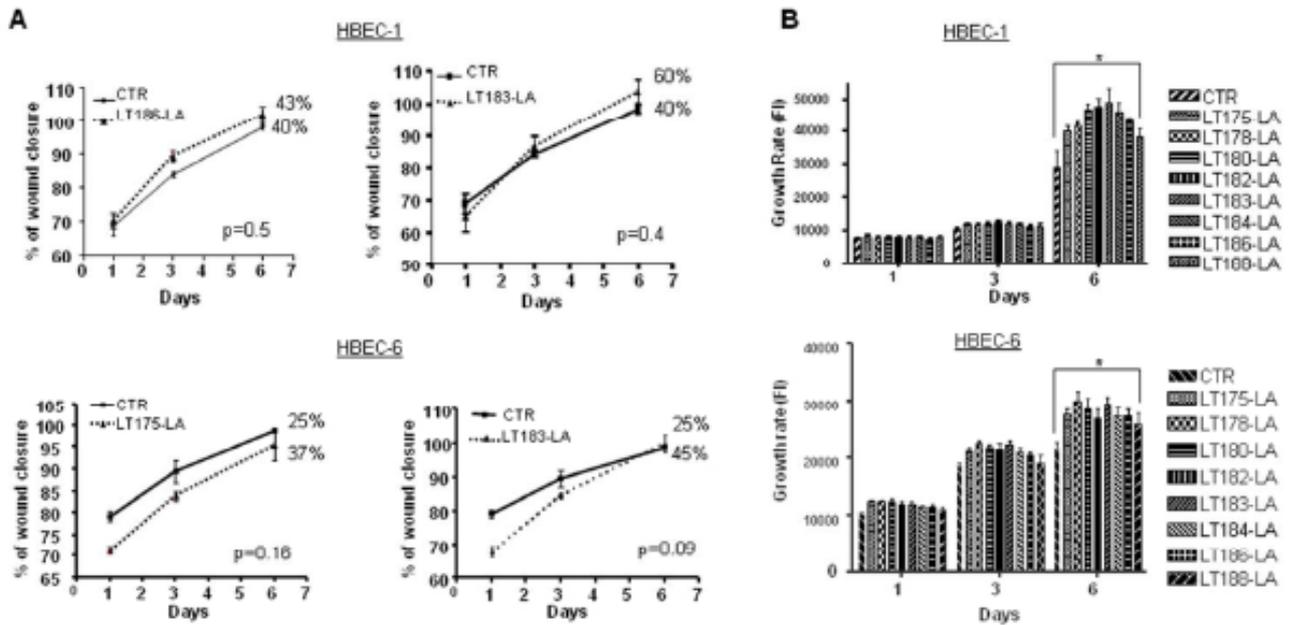


Figura 6. I lipoaspirati aumentano la proliferazione di cellule epiteliali bronchiali normali senza alterare in modo significativo la chiusura della ferita.

Panel A. Esposizione al lipoaspirato induce un lieve ma non significativo aumento del tasso di migrazione su normali cellule epiteliali bronchiali rispetto al controllo.

Panel B. Significativo aumento della velocità di proliferazione dopo l'esposizione con lipoaspirato rispetto al controllo rappresentato dal trattamento con solo terreno. Il numero di cellule proliferanti è stato valutato con un lettore di micro piastre a fluorescenza ed è espresso come intensità di fluorescenza (FI). Gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte.

Figure 7

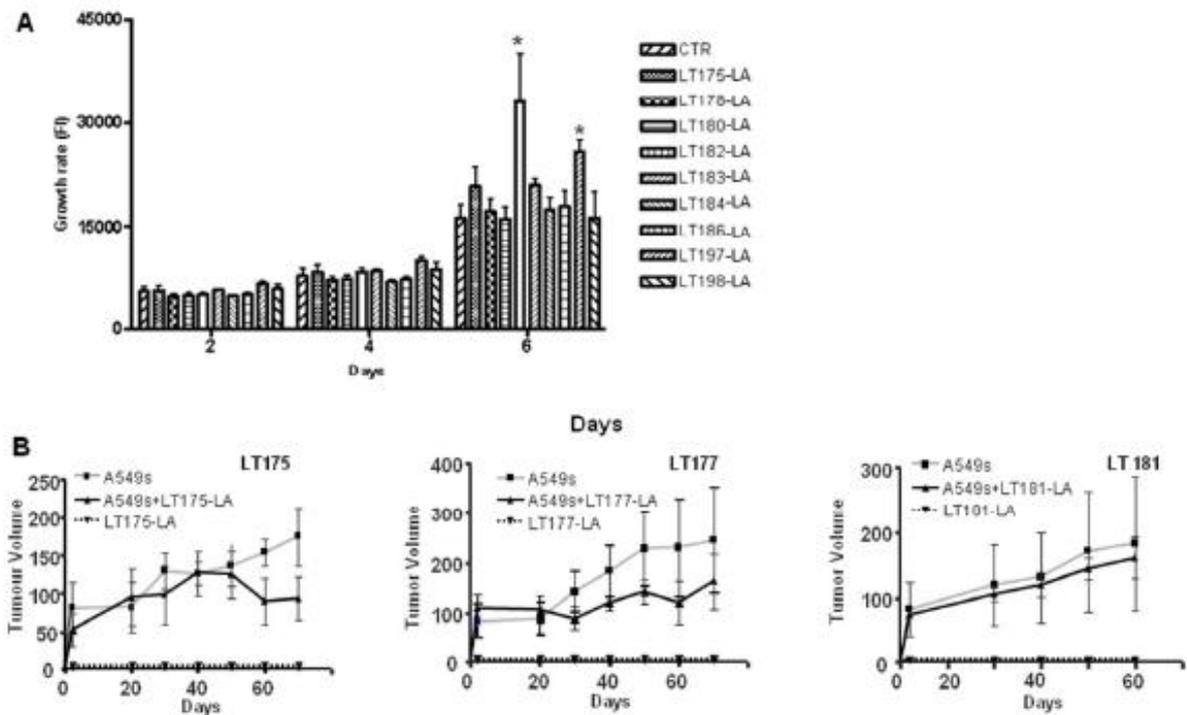


Figura 7. I lipoaspirati non promuovono la proliferazione in vitro e la crescita tumorale in vivo su cellule polmonari tumorali A549.

Panel A. Analisi del tasso di proliferazione della linea cellulare di adenocarcinoma polmonare A549-GFP dopo esposizione ai lipoaspirati per 6 giorni. Non vi è alcuna differenza statistica tra cellule trattate con lipoaspirati ad eccezione di due campioni (LT182 e LT197-LA * $p < 0,05$).

Panel B. La crescita tumorale a tempi diversi dopo il co-inoculo di 10^4 cellule tumorali con lo stesso volume di lipoaspirato intero. Controllo positivo e controllo negativo sono rappresentati dalla linea cellulare A549s o lipoaspirato iniettato da solo. Non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra il gruppo di controllo e i campioni co-inoculati.

Applicazione Clinica

Introduzione

La metastasectomia polmonare rappresenta circa il 10% delle resezioni polmonari per malignità e la resezione atipica effettuata con suturatrici meccaniche è la procedura più frequente (>80%)⁷⁷. Questo tipo di procedura, quando eseguita in modo reiterato per rimuovere lesioni multiple può causare gravi distorsioni del polmone residuo. È stato calcolato che il danno funzionale dopo tre resezioni atipiche è l'equivalente di una lobectomia⁷⁸. Questo aspetto appare più rilevante se le lesioni sono multiple, di grandi dimensioni e situate in profondità nel parenchima polmonare.

Al fine di preservare il tessuto polmonare sano, da oltre trenta anni, la resezione di precisione con elettrobisturi è stata ampiamente utilizzata^{79,80}. Tuttavia negli ultimi anni, la resezione laser è stata proposta come una valida opzione per la metastasectomia polmonare^{81,82}. Dalle prime esperienze con apparecchiature di 1,0 micron di lunghezza d'onda, oggi, i laser con lunghezza d'onda di 1,3 micron rappresentano la prima scelta per il 12,3% dei chirurghi toracici⁷⁷, anche se per sigillare il tessuto polmonare, la tecnica standard ha ancora bisogno di un sutura parenchimale aggiuntiva⁸³⁻⁸⁷. Oggi, i nuovi laser con lunghezza d'onda di 2,0 micron ad emissione continua, riducono la penetrazione dell'energia in modo da limitare il danno nel tessuto circostante la resezione, come dimostrato dai

risultati preliminari in neuroendoscopia e urologia^{46,47}, e promettono di migliorare la precisione dell'aerostasi e dell'emostasi⁴⁸. Nonostante questi vantaggi, le metastasectomie complesse, eseguite per rimuovere le lesioni più grandi e più profonde, possono lasciare delle cavità parenchimali, causando febbre e altre complicazioni infiammatorie.

Per questo abbiamo associato una tecnica per accelerare la guarigione dei tessuti, sfruttando le capacità rigenerative delle cellule staminali derivate da tessuto adiposo autologo. I benefici sulla guarigione delle ferite e sulla modulazione della risposta infiammatoria da parte delle cellule staminali sono stati ampiamente dimostrati, ma la loro efficacia rimane non testata in Chirurgia Toracica nella riparazione del polmone umano⁶³⁻⁶⁶.

Lo scopo dello studio è quello di analizzare la fattibilità della combinazione di laser di nuova generazione con le cellule staminali autologhe prelevate a livello della toracotomia, con l'obiettivo di evitare distorsioni del parenchima preservando la funzionalità polmonare dopo metastasectomia. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base del tipo di procedura; i soggetti sottoposti a metastectomia semplice o complessa sono stati confrontati in termini di incidenza di complicanze postoperatorie e di variazione della funzione polmonare pre- e postoperatoria.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio

Questo protocollo è stato approvato dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS dell'Istituto Nazionale dei Tumori. Lo studio è stato progettato per arruolare 20 metastasectomie polmonari eseguite con Laser Thulium (Quanta System, Solbiate Olona,

Italia) in pazienti consecutivi, associate all'applicazione intraoperatoria, sulle aree di resezione, di cellule staminali ottenute da tessuto adiposo prelevato dalla toracotomia.

I pazienti sono stati divisi in due gruppi identificando metastasectomie semplici e complesse; la complessità della procedura è stata definita secondo i seguenti parametri:

- Numero di lesioni maggiore di 10
- Diametro massimo di almeno un nodulo maggiore di 3cm
- Profondità massima intraparenchimale di almeno un nodulo maggiore di 3cm

Tali parametri clinici sono stati identificati sulla TC preoperatoria con il polmone completamente inflato (Fig.1). In presenza di lesioni multiple, il diametro massimo considerato è stato misurato sulla lesione di maggiori dimensioni. La profondità massima all'interno del parenchima polmonare è stata calcolata dalla superficie polmonare al margine interno del nodulo. I risultati in termini di out come postoperatori sono stati poi confrontati tra i gruppi. I criteri di inclusione sono stati: assenza di recidiva sul sito primario, mancanza di altri siti metastatici, resecabilità della malattia polmonare, paziente di età ≤ 80 anni, funzione cardiopolmonare permissiva per chirurgia e per il tipo di approccio chirurgico (toracotomia). I pazienti con storia documentata di alterata funzionalità renale o epatica, diabete non controllato, sistema immunitario compromesso o con infezione attiva, terapia steroidea cronica (più di 4 settimane), e soggetti non in grado di rispettare i requisiti di studio o programmare il follow-up, sono stati esclusi dalla sperimentazione.

End-point dello studio

I principali end-point dello studio erano: 1) la fattibilità di metastasectomia polmonare mediante laser Thulium (2010nm), 2) incidenza tra i gruppi di perdite aeree postoperatorie prolungate (>7 giorni) 3) fattibilità del prelievo di cellule staminali a livello della toracotomia sulla base del conteggio delle cellule staminali presenti nel lipoaspirato e 4) confronto sull'impatto di questo tipo di procedura sulla funzionalità polmonare come indice della compromissione parenchimale. I parametri di funzionalità polmonare considerati sono stati FEV1% e FEV1/FVC pre-operatoria e post-operatoria. La sicurezza della procedura chirurgica di metastasectomia polmonare con Laser Thulium è stata analizzata in funzione dell'incidenza di eventi avversi durante la degenza post-operatoria. L'efficacia della procedura è stata misurata in termini di incidenza di perdite aeree postoperatorie prolungate (>7 giorni), sulla base dell'utilizzo della valvola di Heimlich e di tutti gli eventi avversi che si sono verificati durante il decorso post-operatorio.

Prelievo di cellule staminali

Il prelievo di cellule staminali, con il paziente in anestesia generale, è stato effettuato in tutti i casi a livello della toracotomia dallo strato sottocutaneo del bordo superiore e inferiore dell'incisione toracica (Fig. 2). Il campione di tessuto adiposo è stato raccolto con una siringa mantenuta in aspirazione a bassa pressione, ottenendo un prelievo medio di 60-80cc, quindi è stato centrifugato a 3000 rpm per 3 minuti (Fig. 3), per separare gli elementi in tre livelli, a seconda delle loro gradiente di densità: le cellule danneggiate nel liquido

sovranatante al livello superiore, la frazione di lipocentrifugato contenente le cellule staminali a livello intermedio, i componenti del sangue sul fondo della provetta (Fig. 4). La concentrazione delle cellule staminali mesenchimali è stata misurata da una piccola aliquota di lipoaspirato.

Il conteggio delle cellule staminali

Per l'analisi delle cellule adipose stromali, i lipoaspirati sono stati lavati tre volte con tampone fosfato isotonic (PBS) e sospesi in un volume uguale di PBS pre-riscaldato a 37°C supplementato con 1% di siero bovino e 0,1% di collagenasi di tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood , NJ, <http://www.worthington-biochem.com>). I tessuti sono stati posti a bagno a 37 ° C in agitazione continua per 120 minuti e centrifugati a 400 g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante, contenente adipociti maturi, lipidi e del mezzo di digestione, è stato rimosso lasciando un pellet di frazione stromale vascolare (SVF). La vitalità delle cellule è stata valutata utilizzando il test di esclusione con trypan blue. Le cellule vitali di maggiori dimensioni con morfologia irregolare sono stati contati, utilizzando la microscopia ottica. Sospensioni monocellulari di cellule derivate dalla SVF isolata da tessuto adiposo sono state caratterizzate a seconda del fenotipo mediante fluorescenza (FACS; analizzatore MACSQuant, Miltenyi Biotec). Le cellule sono state lavate in tampone FACS (PBS contenente 1% BSA e sodio azide 0,05%) ed almeno 1×10^5 cellule per campione sono state incubate in ghiaccio e coniugate ad anticorpi monoclonali (mAb) in tampone FACS a diluizione adeguata. Le frequenze delle differenti popolazioni (fig. 1) in SVF sono state valutate utilizzando le seguenti combinazioni di anticorpi

monoclonali: CD45-CD34 + CD105 + CD73 + CD90 + CD146 + per le cellule staminali mesenchimali, CD31 + CD146 + CD34bright per le cellule endoteliali, CD45-CD34 CD31-CD133-CD146 + per le cellule perivascolari. La contaminazione dei linfociti è stata valutata individuando fra le cellule trattate quelle che esprimono basso side scatter (SSC) e un alto livello di antigene CD45⁸⁸⁻⁹⁵.

Procedura chirurgica e gestione post-operatoria

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a metastasectomia polmonare mediante accesso toracotomico laterale total muscle sparing.

Dopo una accurata palpazione del parenchima, la metastasectomia polmonare è stata eseguita su polmone collassato mediante fotocoagulazione laser applicata con fibra di 600µm di calibro con una potenza da 60 a 80 Watt (Fig. 5). Al termine della procedura, la perdita aerea intraoperatoria è stata misurata usando il test di immersione a un livello di pressione di inflazione di 20-25cmH₂O. In tutte le venti procedure, le cellule staminali sono state applicate su aree di resezione laser, diffondendo il centrifugato adiposo sul parenchima dopo controllo dell'emostasi (Fig. 6). Prima di chiudere il torace sono stati posizionati due drenaggi pleurici collegati ad un sistema di raccolta digitale per monitorare le perdite di aria postoperatorie. I drenaggi sono stati rimossi in sequenza quando il volume di perdite liquide era inferiore a 200ml/die e in assenza di perdita d'aria da almeno 24 ore.

Analisi statistica

Le differenze cliniche (età, sesso, fumo, funzione respiratoria, la chemioterapia preoperatoria, comorbidità) e chirurgiche (numero e la profondità dei noduli asportati, tempo di funzionamento, potenza laser) fra i gruppi sono state analizzate con il test t di Student per le variabili continue e Chi square test per le variabili categoriali. Gli outcome postoperatori di entrambi i gruppi sono stati confrontati in termini di eventi avversi complessivi, complicazioni correlate alle perdite aeree (perdite d'aria prolungate, dimissioni con valvola di Heimlich), e di eventi avversi locali a livello del sito di raccolta (infezione, ematoma, diastasi). Le differenze sono state considerate significative per $p < 0,05$.

Follow-up

In caso di eventi avversi dopo la dimissione, i pazienti sono stati invitati a contattare immediatamente il chirurgo toracico in servizio e sono stati poi valutati in regime d'urgenza. In caso di eventi avversi minori, i pazienti sono stati invitati a informare i ricercatori per telefono e la visita di follow-up è stata anticipata in caso di necessità. Un mese dopo la dimissione, tutti i pazienti di entrambi i gruppi sono stati valutati ambulatorialmente con un esame clinico, radiografia del torace e spirometria. In occasione della visita ambulatoriale, piccole manifestazioni locali e sistemiche avverse verificatesi tra la dimissione e il follow-up sono state discusse con il paziente.

Risultati

Popolazione

Da marzo a settembre 2010, 27 pazienti consecutivi erano eleggibili per lo studio considerato. Otto di loro sono stati esclusi alla registrazione di protocollo (2 casi), per terapia immunosoppressiva per trapianto di fegato (1 caso) e per scarsa compliance a rispettare il follow-up programmato (2 casi). Due pazienti sono stati esclusi perché il loro tessuto adiposo sottocutaneo non era sufficiente per la raccolta e un paziente è stato escluso a causa di diagnosi intraoperatoria di tumore primitivo polmonare. Al termine della fase di reclutamento, la popolazione in studio era composta di 20 metastasectomie polmonari in 19 pazienti. Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riportati nella tabella 1. Tra questi pazienti, 11 sono stati sottoposti a chemioterapia adiuvante dopo resezione del tumore primitivo e in 5 è stata eseguita una seconda linea di chemioterapia dopo la ricorrenza polmonare. Secondo i parametri individuati, le metastasectomie semplici e complesse sono state definite per 9 e 11 casi rispettivamente. Il gruppo delle metastasectomie complesse è risultato composto da sei pazienti per una caratteristica: profondità (4 casi), diametro (1 caso) e numero di lesioni (1 caso con 12 noduli). Cinque pazienti sono stati assegnati al gruppo metastasectomia complesso per due caratteristiche: la profondità ed il diametro delle lesioni (Tabella 2).

Dati intraoperatori

Nessuna complicanza intraoperatoria è stata registrata. Un totale di 72 lesioni sono state rimosse, mantenendo un margine minimo di 3mm dal tumore in tutti i casi.

In un paziente, la metastasectomia ha richiesto la resezione parziale del diaframma, chiuso con sutura diretta. In nessun caso sono state utilizzate suture meccaniche.

Differenze significative tra i gruppi sono stati trovati in termini di emissione di energia laser ($p = 0,04$) e di tempo effettivo di emissione laser ($p = 0,01$). Al momento della riespansione polmonare al termine dell'intervento, prima dell'aspirazione del lipocentrifugato, in nessuno dei due gruppi sono state osservate perdite aeree di tipo III secondo la scala di Macchiarini. In quei casi che hanno mostrato perdite aeree intraoperatorie derivanti dalle aree di resezione laser, è stata effettuata una fotocoagulazione laser supplementare. Non è stato utilizzato alcun patch sigillante o colla adesiva.

Il tessuto adiposo è stato raccolto in tutti i pazienti e il prelievo ha richiesto un tempo medio di 35 minuti (range 25-50). Le procedure di prelievo, centrifugazione e separazione sono state completate in 20-50 minuti in contemporanea con l'intervento chirurgico. Il valore mediano dell'aliquota di lipoaspirato è stato di 70 cc prima della centrifugazione e 32,2 cc dopo la centrifugazione (2.17:1 ratio). Il tempo medio globale dell'intervento è risultato di 118 minuti (range 55-160).

Outcome postoperatorio

Nessuna morte postoperatoria è stata registrata. La degenza media è stata di 5 giorni nel gruppo di metastasectomie semplici e 6 giorni nel gruppo di metastasectomie complesse (p 0,07). I risultati postoperatori sono mostrati nella Tabella 4.

Dopo metastasectomia complessa 4 pazienti hanno sviluppato perdite aeree prolungate. In un paziente il drenaggio pleurico è stato rimosso in POD 13 e 3 pazienti sono stati dimessi con il tubo toracico collegato alla valvola di Heimlich. Un chilotorace è stato registrato dopo la dissezione linfonodale in un tumore delle cellule germinali. Un caso di ematoma della parete toracica è stato osservato a livello del sito di raccolta e trattato in modo conservativo. Due soggetti con febbre sono stati trattati con terapia antibiotica, senza alcun ulteriore segno di infezione sistemica o locale.

La funzione polmonare post-operatoria è stata confrontata tra i gruppi, per mezzo di una spirometria ripetuta a 30 giorni dall'intervento chirurgico. Nessuna riduzione in termini di funzione polmonare tra i due gruppi ($p = 0,78\%$ $\Delta FEV1$, $\Delta FEV1/FVC$ $p = 0.39$) è stata rilevata prima e dopo l'intervento chirurgico.

Le cellule staminali: caratterizzazione e conteggio

I lipoaspirati sono stati elaborati con la digestione collagenasi di tipo I e centrifugazione differenziale per l'isolamento di frazione stromale vascolare (SVF), su cui è stata effettuata l'analisi dei flussi citometria. Dai centrifugati adiposi appena raccolti, la conta delle cellule

ha rivelato una mediana di 0.9×10^6 /ml di cellule vitali, (range 0,05-2,2). Il valore percentuale mediano di cellule staminali mesenchimali, cellule endoteliali e cellule perivascolari rilevato mediante citometria di flusso è stato di 1,3%, 0,25% e 0,01% rispettivamente. Le cellule staminali mesenchimali sono state rilevate in concentrazione $> 1\%$ in 13 casi. Età, sesso chemioterapia preoperatoria e indice di massa corporea non hanno influenzato il numero di cellule staminali identificate nello studio.

Follow-up

I pazienti dimessi con valvola di Heimlich hanno rimosso il drenaggio dopo un tempo medio di 36 giorni (range 13-43). Nessun evento avverso supplementare è stato rilevato alla visita di follow-up. Il tempo mediano di follow-up è stato di 16 mesi. I pazienti non hanno mostrato alcuna evidenza di malattia presso il sito di applicazione del trapianto di cellule staminali. Tra loro, tre pazienti hanno sviluppato metastasi nello polmone controlaterale. Tre pazienti sono deceduti per metastasi a distanza, uno per il cancro del colon-retto, due per soft tissue sarcoma e sarcoma osteogenico. In tre casi, la presenza di noduli bilaterali è stata osservata dopo il trattamento a due, tre e quattro mesi dall'intervento, ma i controlli TAC non hanno evidenziato alcuna progressione della malattia.

Conclusioni

Quando le lesioni sono di grandi dimensioni, molteplici e profonde, la metastasectomia polmonare può diventare una procedura complessa. La wedge resection è la tecnica più

comune⁷⁷ per rimuovere il trattamento metastasi anche se le cucitrici automatiche (stapler) possono causare la distorsione del parenchima adiacente alle graffette della linea di sutura, danneggiando la funzione respiratoria e l'espandibilità del polmone⁷⁸. Infatti le graffette vengono posizionate secondo un angolo planare bidimensionale deformando una struttura di per sé tridimensionale come il polmone. La sfida in queste procedure complesse è salvare la forma tridimensionale del polmone, evitando qualsiasi distorsione del tessuto rimanente. Negli anni, per ottenere resezioni polmonari sempre più conservative, sono state utilizzate diverse apparecchiature laser con differente lunghezza d'onda e un potere di penetrazione che limitasse il danno al parenchima polmonare sano circostante⁸¹⁻⁸⁷. Rispetto ai laser a 1318nm lunghezza d'onda e all'elettrobisturi, il laser Thulium, con lunghezza d'onda di 2010nm ha evidenziato, un ustione tissutale acuta limitata a 0,2 millimetri di profondità. L'analisi citostrutturale al microscopio elettronico a scansione (SEM) sul campione sottoposto a resezione con laser Thulium, supporta queste conclusioni⁴⁶⁻⁴⁸. Tuttavia, migliorare la capacità di tenuta aerea a livello delle resezioni dopo il trattamento chirurgico, rimane il punto più critico per prevenire le complicanze post-operatorie, come le perdite aeree prolungate. Nel corso degli ultimi trent'anni, la capacità di aerostasi di laser a diversa lunghezza d'onda si è dimostrata efficace in caso di resezione superficiale come nelle metastasectomie semplici, ma necessita di procedure di sutura supplementare, quando vengono rimosse lesioni profonde. Sulla base dei risultati preclinici in vitro e in modelli animali, abbiamo sfruttato l'efficacia potenziale di ASC per accelerare la riparazione dei tessuti polmonari, stimolando chemiotassi e migrazione di fibroblasti sull'area di resezione⁷². Partendo dalla lunga esperienza di trapianto di grasso autologo in chirurgia plastica, abbiamo progettato una tecnica per la raccolta intraoperatoria di un campione

autologo di grasso da applicare sulla superficie di resezione polmonare, con lo scopo di migliorare la tenuta del tessuto attraverso le cellule staminali adipose. Il nostro studio mostra che il tessuto grasso raccolto a livello dello strato sottocutaneo della toracotomia è una fonte disponibile di cellule staminali. Inoltre la lipoaspirazione e la centrifugazione dell'innesto adiposo può essere eseguito mentre viene svolta la metastasectomia. Le fasi di raccolta, la centrifugazione e l'applicazione delle cellule staminali trapianto di grasso non hanno significativamente prolungato il tempo dell'intervento chirurgico. I vantaggi portati da questa tecnica combinata possono essere misurati in termini di funzione respiratoria. La spirometria effettuata a un mese di distanza dall'intervento chirurgico non ha mostrato alcuna differenza tra i gruppi di pazienti sottoposti a metastasectomie semplici e complesse in termini di risultati pre- e post-operatorio. Con un follow-up di 16 mesi non è stata osservata alcuna recidiva a livello del sito di applicazione del centrifugato adiposo e non è stato documentato da parte delle cellule staminali alcun effetto di promozione sulle cellule tumorali.

TAB 1. Clinical Characteristics.

	<i>Simple n=9</i>	<i>Complex n=11</i>	<i>Overall n=20</i>	<i>p value</i>
Gender (Male %)	8 (88.8%)	6 (54.5%)	14	0.15
Age at operation (years): median (range)	50 (20-75)	55 (23-80)	54 (23-80)	0.58
Never smoker	4 (44.4%)	6 (54.5%)	10	1
Chemotherapy	7 (77.7%)	9 (81.8%)	17	1
Comorbidity	0	3 (27.2 %)	3	0.21
FEV1% median (range)	92.5 (76-112)	104 (73-118)	97 (73-118)	0.19
BMI median (range)	30.09 (20.30-33.60)	25.70 (20.70-31.60)	25.80 (20.30-33.60)	0.40

TAB 2. Parameters of complex metastasectomy.

	Simple (n=9)	Complex (n=11)
NUMBER OF LESIONS		
1	4	3 (1PAL)
2-5	4	4 (1PAL)
6-9	1	3 (1PAL)
>10	0	1 (1PAL)
DEPTH (cm)		
<1	3	0
1-2,9	6	2 (1PAL)
>3	0	9 (3PAL)
DIAMETER (cm)		
<1	3	1 (1PAL)
1-2,9	6	4 (2PAL)
>3	0	6 (1PAL)

TAB 3. Surgical Characteristics.

	Simple n=9	Complex n=11	Overall n=20	p value
Histology				
<i>Melanoma</i>	1 (11.1%)	0	1 (5%)	0.45
<i>Colorectal</i>	3 (33.3%)	5 (45.4%)	8 (40%)	0.66
<i>Other epithelial</i>	2 (22.2%)	3 (27.2%)	5 (25%)	1
<i>Sarcoma</i>	3 (33.3%)	3 (27.2%)	6 (30%)	1
Volume harvested fat tissue (cc) median (range)	80 (50-120)	60 (40-120)	70 (40-120)	0.68
Power Output (Joule): median (range)	19250 (8690-66000)	47000 (11410-60990)	36705 (8690-66000)	0.04
Time of Laser median (range)	5.20 (1.44-11.00)	11.20 (3.10-16.56)	10.11 (1.44-16.56)	0.01
Time of surgery (min): median (range)	120 (55-160)	115 (75-150)	118 (55-160)	0.65
Intraoperative air leaks	4 (44.4%)	2 (18.2%)	6 (30%)	0.33

TAB 4. Postoperative Outcomes.

	<i>Simple n=9</i>	<i>Complex n=11</i>	<i>Overall n=20</i>	<i>p value</i>
Postoperative lung function				
$\Delta FEV1\%$	-12	-10	-11	0.78
$\Delta FEV1\%/FVC$	3%	-2%	0	0.39
Air related complications				
<i>Prolonged air leaks</i>	0	4 (36.36 %)	4 (20%)	0.09
<i>Discharge on Heimlich valve</i>	0	3 (27.2 %)	3 (15%)	0.21
<i>Drain Removal-days: median (range)</i>	4 (3-5)	5 (4-43)	4 (3-43)	0.07
Hematoma	1 (11.1%)	0	1 (5%)	0.45
Fever	0	2 (18.18 %)	2 (10%)	0.47
Chylothorax	0	1 (9.09 %)	1 (5%)	1
Overall	1 (11.1%)	7 (63.63%)	8 (40%)	0.02
LOS days: median (range)	5 (4-8)	6 (5-14)	5 (4-14)	0.07

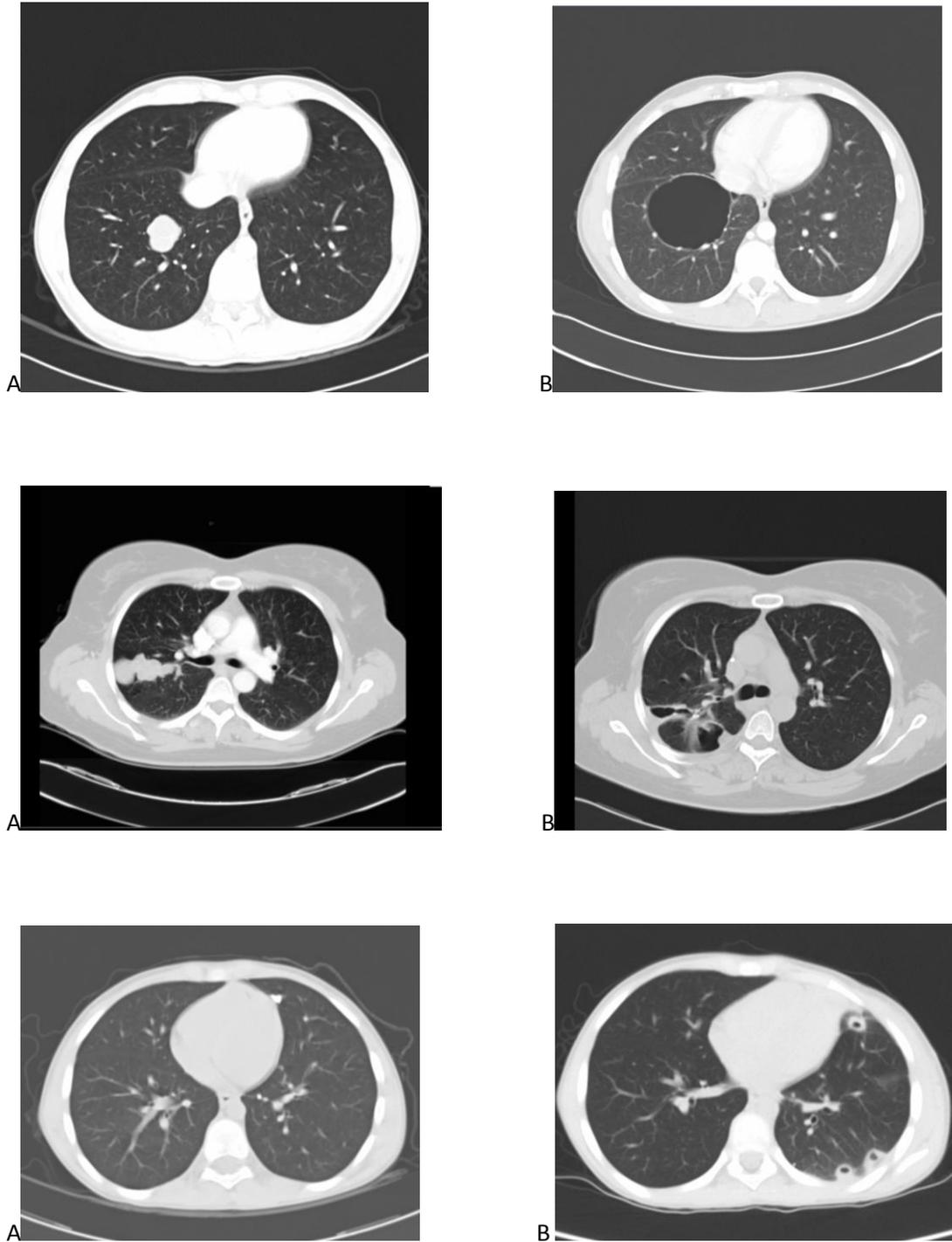


Fig.1. Quadri di metastasectomie definite complesse. A) TC preoperatoria. B) TC nel follow-up



Fig. 2. Prelievo del tessuto adiposo dalla toracotomia

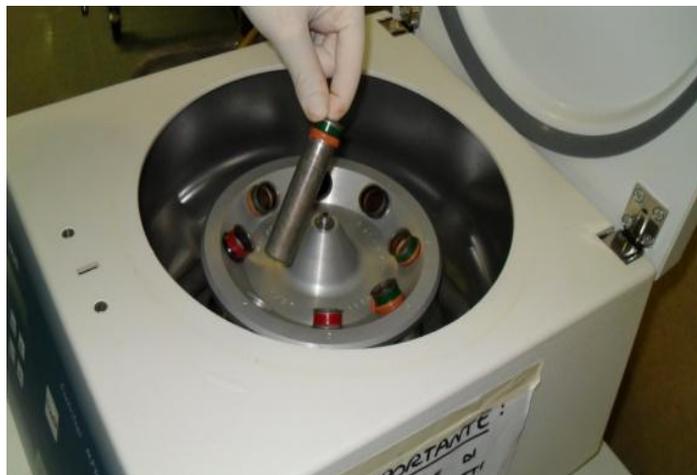


Fig. 3. Fase di centrifugazione



Fig. 4. Componenti del lipocentrifugato: 1) Sovranatante con detriti cellulari, 2) Componente cellulare concentrata contenente le ASC, 3) Sangue.

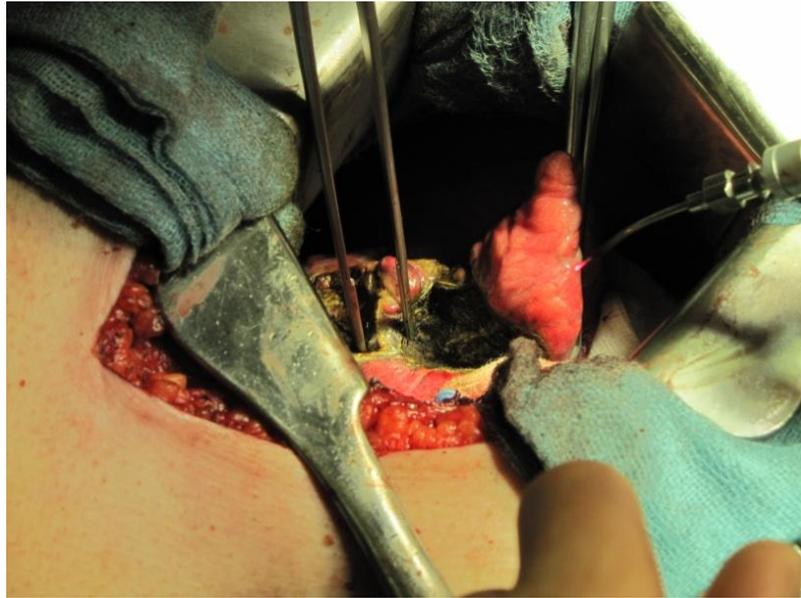


Fig. 5. Metastasectomia Laser.

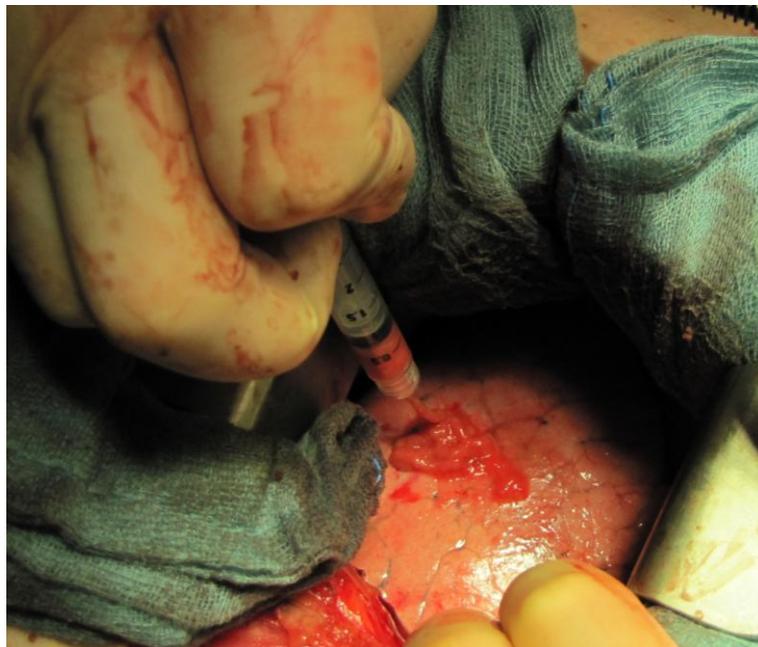


Fig. 6. Applicazione sul tessuto polmonare del lipocentrifugato e delle ASC

Cancer Stem Cells e Nuove Linee di Ricerca

Il tumore può essere immaginato come un organo aberrante originato da una cellula trasformata che ha acquisito la capacità di proliferare indefinitamente attraverso varie mutazioni; inoltre essendo eterogenea, la popolazione tumorale spesso contiene cellule a diversi stadi di differenziamento^{96,97}. Sulla base di questi assunti, negli ultimi anni è stato proposto un modello di sviluppo tumorale derivante da una sottopopolazione di cellule con fenotipo simil-staminale, le cosiddette cellule staminali tumorali (cancer stem cells, CSCs) o cellule iniziatrici del tumore^{49,50}.

Tali cellule sono simili alle cellule staminali per alcune caratteristiche, quali l'autorinnovamento, lo stato indifferenziato, la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stadi cellulari), tuttavia l'origine delle cellule staminali tumorali (CSC) e i rapporti che queste hanno con le cellule staminali adulte sane sono ancora oggetto di studio^{97,98}.

Alcuni autori hanno suggerito che le CSCs derivino da cellule staminali adulte mutate⁹⁹ sostenendo che la tumorigenesi abbia origine a causa di un'alterazione nei meccanismi che regolano l'auto-rinnovamento, poichè nel processo di sviluppo neoplastico sembrerebbero coinvolti i medesimi processi attivati nel self-renewal delle cellule staminali adulte. Tuttavia questo potrebbe essere solo uno dei meccanismi, in quanto non tutte le cellule tumorali che derivano da cellule staminali adulte mutate sono inevitabilmente cellule staminali tumorali. Le CSC infatti mediante trasformazioni oncogeniche di transit amplifying cells¹⁰⁰, possono derivare da cellule progenitrici^{101,102} oppure, da cellule

differenziate, evidenziando che cellule somatiche differenziate possano riacquisire proprietà stem-like per riattivazione di processi che promuovono il self-renewal associato alla trasformazione neoplastica¹⁰³.

Questa popolazione cellulare, sebbene reperibile all'interno della massa tumorale in quantità estremamente esigua (1-2% della popolazione), rappresenterebbe una specie di serbatoio che alimenta il tumore giocando un ruolo cruciale nello sviluppo, nella progressione e nel mantenimento della neoplasia, grazie a meccanismi di farmaco-resistenza alla chemioterapia¹⁰⁴. Inoltre, le cellule staminali tumorali sarebbero responsabili anche dell'aumento dell'aggressività, della capacità di recidiva e della metastatizzazione⁵⁰.

Nell'ambito delle ricerche sulle CSC, particolare attenzione è stata data ai meccanismi con cui queste cellule comunicano fra loro, sopprimendo i normali segnali che regolano la divisione cellulare e l'apoptosi. L'attenzione si è quindi concentrata su alcune proteine presenti sulla superficie baso-laterale della membrana cellulare, le EpCAM, che sono responsabili dell'adesione cellulare e della funzione di signaling inter- e intracellulare, e sono in grado di modulare il ciclo cellulare^{51,52}. La molecola è presente nei tessuti sani dove la concentrazione è regolata, mentre nei tessuti neoplastici, in particolare sulle CSC e sulle metastasi dei tumori solidi, la presenza aberrante di EpCAM lascia supporre che questa proteina transmembrana possa giocare un ruolo di primo piano nella tumorigenesi⁵⁴⁻⁵⁵.

EpCAM è stata inizialmente identificata come un antigene tumore-associato sovraespresso nel carcinoma del colon¹⁰⁵. Da quando è stato scoperto indipendentemente da gruppi diversi, è stato denominato TACSTD1, 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, I-ESA, e KS1 / 4¹⁰⁶. EpCAM è una glicoproteina transmembrana di tipo I di 30-40

kDa costituita da 314 amminoacidi, che si esprime nei tessuti epiteliali normali e neoplastici e funziona come una molecola di adesione cellulare omotipica¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. La componente di maggiori dimensioni è costituita dal dominio extracellulare, che contiene una sequenza EGF-simile, associata ad una porzione più piccola contenente una sequenza ripetuta tireoglobulina-simile^{106,107}. La molecola di EpCAM risulta dalla coespressione delle due componenti e forma complessi con claudina-7, CO-029, e CD44v6 all'interno della membrana cellulare.

EpCAM è abbondantemente espresso a livello dei tumori primari e delle metastasi della maggior parte dei tumori epiteliali maligni, in particolare adenocarcinoma, carcinoma squamo cellulare, carcinoma epatocellulare e retino blastoma⁵³⁻⁵⁵. Di grande rilevanza clinica è la sua espressione sulle CSC derivanti da istotipi diversi^{109,110} e sulle cellule tumorali circolanti che hanno un'alta propensione a formare metastasi ematogena¹¹¹. E' stato dimostrato come la presenza di questa molecola rappresenti un valore predittivo indipendente di prognosi peggiore^{112,113}.

Mentre negli epiteli normali la molecola è espressa a livelli inferiori rispetto ai tumori, l'overespressione di EpCAM si configura come il minimo comune denominatore di diversi carcinomi: recenti studi di immunoistochimica sul cancro alla prostata e sulla neoplasia cervicale intraepiteliale hanno dimostrato che l'espressione di Ep-CAM può aumentare con la progressione della malattia e la proliferazione neoplastica¹¹⁴, correlazioni simili tra overespressione di Ep-CAM e progressione della malattia sono state riportate in pazienti affetti da carcinoma della colecisti¹¹⁵. Questa overespressione è stata anche descritta in 35-

42% dei pazienti con cancro mammario invasivo dove inoltre risulta correlata ad una significativa riduzione dell'intervallo libero da malattia e del tasso di sopravvivenza¹¹⁶⁻¹¹⁸.

La funzione biologica di EpCAM è stata in parte decifrata solo di recente. Oltre al suo ruolo di molecola di adesione, funzioni più importanti comprendono segnalazione cellulare di regolazione di varie risposte biologiche quali la proliferazione, la differenziazione e la migrazione¹⁰⁷.

La sovraregolazione di EpCAM durante la carcinogenesi è quindi associata a un incremento della sintesi proteica, indotto dalla maggiore aderenza omotipica. Sotto uno stimolo adeguato generato dal contatto cellula-cellula il dominio extracellulare è clivato mediante proteolisi intramembrana e rilasciato, mentre il dominio intracellulare, in associazione con binding protein, viene trasdotto al nucleo dove si suppone contribuisca ad attivare la proliferazione delle cellule staminali¹¹⁹⁻¹²². Il meccanismo con cui avviene l'attivazione della segnalazione EpCAM sulla divisione asimmetrica di CSC resta ancora un argomento da chiarire.

L'evidenza che la funzione biologica di EpCAM sia implicata nei processi di tumorigenesi è stata documentata anche in studi di silenziamento genico. Infatti, il knockdown di EpCAM mediante interferenza RNA (RNAi) ha portato alla soppressione della proliferazione e all'apoptosi di cellule tumorali, senza arresto del ciclo cellulare. Analogamente, in cellule di carcinoma mammario la RNAi ha ridotto gli effetti protumorigeni associati alla funzione di signaling di EpCAM^{123,124}.

Grazie a queste caratteristiche, numerose ricerche si sono focalizzate su EpCAM come target per la sperimentazione di farmaci immunoterapeutici specifici. Di recente, anticorpi

monoclonali (mAb) antigene specifici sono stati introdotti con successo in combinazione con regimi di trattamento standard per i pazienti con neoplasie maligne, e un nuovo anticorpo biospecifico (anti-EpCAM x anti-CD3) trifunzionale (catumaxomab / Removab®) è stato approvato per il trattamento dell'ascite maligna dovuta a carcinomi EpCAM-positivi del tratto gastrointestinale e dell'apparato genito-urinario. Catumaxomab immunologicamente agisce mediante due braccia: un braccio forma un legame specifico con i linfociti T, mentre l'altro braccio costituisce un secondo legame specifico con le cellule tumorali mediante l'antigene EpCAM. Attraverso il legame e l'interazione di varie cellule immunitarie, la risultante è una risposta complessa e immuno-specifica contro le cellule tumorali^{125,126}. Tuttavia, l'efficacia clinica di queste terapie tumorali specifiche è stata dimostrata solo in un sottogruppo di pazienti. Si suppone infatti che la funzione biologica della molecola EpCAM sia probabilmente regolata attraverso l'espressione contemporanea di due domini extracellulare (EPEX) e intracellulare (EPIC).

Gli anticorpi anti-EpCAM sono diretti contro il dominio extracellulare EPEX ma non rilevano il dominio EpIC intracellulare.

Nei tessuti sani, è stata osservata una concordanza fra l'espressione dei due domini EPEX e di EpIC; tuttavia, in un tessuto tumorale una discreta percentuale di campioni EPEX positivi hanno mostrato un decremento nell'espressione della componente EpIC^{127,128}. È stato rilevato che pazienti con fenotipo EPEX + / EpICD- mostrano una significativa riduzione del tempo di sopravvivenza libera da malattia, indipendentemente da altri fattori prognostici (studi in corso). Sulla base di questi dati, le ricerche attualmente in corso sono volte a dimostrare che l'espressione della forma intera di EpCAM (EPEX + / EpIC +) potrebbe

rappresentare un fattore predittivo per una buona risposta alla terapia con Catumaxomab e in generale migliorare il tasso di sopravvivenza.

Nel campo dell'Oncologia e della Chirurgia Toracica, le indagini su EpCAM a livello dei tumori polmonari hanno dato risultati contraddittori¹²⁹.

NSCLC

EpCAM è normalmente espressa sulla superficie basolaterale delle cellule della mucosa bronchiale non neoplastiche, mentre non compare a livello dei pneumociti. Analizzando l'espressione della molecola nei due istotipi di tumore polmonare più frequenti, l'adenocarcinoma (AdC) e il carcinoma squamocellulare (SCC) EpCAM era più frequentemente iperespresso in SCC di AdC ($P < 0,01$). Valutando poi la correlazione fra la sovraespressione di EpCAM e le caratteristiche clinico-patologiche della popolazione di pazienti esaminata si è rilevato che in AdC, questa era significativamente associata con il sesso, il grading del tumore, lo stadio relativo al T, la presenza o meno di metastasi linfonodali. Al contrario, la sovraespressione EpCAM non era significativamente correlata all'età del paziente al momento della diagnosi e all'abitudine al fumo. Negli SCC, la sovraespressione EpCAM non è risultata correlata a fattori clinico-patologici. Al momento non è stata trovata una relazione fra l'espressione di EpCAM con la sopravvivenza globale in AdC ($P = 0.23$) o SCC ($P = 0,61$); analogamente l'intervallo libero

da malattia non è risultato statisticamente correlato con l'espressione EpCAM in entrambi gli istotipi (AdC, $P = 0,31$; SCC, $p = 0,60$)¹²⁹.

In uno studio analogo¹³⁰ condotto esclusivamente sull'adenocarcinoma del polmone, è stato confermato che nessuna differenza significativa è presente tra i gruppi EpCAM-overesprimenti e EpCAM-negativi, in termini di intervallo libero da malattia o di overall survival rate, suggerendo che la sovraespressione EpCAM non riveste un significato prognostico. Tuttavia è interessante rilevare che le linee cellulari EGFR-mutanti hanno espresso livelli più elevati di EpCAM rispetto alle linee EGFR wild-type (60.3 vs 7.9, Mann-Whitney U-test, $P = 0.003$).

Esaminando i NSCLC ($n = 103$) e controlli polmonari normali (normali colture polmonari umane e linee di cellule epiteliali bronchiali non neoplastiche immortalizzate, $n = 51$) attraverso l'espressione di mRNA EpCAM utilizzando l'analisi microarray, è stato documentato che l'espressione EpCAM è aumentata in modo significativo di 18,3 volte (Mann-Whitney U-test, $P < 0.001$) in linee cellulari NSCLC rispetto ai controlli normali del polmone. Questi risultati indicano che la maggior parte delle linee cellulari NSCLC iperesprimono EpCAM¹³¹.

È importante sottolineare che il knockdown genico di EpCAM ha indotto apoptosi massiccia nelle linee di cellule di cancro al polmone, ma non in una linea di cellule epiteliali bronchiali umane non neoplastiche immortalizzate, suggerendo che la terapia mirata anti-EpCAM per il cancro del polmone potrebbe avere un alto valore terapeutico. Questi risultati inoltre indicano che le linee di cellule di cancro del polmone, dipendono in gran parte espressione EpCAM per la loro sopravvivenza, e supportano la teoria dell' "Oncogene addiction", che è

stata introdotta da Weinstein¹³² per descrivere il fenomeno secondo cui le cellule tumorali dipendono da uno o pochi oncogeni per il mantenimento del fenotipo maligno. Quindi, sulla base di questi dati è possibile teorizzare che EpCAM nel cancro del polmone svolga la funzione di vero e proprio oncogene.

La conferma, venuta da diversi studi, che linee tumorali mutanti per l'EGFR esprimono livelli più elevati di EpCAM rispetto alle EGFR wild-type ha dimostrato che i tumori EGFR mutanti spesso mostrano un fenotipo epiteliale, come testimoniano gli elevati livelli di E-caderina (marcatore epiteliale) associati a basse concentrazioni di vimentina (marcatore mesenchimale)^{133,134}. Tuttavia, considerando il ruolo critico di EpCAM nella patogenesi del cancro polmonare, è possibile che nelle linee EGFR-mutanti sussista una forma di dipendenza maggiore da EpCAM per il mantenimento del fenotipo maligno rispetto alle linee EGFR wild-type.

Nel presente studio¹³¹, il silenziamento genico di EpCAM ha determinato un significativo aumento dell'apoptosi, senza indurre l'arresto del ciclo cellulare nelle cellule tumorali del polmone. Sebbene un certo numero di rapporti pubblicati hanno stabilito il ruolo di EpCAM come un acceleratore del ciclo cellulare nei tumori umani, il contributo di EpCAM alla sopravvivenza cellulare non è stato determinato.

Tuttavia due ipotesi sono tuttora oggetto di studio: l'apoptosi indotta dal knockdown di EpCAM potrebbe essere specifico per le cellule del cancro del polmone; in alternativa, è possibile che il grado di deplezione di EpCAM serva a determinare a quale tipo di destino, andranno incontro le cellule tumorali, arresto del ciclo cellulare o apoptosi. Data la sostanziale ubiquitariet  della molecola nei NSCLC, EpCAM   stata utilizzata in

alcune sperimentazioni¹³⁵ come marker immunohistochimico per il rilevamento di metastasi occulte linfonodali, che rappresentano ancora oggi un rilevante problema nello staging¹³⁶. Due sono le caratteristiche nell'analisi istologica di routine responsabili di questa sottostadiazione del parametro N: il limitato campionamento di ogni nodo e la scarsa sensibilità per la rilevazione di cellule tumorali isolate o per i piccoli focolai di tumore. Queste limitazioni possono essere superate analizzando sezioni di ogni linfonodo a più livelli, per aumentare il campionamento, migliorando l'analisi immunohistochimica per migliorare la sensibilità di rilevamento del tumore.

L'analisi¹³⁵ è stata condotta su 462 nodi prelevati da 68 pazienti con NSCLC allo stadio Ia (media 6,8 nodi per paziente, mediana sei nodi per paziente).

L'espressione del marker è stata confrontata con l'espressione in 30 nodi benigni precedentemente analizzati nella selezione e fasi di convalida. I linfonodi analizzati sono stati considerati positivi per metastasi se l'espressione di un marcatore era superiore alla massima espressione osservata nei linfonodi benigni. I dati preliminari presentati indicano che il 7% dei pazienti affetti da NSCLC stadati come pN0 sono in realtà positivi all'analisi immunohistochimica effettuata con EpCAM; questo identifica ~ 30% dei pazienti allo stadio Ia come potenziali portatori di metastasi linfonodali occulte. Ulteriori studi in corso stanno utilizzando EpCAM da solo e in associazione con altri marker immunohistochimici per la rilevazione di metastasi linfonodali mediastiniche occulte nei pazienti pN0 e pN1.

NET e SCLC

I recenti progressi tecnologici hanno permesso di quantificare e caratterizzare con metodi diversi le cellule tumorali circolanti (CTC)¹³⁷. La piattaforma CellSearch® è un sistema automatizzato che, attraverso un marcatore costituito da nanoparticelle ferromagnetiche (il cosiddetto ferrofluido) opportunamente combinate con biomolecole consentono di rilevare le CTC con elevata sensibilità, specificità e riproducibilità¹¹¹. Negli attuali kit in commercio la biomolecola che funge da ligando è costituita da un anticorpo anti-EpCAM. L'affidabilità del sistema è stata testata in diversi studi sul carcinoma mammario metastatico, sul carcinoma del colon metastatico e sul carcinoma prostatico, per monitorare l'andamento e l'efficacia del trattamento chemioterapico, riportando che il numero delle CTC può essere considerato un fattore predittivo indipendente per l'intervallo libero da malattia e per la sopravvivenza globale¹³⁸⁻¹⁴¹. Poiché l'assenza di CTC è associata alla stabilità di malattia secondo la definizione data dalle linee guida RECIST¹⁴², mentre la presenza di CTC è un indicatore di progressione di malattia, è stato suggerito che il rilevamento delle CTC può supportare la corretta stratificazione dei pazienti nelle ricerche cliniche e la progettazione di trattamenti su misura.

Proprio grazie alla comprovata iperespressione di EpCAM, in un recente studio sono state analizzate le cellule tumorali circolanti (CTC) in pazienti affetti da tumori neuroendocrini (NET) a sede gastrointestinale e broncopolmonare¹³⁷. Tutte le CTC derivate da NET di origine gastro-intestinale (n=54) hanno mostrato una forte e omogenea colorazione di

membrana per EpCAM, e in questi casi l'espressione di EpCAM non sembra essere stata influenzata dal grading della neoplasia. Per i NET broncopolmonari (n = 13) è stata osservata una espressività variabile. Tuttavia le CTC possono essere rilevate solo quando il tumore primario esprime EpCAM e i NET broncopolmonari positivi avevano una conta più elevata di CTC. Purtroppo lo studio non evidenzia gli istotipi di NET broncopolmonari presi in considerazione ed è ragionevole ritenere che tra il carcinomide tipico, il carcinoma neuroendocrino o il microcitoma una differenza nell'espressione di EpCAM possa essere rilevata. Infatti in uno studio eseguito su campioni autoptici di 10 pazienti affetti da SCLC, è stato rilevato il 100% di positività per EpCAM¹⁴³. Inoltre poiché tutti i pazienti erano stati sottoposti ad una prima linea di chemioterapia standard ed erano deceduti in seguito per recidiva neoplastica, è verosimile che l'espressività di EpCAM possa essere legata a fenomeni di chemioresistenza. A supporto dell'evidenza dell'iperespressività di EpCAM a livello dei microcitomi polmonari, una ricerca ha documentato, mediante l'utilizzo della piattaforma CellSearch®, la presenza di cellule tumorali circolanti (CTC) in 3 soggetti affetti da SCLC. In un quarto soggetto incluso nell'analisi, risultato positivo al momento della diagnosi, è stata riscontrata una riduzione dei livelli di CTC in concomitanza con una remissione parziale di malattia al termine di una prima linea di chemioterapia¹⁴⁴. Questi dati suggeriscono che si possa identificare una sottopopolazione di pazienti con una prognosi più favorevole e con un periodo di stabilità di malattia tale da poter beneficiare di nuovi protocolli terapeutici. La chirurgia, all'interno di protocolli terapeutici multimodali, potrebbe avere un ruolo nel trattamento di pazienti selezionati e in caso di malattia limitata^{145,146}. In conclusione le nuove tecnologie che si basano sulla iperespressività di EpCAM verranno introdotte sempre di più nei prossimi anni nella pratica clinica apportando dei

cambiamenti nella diagnosi, nello staging e negli schemi terapeutici dei tumori di origine epiteliale.

Bibliografia

1. Rice TW, Okereke IC, Blackstone EH. Persistent air-leak following pulmonary resection. *Chest Surg Clin N Am.* 2002 Aug;12(3):529-39.
2. Okereke I, Murthy SC, Alster JM, Blackstone EH, Rice TW. Characterization and importance of air leak after lobectomy. *Ann Thorac Surg.* 2005 Apr;79(4):1167-73.
3. Boffa DJ, Allen MS, Grab JD, Gaissert HA, Harpole DH, Wright CD. Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Feb;135(2):247-54. Epub 2007 Dec 21. Comment in: *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Aug;138(2):295-9.
4. Cerfolio RJ. Recent advances in the treatment of air leaks. *Curr Opin Pulm Med.* 2005 Jul;11(4):319-23
5. Stolz AJ, Schützner J, Lischke R, Simonek J, Pafko P. Predictors of prolonged air leak following pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Feb;27(2):334-6.
6. Venuta F, Rendina EA, De Giacomo T, Coloni GF. Postoperative strategies to treat permanent air leaks. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):391-7. doi:10.1016/j.thorsurg.2010.03.004. Review
7. Varela G, Jiménez MF, Novoa N, Aranda JL. Estimating hospital costs attributable to prolonged air leak in pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Feb;27(2):329-33.
8. Irshad K, Feldman LS, Chu VF, Dorval JF, Baslaim G, Morin JE. Causes of increased length of hospitalization on a general thoracic surgery service: a prospective observational study. *Can J Surg.* 2002 Aug;45(4):264-8.
9. Wright CD, Wain JC, Grillo HC, Moncure AC, Macaluso SM, Mathisen DJ. Pulmonary lobectomy patient care pathway: a model to control cost and maintain quality. *Ann Thorac Surg.* 1997 Aug;64(2):299-302
10. Belda-Sanchís J, Serra-Mitjans M, Iglesias Sentis M, Rami R. Surgical sealant for preventing air leaks after pulmonary resections in patients with lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jan 20;(1):CD003051. doi: 10.1002/14651858.CD003051.pub3.
11. Serra-Mitjans M, Belda-Sanchis J, Rami-Porta R. Surgical sealant for preventing air leaks after pulmonary resections in patients with lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD003051
12. Rice TW, Blackstone EH. Use of sealants and buttressing material in pulmonary surgery: an evidence-based approach. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):377-89. Review.

13. Browdie DA, Cox D. Tests of experimental tissue adhesive sealants: analysis of strength effects in relation to tissue adhesive sealant standards. *Tex Heart Inst J* 2007;34:313–7.
14. K. Wong, P. Goldstraw Effect of fibrin glue in the reduction of postthoracotomy alveolar air leak. *Ann Thorac Surg*, 64 (1997), pp. 979–981
15. Kawamura M, Gika M, Izumi Y, et al. The sealing effect of fibrin glue against alveolar air leakage evaluated up to 48 h; comparison between different methods of application. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;28:39–42.
16. Izbicki JR, Kreusser T, Meier M, et al. Fibrin-glue coated collagen fleece in lung surgery—experimental comparison with infrared coagulation and clinical experience. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994;42:306–9.
17. Anegg U, Lindenmann J, Matzi V, Smolle J, Maier A, Smolle JF Efficiency of fleece-bound sealing (TachoSil) of air leaks in lung surgery: a prospective randomised trial *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007; 31(2):198-202
18. Gika M, Kawamura M, Izumi Y, et al. The short-term efficacy of fibrin glue combined with absorptive sheet material in visceral pleural defect repair. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:12–5
19. Kobayashi H, Sekine T, Nakamura T, et al. In vivo evaluation of a new sealant material on a rat lung air leak model. *J Biomed Mater Res* 2001;58:658–65.
20. De Leyn P, Muller MR, Oosterhuis JW, Schmid T, Choong CK, Weder W, Sokolow Y. Prospective European multicenter randomized trial of PleuraSeal for control of air leaks after elective pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Apr;141(4):881-7. Epub 2010 Nov 19.
21. Allen MS, Wood DE, Hawkinson RW, et al. Prospective randomized study evaluating a biodegradable polymeric sealant for sealing intraoperative air leaks that occur during pulmonary resection. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1792–801.
22. Dango S, Lin R, Hennings E, Passlick B. Initial experience with a synthetic sealant PleuraSeal after pulmonary resections: a prospective study with retrospective case matched controls. *J Cardiothorac Surg*. 2010 Jun 16;5:50.
23. Rosenbaum PR, Rubin DB. 1983. The central role of the propensity score in observational studies for causal effects. *Biometrika* 70: 41–55.
24. Macchiarini P, Wain J, Almy S, Darteville P. Experimental and clinical evaluation of a new synthetic, absorbable sealant to reduce air leaks in thoracic operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Apr;117(4):751-8
25. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003. Aug;3(5):705-13. Review.

26. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS. *Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells*. *Ann Plast Surg*. 2003 Jun;50(6):610-7. PubMed PMID: 12783012
27. Hong L, Peptan IA, Colpan A, Daw JL. *Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells*. *Cells Tissues Organs*. 2006;183(3):133-40.
28. Kim WS, Park BS, Sung JH. *The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells*. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Jul;9(7):879-87. Review.
29. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Conside RV, March KL. 2004. *Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells*. *Circulation* 109:1292-1298.
30. Craft RO, Rophael J, Morrison WA, Vashi AV, Mitchell GM, Penington AJ. 2009. *Effect of local, longterm delivery of platelet-derived growth factor (PDGF) on injected fat graft survival in severe combined immunodeficient (SCID) mice*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:235-243.
31. Bhang SH, Cho SW, Lim JM, Kang JM, Lee TJ, Yang HS, Song YS, Park MH, Kim HS, Yoo KJ, Jang Y, Langer R, Anderson DG, Kim BS. 2009. *Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs*. *Stem Cells* 27:1976-1986.
32. Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, Zhong XY, Ding Q, Chen YX. 2009. *Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue*. *Biochem Biophys Res Commun* 379:1084-1090.
33. Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. *Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells*. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Apr 15;119(5):1409-22; discussion 1423-4.
34. Delay E, Garson S, Tousson G, Sinna R. *Fat injection to the breast: technique, results, and indications based on 880 procedures over 10 years*. *Aesthet Surg J*. 2009 Sep-Oct;29(5):360-76
35. Billings Jr E, May Jr JW. *Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery*. *Plast Reconstr Surg* 1989;83(2):368-81.
36. Cherubino M, Marra KG. *Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction*. *Regen Med*. 2009 Jan;4(1):109-17. Review. 26:
37. Stosich MS, Mao JJ. *Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery*. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jan;119(1):71-83; discussion 84-5.
38. Alhadlaq A, Tang M, Mao JJ. *Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction*. *Tissue Eng*. 2005 Mar-Apr;11(3-4):556-66.
39. Coleman SR. *Facial recontouring with lipostructure*. *Clin Plast Surg*. 1997 Apr;24(2):347-67.

40. Toledo LS, Mauad R. Fat injection: a 20-year revision. *Clin Plast Surg.* 2006 Jan;33(1):47-53, vi. Review.
41. Brunelli A, Cassivi SD, Halgren L. Risk factors for prolonged air leak after pulmonary resection. *Thorac Surg Clin.* 2010 Aug;20(3):359-64. doi: 10.1016/j.thorsurg.2010.03.002. Review.
42. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 2008 Jun;17(3):463-73.
43. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells.* 2011 Jan;29(1):11-9. doi: 10.1002/stem.559. Review.
44. Feng B, Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm.* 2009 Dec;24(6):717-21. doi: 10.1089/cbr.2009.0652. Review
45. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo VS, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabro E, Pastorino U, Sozzi G. 2009. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16281-16286.
46. Bach T, Herrmann TRW, Cellarius C, Gross AJ. Bladder neck incision using a 70W 2micron continuous wave laser. *World J Urol;* 25:263-7; 2007
47. Ludwig HC, Kruschat T, Knobloch T, Teichmann HO, Rostasy K, Rohde V. First experiences with a 2.0 nm near infrared laser system for neuroendoscopy. *Neurosurg Rev;* 30:195-201; 2007
48. Scanagatta P, Pelosi G, Leo F, Furia S, Duranti L, Fabbri A, Manfrini A, Villa A, Vergani B, Pastorino U. Pulmonary resections: cytostructural effects of different-wavelength lasers versus electrocautery. *Tumori.* 2012 Jan-Feb;98(1):90-3. doi: 10.1700/1053.11505
49. Sengupta A, Cancelas JA. Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? *J Cell Physiol.* 2010;225:7-14.
50. Monteiro J, Fodde R. Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer.* 2010;46:1198-1203.
51. Yamashita T, Budhu A, Forgues M, et al. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67(22):10831-9.
52. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu. Rev. Med.* 2007;58:267-84.
53. Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, et al. Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes. Commun.* 1994;2(5):417-28.
54. Spizzo G, Went P, Dirnhof S, et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004;86(3):207-13.

55. Went P, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Hum. Pathol.* 2004;35(1):122-28.
56. Münz M, Kieu C, Mack B, et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates cmyc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004;23(34):5748-58.
57. Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat. Cell. Biol.* 2009;11(2):162-71.
58. Denzel S, Maetzel D, Mack B, et al. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 2009;9:402.
59. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, et al. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2012.
60. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003;100(7):3983-8.
61. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(20):6897-904.
62. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat. Rev. Cancer* 2008;8(5):329-40.
63. Gimble JM, Nuttall ME. 2011. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. *Curr Pharm Des* 17:332-339.
64. Schaffler A, Buchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25:818-827.
65. Kanchwala SK, Glatt BS, Conant EF, Bucky LP. 2009. Autologous fat grafting to the reconstructed breast: the management of acquired contour deformities. *Plast Reconstr Surg* 124:409-418.
66. Schultz GS, Wysocki A. 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 17:153-162.
67. Zuk PA. 2010. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell* 21:1783-1787.
68. Petit JY, Lohsiriwat V, Clough KB, Sarfati I, Ihrai T, Rietjens M, Veronesi P, Rossetto F, Scevola A, Delay E. 2011. The oncologic outcome and immediate surgical complications of lipofilling in breast cancer patients: a multicenter study-milan-paris-lyon experience of 646 lipofilling procedures. *Plast Reconstr Surg* 128:341-346.
69. Ramirez RD, Sheridan S, Girard L, Sato M, Kim Y, Pollack J, Peyton M, Zou Y, Kurie JM, Dimaio JM, Milchgrub S, Smith AL, Souza RF, Gilbey L, Zhang X, Gandia K, Vaughan MB, Wright WE,

- Gazdar AF, Shay JW, Minna JD. 2004. *Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. Cancer Res 64:9027-9034.*
70. Sato M, Vaughan MB, Girard L, Peyton M, Lee W, Shames DS, Ramirez RD, Sunaga N, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD. 2006. *Multiple oncogenic changes (K-RAS(V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells. Cancer Res 66:2116-2128.*
71. Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, Sharma M, Sharma P, Tripathi RP, Gurudutta GU. 2009. *Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. J Cell Mol Med 13:4385-4402.*
72. Andriani F, Facchinetti F, Furia S, Roz L, Bursomanno S, Bertolini G, Carniti C, Sozzi G, Pastorino U. *Adipose tissue displays trophic properties on normal lung cellular components without promoting cancer cells growth. J Cell Physiol. 2012 Nov 5. doi: 10.1002/jcp.24270. [Epub ahead of print]*
73. Kannan S, Wu M. 2006. *Respiratory stem cells and progenitors: overview, derivation, differentiation, carcinogenesis, regeneration and therapeutic application. Curr Stem Cell Res Ther 1:37-46.*
74. Delgado O, Kaisani AA, Spinola M, Xie XJ, Batten KG, Minna JD, Wright WE, Shay JW. 2011. *Multipotent capacity of immortalized human bronchial epithelial cells. PLoS One 6:e22023.*
75. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. 2000. *The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. Mol Med Today 6:324-329.*
76. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, Mancuso P, Calleri A, Corsini C, Pruneri G, Manzotti M, Lohsiriwat V, Rietjens M, Petit JY, Bertolini F. 2012. *The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. Cancer Res 72:325-334.*
77. Internullo E, Cassivi SD, Van Raemdonck D, Friedel G, Treasure T; Pulmonary metastasectomy: a survey of current practice amongst members of the European Society of ESTS Pulmonary Metastasectomy Working Group. *Thoracic Surgeons. J Thorac Oncol. 2008 Nov;3(11):1257-66.*
78. Petrella F, Chieco P, Solli P, Veronesi G, Borri A, Galetta D, Gasparri R, Spaggiari L. *Which factors affect pulmonary function after lung metastasectomy? Eur J Cardiothorac Surg. 2009 May;35(5):792-6. Epub 2009 Feb 23.*
79. Perelman M. *Precision techniques for removal of pathological structures from the lung. Surgery 1983;11:12-16*
80. Cooper JD, Perelman M, Todd TRJ, et al. *Precision cautery and pulmonary lesions. Ann Thorac Surg 1986;41:51-53.*
81. Rolle A, Koch R, Alpard SK, et al. *Lobe-sparing resection of multiple pulmonary metastases with a new 1318 nm Nd:YAG Laser—First 100 patients. Ann Thorac Surg 2002;74:865-869.*

82. Rolle A, Pereszlenyi A, Kock R, et al. Is surgery of multiple lung metastases reasonable? 328 consecutive patients with multiple laser metastasectomies with a new 1318 nm Nd:YAG laser. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006 Jun;131(6):1236-42. Epub 2006 May 2
83. Venuta F, Rolle A, Anile M, Martucci N, Bis B, Rocco G. Techniques used in lung metastasectomy. *J Thorac Oncol*. 2010 Jun;5(6 Suppl 2):S145-50.
84. LoCicero J, Hartz RS, Frederiksen JW, et al. Laser assisted parenchyma sparing pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;97:732–736.
85. Moghissi K. Experience in non-contact Nd:YAG laser in pulmonary surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1988;2:87–94.
86. Branscheid D, Krysa S, Wollkopf G, et al. Does ND-YAG laser extend the indications for resection of pulmonary metastases? *Eur J Cardiothorac Surg* 1992;6:590 –597.
87. Mineo TC, Ambrogi V, Pompeo E, et al. The value of the Nd:YAG laser for the surgery of lung metastases in a randomized trial. *Chest* 1998; 113:1402–1407.
88. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2008 Dec;17(6):1053-63.
89. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):6-10.
90. Tallone T, Realini C, Böhmler A, Kornfeld C, Vassalli G, Moccetti T, Bardelli S, Soldati G. Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011 Apr;4(2):200-10. Epub 2011 Feb 15.
91. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85. Epub 2005 Dec 1.
92. Cai X, Lin Y, Hauschka P, Grottkau BE. Adipose Stem Cells Originate from Perivascular Cells. *Biol Cell*. 2011 Jun 16.
93. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13
94. Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):229-30
95. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

96. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. *Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive?. Cell Commun Signal* 2010;8:6.
97. Wu XZ. *Origin of Cancer Stem Cells: The Role of Self-Renewal and Differentiation. Ann Surg Oncol.* 2008;15:407–414.
98. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. *Nat med 2009 Cancer stemcells: mirage or reality?. Nat Med* 2009; 5:1010-1012.
99. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature* 2001;414:105–111.
100. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. *Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res* 2006;66:9339–9344.
101. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. Nature* 2006;442:818–822.
102. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. *Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med* 2004;351:657–667.
103. Sun B, Chen M, Hawks CL, Pereira-Smith OM, Hornsby PJ. *The minimal set of genetic alterations required for conversion of primary human fibroblasts to cancer cells in the subrenal capsule assay. Neoplasia* 2005;7: 585–593.
104. Baguley BC. *Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs. Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1:121-127.
105. Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D, et al. *Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1979;76(3):1438-42.
106. Baeuerle PA, Gires O. *EpCAM (CD326) finding its role in cancer. Br J Cancer.* 2007 Feb 12;96(3):417-23. *Epub* 2007 Jan 9. *Review. Erratum in: Br J Cancer.* 2007 May 7;96(9):1491.
107. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, et al. *Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. Cancer Treat. Rev.* 2012;38(1):68-75.
108. Balzar M, Briaire-de Bruijn I, Rees-Bakker H, et al. *Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. Mol. Cell. Biol.* 2001;21(7):2570-80.
109. Visvader JE, Lindeman GJ. *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat. Rev. Cancer* 2008;8(10):755-68.
110. Gires O, Klein CA, Baeuerle PA. *On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. Nat. Rev. Cancer* 2009;9(2):143; *author reply*-43.

111. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(20):6897-904.
112. Agboola AJ, Paish EC, Rakha EA, Powe DG, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. EpCAM expression is an indicator of recurrence in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(2):575-82. doi: 10.1007/s10549-011-1813-7. Epub 2011 Oct 15.
113. Fong D, Spizzo G, Mitterer M, Seeber A, Steurer M, Gastl G, Brosch I, Moser P. Low expression of junctional adhesion molecule a is associated with metastasis and poor survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012 Dec;19(13):4330-6. doi: 10.1245/s10434-012-2381-8. Epub 2012 May 2.
114. Spizzo G, Fong D, Wurm M, et al. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J. Clin. Pathol.* 2011;64(5):415-20.
115. Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G (2004) Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 10: 3131–3136
116. Muller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Janicke F, Pantel K (2005) Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 11:3678– 3685
117. Gostner JM, Fong D, Wrulich OA, Lehne F, Zitt M, Hermann M, Krobtsch S, Martowicz A, Gastl G, Spizzo G. Effects of EpCAM overexpression on human breast cancer cell lines. *BMC Cancer.* 2011 Jan 31;11:45. doi: 10.1186/1471-2407-11-45. .
118. Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet.* 2000 Dec 9;356(9246):1981-2
119. Müinz M, Kieu C, Mack B, et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates cmyc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004;23(34):5748-58.
120. Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat. Cell. Biol.* 2009;11(2):162-71.
121. Denzel S, Maetzel D, Mack B, et al. Initial activation of EpCAM cleavage via cell-to-cell contact. *BMC Cancer* 2009;9:402.
122. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, et al. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2012.
123. Hase T, Sato M, Yoshida K, et al. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2011;102(8):1493-500.

124. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004;64(16):5818-24.
125. Frampton JE. *Catumaxomab: in malignant ascites. Drugs.* 2012 Jul 9;72(10):1399-410. doi: 10.2165/11209040-000000000-00000. Review.
126. Bokemeyer C. *Catumaxomab--trifunctional anti-EpCAM antibody used to treat malignant ascites. Expert Opin Biol Ther.* 2010 Aug;10(8):1259-69. doi: 10.1517/14712598.2010.504706. Review.
127. Ralhan R, He HC, So AK, Tripathi SC, Kumar M, Hasan MR, Kaur J, Kashat L, MacMillan C, Chauhan SS, Freeman JL, Walfish PG. Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e14130. doi: 10.1371/journal.pone.0014130.
128. Kunavisarut T, Kak I, Macmillan C, Ralhan R, Walfish PG. Immunohistochemical analysis based Ep-ICD subcellular localization index (ESLI) is a novel marker for metastatic papillary thyroid microcarcinoma. *BMC Cancer.* 2012 Nov 15;12:523. doi: 10.1186/1471-2407-12-523
129. Pak MG, Shin DH, Lee CH, Lee MK. Significance of EpCAM and TROP2 expression in non-small cell lung cancer. *World J Surg Oncol.* 2012 Apr 6;10:53. doi: 10.1186/1477-7819-10-53.
130. Kim Y, Kim HS, Cui ZY, Lee HS, Ahn JS, Park CK, Park K, Ahn MJ. Clinicopathological implications of EpCAM expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res.* 2009 May;29(5):1817-22.
131. Hase T, Sato M, Yoshida K, Girard L, Takeyama Y, Horio M, Elshazley M, Oguri T, Sekido Y, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD, Kondo M, Hasegawa Y. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer Sci.* 2011 Aug;102(8):1493-500. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01973.x. Epub 2011 Jun 2.
132. Weinstein IB. *Cancer. Addiction to oncogenes – the Achilles heel of cancer. Science.* 2002;297:63–4.
133. Takeyama Y, Sato M, Horio M, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2010; 296:216–24.
134. Deng QF, Zhou CC, Su CX. Clinicopathological features and epidermal growth factor receptor mutations associated with epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Respirology.* 2009; 14:371–6.
135. Xi L, Coello MC, Litle VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, El-Hefnawy T, Landreneau RJ, Luketich JD, Godfrey TE. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2484-91

136. Coello MC, Luketich JD, Litle VR, Godfrey TE. Prognostic significance of micrometastasis in nonsmall-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004;5:214–225.
137. Khan MS, Tsigani T, Rashid M, Rabouhans JS, Yu D, Luong TV, Caplin M, Meyer T. Circulating tumor cells and EpCAM expression in neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 15;17(2):337-45. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1776. Epub 2011 Jan 11
138. Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, et al. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1420–30.
139. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781–91.
140. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer.[Erratum in *J Clin Oncol*. 2009;27:1923]. *J Clin Oncol* 2008;26:3213–21.
141. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer.[Erratum in *Clin Cancer Res* 2009;15:1506]. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302–9.
142. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
143. Brezicka T. Expression of epithelial-cell adhesion molecule (Ep-CAM) in small cell lung cancer as defined by monoclonal antibodies 17-1A and BerEP4. *Acta Oncol*. 2005;44(7):723-7
144. Bevilacqua S, Gallo M, Franco R, Rossi A, De Luca A, Rocco G, Botti G, Gridelli C, Normanno N. A "live" biopsy in a small-cell lung cancer patient by detection of circulating tumor cells.
145. Jones CD, Cummings IG, Shipolini AR, McCormack DJ. Does surgery improve prognosis in patients with small-cell lung carcinoma? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 Nov 20. [Epub ahead of print]
146. National Institute for Health and Clinical Excellence. *The Diagnosis and Treatment of Lung Cancer*. <http://guidance.nice.org.uk/cg121>. (April 2011, date last accessed). *Lung Cancer*. 2009 Jul;65(1):123-5. doi: 10.1016/j.lungcan.2009.01.019. Epub 2009 Mar 3.

