ABSTRACT

Tendons are specialised connective tissues that transmit forces from muscle to bone, enabling movement and maintaining postural stability. Their limited intrinsic healing capacity contributes to frequent tendinopathies and re-injury. Conventional treatments often fail to restore full function, creating a need for alternative regenerative approaches. Tendon stem/progenitor cells (TSPCs) have been proposed as candidates for tendon repair due to their self-renewal capacity and tenogenic potential. Extracellular vesicles (EVs) secreted by TSPCs may also play a therapeutic role by modulating inflammation, supporting cell proliferation, and influencing extracellular matrix (ECM) remodelling. However, the contribution of TSPC-derived conditioned medium (CM) and crude EVs (cEVs) remains incompletely defined.

This thesis investigated the properties of porcine and human TSPC-derived CM and cEVs, and their potential relevance for tendon repair. Type II TSPCs (TSPCs II), isolated from the deep digital flexor tendon, were characterised under different culture conditions. Hypoxia appeared to increase EV secretion and to influence the expression of selected tenogenic markers. Dynamic culture and GDF-5 supplementation were associated with changes in cell behaviour and matrix deposition. Comparative analysis highlighted species-specific responses: in 2D cultures, porcine secretomes induced tenogenic marker expression without the need for exogenous GDF-5, whereas in 3D culture systems, human secretomes showed more pronounced effects on tenogenic differentiation and ECM organisation.

The study followed a stepwise approach, beginning with cell and EV characterisation and progressing through the evaluation of oxygen tension, mechanical stimulation, and biomaterial integration. Collectively, the findings suggest that microenvironmental cues influence the bioactivity of TSPC-derived secretomes. While further studies are required to clarify underlying mechanisms and confirm therapeutic efficacy, these results provide insights into the potential of cell-free, EV-based approaches for tendon repair and contribute to ongoing work in musculoskeletal regenerative medicine.

ABSTRACT

I tendini sono tessuti connettivi specializzati che trasmettono le forze dal muscolo all'osso, permettendo il movimento e garantendo la stabilità posturale. La loro limitata capacità di guarigione intrinseca contribuisce all'elevata incidenza di tendinopatie e recidive. I trattamenti convenzionali spesso non riescono a ripristinare pienamente la funzionalità del tessuto, evidenziando la necessità di approcci rigenerativi alternativi. Le cellule staminali/progenitrici tendinee (TSPCs) sono state proposte come candidate per la riparazione del tessuto tendineo grazie alla loro capacità di autorinnovamento e al loro potenziale tenogenico. Inoltre, le vescicole extracellulari (EVs) secrete dalle TSPCs potrebbero svolgere un ruolo terapeutico modulando l'infiammazione, supportando la proliferazione cellulare e influenzando il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM). Tuttavia, il contributo specifico del mezzo condizionato (CM) e delle EV grezze (cEVs) derivati da TSPCs rimane ancora poco definito.

Questa tesi ha studiato le proprietà del CM e delle cEVs derivati da TSPCs di origine suina e umana, e la loro potenziale rilevanza per la riparazione tendinea. Le TSPCs di tipo II (TSPCs II), isolate dal tendine flessore profondo delle dita, sono state caratterizzate in diverse condizioni di coltura. L'ipossia è risultata associata a un aumento della secrezione di EV e a variazioni nell'espressione di alcuni marcatori tenogenici. La coltura dinamica e l'aggiunta di GDF-5 hanno influenzato il comportamento cellulare e la deposizione di matrice. L'analisi comparativa ha evidenziato risposte specie-specifiche: nei sistemi 2D, i secretomi suini hanno indotto l'espressione di marcatori tenogenici senza la necessità di GDF-5 esogeno, mentre nei sistemi 3D i secretomi umani hanno mostrato effetti più marcati sulla differenziazione tenogenica e sull'organizzazione dell'ECM.

Lo studio ha seguito un approccio progressivo, a partire dalla caratterizzazione cellulare ed EV fino alla valutazione dell'effetto della tensione di ossigeno, della stimolazione meccanica e dell'integrazione con biomateriali. Complessivamente, i risultati suggeriscono che i segnali microambientali influenzano la bioattività dei secretomi derivati dalle TSPCs. Sebbene ulteriori studi siano necessari per chiarire i meccanismi alla base di tali effetti e confermare l'efficacia terapeutica, questi dati forniscono nuove conoscenze sul potenziale degli approcci cell-free basati su EV per la riparazione tendinea e contribuiscono allo sviluppo della medicina rigenerativa muscoloscheletrica.