

Abstract

Le lesioni del muscolo scheletrico possono guarire spontaneamente, grazie al potenziale rigenerativo intrinseco garantito dalla presenza di un pool di cellule staminali residenti, conosciute come cellule satelliti. Dopo la lesione, le cellule satelliti quiescenti iniziano a proliferare e a differenziarsi verso cellule muscolari mature. Anche le cellule del sistema immunitario svolgono un ruolo centrale nel processo di rigenerazione del muscolo scheletrico, passando da un microambiente pro-infiammatorio ad uno anti-infiammatorio, a mano a mano che il processo di guarigione procede e il muscolo leso guarisce strutturalmente e funzionalmente. Tuttavia, il potenziale rigenerativo del muscolo scheletrico è limitato, soprattutto in caso di lesioni severe, con recupero incompleto e infiammazione cronica. Le terapie attuali sono limitate alla gestione conservativa delle lesioni muscolari, tra cui il protocollo RICE (riposo, ghiaccio, compressione e elevazione) e farmaci anti-infiammatori non steroidei o corticosteroidi intramuscolari per il sollievo dei sintomi infiammatori. Questi approcci non forniscono un ripristino completo allo stato pre-lesione, per questo motivo un nuovo approccio basato sulle terapie cellulari può rappresentare una valida opzione di trattamento. Tuttavia, queste terapie mostrano diversi problemi tecnici, come la raccolta ed espansione *in vitro* delle cellule prima del trapianto. L'infusione di cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) può essere un altro approccio alternativo e promettente anche se gli studi *in vitro* e clinici sono ancora pochi. Sulla base di questa evidenza, lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di sviluppare modelli innovativi *in vitro* per studiare il commitment miogenico delle cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo umano (*hBM-MSCs*) adottando due diversi approcci:

(i) co-cultura bidimensionale (2D) di cellule staminali umane e PBMCs in condizioni dinamiche, come la perfusione;

(ii) sistemi bio-ingegnerizzati tridimensionali (3D) di co-cultura di cellule staminali umane e PBMCs.

In primo luogo, sono state studiate le condizioni di coltura appropriate, tra cui la composizione del terreno di coltura e il rapporto di semina cellulare tra *hBM-MSCs* e le cellule muscolari primarie umane (*hSkMs*), utilizzando approcci standard di coltura monostrato. Le cellule coltivate con mezzo di coltura supplementato con 10 ng/mL di fattore di crescita fibroblast-like b (*b-FGF*) e co-coltivate con *hSkMs* hanno mostrato una maggiore espressione genica correlata alla miogenesi (*Desmina*, 141 fold; Catena pesante della Miosina 2 (*MYH2*), 32 -fold) dopo 21 giorni, e una prevalente espressione di citochine anti-infiammatorie (*IL10*, 15-fold; e *IL4*, 1-fold) rispetto a quelle pro-infiammatorie (*IL1*, 1,4-fold). Successivamente, i PBMCs raccolti tramite un sistema commerciale di filtrazione, comunemente usato nella pratica clinica, sono stati aggiunti al sistema di coltura attraverso un supporto transwell per studiare eventuali effetti paracrini sugli eventi miogenici. Il commitment miogenico di *hBM-MSCs* in presenza e in assenza di PBMCs è stato studiato tramite l'espressione

genica tramite qRT-PCR e dall'espressione proteica con immunofluorescenza (IF) e citometria a flusso. In presenza di PBMCs, i *hBM-MSCs* hanno upregolato significativamente i geni miogenici, quali Desmina e MYH2 a partire dal giorno 7 di coltura, mentre le citochine pro-infiammatorie (IL12A al giorno 14) sono state downregulate. Successivamente, il commitment miogenico di *hBM-MSCs* è stato ulteriormente implementato utilizzando un approccio 3D che impiega scaffolds di fibrina con *hBM-MSCs* più *hSkMs* con e senza PBMCs, coltivati in condizioni dinamiche utilizzando un bioreattore a perfusione. Questo sistema di coltura si è rivelato un ambiente biomimetico valido per il commitment miogenico delle cellule staminali. Infatti, tutti i geni relativi al fenotipo miogenico erano upregolati in presenza di PBMCs come anche Desmina e MYH2 sono state evidenziate anche a livello proteico. Inoltre, la presenza di PBMCs in coltura 3D ha indotto una downregolazione significativa delle citochine pro-infiammatorie.

Questo sistema di filtrazione del sangue è stato studiato strutturalmente tramite microscopia ottica ed elettronica, spettroscopia infrarossa trasformata di Fourier (FTIR), calorimetria a scansione differenziale (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA). La struttura della membrana filtrante e la relativa composizione polimerica mostra una struttura morfologica caratteristica composta dal polimero poliidrossi butirato (PHB). Il fenotipo dei PBMCs filtrati è stato caratterizzato con citometria a flusso per confermare l'efficacia del sistema di filtrazione nella concentrazione dei PBMCs in piccoli volumi e conservando la loro composizione.

In conclusione, questo lavoro di tesi conferma che le *hBM-MSCs* rappresentano una valida fonte di cellule staminali nell'ambito dell'ingegneria tissutale, poiché le *hBM-MSCs* mostrano un potenziale miogenico versatile, potenziato e modulato dalla co-coltura con i PBMCs filtrati. Inoltre, il nostro modello 3D biomimetico *in vitro* mima in maniera ottimale l'architettura dei tessuti fisiologici, migliorando la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule staminali e promuovendo complessi cross-talk biologici *in vivo*.