

INTRODUZIONE.....	3
RIPARAZIONE E RIGENERAZIONE DEL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO IN SEGUITO A DANNO	5
<i>Le fasi principali della riparazione di una lesione muscolare.....</i>	5
<i>Le cellule satelliti.....</i>	8
<i>Regolazione della rigenerazione muscolare scheletrica</i>	13
LA TERAPIA CELLULARE	28
<i>Cellule staminali.....</i>	29
TERAPIA CELLULARE PER LA RIGENERAZIONE MUSCOLARE	37
<i>Cellule satelliti.....</i>	37
<i>Cellule mesenchimali stromali.....</i>	38
PLASMA RICCO DI PIASTRINE E RIGENERAZIONE MUSCOLARE SCHELETRICA	41
<i>PRP: proprietà e vantaggi.....</i>	41
<i>Utilizzo del PRP</i>	43
<i>PRP e Muscolo scheletrico: potenzialità e controversie.</i>	46
SCOPO DELLO STUDIO	50
MATERIALI E METODI	51
PREPARAZIONE DEL PLASMA RICCO DI PIASTRINE (PLATELET RICH PLASMA, PRP)	51
COLTURE CELLULARI.....	52
<i>Mioblasti murini scheletrici della linea C2C12.....</i>	52
<i>Cellule stromali/mesenchimali staminali da midollo osseo (BM-MSC)</i>	52
<i>Cellule Satelliti.....</i>	52
<i>Co-coltura di mioblasti scheletrici C2C12 o cellule satelliti e cellule BM-MSC</i>	53
SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTS	53
CONTA CELLULARE	54
SAGGIO FLUORESCENTE DI INCORPORAZIONE DI ANALOGHI NUCLEOTIDI MODIFICATI EDU 5-ETINIL-2-DEOSSURIIDINA	54
IMMUNOFLUORESCENZA CONFOCALE	55
WESTERN BLOTTING	56
ANALISI STATISTICA	57
RISULTATI	58
IL PRP MODULA VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DI MIOBLASTI C2C12	58
IL PRP MODULA VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E SOPRAVVIVENZA DI CELLULE BM-MSC.	64

LA COMBINAZIONE PRP/BM-MSC STIMOLA LA PROLIFERAZIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DI MIOBLASTI C2C12	67
LA COMBINAZIONE PRP/BM-MSC STIMOLA L'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE SATELLITI	69
DISCUSSIONE	71
CONCLUSIONE.....	76
BIBLIOGRAFIA	77
RINGRAZIAMENTI	95

INTRODUZIONE

L'incidenza delle patologie e danni a carico del muscolo scheletrico (distrofia muscolare, danno indotto da esercizio fisico, immobilizzazione, denervazione e invecchiamento) è molto alta nella popolazione con costi rilevanti per il Sistema Sanitario; inoltre le attuali terapie farmacologiche e/o riabilitative non sono del tutto efficaci per il raggiungimento di un completo recupero morfo-funzionale di un muscolo leso o patologico. Risulta pertanto di primaria importanza l'identificazione e lo sviluppo di strategie terapeutiche alternative e più efficaci. È noto che il tessuto muscolare scheletrico possiede una buona capacità rigenerativa, in gran parte dovuta all'attività di una popolazione di cellule progenitrici muscolari residenti, definite cellule satelliti. Tali cellule, in un muscolo sano si trovano in uno stato di quiescenza, ma sono capaci di attivarsi in risposta ad un trauma o malattia muscolare e di proliferare e differenziare per formare nuove fibre muscolari. Le cellule satelliti, tuttavia, sono relativamente scarse nel tessuto muscolare e, in caso di danno severo ed esteso, potrebbero non essere reclutate in quantità sufficiente nel sito di lesione; inoltre le loro potenzialità rigenerative potrebbero essere ostacolate da una serie di complicanze, compresa l'insorgenza della fibrosi.

Numerose ricerche hanno dimostrato che la riparazione/rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico potrebbero trarre benefici della terapia cellulare; a tal fine potrebbero risultare particolarmente idonee le cellule stromali/staminali mesenchimali adulte provenienti dal midollo osseo (*Bone marrow derived- mesenchymal stromal cells*, BM-MS). Sta diventando sempre più evidente che, l'effetto benefico di queste cellule non sia dovuto tanto alla loro capacità di differenziamento in cellule muscolari scheletriche, ma piuttosto a quella di secernere e liberare fattori di crescita e citochine in grado di esercitare molteplici effetti a livello del tessuto circostante. Nonostante i risultati incoraggianti, l'utilizzo di cellule BM-MS in protocolli di medicina rigenerativa è ostacolato ancora da una serie di criticità. In particolare, le cellule trapiantate presentano una scarsa sopravvivenza nel tessuto ospite e restano ancora da definire i fattori e i meccanismi molecolari che ne possono influenzare la funzionalità. Inoltre, emerge la necessità di standardizzare i protocolli di coltura e espansione *in vitro* a scopo clinico al fine di evitare sensibilizzazioni e contaminazioni legate all'uso di

proteine di origine animale come il siero fetale bovino, normalmente utilizzato nelle colture cellulari. In questo contesto, l'utilizzo di emoderivati ad uso non trasfusionale quali il plasma ricco di piastrine (*Platelet Rich Plasma*, PRP), potrebbe offrire numerosi vantaggi. Infatti, esso è facilmente isolabile da sangue intero di pazienti, è potenzialmente sicuro e, essendo una fonte naturale di fattori di crescita derivati dalle piastrine, potrebbe rappresentare un buon sostituto del siero animale per la coltura cellulare *in vitro* apportando contemporaneamente effetti terapeutici benefici quando applicato *in vivo* nel sito di lesione tissutale. Studi recenti hanno dimostrato che il PRP *in vitro* ha effetti positivi sulla sopravvivenza e sulla proliferazione di diversi tipi di cellule e che, *in vivo* contribuisce ad implementare i meccanismi di riparazione/rigenerazione di diversi tessuti danneggiati tra cui il muscolo scheletrico. Tuttavia, per quanto riguarda l'applicazione terapeutica del PRP a livello di lesioni del muscolo scheletrico i dati clinici sono tuttora controversi ed appaiono indispensabili ulteriori evidenze sperimentali di tipo traslazionale che giustifichino il passaggio “*from the bench to the bedside*”.

RIPARAZIONE E RIGENERAZIONE DEL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO IN SEGUITO A DANNO

Le fasi principali della riparazione di una lesione muscolare

Il muscolo scheletrico adulto è un tessuto relativamente stabile, con un basso *turnover* di replicazione; tuttavia possiede una considerevole capacità rigenerativa, che si manifesta in seguito a traumi o in specifici stati patologici. Sia che il danno muscolare dipenda da un trauma diretto (attività fisica intensa e allenamento alla resistenza) o da difetti innati e, indipendentemente dalla gravità della lesione, il processo di riparazione del muscolo prevede il susseguirsi di fasi che in parte si sovrappongono e che si possono schematizzare nel seguente modo: 1) degenerazione e infiammazione 2) fase rigenerativa e 3) fase di rimodellamento della matrice extracellulare/riparazione (Figura 1).

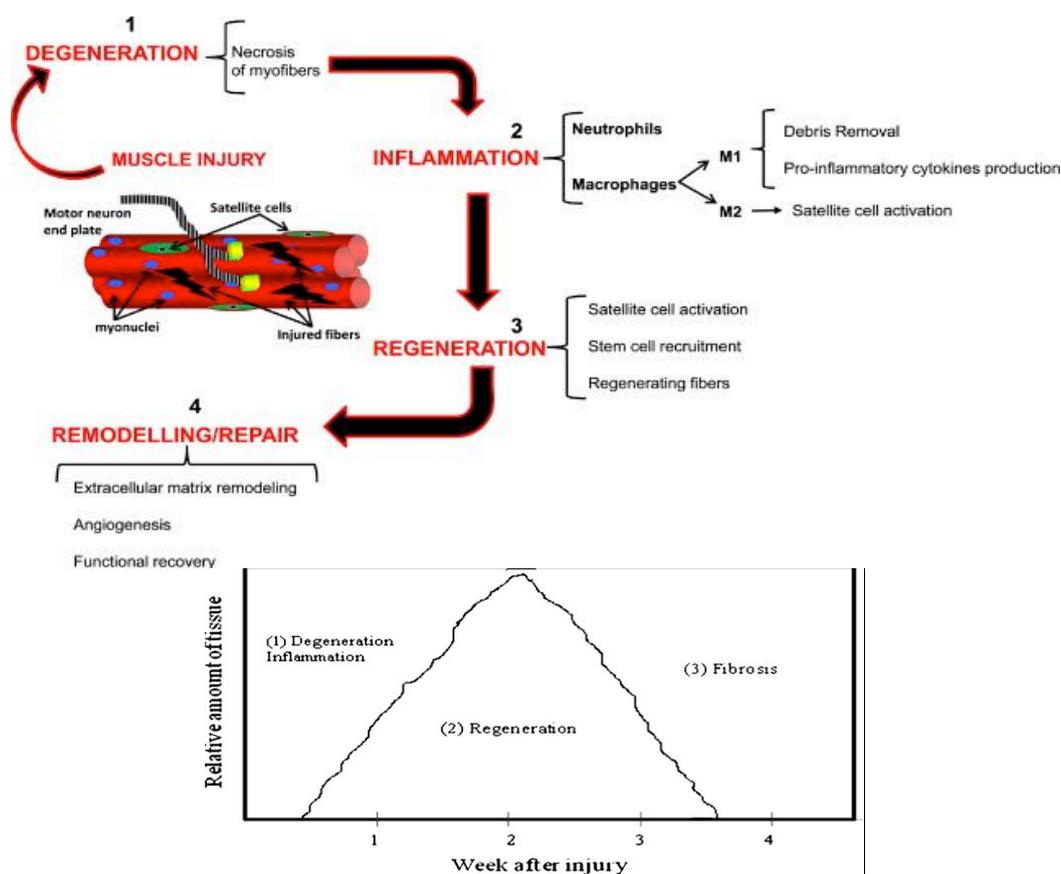


Figura 1. La risposta muscolare al danno. Fasi che si susseguono nel tempo in seguito a danno muscolare (da Carosio et al. 2011; da Filippin et al. 2009).

- Fase di degenerazione e infiammazione:

L'evento iniziale che si instaura in seguito a danno è la necrosi delle fibre muscolari. Questo evento è generalmente innescato dalla rottura del sarcolemma delle miofibre con conseguente aumento della permeabilità cellulare (Yin et al., 2013). Tale processo, è causato da un aumento del flusso di calcio e dal rilascio di questo dal reticolo sarcoplasmatico che, a sua volta, attiva una serie di proteasi calcio-dipendenti che portano ad una rapida degenerazione tissutale. La presenza di fibre necrotiche attiva la risposta infiammatoria che si caratterizza per l'invasione del tessuto lesionato da parte di specifiche popolazioni di cellule infiammatorie il cui reclutamento avviene in maniera sequenziale (Figura 2a). L'infiammazione è chiaramente una componente fondamentale della fisiologia del muscolo ed è una fase importante del processo rigenerativo. Infatti, l'inibizione della risposta infiammatoria o l'alterazione dell'attività fagocitaria delle cellule deputate a questo processo, ha effetti negativi sul processo di rigenerazione. Questi eventi accadono entro i primi minuti e perdurano per una/due settimane dopo il danno. Le prime cellule che infiltrano il sito di danno sono i neutrofili. È stato osservato che già dopo un'ora dal danno muscolare e fino a sei ore, il loro numero aumenta in modo significativo. Queste cellule rapidamente rilasciano alte concentrazioni di radicali liberi e proteasi, che promuovono la rimozione dei detriti cellulari e secernono numerose citochine pro-infiammatorie in grado di stimolare il richiamo di macrofagi, con conseguente amplificazione del processo infiammatorio (Tidball, 2005; Turner et al., 2012). Dopo infiltrazione dei neutrofili e circa quarantotto ore dopo il danno, i macrofagi diventano il tipo di cellule infiammatorie predominante a livello del sito lesionato. In particolare, si possono distinguere due differenti classi di macrofagi conosciuti come M1 e M2 (Schiaffino et al., 2017; Tidball, 2017). I macrofagi M1 esprimono i *marker* di superficie $CD68^+/CD163^-$, sono i primi a invadere il sito di danno e raggiungono la loro massima concentrazione dopo circa ventiquattro ore. Varie sono le azioni di queste cellule: infatti, è stato dimostrato che, mediante un meccanismo ossido nitrico (NO)-dipendente, esse promuovono la lisi muscolare; tale azione risulta aumentata in presenza dei neutrofili. D'altra parte i macrofagi svolgono un ruolo determinante nella rimozione di tessuto necrotico e di detriti cellulari, e producono citochine, fattori di crescita, e chemochine (come interleuchine IL1 β , IL6, IL8, il fattore di necrosi tumorale alfa,

TNF α) importanti non solo per il reclutamento di ulteriori cellule infiammatorie ma anche per l'attivazione delle cellule satelliti e quindi per la rigenerazione tissutale (Tidball 2005; Butterfield et al., 2006; Arnold et al., 2007). La seconda popolazione di macrofagi (M2), esprimenti i *marker* di superficie CD68/CD163⁺, raggiungono la loro concentrazione massima dopo circa 2/4 giorni dal danno. Queste cellule M2, a differenza delle prime, sono responsabili dell'attenuazione della risposta infiammatoria, producendo citochine anti-infiammatorie (IL10), e sono coinvolte nella promozione della formazione di nuovi vasi (angiogenesi) e nel processo di attivazione delle cellule satelliti (Carosio et al., 2011).

- Fase rigenerativa

La fase infiammatoria è seguita dalla fase proliferativa che prevede l'attivazione di cellule staminali unipotenti residenti nel tessuto muscolare scheletrico, le cellule satelliti, le quali sono responsabili della formazione di nuove fibre muscolari. Queste cellule, normalmente in stato di quiescenza, si attivano seguendo un cammino che culmina con la fusione dei mioblasti in elementi multinucleati, i miotubi, precursori delle fibre muscolari (Figura 2). Questa fase inizia la prima settimana dopo il danno e raggiunge il suo picco dopo circa quattordici giorni.

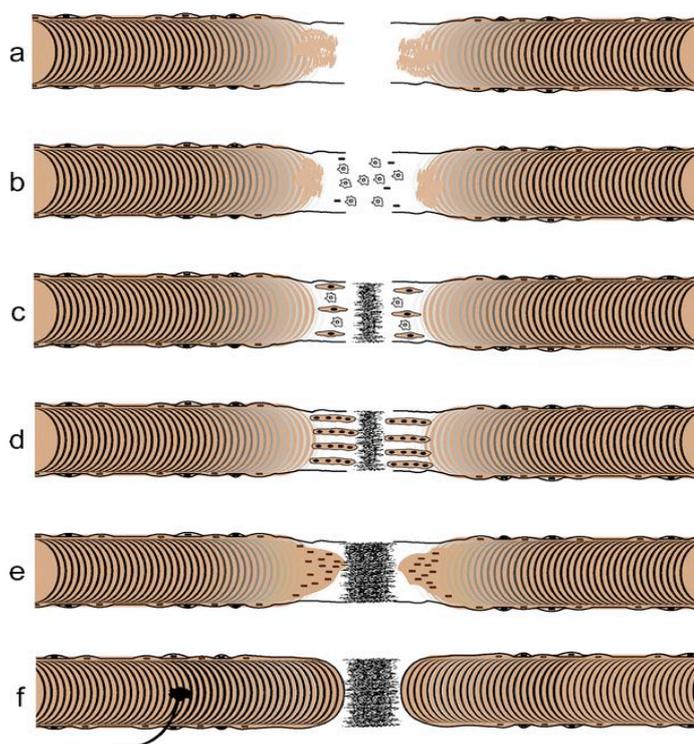


Figura 2. Rigenerazione muscolare scheletrica in seguito a danno. Dopo lesione muscolare con perdita volumetrica (a), le fibre necrotiche vengono degradate grazie all'invasione delle cellule infiammatorie le quali a sua volta attirano le cellule satelliti e rimuovono i detriti cellulari (b). Le cellule satelliti cominciano a differenziarsi in mioblasti mentre i fibroblasti iniziano a depositare il tessuto cicatriziale (c). Si iniziano a formare miotubi che iniziano a fondere con le miofibre esistenti per formare nuovi tessuti muscolari (d). Nei casi di perdita muscolare volumetrica, la formazione del tessuto cicatriziale procede più rapidamente della miogenesi, con la produzione di una cicatrice densa che impedisce alle miofibre di colmare la ferita (e) e che divide il muscolo. Di conseguenza, il tessuto distale (destra) che non contiene nessuna giunzione neuromuscolare diviene denervato (f)

- Fase di rimodellamento della matrice extracellulare/riparazione.

La fase finale del processo rigenerativo è caratterizzata dal rimodellamento del tessuto connettivo, neovascolarizzazione e dal recupero funzionale del muscolo danneggiato. Tale fase inizia con la migrazione di cellule endoteliali e fibroblastiche a livello del sito di lesione. Sia la migrazione che la successiva proliferazione di queste cellule, sono stimulate da fattori di crescita e citochine. Le fonti principali di tali molecole sono le piastrine, le cellule infiammatorie (in particolare i macrofagi) e le cellule attivate dell'endotelio. Le cellule endoteliali migrate nel sito di danno sono responsabili della formazione di nuovi vasi capillari, mentre i fibroblasti hanno il compito di produrre matrice extracellulare (ECM) (Turner e Badyak, 2012). Questo processo normalmente inizia due settimane dopo il danno e prosegue in maniera crescente per quattro settimane. In questa fase gioca un ruolo importante, il TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*), (Jarvinen et al., 2005). Questa risposta produttiva inizialmente è vantaggiosa perché rapida e aiuta a proteggere il tessuto danneggiato. Tuttavia, se la fibrosi si prolunga nel tempo e in ammontare, si può formare tessuto cicatriziale non contrattile con conseguente perdita della funzione muscolare (Figura 2). Il processo riparativo si completa quando le miofibre danneggiate recuperano la loro capacità contrattile e funzionale. Risulta evidente che il raggiungimento del pieno recupero morfo-funzionale di un muscolo danneggiato dipende dal delicato equilibrio che si instaura tra i processi di infiammazione, rigenerazione e fibrosi.

Le cellule satelliti

Le cellule satelliti sono elementi mioblastici mononucleati, precursori delle fibre muscolari scheletriche e sono responsabili della crescita postnatale, della riparazione/rigenerazione e del mantenimento del tessuto muscolare scheletrico. Tali cellule furono osservate per la prima volta mediante microscopia elettronica nel 1961 da Mauro che individuò un gruppo di cellule mononucleate alla periferia delle fibre

muscolari adulte. La loro giustapposizione diretta con le miofibre sollevò immediatamente l'ipotesi che queste cellule potessero essere coinvolte nel processo di crescita e nella rigenerazione del muscolo scheletrico (Mauro, 1961). Infatti, da esperimenti successivi eseguiti mediante marcatura con timidina triziata e microscopia elettronica risultò che queste cellule andavano incontro a mitosi e contribuivano a fornire nuclei alle fibre (Moss e Leblond, 1970; Reznik, 1969). In seguito, ulteriori indagini dimostrarono che le cellule satelliti si trovano in uno stato di quiescenza nei muscoli adulti ma possono rapidamente entrare nel ciclo cellulare in seguito a lesione muscolare (Snow, 1977). Le cellule satelliti sono state così chiamate per la loro localizzazione anatomica alla periferia di una fibra muscolare scheletrica, tra il sarcolemma e la membrana basale (Figura 3). Morfologicamente queste cellule mononucleate appaiono tondeggianti con estremità allungate. Il nucleo di dimensioni ridotte contiene abbondante eterocromatina e il citoplasma è scarso, hanno pochi mitocondri, un reticolo endoplasmatico rugoso ridotto, un apparato del Golgi poco sviluppato e nessun miofilamento. Questa morfologia ben si correla con lo stato di quiescenza e di inattività.

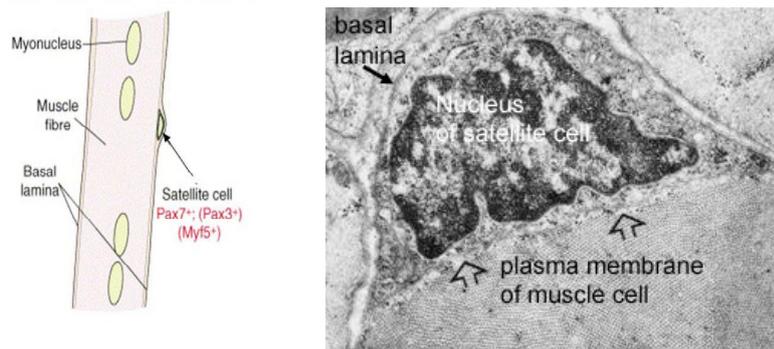


Figura 3. A sinistra: schema della localizzazione di una cellula satellite, tra il sarcolemma e la membrana basale di una fibra muscolare scheletrica (modificato da Buckingham, 2006). A destra: immagine al microscopio elettronico a trasmissione di una sezione trasversale di muscolo scheletrico dove è visibile una cellula satellite caratterizzata dalla presenza di un unico nucleo.

Le cellule satelliti sono presenti in tutti i muscoli scheletrici anche se con una diversa distribuzione nei diversi muscoli e nei diversi tipi di fibra. Negli adulti la percentuale di cellule satelliti nel muscolo soleo (muscolo principalmente composto da fibre lente) è generalmente due o quattro volte superiore rispetto a quella del muscolo tibiale anteriore o del muscolo estensore lungo delle dita (muscoli principalmente composti da fibre

veloci) (Yin et al., 2013). Inoltre, all'interno dello stesso muscolo, il numero di cellule satelliti che si trovano in prossimità delle fibre muscolari lente di tipo I è superiore rispetto al numero di cellule che si trovano vicino alle fibre veloci di tipo IIa e tipo IIb (Mackey et al., 2009). Una maggior densità di cellule satelliti è stata anche osservata a livello della placca neuromuscolare e nelle vicinanze dei capillari, suggerendo che alcuni fattori rilasciati da queste strutture potrebbero giocare un ruolo nella regolazione della loro funzionalità e nel *pool* di cellule satelliti stesse. La loro popolazione varia anche in base all'età. Si assiste infatti ad una diminuzione del numero di queste cellule nel corso della vita. Alla nascita, nel topo, il numero di cellule satelliti rappresenta circa il 30% dei nuclei muscolari mentre scende al 5% nell'adulto. Dopo la maturità sessuale, il numero di cellule satelliti continua a diminuire sebbene non drasticamente (Chargè e Rudnicki, 2004; Corbu et al., 2010).

Marker identificativi

Dal punto di vista molecolare le cellule satelliti sono contraddistinte dall'espressione del fattore nucleare di trascrizione Pax7 (*Paired Box Transcription*) (Buckingham, 2007).

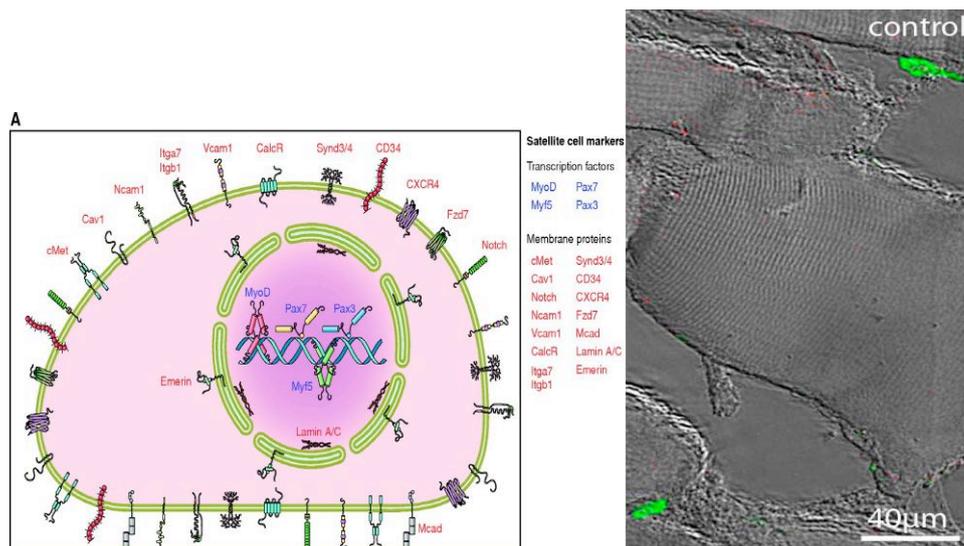


Figura 4. A destra i marker delle cellule satelliti. A sinistra immagine di una sezione di muscolo scheletrico EDL murino ottenuta sovrapponendo un'immagine a contrasto di fase e un'immagine ottenuta al microscopio confocale a fluorescenza a scansione laser. In verde sono rappresentate le cellule satelliti esprimenti Pax 7 (modificato da Sassoli et al., 2010).

Poiché solo le cellule satelliti esprimono Pax7, anticorpi specifici per tale fattore permettono di identificare in maniera diretta le cellule satelliti nei preparati istologici di

tessuto muscolare, nelle colture cellulari o nelle fibre muscolari isolate (Figura 4). Alcune cellule satelliti di alcuni muscoli, come il diaframma, esprimono anche Pax3 (Soleimani, 2012). I fattori Pax giocano un ruolo molto importante nell'embriogenesi di diversi tessuti e organi. I geni della famiglia dei fattori di trascrizione Pax sono caratterizzati dalla presenza di due domini in grado di legarsi al DNA; uno *paired domain* e un *homeodomain*. Il fattore Pax7 è fondamentale per la specificazione delle cellule satelliti e per la loro sopravvivenza. In topi geneticamente mutati per la soppressione dell'espressione del gene Pax7, è stato osservato che il numero di cellule satelliti diminuisce rapidamente subito dopo la nascita, presumibilmente per morte apoptotica (Sincennes et al., 2016). Pax7 inoltre è fondamentale per la progressione nel ciclo cellulare delle cellule satelliti e dei mioblasti e Pax3 funziona regolando l'espressione di specifici fattori miogenici (MRF: myogenic regulator factors) quali Myf5, MyoD, MRF4 e miogenina (Soleimani, 2012; Zammit et al., 2006; Yablonka-Reuveni et al., 2008). I fattori miogenici giocano un ruolo importante nel definire il destino delle cellule satelliti (differenziamento verso la fibra muscolare o meno) e, infatti, sono espressi in modo coordinato e sequenziale durante il processo di miogenesi. Le cellule satelliti esprimono anche altri fattori, quali il recettore c-met per il fattore HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), CD34 (*hematopoietic progenitor cell antigen*), Sindecano 3, Sindecano 4, caderina di tipo muscolare (M-caderina), integrina $\alpha 7$ e integrina $\beta 1$, MNF (*Myocyte Nuclear Factor*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) (Covault e Sanes, 1986 ; Garry et al., 1997; Cornelison e Wold, 1997; Tatsumi et al., 1998, Jesse et al., 1998, Beauchamp et al., 2000, Cornelison et al., 2001, Chargè e Rudnicki, 2004; Yin et al., 2013, Figura 4). Tuttavia, anche nel contesto del tessuto muscolare scheletrico, questi marker, ad eccezione della M-caderina, non sono espressi esclusivamente da cellule della linea miogenica.

Ruolo delle cellule satelliti nella rigenerazione muscolare scheletrica

La rigenerazione muscolare scheletrica è caratterizzata inizialmente dall'attivazione delle cellule satelliti, che in condizioni normali sono in fase G0, ma si attivano in risposta a specifici segnali che provengono dall'ambiente circostante e iniziano a proliferare (Costamagna et al., 2015). L'attivazione delle cellule satelliti coinvolge moltissime cellule: è stato infatti osservato che le cellule satelliti durante lo sviluppo, la crescita e la rigenerazione muscolare, sono capaci di migrare tra le fibre e anche tra i muscoli adiacenti. Dopo una serie di cicli di proliferazione la maggior parte delle cellule

satelliti entra nel programma di differenziamento miogenico. In particolare, le cellule attivate iniziano a fondersi tra loro per formare miotubi e poi fibre multinucleate mature in grado di fondersi direttamente con le fibre danneggiate (Chargè e Rudnicki, 2004; Shi e Garry 2006). Inizialmente le nuove fibre muscolari sono caratterizzate da dimensioni ridotte e nuclei centrali.

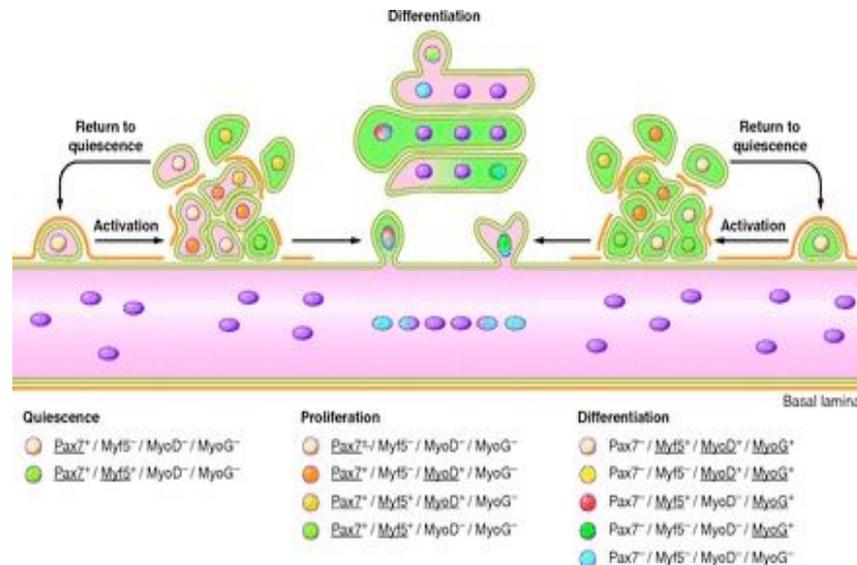


Figura 5 Tappe del programma miogenico. Una volta attivate, le cellule satelliti seguono essenzialmente le tappe della miogenesi embrionale attivazione, proliferazione, differenziamento e fusione con formazione di miotubi e infine delle miofibre. Alcune cellule satelliti non differenziano in fibre muscolari scheletriche, si autoreplicano e tornano allo stato di quiescenza, provvedendo alla riserva del pool di cellule satelliti (self renewal) (da Yin *et al.*, 2013)

Nel giro di circa 3-5 settimane le neofibre aumenteranno le proprie dimensioni e i nuclei, prima centrali, si sposteranno alla periferia della fibra. L'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule satelliti sono processi regolati da una famiglia di fattori di trascrizione, tra cui Myf5, MyoD, Miogenina e Mrf4. All'inizio, le cellule esprimono il fattore di trascrizione Myf5 e poi MyoD e iniziano a proliferare come cellule co-esprimenti Pax7 e MyoD (Pax7⁺/MyoD⁺). L'espressione di Myf5 e MyoD è mutualmente esclusiva: cellule che esprimono MyoD non esprimono più Myf5. Queste cellule Pax7⁺/MyoD⁺ daranno origine a due popolazioni con destini divergenti. Un pool di cellule downregola Pax7, mantiene l'espressione di MyoD e inizia il programma di differenziamento miogenico. Con la comparsa di miogenina si ha l'uscita dal ciclo cellulare dei mioblasti, la loro fusione e l'inizio del differenziamento. MRF4 compare quando i mioblasti entrano nella fase terminale di differenziazione (Zhou e Bornemann, 2001), a cui segue l'espressione di geni muscolo specifici per le catene pesanti della

miosina e della proteina chinasi muscolare. Un altro pool di cellule derivanti da cellule Pax7⁺/MyoD⁺ invece non differenzia, downregola MyoD, mantiene l'espressione di Pax7 e Myf5 e va a ricostituire la riserva iniziale di cellule satelliti, garantendo un ricambio, disponibile per successivi cicli rigenerativi. Viste tali capacità di autorigenerazione, le cellule satelliti possono essere considerate le cellule staminali residenti unipotenti del muscolo scheletrico (Kuang and Kuroda, 2007; Tierney and Sacco, 2016; Figura 5).

Regolazione della rigenerazione muscolare scheletrica

Il comportamento delle cellule satelliti, il mantenimento del loro stato di quiescenza, la loro attivazione, nonché la loro progressione o meno nel programma miogenico, sono tutte fasi regolate precisamente da una serie di meccanismi e fattori stimolanti o inibenti, che agiscono all'interno del microambiente (nicchia) dove tali cellule sono localizzate (Figura 6). Questi fattori comprendono vie di segnalazione, interazioni cellula-cellula, cellula-matrice extracellulare, cellula-membrana basale come pure la secrezione da parte di cellule residenti come ad esempio le cellule interstiziali, cellule endoteliali, e cellule immunitarie di ulteriori fattori (Bentzinger et al., 2010; Ten Broek et al., 2010).

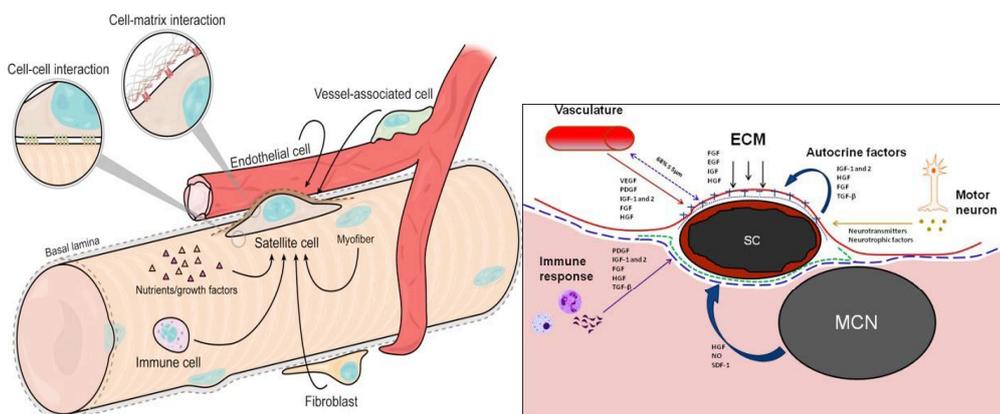


Figura 6. Nicchia delle cellule satelliti. Il comportamento di queste cellule è influenzato da interazioni cellula-cellula, interazioni cellula-ECM, cellula-membrana basale e dalla secrezione di diversi fattori (Bentzinger et al., 2012; Ten Broek et al., 2010)

Vie di segnalazione

- *La via di segnalazione di Wnt*

La via di segnalazione mediata dalla famiglia di glicoproteine Wnt è coinvolta in diversi processi biologici, come la proliferazione, l'adesione, la polarità e la morfologia di molti tipi di cellule comprese le cellule satelliti. Questa via di segnalazione si attiva quando la glicoproteina Wnt si lega al recettore Frizzled localizzato sulla membrana plasmatica delle cellule target. Frizzled presenta un dominio extracellulare N-terminale ricco di cisteine che lega la proteina Wnt, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossiterminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria anche la presenza dei corecettori LRP (*LDL-related protein*) e la formazione del complesso ternario WNT/Frizzled/LRP. I segnali Wnt sono trasdotti attraverso almeno tre vie distinte di segnalazione intracellulare, che comprendono il *pathway* canonico "Wnt/ β -catenina", il *pathway* "Wnt/Ca²⁺" e il *pathway* "Wnt/PCP" (*planar cell polarity*) (Figura 7). Il più studiato è il *pathway* "Wnt/ β -catenina", la cui funzione principale è quella di regolare i livelli intracellulari di β -catenina. Questa proteina si associa con la caderina transmembrana e l' α -catenina legata al citoscheletro, promuovendo l'adesione e controllando la morfologia cellulare. I livelli di β -catenina citoplasmatica sono mantenuti grazie all'enzima GSK3- β (*Glycogen Synthase Kinase-3 β*) che è in grado di degradare l'eccesso di β -catenina. In particolare, si forma un complesso multiproteico che porta alla fosforilazione della β -catenina. Questa, una volta fosforilata viene legata dalla proteina β -TrCP (*β -transducin repeat containing protein*), una componente del complesso E3 ubiquitina ligasi, che la rende poliubiquitinata e quindi degradabile dal proteasoma. Il legame delle glicoproteine Wnt con il recettore, induce la fosforilazione di Dishevelled (Dvl), una proteina che inattiva l'enzima GSK-3 β . Ciò determina un aumento di β -catenina citoplasmatica non fosforilata, la quale migra nel nucleo dove funge da trans-attivatore trascrizionale dei suoi geni target, legandosi ai fattori di trascrizione TCF/LEF (Nelson e Nusse, 2004). Numerose ricerche indicano che questa via di segnalazione regola la funzione delle cellule satelliti durante il processo di rigenerazione muscolare, anche se il suo ruolo esatto rimane incerto e i dati ottenuti sono in parte contrastanti. Infatti, lo studio di Brack (Brack et al., 2008) suggerì che la via di segnalazione mediata da Wnt fosse capace di promuovere il *commitment* e il differenziamento durante la miogenesi adulta, mentre Perez-Ruiz (Perez-Ruiz et al.,

2008) ipotizzò che la β -catenina fosse in grado di promuovere l'autorinnovamento delle cellule satelliti e di prevenire l'immediato differenziamento miogenico: lo stesso autore osservò, difatti, che l'espressione della β -catenina o l'inibizione della sua degradazione da parte dell'enzima GSK3 β portava ad una diminuita espressione di marker di differenziamento miogenico quali MyoD e miogenina.

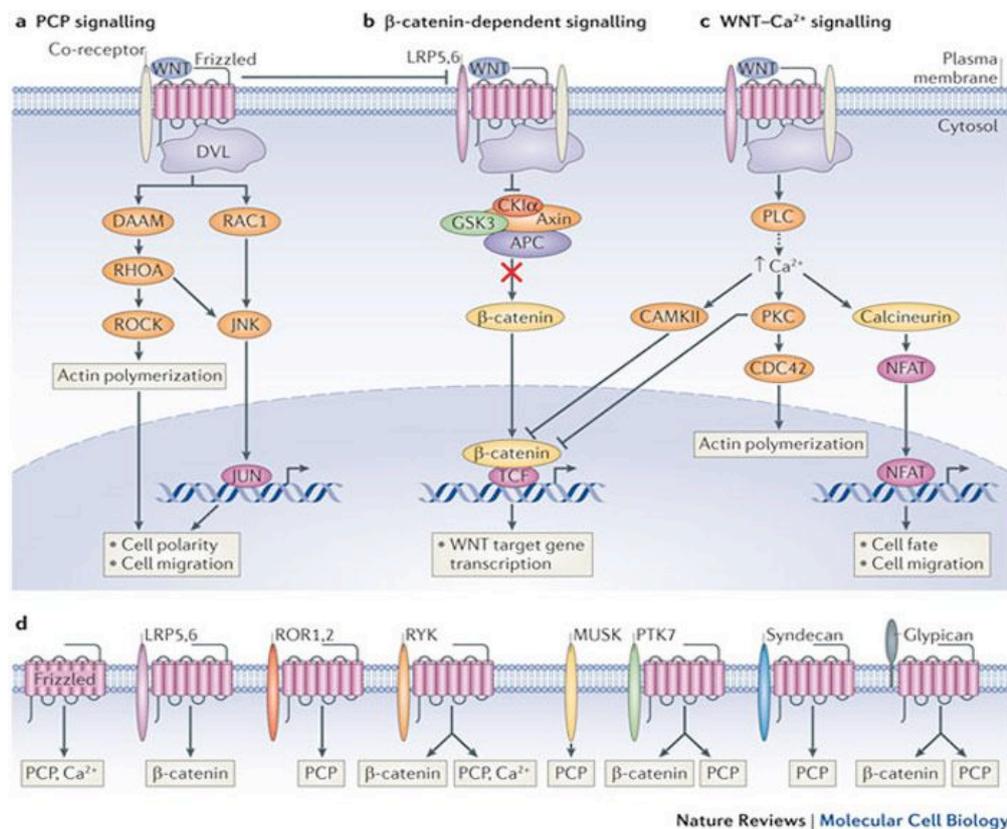


Figura 7. Le vie di segnalazione della proteina WNT.

Viceversa, quando l'espressione di β -catenina veniva downregolata si aveva una minore presenza di cellule Pax7⁺/MyoD⁻ e un aumento del differenziamento miogenico. Poiché i livelli di β -catenina determinavano tali effetti, è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento del *pathway* Wnt/ β -catenina. Infine, un altro gruppo di ricerca (Otto et al., 2008) ipotizzò invece che Wnt fosse importante per la proliferazione delle cellule satelliti durante il processo di rigenerazione del muscolo scheletrico. Osservarono che le proteine Wnt (Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, Wnt11) venivano espresse dalle fibre e dalle cellule satelliti dopo 2 giorni di coltura *in vitro* e che le proteine esogene Wnt1, Wnt3a e Wnt5a erano in grado di promuovere la proliferazione cellulare mentre Wnt4 e Wnt6, non espresse durante la rigenerazione muscolare scheletrica, la inibivano. L'effetto di Wnt3a così descritto sembra quindi opporsi a quello pro-differenziante riportato da

Brack (Brack et al., 2008). Ciò potrebbe essere dovuto alle diverse fonti di ligandi Wnt, come anche dall'espressione di Wnt da parte di cellule in coltura e dalla proteina ricombinante, che a sua volta potrebbero influenzare la concentrazione di Wnt e il tempo di espressione. Studi recenti hanno mostrato che non solo il *pathway* “Wnt/ β -catenina” ma anche che il *pathway* “Wnt/PCP” è in grado di regolare il comportamento delle cellule satelliti. Il legame Wnt-recettore induce attivazione della proteina Dvl che a sua volta porta ad attivazione di piccole GTPasi quali RhoA e Rac. Queste proteine portano a riorganizzazione del citoscheletro e all'attivazione di JNK (*Jun N-terminal kinase*) (Figura 7). La proteina Wnt7a agisce legandosi al recettore Frizzled7 attivando in modo specifico il percorso Wnt/PCP sia *ex vivo* che *in vitro*, ed è stato dimostrato che l'attivazione di questo percorso grazie a Wnt7a ricombinante è in grado di ampliare il pool di riserva di cellule staminali stimolando in modo particolare il processo di divisione cellulare simmetrica (Le Grand et al, 2009).

- *La via di segnalazione di Notch*

La via di segnalazione mediata dalla famiglia dei recettori Notch è emersa come un regolatore cruciale in molti processi cellulari diversi, inclusa la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza e l'apoptosi in molti tipi cellulari tra cui le cellule satelliti (Borggreffe et al., 2009; Gering et al., 2010; Cave, 2011; Chen et al., 2012). I recettori Notch (da Notch-1 a Notch-4 nei mammiferi) sono proteine transmembrana la cui attivazione richiede l'interazione con specifici ligandi. Il sito di legame con il ligando si trova a livello del dominio extracellulare del recettore. I ligandi sono Jagged 1 e -2, e Delta-like 1-4, espressi a livello della membrana plasmatica di cellule adiacenti. In seguito al legame con il ligando, si attiva un complesso proteolitico (disintegrine, metalloproteasi ADAM γ -secretasi) che determina il taglio di Notch con conseguente rilascio nel citoplasma di un frammento chiamato Notch-ICD (NICD), il quale trasloca nel nucleo e stimola la trascrizione di geni bersaglio (Boni et al., 2008; Figura 8).

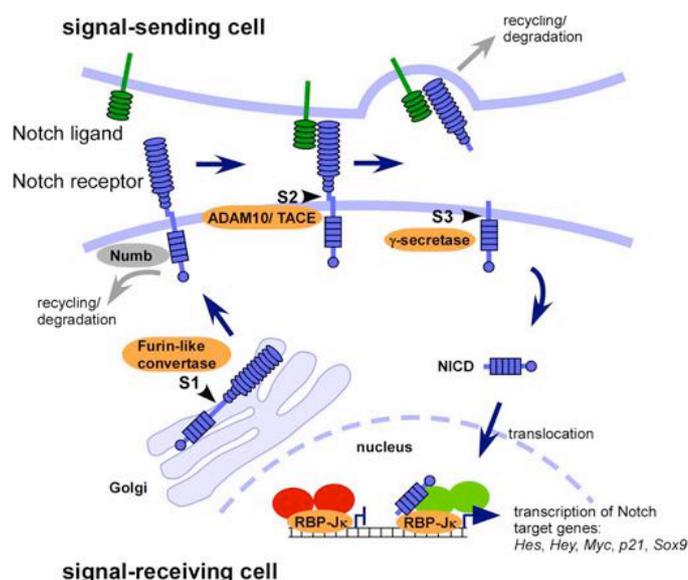


Figura 8. La via di segnalazione di Notch. (modificato da Geisler e Strazzabosco, 2015)

La via di segnalazione mediata da Notch gioca un ruolo chiave nella rigenerazione muscolare scheletrica. Nelle cellule progenitrici muscolari è stato dimostrato che il frammento NICD induce la trascrizione del gene Hes-1 il quale codifica per un fattore di repressione in grado di bloccare l'espressione dei fattori di trascrizione miogenici quali MyoD, Mef2 e miogenina. In particolare, Notch-1 è coinvolto nella promozione della proliferazione mioblastica e nell'inibizione del differenziamento miogenico (Buas et al., 2010). Dopo un danno muscolare, il ligando Delta viene rapidamente upregolato sia nelle cellule satelliti attivate che nelle fibre. Questo aumento induce attivazione di Notch che conseguentemente promuove la proliferazione delle cellule satelliti. Al contrario, l'inibizione di questa via di segnalazione ne riduce l'attivazione e altera la rigenerazione del muscolo (Conboy e Rando, 2002). Con l'invecchiamento, l'espressione di Notch da parte delle cellule satelliti rimane invariata. Ciononostante, in seguito a lesione viene a mancare l'upregolazione di Delta, il che comporta una ridotta proliferazione cellulare e una rigenerazione muscolare alterata (Conboy et al., 2003). Tuttavia, per la fusione dei mioblasti e durante il differenziamento miogenico è necessario che la via di segnalazione mediata da Notch venga inattivata. A tale scopo esistono due meccanismi in grado di inibire questa via di segnalazione. Il primo coinvolge Numb, che induce ubiquitinazione del frammento attivo NICD determinando l'inibizione di questa via di segnalazione. Il secondo meccanismo coinvolge la via di segnalazione mediata da Wnt. Infatti, l'attivazione di Notch è associata alla fosforilazione della tirosina 216 di GSK-3b, mentre il trattamento con l'inibitore di Notch o l'attivazione della segnalazione Wnt nei mioblasti coincide con la

defosforilazione di questo residuo (Brack et al., 2008). Sebbene il meccanismo esatto rimanga sconosciuto è stato ipotizzato che alla base di questo antagonismo sia coinvolta la presenilina-1, enzima importante per il clivaggio di Notch e coinvolta nel pathway di Wnt. Sembra infatti che la presenilina-1 regoli negativamente la via di segnalazione Wnt/ β -catenina in quanto necessaria per l'ubiquitinazione della β -catenina (De Strooper e Annaert, 2001; Figura 9).

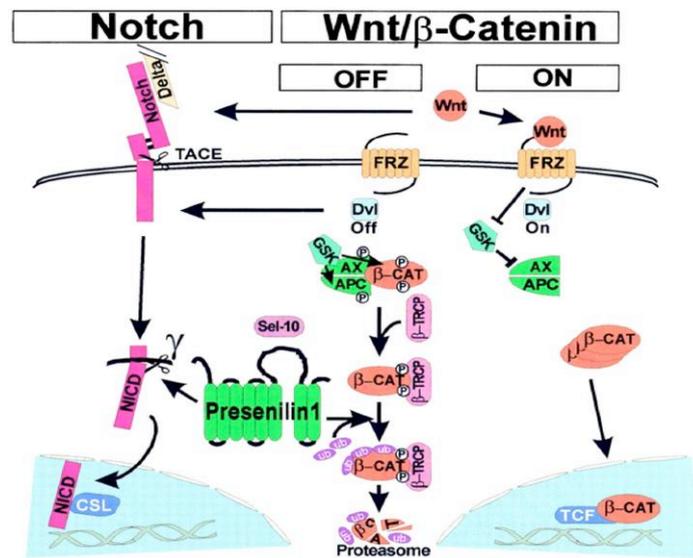


Figura 9. La presenilina nei pathways di Notch e Wnt. Rappresentazione schematica di entrambe le vie di segnalazione. Le frecce orizzontali indicano possibili *cross-talk* negativi. (da De Strooper e Annaert, 2001)

Sfingolipidi

Gli sfingolipidi sono un grande gruppo di glicolipidi naturali, in cui lo scheletro molecolare è rappresentato dalla molecola di sfingosina, un amino-alcool a lunga catena insatura. Ceramide, ceramide-1-fosfato, sfingosina e sfingosina-1-fosfato (S1P), inizialmente venivano ritenuti precursori inerti e prodotti intermedi del metabolismo lipidico, ma recentemente sono emersi come importanti molecole di segnalazione, capaci di regolare processi come proliferazione, migrazione, senescenza e morte cellulare (Hannun e Obeid, 2008). Studi condotti anche dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che lo sfingolipide S1P, legandosi al recettore accoppiato alla proteina G S1PR, influenza il processo di rigenerazione del muscolo scheletrico, promuovendo proliferazione, differenziamento e sopravvivenza di cellule mioblastiche (Sassoli et al.,

2014). Inoltre, è stato osservato che S1P esogeno è in grado di attenuare i danni muscolari indotti da una contrazione eccentrica, proteggendo le fibre muscolari dall'apoptosi e preservando la vitalità e il rinnovamento delle cellule satelliti (Sassoli et al., 2011a). Tuttavia, i dati sugli effetti degli sfingolipidi sulle cellule satelliti sono ancora incompleti. Ad esempio, l'effetto della ceramide sull'attivazione, proliferazione e differenziamento di queste cellule durante la rigenerazione muscolare scheletrica è poco noto e resta ancora da chiarire e verificare se S1P possa legarsi o meno ad altre proteine intracellulari ed esercitare azioni indipendenti da quelle dovute al suo legame con il recettore S1PR.

Nicchia muscolare

Le fibre muscolari prendono contatto diretto con le cellule satelliti regolandone il comportamento. Le fibre infatti, rilasciano nell'ambiente una serie di fattori in grado di influenzare la funzionalità delle cellule satelliti, ad esempio il fattore SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*), ligando del recettore CXCR4 (*chemokine receptor type 4*) che si trova sulla superficie delle cellule satelliti. Questa via di segnalazione SDF-1/CXCR4 si è dimostrata capace di promuovere la migrazione cellulare (Ratajczak et al., 2003). Inoltre, è stato osservato che in seguito a lesione, nelle fibre muscolari aumenta l'espressione di Delta, ligando del recettore transmembrana Notch, il quale, attivandosi promuove e stimola la proliferazione delle cellule satelliti (Conboy et al., 2003). Con l'invecchiamento, diminuiscono le dimensioni e il numero delle fibre e, anche se l'effetto diretto di tale cambiamento morfologico non è noto, si osserva una ridotta espressione di Delta e di conseguenza una diminuita attivazione della via di segnalazione di Notch. Questo evento potrebbe compromettere l'attivazione delle cellule satelliti e quindi alterare il processo di rigenerazione muscolare scheletrica.

Matrice extracellulare e fattori di crescita

La membrana basale delle fibre muscolari scheletriche è composta da una rete di matrice extracellulare che si trova a diretto contatto con le cellule satelliti e le separa dall'interstizio muscolare. La membrana basale è composta da collagene tipo IV, glicoproteine come laminina, entactina, fibronectina, decorina e proteoglicani. Queste molecole, sono principalmente sintetizzate e secrete dai fibroblasti, ma possono anche

essere secrete dai mioblasti durante lo sviluppo e la rigenerazione muscolare; le cellule satelliti più precisamente risiedono tra la lamina basale, composta principalmente da una rete di collagene di tipo IV e il sarcolemma apicale ricoperto di laminina. La membrana basale presenta un gran numero di siti di legame per le integrine $\alpha 7/\beta 1$; tali siti ancorano il citoscheletro actinico delle cellule satelliti alla matrice extracellulare. Ciò è fondamentale per l'attivazione di queste cellule poiché rende possibile trasdurre la forza meccanica extracellulare in segnali chimici intracellulari. Inoltre, i proteoglicani sulla superficie delle cellule satelliti agiscono da recettori per una serie di fattori di crescita. come ad esempio HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF-I, IGF-II (*insulin-like growth factor*) e le glicoproteine Wnt. Questi fattori di crescita vengono rilasciati dalle cellule satelliti, dalle fibre, dalle cellule interstiziali o provengono dal siero, alcuni sono presenti come riserva locale in forma inattiva con lo scopo di facilitare una rapida risposta in seguito a lesione. Infatti, la loro attivazione procede rapidamente grazie ad una serie di enzimi proteolitici presenti nel siero o nell'interstizio quali ad esempio la trombina, le proteasi e le metalloproteasi della matrice (MMP). Questo processo altamente coordinato ha lo scopo di promuovere la sopravvivenza, l'attivazione e la proliferazione delle cellule satelliti dopo danno muscolare. I fattori che influenzano le cellule satelliti e il processo di rigenerazione sono vari e i principali sono riassunti in Tabella 1.

Growth factor	Producing cell type	Proliferation/ differentiation	Function	Literatures
HGF	Active immune cells + vasculature + ECM	+/+	Induces quiescent SC activation	Allen et al. (1995), Suzuki et al. (2002), Tatsumi et al. (1998, 2001)
Basic FGF	Active immune cells + vasculature + autocrine + ECM	+/+	Up-regulated during regeneration, specific role is unclear	Allen and Boxhorn (1989), Doumit et al. (1993), Haugk et al. (1995), Robertson et al. (1993)
IGF-I	Active immune cells + vasculature + autocrine + ECM	+++	Highly mitogenic for myoblasts and promotes cell survival	Adams and McCue (1998), Allen and Boxhorn (1989), Doumit et al. (1993), Haugk et al. (1995), Menetrey et al. (2000), Sato et al. (2003)
IGF-2	Active immune cells + vasculature + autocrine	+/+	Up-regulated after IGF-I up-regulation, and has a small contribution in myoblast proliferation/differentiation	Doumit et al. (1993), Haugk et al. (1995)
VEGF	Variety of cell types, up-regulated during hypoxia	+/?	Stimulates angiogenesis	Doumit et al. (1993), Gowdak et al. (2000), Springer et al. (1998)
PDGF-AA, PDGF-BB	Active immune cells + endothelial cells	-/+, +/-	Regulate proliferation/differentiation in opposite ways and support angiogenesis	Doumit et al. (1993), Robertson et al. (1993)
Myostatin	Circulation + autocrine	-/-	Maintains SC quiescence	Amthor et al. (2002), McCroskery et al. (2003), McPherron and Lee (1997)
TGF- $\beta 1$ and TGF- α	Active immune cells + autocrine	-/-	Prevents myoblast differentiation and recruitment	Allen and Boxhorn. (1989), Haugk et al. (1995), Robertson et al. (1993)

Tabella 1. Principali fattori che regolano il comportamento delle cellule satelliti e il processo di rigenerazione muscolare (modificato da Ten Broek et al., 2010).

I fattori di crescita IGF-I e IGF-II agiscono in modo autocrino/paracrino durante la rigenerazione e svolgono un ruolo importante nel regolare l'attività delle cellule satelliti. IGF-I è in grado di ridurre la degenerazione e di promuovere la sopravvivenza delle

fibre muscolari. Entrambi i fattori favoriscono una più rapida risoluzione dell'evento infiammatorio che si verifica in seguito a trauma, riducono la fibrosi ostacolando quindi la formazione di una cicatrice non contrattile e modulano il livello di espressione dei fattori di trascrizione miogenica nelle cellule satelliti, favorendo la loro proliferazione e il loro differenziamento. L'aumento di IGF-I nel muscolo scheletrico è associato anche a ipertrofia, dovuta ad un incremento della sintesi proteica e ad una maggior attivazione delle cellule satelliti, che provvedono a rifornire le fibre di nuovi mionuclei. Da studi *in vitro* è emerso che tali effetti siano in parte dovuti al coinvolgimento della via del fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e la conseguente attivazione del signaling antiapoptotico di AKT. PI3K sembra essere coinvolto anche nell'incremento della sintesi proteica mediata dal fattore IGF-I (Yin et al., 2013; Ten Broek et al., 2010).

Un fattore importante nell'induzione dell'uscita dallo stato di quiescenza delle cellule satelliti è il fattore HGF, che si trova nella forma inattiva pro-HGF a livello della matrice extracellulare circondante le cellule satelliti. I dati *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che in seguito a danno si attiva l'enzima ossido nitrico sintasi (*Nitric Oxide Synthase*, NOS), responsabile della produzione di ossido nitrico. Questo a sua volta attiva le MMP determinando il rilascio di HGF dalla matrice extracellulare. Questo poi agisce direttamente sulle cellule satelliti, legandosi al recettore specifico c-met, espresso sia dalle cellule quiescenti che quelle attivate e ne provoca l'attivazione, la loro migrazione nel sito di danno e la proliferazione dei mioblasti, inibendo però al contempo il loro differenziamento (Ten Broek et al., 2010; Anderson, 2016).

Delle nove isoforme di FGF solo cinque hanno mostrato un'attività mitogena nelle cellule satelliti. In particolare, questi fattori stimolano la proliferazione cellulare e rallentano il differenziamento miogenico (Pawlikowski et al., 2017). Inoltre, i fattori di crescita FGF promuovono la rigenerazione muscolare grazie alla loro capacità di indurre angiogenesi.

I fattori della famiglia dei TGF- β agiscono invece inibendo sia la proliferazione che il differenziamento delle cellule satellite. La miostatina, membro della famiglia dei TGF- β , viene espresso dalle cellule satelliti e dai mioblasti e il suo rilascio determina downregolazione dei marker Pax3 e Myf5 e inibisce l'espressione di MyoD. La miostatina è in grado di mantenere le cellule satelliti nello stato di quiescenza e inibire il loro *autorinnovamento*. Inoltre, sia la miostatina che il TGF- β 1 agiscono inibendo sia il reclutamento delle cellule mioblastiche nonché il loro differenziamento (Ten Broek et al., 2010). Oltre a tali effetti è ben noto che i fattori di crescita TGF- β risultano poi

importanti nella promozione della fibrosi, inducendo la transizione fibroblasto/miofibroblasto, promuovendo la deposizione di matrice extracellulare e aumentando la produzione di collagene e proteine della matrice. Ciò favorisce la formazione di tessuti cicatriziali che alterano la funzionalità muscolare e impediscono la corretta rigenerazione tissutale (Delaney et al., 2017).

Le MMP sono una famiglia di enzimi zinco-dipendenti in grado di degradare i componenti della matrice extracellulare. Nel muscolo scheletrico, le MMP svolgono un ruolo importante durante la rigenerazione muscolare regolando l'attivazione, la migrazione e il differenziamento cellulare. Tra tutte le MMP, nel muscolo scheletrico sono presenti MMP-2,-3,-7 e -9. In particolare, tra queste, MMP-2 e MMP-9, giocano un ruolo importante nella rigenerazione del muscolo scheletrico in seguito a danno. È stato osservato che MMP-9 è coinvolta nella progressione del ciclo delle cellule mioblastiche (Zimowska et al., 2013), mentre l'espressione e l'attività di MMP-2 durante la fase di allungamento del differenziamento miogenico, è un requisito essenziale per completare la successiva migrazione e fusione delle cellule mioblastiche (Oh et al., 2004; Lluri et al., 2005; Ohtake et al., 2006; Nishimura et al., 2008; Chen e Li 2009; Miyazaki et al., 2011). La MMP-2 degrada il collagene di tipo IV e ciò consente alle cellule satelliti di migrare attraverso la membrana basale verso il sito di lesione. Recenti studi indicano che l'ossido nitrico induce un aumento dell'attività enzimatica e dei livelli di espressione di MMP-2 e MMP-9 e che l'attivazione di MMP-2 è necessaria per il rilascio di HGF dalla matrice extracellulare (Kherif et al., 1999; Yamada et al., 2008).

Microambiente esterno alla nicchia

Oltre ai meccanismi e fattori che agiscono all'interno della nicchia dove risiedono le cellule satelliti, anche le popolazioni cellulari stromali locali, i motoneuroni, i vasi sanguigni e i fattori da questi rilasciati, regolano il comportamento delle cellule satelliti e influenzano quindi la rigenerazione del muscolo lesso.

- *Cellule dello stroma*

Le cellule stromali sono una componente rilevante tra la membrana basale e l'epimisio che circonda il muscolo scheletrico. La principale popolazione di cellule stromali è rappresentata fibroblasti, i quali, oltre a secernere fattori di crescita come ad esempio FGF, hanno il compito di secernere matrice extracellulare. In diverse condizioni patologiche (diabete e distrofia muscolare) o con l'invecchiamento, si assiste ad una infiltrazione di tessuto fibrotico e adiposo dello stroma che compromette la funzionalità

muscolare. E' stato dimostrato che sia gli adipociti che i fibroblasti intramuscolari derivano da progenitori residenti nel muscolo (*fibrocyte/adypocyte progenitors*, FAPs). Tali cellule non possiedono peraltro potenziale miogenico nè *in vitro* nè *in vivo*. I FAP sono abbondanti nel muscolo sano e il loro differenziamento è influenzato dal microambiente in cui si trovano. In caso di danno muscolare queste cellule ritornano in ciclo, proliferano e producono segnali che promuovono il processo di rigenerazione del muscolo scheletrico. Sembra, infatti, che questi precursori favoriscano il differenziamento delle cellule satelliti presumibilmente grazie alla produzione di interleuchina-6 (IL-6). In sintesi, durante la rigenerazione muscolare scheletrica si viene a creare un microambiente caratterizzato dalla coesistenza di progenitori delle fibre muscolari e FAP, entrambi con il compito di coordinare il processo riparativo. In caso di patologia muscolare, tuttavia, si viene a interrompere questo equilibrio, i FAP si differenziano in adipociti e presumibilmente anche in fibroblasti e possono condurre alla produzione di tessuto adiposo e fibroso in eccesso (Joe et al., 2010). Oltre ai FAP sono stati identificati a livello dell'interstizio muscolare anche i telociti, un particolare tipo cellulare di origine mesenchimale localizzato in prossimità delle cellule satelliti, fibre muscolari, terminazioni nervose e vasi sanguigni (Popescu et al., 2011; Bojin et al., 2011). A livello ultrastrutturale, i telociti sono caratterizzati da un corpo cellulare di piccole dimensioni, con lunghi processi citoplasmatici di aspetto moniliforme, chiamati telopodi. Per la loro posizione strategica nell'interstizio del muscolo scheletrico, i telociti partecipano alla segnalazione intercellulare tra cellule stromali, cellule immunitarie, cellule muscolari, microvasi e fibre nervose, mediante contatti intercellulari e secrezione paracrina di molecole di segnalazione, attraverso il rilascio di vescicole ed esosomi (Faussonne-Pellegrini e Popescu, 2011). Sebbene il loro ruolo esatto nel processo di rigenerazione muscolare sia ancora sconosciuto, l'osservazione che queste cellule secernono il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) suggerisce che i telociti potrebbero essere coinvolti nella promozione dell'auto-rinnovamento delle cellule satelliti, facilitando la neoangiogenesi e prevenendo la fibrosi (Deasy et al., 2009). Un'altra popolazione cellulare dell'interstizio muscolare è rappresentata dalle *muscle side population (SP) cells*, cellule caratterizzate dall'espressione della proteina trasportatrice Abcg2. Una piccola frazione di queste cellule sembra partecipare al processo di rigenerazione muscolare, rappresentando una fonte di cellule satelliti. È stato infatti dimostrato che la rimozione di Abcg2 è in grado di alterare il processo rigenerativo (Doyle et al., 2011).

- *Motoneuroni*

È ben noto che la denervazione provoca atrofia progressiva del muscolo scheletrico. A seguito di denervazione, nella prima settimana la percentuale di cellule satelliti nel muscolo aumenta, similmente a ciò che avviene dopo una lesione muscolare. Tuttavia, con il tempo si assiste ad una drastica riduzione di tali elementi, dovuta ad una ridotta capacità mitotica e ad un' aumentata apoptosi. Nonostante sia ancora poco conosciuto il ruolo dei neuroni nell'influenzare le cellule satelliti, sembra che siano coinvolte due neurotrofine quali NGF (*Nerve Growth Factor*) e BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*). NGF è espresso durante lo sviluppo muscolare e la sua espressione si riduce dopo la nascita. Nei muscoli adulti questo fattore viene espresso dalle fibre muscolari e dai fibroblasti durante la fase rigenerativa in corso di diverse condizioni patologiche come ad esempio la distrofia muscolare (Ruberti et al., 2000). All'interno del muscolo scheletrico, NGF agisce legandosi al recettore a bassa affinità p75^{NTR} espresso dalle cellule satelliti, mioblasti primari umani e miotubi (Deponti et al., 2009). È stato osservato che questa interazione NGF/ p75^{NTR} è necessaria per il differenziamento miogenico, in particolare sembra essere importante per indurre i cambiamenti morfologici necessari per la fusione dei mioblasti in miotubi. Come NGF, BDNF viene espresso durante lo sviluppo muscolare ma non nelle fibre adulte. BDNF è presente nella maggior parte delle cellule satelliti e sembra che la sua funzione sia quella di mantenere lo stato di quiescenza, impedendo il differenziamento. Un recettore specifico di BDNF non è stato identificato a livello del muscolo scheletrico, si suppone quindi che l'azione di questa neurotrofina sia dovuta al suo legame con il recettore p75^{NTR} in modo analogo al fattore NGF (Mousaviet al., 2006). Nel loro complesso questi dati indicano come i fattori neurotrofici funzionino in modo autocrino per regolare il comportamento delle cellule satelliti e quindi la rigenerazione muscolare. Recentemente è stato dimostrato che le cellule satelliti sono in grado di controllare l'innervazione della fibra muscolare mediante rilascio di semaforina 3A, un fattore ben noto per essere coinvolto nella crescita dell'assone, a confermare che una corretta rigenerazione muscolare è strettamente dipendente da una coordinata interazione delle cellule satelliti con la propria nicchia (Tatsumi et al., 2009).

- *Vasi sanguigni*

La maggior parte delle cellule satelliti è strettamente associata a capillari. È ben noto come angiogenesi e miogenesi siano due processi che durante la rigenerazione

muscolare avvengono contemporaneamente. Il fattore VEGF svolge un ruolo cruciale nel processo di rigenerazione muscolare regolando e influenzando il comportamento delle cellule satelliti. Il VEGF viene prodotto non solo dalle cellule endoteliali ma anche dalle cellule satelliti stesse, dai mioblasti e dalle fibre muscolari durante il differenziamento miogenico. Il VEGF può funzionare in modo autocrino stimolando la migrazione e proliferazione cellulare, prevenendo l'apoptosi e promuovendo il differenziamento (Germani et al., 2003; Sassoli et al., 2012a). Inoltre, il trattamento con VEGF è in grado di attivare la via di segnalazione di Akt provocando l'ipertrofia della fibra (Takahashi et al., 2002).

Fattori sistemici

- *Cellule immunitarie*

Nelle fasi successive ad una lesione muscolare, le cellule immunitarie vengono reclutate e svolgono un ruolo importante nel processo di rigenerazione. Esse infatti infiltrano rapidamente il muscolo, rimuovono il tessuto necrotico e secernono fattori, alcuni dei quali attivano le cellule satelliti. L'inibizione della risposta infiammatoria o alterazione dell'attività fagocitica delle cellule mieloidi danneggia il processo rigenerativo. Le cellule satelliti e le cellule immunitarie si influenzano reciprocamente attraverso il rilascio di chemochine. Infatti, le prime secernono citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α che reclutano le cellule immunitarie nel sito di danno e ne promuovono l'attività, le seconde, a loro volta, secernono fattori di crescita, citochine come IL-6, componenti dell'ECM e MMP che favoriscono l'uscita delle cellule satelliti dalla lamina basale delle fibre e promuovono la loro proliferazione. Inoltre l'interazione tra queste due popolazioni cellulari previene l'apoptosi delle cellule satelliti.

- *Interleuchina-6 (IL-6)*

IL-6 è una citochina pleiotropica prodotta da molti tipi di cellule, come cellule emopoietiche, fibroblasti e cellule endoteliali. Durante la rigenerazione le principali fonti di IL-6 sono le cellule satelliti, le fibre muscolari e i neutrofili. È stato dimostrato che IL-6 induce la proliferazione delle cellule satelliti ed è coinvolta nell'ipertrofia muscolare mediata da queste (Serrano et al., 2008). IL-6 agisce in modo autocrino

legandosi al recettore IL6R (*Interleukin 6 receptor*) espresso sul sarcolemma delle fibre, a seguito, ad es., di esercizio fisico. Il legame con il recettore attiva a sua volta la via di segnalazione JAK/STAT3 (Serrano et al., 2008). In particolare il legame citochina-recettore porta ad attivazione della proteina Janus chinasi (JAK2), che ha una funzione di tirosina chinasi, ed è quindi in grado di fosforilare residui di tirosina di altre proteine. JAK2 attivato provoca la fosforilazione della proteina STAT3, la quale a sua volta dimerizza, trasloca nel nucleo e agisce come fattore di trascrizione per l'attivazione di geni target.

- *Ossido nitrico (NO)*

L'ossido nitrico NO è una molecola molto piccola, che diffonde liberamente attraverso le membrane cellulari, e che regola un'ampia varietà di funzioni cellulari. È prodotta da molte cellule, ad esempio le cellule muscolari scheletriche e cardiache, le cellule epiteliali, le cellule endoteliali, i macrofagi, i fibroblasti e gli epatociti, attraverso una reazione catalizzata dalla ossido nitrico sintetasi (NOS). Sono state caratterizzate tre isoforme di NOS, ognuna codificata da geni differenti. Due isoforme sono costitutivamente espresse (quella endoteliale –eNOS e quella neuronale –nNOS), mentre una isoforma è inducibile (iNOS). Diverse cellule hanno la capacità di produrre NO nel muscolo scheletrico. In particolare, nell'uomo nNOS è costitutivamente espressa a livello del sarcolemma delle fibre muscolari, localizzata in strutture specializzate della membrana, attraverso il legame con l'alfa1-sintrofina, una proteina associata alla distrofina. E' stato osservato che l'assenza di distrofina (distrofia muscolare di Duchenne) porta ad una conseguente diminuzione di nNOS, il che induce infiammazione, lisi delle membrane, perdita di tessuto muscolare e morte cellulare. In modelli animali della stessa patologia, è stato osservato che l'NO ha un importante effetto protettivo. eNOS è espressa dalle cellule endoteliali. iNOS è assente o presente a livelli molto bassi nel muscolo scheletrico normale di ratto e umano, tuttavia il suo livello aumenta marcatamente durante l'infiammazione, come in caso di miopatie. In seguito a danno muscolare, nella fase di degenerazione, NO viene prodotta da macrofagi e fibre muscolari, con conseguente necrosi delle fibre stesse. Durante la fase di rigenerazione muscolare, NO invece sembra avere un ruolo critico nell'attivazione delle cellule satelliti (Filippin et al., 2009). Infatti, la somministrazione di un inibitore di NOS, L-NAME (*l-arginine methyl ester*) inibisce

l'attivazione di queste cellule. Questo presumibilmente è legato al fatto che l'inibizione di NOS impedisce il legame del fattore HGF al recettore c-Met sulle cellule satelliti. Viceversa il trattamento con l-arginina, substrato di NOS, ne determina un aumento dell'attivazione (Anderson, 2000). NO agisce promuovendo l'attivazione di MMP2 che determina a sua volta il rilascio di HGF dalla matrice extracellulare delle cellule satelliti (Yamada et al., 2008; Figura 10).

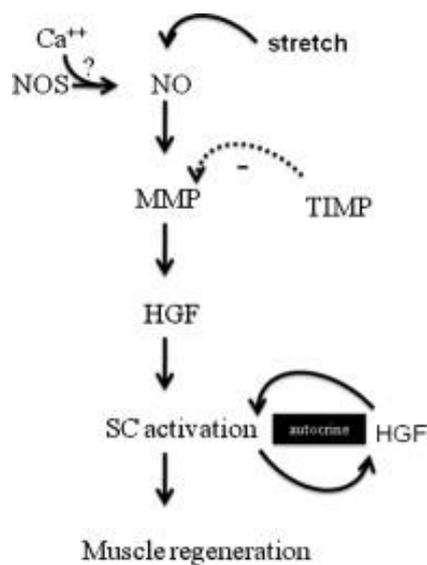


Figura 10. Attivazione delle cellule satelliti NO-dipendente (da Filippin et al., 2009).

E' stato anche osservato che NO può regolare la migrazione cellulare (Collins-Hooper et al., 2012) e prevenire la fibrosi inibendo la via di segnalazione del fattore profibrotico TGF- β . Infatti, Darmani e collaboratori (2004) valutando l'espressione di iNOS e TGF- β 1 nei macrofagi infiltrati all'interno del tendine del muscolo flessore delle dita di animale sottoposto a lesione da schiacciamento, hanno dimostrato che durante la normale guarigione, i livelli di TGF- β risultano alti in fase precoce e gradualmente decrescono rimanendo, a tre settimane dal danno, leggermente al di sopra dei livelli del muscolo sano. L'inibizione di NOS tramite trattamento dell'animale con L-NAME al momento del danno porta ad una cronica overespressione di TGF- β da parte dei macrofagi infiltrati a 5 settimane dal danno. Infine, NO svolge un ruolo chiave poiché può agire come vasodilatatore e può

promuovere l'attivazione di molti fattori di crescita coinvolti nella rigenerazione del muscolo scheletrico, come VEGF e FGF (Ziche e Morbidelli, 2000; Rubinstein et al., 1998) Un processo essenziale per la rigenerazione di un muscolo lesionato è l'angiogenesi, che consiste nella ricostruzione dei vasi danneggiati, ripristino del flusso sanguigno e del rifornimento di ossigeno ai tessuti. L'angiogenesi è un prerequisito per la guarigione morfologica e funzionale del muscolo danneggiato. È stato osservato che in seguito a una lesione muscolare da schiacciamento, in un modello sperimentale animale, si assiste ad un aumento dell'area della sezione trasversale media capillare di almeno tre volte e un aumento di tre o quattro volte del flusso sanguigno globale dell'arto e del letto capillare. La somministrazione di L-NAME provoca una diminuzione dell'iperperfusion che segue il danno muscolare, a suggerire il ruolo chiave della produzione di NO locale nella vasodilatazione nel muscolo scheletrico danneggiato (Filippin et al., 2009).

LA TERAPIA CELLULARE

La riparazione di un muscolo leso dipende principalmente dal tipo e dalla gravità del danno muscolare. Se la lesione è lieve, la guarigione e il raggiungimento di un pieno recupero funzionale del muscolo scheletrico sono possibili e sicuramente sono la conseguenza del corretto equilibrio che si crea tra il processo di rigenerazione del tessuto muscolare ad opera delle cellule satelliti, e il processo di produzione di tessuto connettivo. In caso di danno esteso, la sola presenza delle cellule satelliti non è sufficiente a garantire un rapido recupero funzionale del muscolo danneggiato. Questo perché all'interno di un muscolo scheletrico, le cellule satelliti sono scarse rappresentando dal 2 al 7% della totalità dei nuclei e potrebbero non essere reclutate in quantità sufficiente nel sito di lesione. Inoltre, in queste condizioni, la capacità delle cellule satelliti di differenziarsi in fibre muscolari e rigenerare il muscolo danneggiato, può essere ostacolata e compromessa dalla presenza di un'intensa risposta infiammatoria e dalla proliferazione/attivazione dei fibroblasti con la deposizione eccessiva di matrice extracellulare, per cui spesso il tessuto muscolare funzionale viene ad essere sostituito da una cicatrice fibrosa non contrattile che amplifica il focus irritativo (Carosio et al., 2011; Filippin et al., 2009; Turner e Badyak; Wang et al., 2009).

In considerazione delle diverse criticità correlate con il processo di rigenerazione muscolare, numerose sono le ricerche dedicate all'identificazione di strategie terapeutiche per promuovere il recupero morfo-funzionale di un muscolo scheletrico danneggiato o patologico, mirate in particolare a potenziare i processi endogeni di rigenerazione tissutale e a stimolare la ricreazione di un microambiente favorevole per la funzionalità dei progenitori muscolari. In questo scenario, un approccio terapeutico innovativo, efficace e sicuramente interessante, può essere rappresentato dalla terapia cellulare che prevede l'inoculo di cellule staminali per la ricostruzione biologica di un tessuto (El Oakley et al., 2001).

In generale, da un punto di vista funzionale, i requisiti fondamentali che le cellule da inoculare, allo scopo di favorire la formazione di nuovo tessuto, devono possedere sono:

- capacità di colonizzare il tessuto danneggiato (integrazione anatomica). Tale requisito è ovviamente condizione fondante per qualsiasi innesto cellulare terapeutico. Ciò implica che le cellule trapiantate devono essere in grado di sopravvivere nel tessuto ricevente, sia esso una cicatrice o tessuto patologico. È stato ipotizzato che in determinate situazioni di insufficiente apporto ematico, parte delle cellule inoculate devono anche essere in grado di contribuire al proprio, con l'induzione della creazione di nuovi vasi (angiogenesi);
- capacità di differenziare in senso tessuto-specifico. Le cellule innestate devono possedere una "plasticità" cellulare che permette una loro "riprogrammazione" all'interno del tessuto ricevente.

Cellule staminali

Una cellula per essere definita staminale deve soddisfare due requisiti: la capacità di autorinnovarsi (*self renewal*), al fine di garantire una riserva costante di cellule disponibili, e la capacità di specializzarsi e differenziarsi verso una specifica linea differenziativa per costituire una progenie di cellule mature in grado di formare tessuti o organi e di espletare specifiche funzioni. (Figura 11).

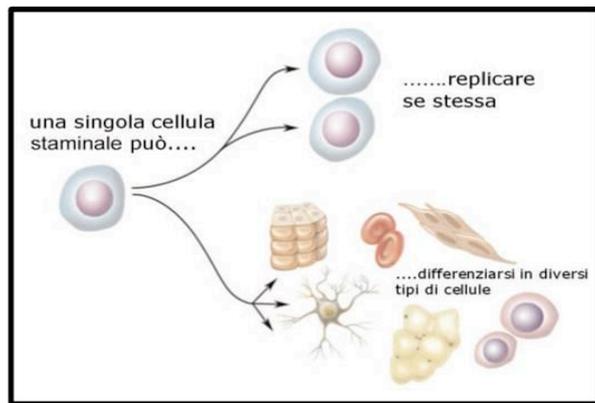


Figura 11. Caratteristiche di una cellula staminale: capacità di autorinnovamento e di differenziarsi in citotipi diversi.

L' autorinnovamento consiste nella capacità di tali cellule di compiere illimitati cicli replicativi, mantenendo lo stesso stato differenziativo. Almeno una delle due cellule che si originano dalla divisione cellulare è staminale. Esistono due tipi di divisione cellulare: divisione simmetrica e divisione asimmetrica. Nel primo caso la cellula staminale dà origine a due copie di se stessa mentre nel secondo, la cellula staminale origina due cellule figlie di cui una conserva le caratteristiche di staminalità mentre l'altra, chiamata progenitore cellulare, va incontro a differenziamento.

In base al loro potenziale differenziativo le cellule staminali possono essere definite (Figura 12):

totipotenti: capaci di produrre tutte le cellule differenziate in un organismo, compresi i tessuti extraembrionali cellulari come la placenta e il sacco vitellino. Solo lo zigote possiede questa capacità. Lo stato di totipotenza non dura a lungo; esso viene gradualmente a perdersi fin dallo stadio a otto blastomeri (2-3 giorno dalla fecondazione). Superato questo momento infatti, nella successiva divisione cellulare, si assiste alla formazione di un abbozzo sferico di 16 cellule, somigliante al frutto della mora (da cui il nome morula, piccola mora, che viene dato all'embrione a questo stadio). Le cellule della morula non possono più dare origine ad un individuo completo. Le cellule staminali perdono la totipotenza per diventare pluripotenti.

pluripotenti: sono in grado di generare tutte le cellule derivate dai tre foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma, ma non le cellule che compongono i tessuti extraembrionali.

Multipotenti: possiedono la capacità di dividersi, ma sono in grado di produrre un numero limitato di linee cellulari. Tipico esempio di cellule staminali multipotenti sono

le cellule staminali ematopoietiche.

unipotenti: capacità di differenziarsi in un singolo tipo di cellula (es. cellula satellite muscolo scheletrico).

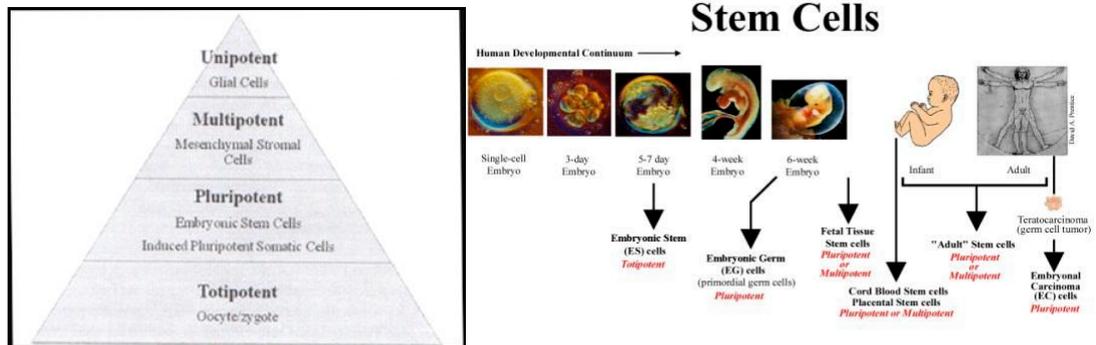


Figura 12. Potenziale differenziativo delle cellule staminali.

Le sorgenti di reperimento cellulare potenzialmente utilizzabili in ambito clinico per la terapia cellulare possono essere classificate in due categorie principali: allogenica e autologa.

Per **fonte allogenica** si intende una fonte di reperimento geneticamente non identica al ricevente. Allo stato attuale, i tipi cellulari allogenici più sperimentati per prospettive di trapianto nell'uomo sono le cellule staminali embrionali umane, le cellule fetali o neonatali, e le cellule staminali ematopoietiche da cordone ombelicale.

Le cellule staminali embrionali provengono da un embrione allo stadio di blastocisti, cioè a 4-5 giorni dalla fecondazione. La blastocisti è costituita da tre strutture: il trofoblasto, strato cellulare esterno, che circonda il blastocele, ovvero la cavità interna in cui è contenuto, ad una estremità, un gruppo di cellule che darà origine all'embrione, detto massa cellulare interna. Le cellule staminali embrionali derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti in seguito a distruzione del trofoblasto (Figura 13). Sono cellule pluripotenti, in grado di originare qualsiasi tipo cellulare proveniente dai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma ed endoderma).

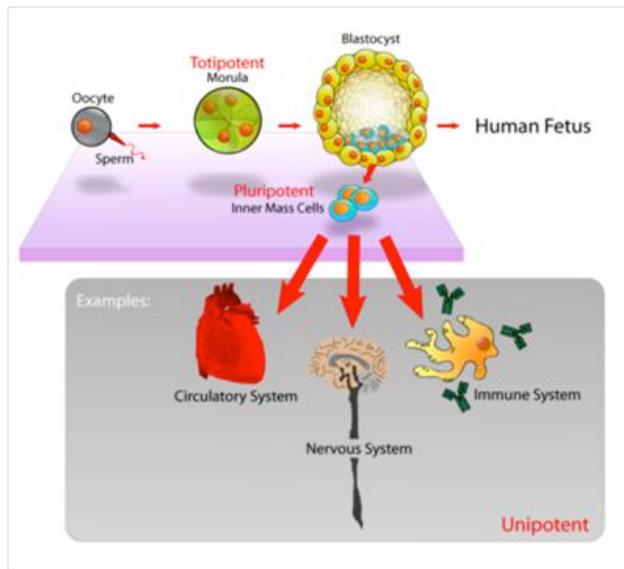


Figura 13. Cellule staminali embrionali.

Il potenziale vantaggio dell'utilizzazione di queste cellule staminali rispetto alle cellule staminali adulte è l'illimitata capacità di proliferare *in vitro* e di generare un'ampia gamma di linee cellulari. Tuttavia, l'utilizzo di cellule staminali embrionali umane per trapianti cellulari a carattere terapeutico, comporta una serie di criticità riguardanti gli aspetti etici legati all'impiego di embrioni umani come fonte di cellule staminali. Inoltre, queste cellule possono provocare la formazione di tumori benigni (teratomi) e maligni (teratocarcinomi). Infine, l'aspetto immunologico non è stato ancora ben approfondito e non è chiaro se cellule derivate dalle cellule embrionali *in vitro* possano dar luogo ad una reazione immunitaria da parte dell'organismo ricevente.

Le cellule fetali staminali sono cellule staminali estratte dal feto, durante il periodo dello sviluppo, compreso tra la decima settimana di gestazione fino alla nascita. Sono ottenute a seguito di aborti spontanei o interruzioni di gravidanza. Sono considerate cellule pluripotenti, deputate in natura all'accrescimento dei tessuti del neonato.

Le cellule staminali cordonali si ricavano dal sangue del cordone ombelicale. Il cordone ombelicale, reciso al momento del parto, può essere conservato a bassissima temperatura e fornire staminali intatte anche dopo un lungo periodo. Sembra che le cellule staminali cordonali siano in grado di dare origine a diversi tipi cellulari e che le loro capacità differenziative possano essere paragonate a quelle delle cellule staminali ematopoietiche isolate dal midollo osseo (Peters et al., 2010; Arien-Zakay et al., 2010).

Per **fonte autologa** di cellule staminali si intende una fonte di reperimento geneticamente identica al ricevente. Tra le più promettenti per l'utilizzo clinico sono da

considerare le cellule staminali isolate dall'individuo adulto.

Queste sono cellule indifferenziate localizzate nei tessuti di un organismo adulto con capacità di autoreplicazione, anche se più limitata rispetto alle cellule staminali embrionali; rispetto a queste ultime possiedono anche una capacità differenziativa ristretta: infatti sono cellule unipotenti o multipotenti. Le cellule staminali adulte sono state reperite in molti organi come cervello, midollo osseo, vasi sanguigni, muscolo scheletrico, pelle e fegato, dove risiedono in particolari micro-ambienti chiamati nicchie e dove rimangono allo stato quiescente per molto tempo fino a che in caso di patologia o danno si attivano, iniziano a proliferare, migrano fuori dalla nicchia e differenziano (Fuchs et al., 2004; Urbanek et al., 2006). Il ruolo primario di queste cellule è il mantenimento e la riparazione del tessuto in cui sono localizzate. Negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali hanno mostrato come queste cellule staminali sono in grado di trans-differenziare in cellule di un tessuto di origine diversa, in appropriate condizioni sperimentali, rendendole così oggetto di numerosi studi (Blau et al., 2001; Korbling e Anderlini, 2002).

Cellule mesenchimali stromali/staminali adulte da midollo osseo (BM-MS)

Le cellule mesenchimali stromali/staminali (MSC) sono una popolazione di cellule staminali adulte, presenti nei compartimenti stromali di supporto degli organi adulti. La loro presenza è stata dimostrata in diversi organi e tessuti inclusi muscolo scheletrico, tessuto adiposo, fegato, derma, pancreas, polmone, periostio, liquido sinoviale, polpa dentale, placenta, liquido amniotico, cordone ombelicale e altri tessuti fetali; tuttavia la loro principale fonte rimane il midollo osseo dove sono state identificate più di 40 anni fa (Zuk et al., 2002; Salem et al., 2010; Bashir et al., 2014; Figura 14).

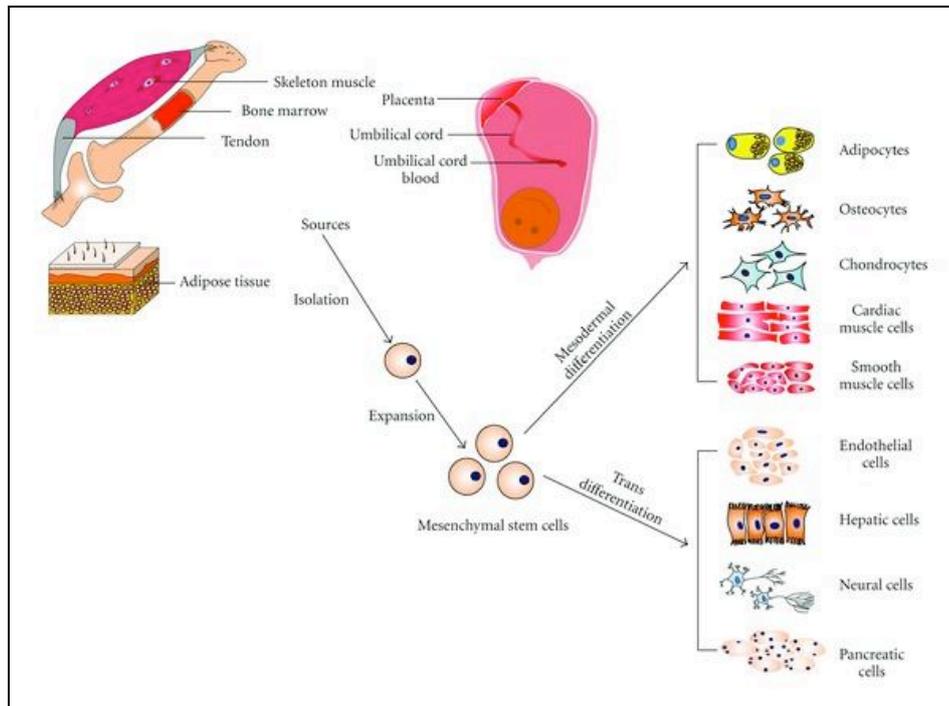


Figura 14. Potenziale differenziativo di cellule mesenchimali staminali isolate da diverse fonti. Le cellule MSC sono state isolate da muscolo scheletrico, midollo osseo, tendine, tessuto adiposo, placenta e cordone ombelicale e sono capaci di differenziarsi in cellule derivanti dal foglietto mesodermico come, adipociti, osteociti, condrociti, cardiomiociti e cellule muscolari lisce e sono in grado anche di trans-differenziare in cellule endoteliali, cellule epatiche, cellule neurali e cellule pancreatiche derivate dagli altri foglietti embrionali (Zhang et al., 2012)

La loro scoperta si deve allo scienziato russo Alexander Friedenstein che nel 1970 coltivò biopsie di stroma midollare e, dopo quattro ore, rimosse le cellule non aderenti, eliminando così la maggior parte delle cellule ematopoietiche. Le cellule adese alla piastra si mostravano in apparenza eterogenee, di aspetto fusiforme e formavano focolai di due o quattro cellule, che rimanevano inattive per 2-4 giorni per poi iniziare a moltiplicarsi rapidamente. Dopo molti passaggi in coltura, le cellule aderenti diventavano più omogenee formando colonie, ognuna delle quali derivata da un singolo precursore, per questo definite unità formanti colonie fibroblastoidi (CFU-F). Nel midollo osseo le cellule MSC sono parte integrante della nicchia ematopoietica (Figura 15); dove sono in grado di regolare la sopravvivenza, la replicazione, la migrazione e il differenziamento delle cellule staminali ematopoietiche e di supportare l'ematopoiesi attraverso diversi meccanismi quali l'interazione tra cellule o la produzione di fattori di crescita e chemochine come il fattore SDF1 (Ji et al., 2004; Friedenstein et al., 1968; Méndez-Ferrer et al., 2010).

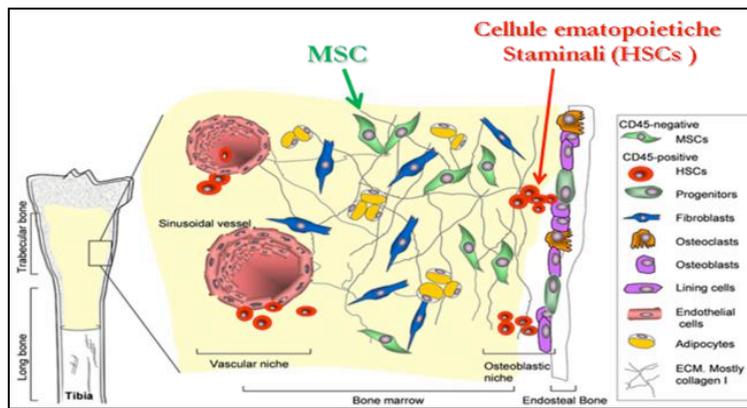


Figura 15. Schema della “nicchia emopoietica” del midollo osseo dove si trovano vari tipi cellulari tra cui le cellule staminali emopoietiche (HSCs) e le cellule mesenchimali stromali staminali (MSC) (Da Grassel E Ahmed, *Frontiers in Bioscience*, 2007).

Le cellule MSC hanno aspetto fusiforme, sono capaci di aderire alle piastre da coltura e hanno capacità di differenziarsi in adipociti, osteoblasti e condrociti (Figura 16). Dal punto di vista immunofenotipico tali cellule sono caratterizzate dall'espressione di antigeni di superficie come CD73, un ecto-5'-nucleotide, coinvolto nelle interazioni stromali del midollo osseo, nella migrazione delle MSC e nella modulazione dell'immunità adattativa, CD90 (antigene Thy1) e CD105 o endoglin, ovvero il recettore III del TGF- β , implicato nella differenziazione in senso condrogenico delle cellule. Tali cellule tuttavia non esprimono i marcatori emopoietici come: CD11 e CD14 (*marker* di monociti e macrofagi); CD34 (marcatore precoce di staminali emopoietiche e cellule endoteliali), CD45 (leucociti) CD19 o CD79a (cellule B) e antigeni di leucociti umani (HLA)-DR sulla superficie molecolare (Dominici et al., 2006; Figura 16). Nonostante i criteri per identificare le cellule MSC siano ben stabiliti, il rischio di contaminazioni da parte di cellule non mesenchimali durante il loro isolamento, risulta alto e di conseguenza la popolazione che si ottiene può essere eterogenea e la percentuale di MSC di difficile misurazione (Richardson et al., 2012).

Le MSC possiedono una serie di proprietà biologiche uniche che le rendono candidati cellulari ideali da poter utilizzare nei protocolli di medicina rigenerativa mirati alla ricostruzione di diversi tessuti danneggiati (Sassoli et al., 2012a).

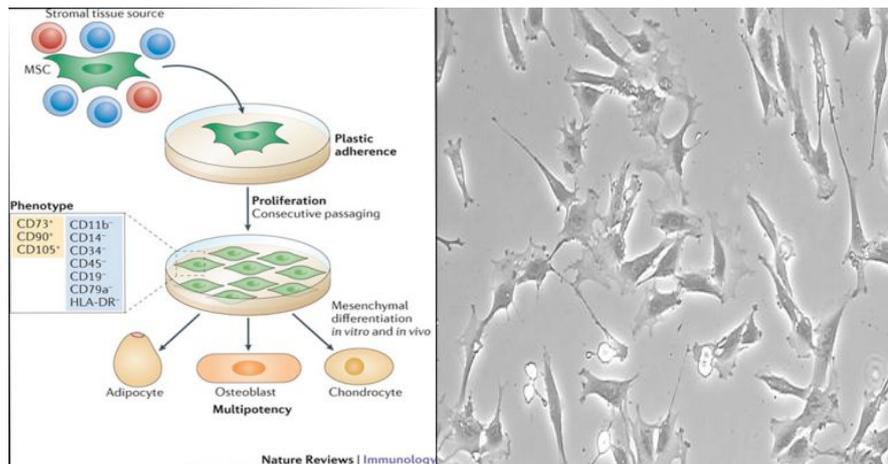


Figura 16. (A destra) **Criteria identificativi delle cellule mesenchimali stromali:** Le cellule MSC isolate da midollo osseo esprimono sulla loro superficie una serie di *marker* identificativi come ad esempio CD90, CD105 e CD73 (modificato da Le Blanck 2012). A sinistra: Immagine a contrasto di fase di cellule mesenchimali isolate da midollo osseo di topi adulti (Giannelli et al., 2013).

Infatti tali cellule:

- sono facili da isolare da pazienti o da banche di midollo osseo e quindi il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle cellule staminali embrionali;
- possono essere rapidamente espanse, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa (Zhironkina et al., 2012; Haack-Sørensen., 2012);
- sono dotate di grande plasticità essendo capaci di differenziare, quantomeno sotto opportuna stimolazione *in vitro*, in elementi di derivazione mesenchimale e non-mesenchimali inclusi cellule mioblastiche (Wakitani et al., 1995) cardiomiociti (Makino et al., 1999) cellule epatocita- simile (Schwartz et al., 2002), cellule neuronali e di nevroglia (Woodbury et al., 2000; Sanchez-Ramos et al., 2000) e cellule endoteliali (Oswald et al., 2004);
- se vengono inoculate per via sistemica, sono capaci di migrare verso i siti specifici di danno tissutale, (Chapel et al., 2003; Chamberlaine et al., 2007; Satija et al., 2007);
- sono capaci di esercitare un'azione anti-infiammatoria e immunosoppressiva modulando la funzionalità delle cellule dell'immunità innata e acquisita (Uccelli et al., 2006); inoltre
- hanno una bassa espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e sono inoltre prive di componenti del MHC di classe II (Uccelli et al., 2006) il che

le rende non immunogeniche. Per tutte queste proprietà è possibile un loro utilizzo in contesti sia autologhi che eterologhi.

- Non hanno potenzialità tumorigeniche (Wang et al., 2012)

TERAPIA CELLULARE PER LA RIGENERAZIONE MUSCOLARE

Cellule satelliti

I candidati più idonei per la rigenerazione muscolare scheletrica sono le cellule satelliti, in virtù del fatto che rappresentano una popolazione cellulare residente del muscolo scheletrico, già programmata per ricostituire il tessuto muscolare; la loro potenzialità terapeutica, in effetti, è stata dimostrata in diversi modelli animali sperimentali di distrofia e di danno muscolare (Cossu et al., 2004; Tedesco et al., 2010; Montarras et al., 2005) e anche nel recupero della funzionalità muscolare di muscoli traumatizzati (Kuang e Rudnicki, 2008; Menasche, 2007). Uno studio molto originale e pionieristico è quello condotto da Partridge e collaboratori (1989) dove si dimostra che l'inoculo di cellule mioblastiche derivate da cellule satelliti isolate da muscoli di topi sani e coltivate *in vitro* è in grado di ristabilire l'espressione di distrofina in muscoli di topo distrofico. Li e collaboratori (2010a), hanno dimostrato che l'autotrapianto di cellule satelliti isolate da un muscolo sano è capace di promuovere la rigenerazione del muscolo scheletrico lesionato per schiacciamento nel coniglio.

L'utilizzo delle cellule satelliti per la rigenerazione muscolare scheletrica offre numerosi vantaggi:

- Le cellule satelliti possono essere chiaramente identificate; esse sono tra le poche cellule staminali adulte che possono essere identificate con certezza e affidabilità, grazie alla loro specifica localizzazione anatomica e all'espressione di specifici marker molecolari.
- Sono facilmente isolabili da biopsie di muscolo scheletrico umano, senza complicate procedure e possono essere amplificate *in vitro* in laboratorio (i protocolli di purificazione e le condizioni di coltura sono ben definiti e sperimentati).
- Hanno capacità di autorinnovamento e ciò garantisce la funzionalità delle cellule trapiantate a lungo termine.

- La miogenesi è un processo ormai noto, e i fattori trascrizionali che regolano l'attivazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule satelliti sono stati ben studiati. Queste informazioni sono essenziali al fine di poter manipolare le cellule prima del trapianto e conoscere il loro destino una volta inserite nel tessuto ospite.
- Modelli sperimentali di colture cellulari e modelli animali sono a disposizione per lo studio delle cellule satelliti in condizioni sia fisiologiche che patologiche (modelli di danno muscolare, mioipatie, malattie muscolari degenerative in generale).

Tuttavia, è necessario anche sottolineare tutta una serie di criticità che ostacolano l'utilizzo delle cellule satelliti per scopi rigenerativi quali: i) l'alta eterogeneità di questa popolazione cellulare (Yin et al., 2013), ii) la perdita del loro potenziale miogenico dopo isolamento ed espansione in coltura (Montarras et al., 2005), iii) la pre-determinazione dipendente dal tipo di fibra muscolare da cui derivano (fibre lente versus fibre rapide, muscoli della testa versus muscoli degli arti) (Harel et al., 2009), iv) la scarsa sopravvivenza nel tessuto ricevente (Sammels et al., 2004); v) l'incapacità da parte di queste cellule di attraversare la parete dei vasi sanguigni che non consente un loro trapianto per via sistemica, limitando il loro impiego terapeutico a iniezioni locali, una procedura non facile e fastidiosa per il paziente. In più, considerata la scarsa capacità di migrazione intramuscolare delle cellule satelliti, esse dovrebbero essere iniettate in più siti e ad altissima densità. Recenti studi hanno indicato che enzimi capaci di degradare la matrice extracellulare, come le metalloproteasi, potrebbero migliorare e facilitare la migrazione delle cellule trapiantate. Anche il rischio di rigetto immunitario è alto soprattutto qualora siano trapiantati mioblasti allogenici e pertanto è necessaria la somministrazione di agenti immunosoppressori (Skuk et al., 2007). Sulla base di tutte queste considerazioni l'attenzione da parte di molti ricercatori è stata spostata su altre fonti di cellule di origine non miogenica da utilizzare per la riparazione/rigenerazione del muscolo scheletrico e cardiaco e tra queste risultano particolarmente promettenti le cellule mesenchimali stromali/staminali adulte derivate da midollo osseo.

Cellule mesenchimali stromali

Le cellule MSC, date le loro caratteristiche, rappresentano uno dei tipi di cellula staminale più adatto all'utilizzo nel trattamento di molte patologie degenerative.

Numerosi studi hanno dimostrato che le MSC da midollo osseo (BM-MS), una volta inoculate in muscoli di animali danneggiati o affetti da patologie muscolari, sono in grado di esercitare un'azione benefica in termini di recupero funzionale del muscolo scheletrico (Turner et al., 2012; Cashman et al., 2013). Infatti, la somministrazione locale o sistemica di queste cellule in muscoli lesionati in seguito a lacerazione (Natsu et al., 2004), taglio o schiacciamento (Matziolis et al., 2004; Von Roth et al., 2012) o iniezione di cardiotoxina (Dezawa et al., 2005; De La Garza-Rodea et al., 2011) promuove la formazione di nuove fibre e contribuisce al recupero funzionale del tessuto muscolare. È stato anche osservato un considerevole aumento della densità capillare e della perfusione collaterale, associate ad una diminuzione dell'arrangiamento spaziale disordinato e del numero di fibre atrofiche in muscoli ischemici trapiantati con BM-MS (Kinnaird et al., 2004; Li et al., 2010b). Inoltre, alcuni studi riportano che l'iniezione di cellule BM-MS in muscoli distrofici, è capace di ripristinare i livelli di distrofina (Dezawa et al., 2005; Feng et al., 2008; Li et al., 2011), ridurre lo stress ossidativo (Winkler et al., 2012), e migliorare la funzione motoria (Li et al., 2011).

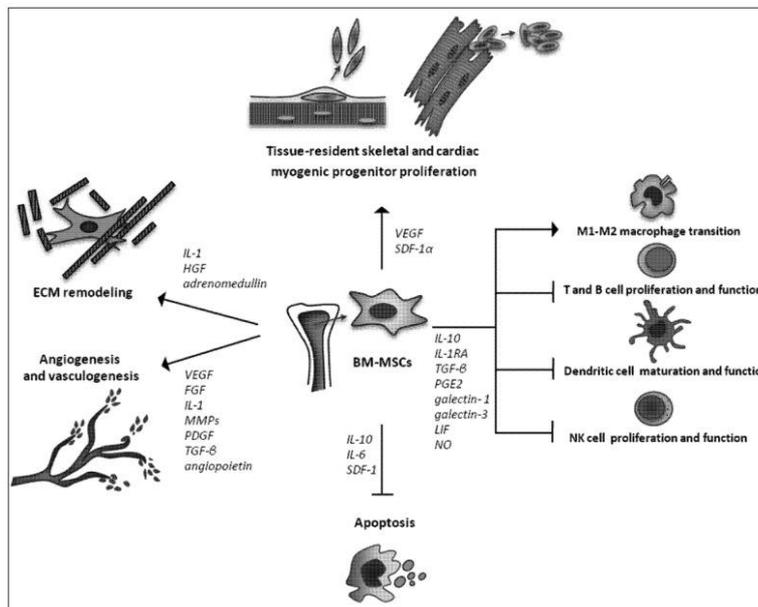


Figura 17. Effetti terapeutici paracrini di cellule stromali mesenchimali derivanti dal midollo osseo (BM-MS). **Abbreviazioni:** ECM: matrice extracellulare; FGF: fattore di crescita dei fibroblasti; HGF: fattore di crescita degli epatociti; IL-1: l'interleuchina-1; IL-6: interleuchina-6; IL-10: l'interleuchina-10; MMP: metalloproteinasi; PDGF: fattore crescita derivante dalle piastrine; TGF-β: fattore di crescita trasformante-β; VEGF: fattore di crescita dell'endotelio vascolare SDF-1: fattore-1 derivato dalle cellule stromali; IL-1RA: *interleukin 1 receptor antagonist*; PGE2: prostaglandina E2; LIF: fattore inibitorio di leucemia; NO: ossido nitrico (da Sassoli et al., 2012b)

È stato dimostrato che le cellule BM-MSc possono differenziare in vitro in cellule con caratteristiche simili a quelle di cellule muscolari scheletriche, lisce e cardiache (Ferrari et al., 1998; Goldring et al., 2002) e che, se coltivate insieme a mioblasti umani in corso di differenziamento, possono partecipare alla formazione di miotubi mediante la fusione con queste cellule (Goncalves et al., 2006; Beier et al., 2011). Nonostante la loro plasticità, rimangono tuttavia ancora da chiarire i meccanismi attraverso i quali le cellule inoculate esercitano effetti benefici sulla performance del tessuto. Infatti, ad eccezione di pochi studi, rimane ancora molto controverso la possibilità che *in vivo* le BM-MSc possano transdifferenziare in fibre muscolari scheletriche e/o fondersi con le cellule ospiti. Sembra sempre più evidente che la loro azione benefica non sia tanto dovuta alla multipotenza e possibilità di transdifferenziare in cellule muscolari, ma piuttosto alla loro capacità di secernere fattori paracrini con molteplici effetti sul microambiente circostante, inclusa la promozione della neo-angiogenesi mediante il rilascio di VEGF, inibizione dell'apoptosi, rimodellamento della matrice extracellulare e stimolazione dei meccanismi endogeni di riparazione (Gnecchi et al., 2008; La Par et al., 2009; Chimenti et al., 2010; Quattrocchi et al., 2010; Figura 17). In questo contesto, studi in vitro condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che le cellule BM-MSc sono capaci di: i) stimolare la proliferazione delle cellule satelliti, ii) promuovere il rilascio da parte dei mioblasti di enzimi coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare (MMP), evento peraltro necessario per la migrazione e la proliferazione degli elementi cellulari coinvolti nei processi riparativi, iii) inibire il differenziamento dei fibroblasti estratti da muscolo scheletrico in miofibroblasti, principali cellule responsabili della deposizione eccessiva di matrice extracellulare e della progressione del processo di fibrosi; inoltre iv) tali effetti sono per lo più mediati dalla secrezione di una serie di fattori paracrini di crescita e citochine, tra cui il fattore VEGF e il lipide bioattivo sfingosina 1-fosfato (S1P) (Sassoli et al., 2012a; Sassoli et al., 2014a; Sassoli et al., 2014a).

Attualmente le cellule BM-MSc costituiscono una fonte di reperimento molto promettente per la terapia cellulare in ambito clinico ma nonostante i risultati incoraggianti ottenuti, il loro utilizzo in protocolli di medicina rigenerativa è ostacolato da una serie di criticità e di limiti (von Bahr et al. 2012; Bashir et al. 2014; De Becker e Riet 2016). Infatti, una volta trapiantate a livello del tessuto danneggiato le cellule BM-MSc sopravvivono transitoriamente e in fase precoce vanno incontro ad apoptosi. Una notevole mole di ricerche è diretta da identificare fattori di crescita appropriati in

grado di promuovere la sopravvivenza e la funzionalità di queste cellule. Numerosi studi si sono focalizzati sullo sviluppo di supporti bioingegnerizzati, ossia matrici idonee alla crescita cellulare, da inoculare unitamente alle cellule a livello del tessuto lesso al fine di garantirne un miglior insediamento e una maggiore sopravvivenza. Inoltre, in generale è necessario sottolineare che, al fine di poter utilizzare le cellule staminali nella pratica clinica occorre standardizzare i protocolli di espansione, identificare le condizioni di coltura in vitro più idonee per la loro proliferazione e differenziamento e identificare le modalità più idonee per il loro inoculo. In aggiunta, sono ancora necessari studi a lungo termine per chiarire meglio gli effetti collaterali e convalidare la sicurezza di queste cellule per la rigenerazione di diversi tessuti incluso il tessuto muscolare scheletrico. Infine, per la manipolazione di queste cellule, è di cruciale importanza evitare sensibilizzazioni e contaminazioni legate all'uso di proteine di origine animale come il siero fetale bovino (FBS) che normalmente viene utilizzato per la coltura cellulare in vitro (Tonti e Mannello, 2008).

PLASMA RICCO DI PIASTRINE E RIGENERAZIONE MUSCOLARE SCHELETRICA

Negli ultimi decenni gli sviluppi scientifici della biologia cellulare e molecolare e la progressiva comprensione dei processi di guarigione delle ferite e dei processi di rigenerazione dei tessuti hanno stimolato la ricerca e lo sviluppo nell'ambito della medicina rigenerativa e dell'ingegneria dei tessuti.

L'idea di "soluzioni biologiche" per problemi biologici e medici sta emergendo come un paradigma che porta allo sviluppo di nuovi o più ottimizzati preparati biologici che potrebbero aprire nuovi percorsi in ambito chirurgico e per il trattamento di una vasta gamma di patologie. Inoltre, le più recenti tendenze cliniche mirano allo sviluppo di procedure sempre meno invasive e di trattamenti accelerati atti a ridurre la morbilità e migliorare il recupero funzionale. Questo tipo di procedure avrebbero anche notevoli ricadute economiche nel senso di riduzione dei costi legati all'assistenza sanitaria.

PRP: proprietà e vantaggi

In diversi ambiti terapeutici sta emergendo come promettente strategia l'utilizzo del plasma ricco di piastrine (*Platelet Rich Plasma*, PRP), un emoderivato ad uso non

trasfusionale, definito come una parte di plasma ad alta concentrazione di piastrine (concentrazione piastrinica maggiore di 1.0×10^6 cells/ul). Il rationale dell'impiego di tale preparato risiede nella ricchezza di fattori di crescita, i quali potrebbero svolgere un'azione sinergica attivando molteplici vie di segnalazione importanti per numerosi processi tra cui sopravvivenza e proliferazione cellulare (Amable et al., 2013; Guevara-Alvarez et al., 2014; Suchánková Kleplová et al., 2014; Navani et al., 2017). I fattori di crescita sono dei mediatori biologici naturali che agiscono a livello cellulare stimolando diversi processi tra cui proliferazione e differenziamento. Le piastrine elaborano, immagazzinano e quindi rilasciano, se attivate, numerosi fattori di crescita capaci di stimolare la replicazione di diversi tipi cellulari come fibroblasti, osteoblasti e cellule endoteliali, esercitando peraltro, un'azione chemiotattica verso macrofagi, e polimorfonucleati. Pertanto, rilasciati localmente questi fattori possono innescare processi di rigenerazione tissutale. Tra i numerosi fattori di crescita contenuti nel PRP, si possono annoverare PDGF, TGF- β , EGF, FGF, IGF-1, HGF, IL-1, VEGF e S1P. Vista l'alta presenza di questi fattori piastrinici, il PRP potrebbe essere usato per scopi rigenerativi al fine di promuovere e favorire la riparazione di un tessuto quando applicato *in vivo* nel sito di lesione.

Le piastrine contenute nel PRP per rilasciare i vari fattori degli alfa-granuli necessitano di attivazione, cui fa seguito la degranulazione e il rilascio del contenuto. Tale processo porta alla formazione di una sostanza gelatinosa, il gel piastrinico (Figura 18), nel quale le piastrine attivate sono intrappolate in una maglia di fibrina dove continuano ad esercitare la loro attività, diffondendo le sostanze bioattive lentamente nell'ambiente (Roman e Bolta, 2007). Un potenziale vantaggio del PRP è dato dalla facilità d'isolamento dal sangue del paziente da trattare (PRP autologo) dopo un semplice processo di centrifugazione; rendendolo quindi un prodotto potenzialmente sicuro, senza rischi di trasmissione di malattie o di reazione immunogeniche. Infatti, l'utilizzo di sieri di origine animale per la coltivazione di cellule per uso clinico potrebbe rappresentare una componente xenogenica potenzialmente dannosa.



Figura 18. Preparazione del PRP

Le proteine di tale siero potrebbero, infatti, essere internalizzate dalle cellule in coltura e stimolarne l'immunogenicità. Pertanto, numerose ricerche si sono dedicate all'identificazione di possibili sostituti del siero animale, privi di immunogenicità. Il PRP, sia per l'origine autologa che per la sua alta concentrazione di fattori di crescita e per le sue caratteristiche di sicurezza, oltre a fornire effetti terapeutici benefici quando applicato *in vivo* nel sito di lesione tissutale, potrebbe rappresentare anche un ottimo sostituto dei sieri di origine animale per la coltura cellulare *in vitro* (Suchánková Kleplová et al., 2014). Infine, un ulteriore vantaggio legato all'utilizzo del PRP è rappresentato dal suo basso costo.

Utilizzo del PRP

Il PRP è stato studiato e applicato con diverse finalità sperimentali e terapeutiche, tra cui il trattamento delle ulcere croniche, la rigenerazione ossea e dei tessuti molli in odontoiatria e implantologia orale (Anitua et al., 2007). Il PRP autologo è stato sviluppato nei primi anni '70 come un bioprodotto per uso infusionale.

Tra i primi usi sperimentali delle piastrine sono da annoverare le ricerche del gruppo di Ross (Ross et al., 1974) su colture di cellule muscolari lisce. In tale protocollo, l'aggiunta al siero di piastrine e calcio o del prodotto derivato dall'attivazione piastrinica, aumentava l'attività mitogena e la proliferazione cellulare. Il PRP autologo è stato usato per la prima volta nel 1987 in una chirurgia cardiaca (Ferrari et al. 1987) e il suo utilizzo si è rivelato privo di complicanze. L'utilizzo clinico del PRP è però raramente segnalato negli anni '80

(Miyazono et al., 1989) e ha cominciato guadagnare popolarità a metà degli anni '90 in svariati settori della medicina. Trova applicazione in primo luogo nel trattamento di ferite o ulcere cutanee a diversa localizzazione (Borzini et al., 2006). Infatti, vari studi riportano che, applicando il PRP sull'area della lesione ulcerosa, i numerosi fattori di crescita derivati dalle piastrine contenuti nel gel, favoriscono la rigenerazione tissutale velocizzando il processo e migliorando la qualità della riparazione cutanea (Frykberg et al., 2010; Sell SA et al., 2011) (Figura 19). Inoltre, l'utilizzo di PRP rappresenta il trattamento di scelta nella terapia topica di ulcere diabetiche (Carter et al., 2011). Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre dimostrato che l'utilizzo del PRP da solo o in combinazione con MSC all'interno della matrice dermica INTEGRA[®] contribuisce alla rigenerazione di lesioni cutanee in un modello animale. In particolare, il PRP si è dimostrato capace di preservare la vitalità delle cellule BM-MSC, stimolare la loro proliferazione e migliorare la loro capacità di reclutare precursori endogeni nei siti di lesione (Formigli et al., 2012).

Interessanti approcci sperimentali includono l'applicazione del PRP per la rigenerazione di nervi periferici di ratto e in ambito oculistico, in forma non attivata, per il trattamento di ustioni e ulcere corneali (Anitua et al., 2007).

In chirurgia odontostomatologica e maxillo-facciale il PRP viene utilizzato in implantologia per la sua capacità osteoconduttiva, da solo o in associazione a materiali biocompatibili allogenici o artificiali e in chirurgia parodontale nei soggetti con difetti di cicatrizzazione ed emostasi (Marx, 2004).

Altro settore dove trova impiego il PRP è la chirurgia ortopedica dove viene utilizzato negli interventi di osteosintesi, nelle resezioni ossee e negli interventi di artroprotesi per favorire i processi di osteogenesi, osteoinduzione ed osteoconduzione. In tali sedi il PRP, con la liberazione dei fattori di crescita agisce sulla proliferazione cellulare e la condrogenesi (Everts et al., 2006). In ortopedia il PRP appare estremamente promettente anche per il trattamento di danni a tendini (Figura 20) legamenti e tessuto muscolare, che solitamente guariscono molto lentamente. Studi condotti *in vitro* su tenociti umani hanno dimostrato che il pool di fattori di crescita rilasciati dalle piastrine ne aumenta la proliferazione e stimola alla produzione di fattori di crescita, come il VEGF e HGF.



Figura 19. (A) Infiltrazione di PRP a livello del letto dell'ulcera; (B) Situazione post-operatoria dopo 15 giorni dal trattamento; (C) Situazione post-operatoria dopo 30 giorni dal trattamento (D) Situazione post-operatoria dopo 45 giorni dal trattamento e guarigione completa della lesione ulcerosa (Da Gentile et al., 2016).

Questa azione paracrina promuove l'angiogenesi e previene la formazione di fibrosi, grazie al fattore HGF, importante agente antifibrotico (Anitua et al., 2005). Nell'ambito delle tendinopatie l'infiltrazione di PRP a distanza di una settimana dall'intervento chirurgico (Virchenko et al., 2006), l'applicazione intra-operatoria (Sanchez et al., 2007), l'applicazione locale eco-guidata (Mishra e Pavelko, 2006) hanno evidenziato recuperi significativamente migliori nei pazienti trattati con PRP. Inoltre il PRP, da solo o associato a tessuto adiposo, sta emergendo come potenziale strategia terapeutica in chirurgia estetica per la correzione dei difetti del volto, trattamento di cicatrici, per la ricostruzione del seno e per il trattamento dell'alopecia androgenica (Gentile et al., 2013; Gentile et al., 2015). Attualmente, le possibili applicazioni sia sperimentali che cliniche del PRP sono ancora oggetto di studi per definire al meglio le sue caratteristiche e potenzialità, come pure per standardizzarne la preparazione e l'applicazione.

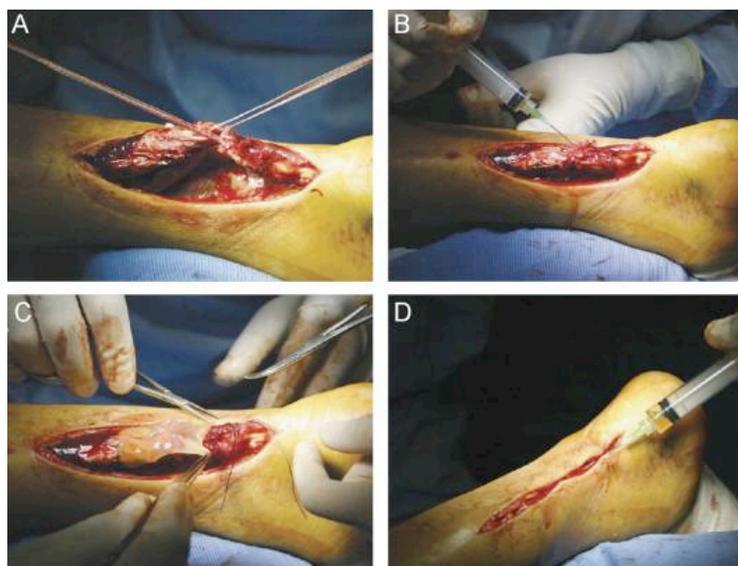


Figura 20. Trattamento chirurgico della rottura del tendine di Achille: (A) suturazione chirurgica del tendine di Achille; (B) iniezione di PRP attivato all'interno dei fascicoli; (C) applicazione di uno *scaffold* di fibrina nell'area interessata (D) infiltrazione sottocutanea di PRP attivato prima della sutura (Da Anitua et al., 2007).

PRP e Muscolo scheletrico: potenzialità e controversie.

Numerosi e recenti studi hanno dimostrato effetti positivi del PRP *in vitro* sulla sopravvivenza, proliferazione e migrazione di diversi tipi di cellule, tra cui i mioblasti (Graziani et al., 2006; Formigli et al., 2012; Amable et al., 2014; Kelc et al., 2015, McLure et al., 2016; Tsai et al., 2017). Risultati incoraggianti, anche se ancora ad uno stadio iniziale, sono stati osservati anche in vivo in seguito a trattamento con PRP di muscoli scheletrici danneggiati. In particolare, in modelli animali di danno muscolare da contusione o da strappo, il PRP è stato capace di promuovere l'attivazione delle cellule satelliti e la miogenesi, di migliorare la contrattilità del muscolo, di ridurre il tempo di recupero e di aumentare la neovascolarizzazione (Wright-Carpenter et al., 2004; Hammond et al., 2009; Gigante et al., 2012). Inoltre, in uno studio recente è stato dimostrato che la combinazione del PRP con l'agente antifibrotico Losartan migliorava la guarigione rispetto al trattamento con il solo PRP (Terada et al., 2013). Infatti, tale combinazione sembra ridurre la fibrosi, promuovere l'angiogenesi e stimolare la riparazione del muscolo con lesioni da contusione. Visti gli ottimi risultati ottenuti *in vitro* e su modelli animali, sono stati condotti sull'uomo una serie di studi clinici mirati a valutare gli effetti del PRP su lesioni muscolari scheletriche. Tuttavia, i dati ottenuti sono risultati scarsi e contrastanti (Tabella 2). Una delle possibili cause della scarsità di dati può essere legata al fatto che l'agenzia mondiale antidoping (*World Anti-Doping Agency*, WADA) fino all'anno 2010 ha considerato la terapia con PRP (e quindi con

fattori di crescita) tra le procedure proibite e, di conseguenza, sono stati pochi gli studi condotti. In seguito, è stato definito che le formulazioni del PRP utilizzate non sono in grado di provocare un aumento significativo delle prestazioni sportive. Perciò, poichè l'uso a scopo terapeutico del PRP non viola lo spirito delle competizioni sportive, esso è stato rimosso dalla lista delle procedure proibite dal 2011.

Autore	Popolazione	Tipo di danno	Tipo di preparazione di PRP	Modo di somministrazione	Risultati
Wright-Carpenter et al., (2004)	18 sportivi professionisti e 11 controlli. (Europa)	Moderato, danno muscolare di secondo grado- 7 tipi muscolari diagnosticati da MRI	Siero autologo ottenuto da sangue intero e centrifugato, conservato a -20 ° C	Iniezione iniziale dopo 2 giorni dal danno, seguita da iniezione ogni due giorni fino al completo recupero. (Iniezioni di 2,5 ml).	Tempo di recupero del gruppo trattato con PRP di 16,6 giorni vs 22,3 giorni nel gruppo di controllo.
Loo et al., (2009)	Uomo di 35 anni, body Builder professionista.	Rottura del muscolo adduttore lungo destro, con ematoma diagnosticato da ultrasuoni	Centrifugazione del sangue intero, no buffy coat, attivato con calcio	3 iniezioni settimanali	Guarigione muscolare, ematoma organizzato, sollievo dal dolore, ritorno all'allenamento 1 settimana dopo le 3 iniezioni.
Hamilton et al., (2010)	Maschio di 42 anni con malattia coronarica	Danno di secondo grado al muscolo ischiocrurale	Preparazione commercial Biomet Recover®	Iniezione guidata da ultrasuoni (3 somministrazioni di 1 ml) nel sito di lesione e successiva applicazione immediata di ghiaccio.	Risoluzione lieve dopo 9 giorni dal trattamento, completa dopo 17 giorni e ritorno all'attività 3 settimane dopo trattamento.
Wetzel et al., (2013)	15 pazienti (12 femmine). Fallimento della terapia tradizionale. 12 pazienti trattati con PRP vs 5 pazienti trattati con terapia tradizionale	Lesione prossimale del muscolo ischiocrurale	55 cc di PRP ottenuto da sangue intero	Iniezione nel muscolo di un singolo bolo da 6 cc di PRP	Nessuna differenza tra i due gruppi, tutti gli atleti hanno ripreso l'attività sportive. PRP diminuisce il dolore.

Bubnov et al., (2013)	30 atleti maschi Ucraini	Lesioni muscolari acute (coscia, spalla, piede e caviglia)	Preparazione ottenuta mediante centrifugazione completa di sangue, incluso buffy coat, nessuna attivazione	Singola iniezione PRP guidata da ultrasuoni	Il gruppo trattato con PRP riporta un maggior sollievo dal dolore, una migliore rigenerazione e funzione muscolare. Nessuna differenza a 28 giorni ad eccezione della migliore motilità e funzionalità globale soggettiva. Tempo di ritorno allo sport: 10 giorni nei pazienti trattati con PRP vs 22 giorni nei controlli
Bernuzzi et al., (2014)	53 atleti (36 uomini, 17 donne)	Lesioni muscolari o miotendinee di I-III grado	Centrifugazione completa del sangue, concentrato piastrinico conservato a -40 ° C	Concentrato attivato con trombina. Iniezioni di 1 ml di preparato ogni 7 giorni × 3 settimane	Progressive diminuzione del dolore. I pazienti hanno ripreso lo sport dopo circa 30 giorni.
Reurink et al., (2014)	80 atleti (76 maschi, 4 femmine)	Danno acuto al muscolo ischiocrurale confermato da MRI	Preparazione commerciale Arthrex®	2 iniezioni - Iniezione 5 giorni dalla lesione, poi 5-7 giorni dopo, 3 × 1mL nella lesione	Il tempo di ritorno allo sport mediamente non era diverso tra i gruppi (42 giorni)

Tabella 2. Studi clinici del PRP su lesioni muscolari (da Mosca e Rodeo 2015).

In numerosi studi il PRP si è dimostrato capace di promuovere la guarigione del muscolo leso e di ridurre il tempo di recupero e il dolore del paziente mentre in altri non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra i pazienti trattati con PRP e pazienti di controllo (Mosca e Rodeo, 2015) (Tabella 2). Questa discordanza tra i vari dati ottenuti potrebbe essere in parte dovuta alla mancanza di un adeguato protocollo standardizzato per la preparazione ed applicazione del PRP (Tabella 3). La variazione della metodica di ottenimento, di preparazione e di attivazione nonché la diversa concentrazione piastrinica tra i vari preparati di PRP influenzano la quantità dei fattori di crescita presenti nel plasma e conseguentemente la risposta al trattamento. Inoltre queste variazioni insieme alla mancanza di un metodo di applicazione standard (sito e modo di applicazione, dosaggio e frequenza) limitano l'interpretazione dei dati disponibili e la capacità di trarre conclusioni significative. Risulta quindi necessario standardizzare il prodotto, caratterizzare i componenti attivi e formulare una preparazione specifica per le diverse patologie (Anitua et al., 2007).

Platelet-rich plasma (PRP) and muscle injury: research limitations

Variability in PRP preparation methods and reporting of injection procedures

Platelet concentration and growth factor levels inconsistent

Optimal timing, frequency, and dose-response not established

Small sample sizes in animal and human studies

Type (acute vs. repetitive) and location of injury variable

Poor correlation between rodent and human models of injury

In vivo mechanisms of healing more complex than in vitro

Majority of clinical data uncontrolled or retrospective

Selection bias in clinical studies (e.g., lack of randomization)

Detection bias in animal and human studies (e.g., non-blinded outcome measurements)

Limited generalizability in clinical studies (e.g., predominately male athletes)

Tabella 3. Criticità legate all'uso del PRP (da Mosca e Rodeo 2015).

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del presente studio è stato quello di valutare, in una prima fase, gli effetti del PRP rispetto al siero di origine animale nella coltura *in vitro* di mioblasti della linea C2C12, cellule satelliti e cellule BM-MSC in termini di vitalità, sopravvivenza, proliferazione e differenziamento miogenico. In una seconda fase e in vista di una futura applicazione clinica, è stato analizzato l'effetto della combinazione PRP/BM-MSC su colture di cellule mioblastiche C2C12 nel supportare e sostenere il programma di differenziamento miogenico.

MATERIALI E METODI

Gli animali sono stati trattati in accordo con le linee guida della comunità Europea per la cura degli animali (DL 116/92), in applicazione della Direttiva Europea del Consiglio del 24 Novembre 1986; 86/609/EEC) approvata dalla Commissione per la cura e l'utilizzo sperimentale degli animali da parte dell'Università degli studi di Firenze. La politica etica dell'Università di Firenze è conforme alle linee guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio del *National Institutes of Health* (NIH Pubblicazione No. 85-23, rivista nel 1996, Università degli Studi di Firenze assicurazione No. A5278-01). I protocolli sono stati comunicati alle autorità locali e al Ministero italiano della Salute, secondo la legge italiana (art. 7/D.lgs 116/92); tale procedura non richiede l'autorizzazione del Ministero. Il PRP è stato ottenuto da prelievi di sangue intero eseguiti su volontari sani adulti dopo consenso informato presso l'unità di Medicina Immunoematologica e Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera Careggi di Firenze. Le aliquote ottenute sono state classificate come non adatte per scopi infusionali/trasfusionali. L'utilizzo di PRP *in vitro* non richiede l'approvazione del Comitato Etico.

PREPARAZIONE DEL PLASMA RICCO DI PIASTRINE (*PLATELET RICH PLASMA*, PRP)

Il plasma ricco di piastrine (*Platelet Rich Plasma*, PRP) è stato ottenuto da prelievi di sangue intero eseguiti su volontari sani e adulti tramite piastrinoaferesi come riportato in precedenza (Formigli et al., 2012). In particolare, l'aggregato piastrinico è stato ottenuto centrifugando una sacca di plasma per 10 minuti a 3000 rpm. Le piastrine presenti nel PRP, sono state leucodeplete, irradiate e poi contaminate automaticamente utilizzando una camera contaglobuli. La concentrazione finale di piastrine nel PRP era pari a $2 \cdot 10^6$ / $\mu\text{l} \pm 10\%$. In seguito, il PRP è stato attivato con una soluzione di calcio digluconato e trombina al 10% e poi diluito con terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, DMEM; Sigma, Milano, Italia) contenente 4,5 g/l di glucosio in assenza di siero (*serum-free*, SF) al fine di ottenere due diverse diluizioni di PRP (1:50 e 1:100).

COLTURE CELLULARI

Mioblasti murini scheletrici della linea C2C12

Nel presente studio abbiamo utilizzato una linea cellulare di mioblasti scheletrici di topo (C2C12) proveniente dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Le cellule sono state coltivate in apposite piastre da coltura cellulare, in terreno di crescita DMEM addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di penicillina/streptomicina (Sigma, Milano, Italia) ed incubate a 37° C in un'atmosfera contenente 5% di CO₂ e 95% di aria fino al raggiungimento di una confluenza pari all'80%. Le cellule sono state poi coltivate in terreno di coltura SF, nel terreno standard di proliferazione dei mioblasti (*Proliferation medium*, PM) contenente DMEM e il 10% di FBS o in terreno di differenziamento (*Differentiation medium*, DM) contenente siero di cavallo (HS, Sigma) al 2% per tempi variabili di 24, 48, 72 ore e 5 giorni.

Cellule stromali/mesenchimali staminali da midollo osseo (BM-MSC)

Le cellule stromali/mesenchimali staminali sono state isolate da midollo osseo di topi maschi C2F1, espanso in vitro e caratterizzate come riportato in precedenza (Sassoli et al., 2012a). Le cellule sono state coltivate nel loro specifico PM contenente DMEM addizionato con 20% di FBS o nel mezzo di coltura SF in presenza o in assenza di PRP alle differenti diluizioni di 1:50 e 1:100 per 24 ore.

Cellule Satelliti

Le cellule satelliti sono state isolate da fibre muscolari da muscolo Estensore lungo delle dita (EDL) di topi maschi adulti (25-30 g) come riportato in precedenza (Sassoli et al., 2014b). In particolare, i muscoli EDL sono stati prelevati e immersi in una soluzione contenente collagenasi di tipo I allo 0,2% in DMEM (Sigma) e poi trasferiti in una piastra di Petri contenente terreno DMEM senza siero. Le singole fibre muscolari sono state isolate dai muscoli mediante digestione meccanica con pipette Pasteur, raccolte in una piastra 24/well pre-trattata con Matrigel (BD Biosciences, San Josè, CA, USA) e poi coltivate per 24 ore a 37°C in atmosfera umidificata contenente 5% CO₂ in PM contenente DMEM addizionato con il 20% di FBS, 10% di HS, 0,5% di estratto di embrione di pollo (Sera Laboratories International Ltd, Horsted Keynes, UK) 1% di

Penicillina/Streptomicina e L-glutammina (25mM) al fine di permettere la fuoriuscita di cellule satelliti. Successivamente, le fibre muscolari sono state rimosse e le cellule satelliti ottenute, sono state coltivate nello specifico PM e in terreno di coltura SF addizionato con PRP 1:50 per 24 ore.

Co-coltura di mioblasti scheletrici C2C12 o cellule satelliti e cellule BM-MSC

In esperimenti paralleli, le cellule C2C12 o le cellule satelliti sono state coltivate insieme alle cellule BM-MSC in un rapporto 2:1 in terreno di coltura PM o SF in presenza o in assenza di PRP alla diluizione di 1:50 e 1:100 per vari tempi (24, 72 ore e 5 giorni). Prima di essere piastrate, al fine di poterle identificare, le cellule MSC di topo sono state marcate con un colorante vitale lipofilico specifico per le membrane fluorescente (rosso) utilizzando il kit *Vybrant™ Dil Cell-Labeling solutions* fornito dalla ditta Molecular Probes, (Eugene, OR, USA) (Sassoli et al., 2012a).

SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTS

La vitalità cellulare è stata determinata per mezzo del saggio colorimetrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolo (MTS-Promega Corp). Nelle cellule vitali l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi è capace di ridurre il colorante MTS (giallo), formando formazano, un derivato solubile di colore marrone che assorbe ad una lunghezza d'onda di 492nm (Mosmann, 1983). Le cellule C2C12 e le cellule MSC sono state coltivate in una piastra 96/well (10⁴ cellule/pozzetto) nei rispettivi PM per 24 ore, in seguito, il terreno di crescita è stato sostituito con un terreno SF in presenza o in assenza di PRP alle diluizioni di 1:50 e 1:100 e le cellule sono state così coltivate per 24 ore. Per l'esecuzione del saggio MTS, sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 100µl di terreno di crescita senza rosso fenolo e 20µl di soluzione MTS fornita dalla ditta. Le cellule sono state quindi incubate a 37°C in un'atmosfera contenente 5% di CO² per circa 4 ore. In seguito, la densità ottica di formazano risultante dalla riduzione di tetrazolo da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi è stata misurata usando uno spettrofotometro (Amersham, Pharmacia Biotech, Cambridge, Regno Unito) ad una lunghezza d'onda di 492 nm.

CONTA CELLULARE

La proliferazione delle cellule C2C12 è stata valutata mediante conta cellulare. In particolare, le cellule sono state coltivate in una piastra 6/well (10^5 cellule/pozzetto) in terreno PM o in mezzo di coltura SF in presenza o in assenza di PRP 1:50 e 1: 100 per 24 ore. Le cellule sono state poi sciacquate con tampone PBS, fissate con paraformaldeide (PFA) allo 0.5% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente, e colorate con blu di toluidina (Sigma) per 5 minuti. Successivamente le cellule sono state contate in 10 campi ottici random (1,3x1,0 mm) utilizzando un microscopio Zeiss Axioskop 20 (Carl Zeiss SpA, Milano, Italia) dotato di un di obiettivo 10x.

SAGGIO FLUORESCENTE DI INCORPORAZIONE DI ANALOGHI NUCLEOTIDI MODIFICATI EDU 5-ETINIL-2-DEOSSOURIDINA

La proliferazione delle cellule C2C12 è stata valutata utilizzando il kit fluorescente *Click-it EdU Cell Proliferation* (Life Technologies) come riportato in precedenza (Sassoli et al. 2014a). Quest'analisi permette di valutare l'incorporazione di analoghi della pirimidina, EdU, al posto della timidina all'interno della molecola di DNA di nuova sintesi che avviene durante la fase S del ciclo cellulare (cellule replicanti). A tale scopo, le cellule adese su vetrini copri oggetto, sono state incubate con una soluzione contenente 10 μ M di EdU per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state sciacquate con tampone PBS, fissate con PFA allo 0.5% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate con acetone freddo per 3 minuti ed infine incubate con una soluzione contenente il fluorocromo Alexa Fluor- 488 per marcare gli Edu (Detection Kit) per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Dopo una serie di lavaggi in PBS, i vetrini coprioggetti contenenti le cellule marcate, sono stati montati con balsamo acquoso (Biomeda Gel mount, Electron Microscopy Sciences, Foster City, CA, USA) e osservati al microscopio confocale a scansione laser Leica TSC SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) dotato di obiettivo 60X ad olio Leica PlanApo e di una sorgente laser a HeNe/Argon per la fluorescenza e di un sistema ottico di contrasto interferenziale (DIC) per le immagini in trasmissione. Il numero delle cellule con nuclei EdU positivi è stato valutato in 10 campi ottici (200x200 μ m) ed espresso in percentuale come numero dei nuclei positivi rispetto al numero totale delle cellule. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

IMMUNOFLUORESCENZA CONFOCALE

Le cellule adese su vetrini copri oggetto, sono state fissate con PFA allo 0.5% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente, permeabilizzate con acetone freddo per 3 minuti, e poi incubate per 20 minuti con un tampone di blocco contenente 0.5% di albumina di siero bovino (BSA) e il 3% di glicerolo in PBS al fine di mascherare i siti aspecifici. In seguito, le cellule sono state incubate con i seguenti anticorpi primari: Ki67 (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio; 1:100 Abcam, Cambridge, UK), MMP-2 (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio; 1:200 Abcam), Pax-7 (anticorpo monoclonale prodotto nel topo; 1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), MyoD (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio 1:100; Santa Cruz Biotechnology), Notch-1 (anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio; 1:200 Abcam), Miogenina (anticorpo monoclonale prodotto nel topo, 1:50, Sigma), Actina α -sarcomerica (anticorpo monoclonale prodotto nel topo 1:100; DakoCytomation Carpinteria, CA, USA), AKT (anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio 1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), phospho-AKT (p-AKT, anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio 1:100; Cell Signaling Technology) a 4°C per una notte. L'immunoreazione è stata rivelata usando anticorpi secondari anti-topo e anti-coniglio coniugati con fluorocromo Alexa Fluor488 (verde, 1:200; Molecular Probes), e con fluorocromo Alexa Fluor568 (rosso, 1:200; Molecular Probes) per 1 ora a temperatura ambiente. In alcuni esperimenti, la marcatura di contrasto è stata effettuata con falloidina coniugata con tetrametilrodamina isotiocianato rossa (TRITC, 1:100 per 1 ora a temperatura ambiente; Sigma) per rivelare i filamenti di F-actina o con ioduro di propidio rosso (PI, 1:30 per 30 secondi a temperatura ambiente; Molecular Probes) per rivelare i nuclei. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo gli anticorpi primari con siero non immune; la cross-reattività degli anticorpi secondari è stata testata in esperimenti di controllo in cui era omesso l'anticorpo primario. Dopo vari lavaggi in PBS e in acqua, i vetrini coprioggetto, contenenti le cellule immunomarcate, sono stati montati usando un balsamo acquoso. L'osservazione è stata eseguita con un microscopio confocale a scansione laser (Leica Microsystem) dotato di obiettivo Leica PlanApo X63 a immersione, di una sorgente laser a HeNe/Argon per la fluorescenza e di un sistema ottico di contrasto interferenziale (DIC) per le immagini in trasmissione. Una serie di sezioni ottiche (1024 x 1024 pixels) ad intervalli di 0.4 μ m sono state ottenute e poi sovrapposte in modo tale da creare una singola immagine composita. L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale fluorescente relativo a MMP-2, Notch-1, Actina

α -sarcomerica e AKT è stata eseguita su immagini digitali usando il programma ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) in 20 regioni di interesse (ROI) di 100 μm^2 di superficie per ogni volume di scansione focale. L'analisi quantitativa del numero di cellule con nuclei Ki67, MyoD, p-AKT o Pax-7 positivi è stata eseguita contando le cellule in almeno 10 campi ottici (63x ocular) 200x200 μm e i risultati sono stati espressi come numero di cellule positive per campo ottico come numero dei nuclei positivi rispetto al numero totale delle cellule.

WESTERN BLOTTING

Le cellule sono state risospese in un volume appropriato di tampone di lisi contenente 10 mM Tris/HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA 1mM NaF, 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, glicerolo 10%, sodio dodecil solfato 0,1% (SDS), deossicolato 0,5% (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), integrati con 50 $\mu\text{l/ml}$ Cocktail di Inibitori di Proteasi (Sigma) e 1Mm di fenilmetilsulfonil fluoride PMSF (Sigma). Gli estratti cellulari sono stati centrifugati a 13.000 g per 10 minuti a 4°C, e i supernatanti sono stati raccolti e sottoposti all'analisi di western blotting. Il contenuto proteico è stato quantificato mediante il metodo *Bio-Rad Protein assay* (Bio-Rad laboratories S.r.l; Milano, Italia). Le proteine della frazione supernatante (40 μg) sono state separate mediante elettroforesi su NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, Life Technologies) a un voltaggio di 200 V per 40 minuti e trasferite su membrane di polivinilidenfluoruro PVDF (Invitrogen, Life Technologies), ad un voltaggio di 30V per un'ora. In seguito, le membrane sono state incubate con una soluzione di blocco fornita nel *Western Breeze[®] Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen, Life Technologies) per 30 minuti a temperatura ambiente e poi incubate per una notte a 4°C con anticorpi anti-metalloproteinasi MMP-2 (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio 1:2000; Abcam), anti-MyoD (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), anti-Notch-1 (anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio 1:2000; Abcam), anti-Miogenina (anticorpo monoclonale prodotto nel topo 1:500; Sigma) anti-AKT (anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio 1:1000 Cell Signaling Technology), anti-p-AKT (anticorpo monoclonale prodotto nel coniglio 1:1000 Cell Signaling Technology) e anti- α -Tubulina (anticorpo policlonale prodotto nel coniglio 1:1000; Merck, Milano Italia), assumendo α -tubulina come proteina di riferimento. L'immunorivelazione è stata

eseguita secondo il protocollo del *Western Breeze®Chromogenic Immunodetection Kit* (Invitrogen). L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata utilizzando un software di analisi di immagini ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) e i valori sono stati normalizzati rispetto alla proteina di riferimento α -tubulina.

ANALISI STATISTICA

I risultati di tre diversi esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato sono stati espressi come media \pm SEM (*Standard Error of Mean*). L'analisi statistica delle differenze tra i vari gruppi sperimentali è stata eseguita utilizzando one-way ANOVA, il test di comparazione multipla Newman–Keuls. I valori con $p \leq 0.05$ sono stati considerati significativi. I calcoli sono stati eseguiti con il software di programmi statistici GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RISULTATI

IL PRP MODULA VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DI MIOBLASTI C2C12

Al fine di valutare gli effetti del PRP sulla vitalità, proliferazione e differenziamento miogenico di cellule mioblastiche C2C12, abbiamo coltivato le cellule in presenza di PRP alle diluizioni di 1:50 e 1:100 per tempi diversi (24, 48, 72 ore e 5 giorni) come precedentemente riportato (Formigli et al., 2012). Le cellule coltivate in DMEM senza siero (SF) o addizionato con FBS 10% (PM) o HS 2% (DM) venivano considerati come controlli. Tramite saggio MTS abbiamo dimostrato che il trattamento con PRP 1:50 e 1:100 per 24 ore induceva un aumento della vitalità cellulare rispetto alle cellule coltivate in terreno SF, come dimostrato dal significativo aumento dell'attività mitocondriale delle cellule (valori di assorbanza a 492 nm: SF, $0,184 \pm 0,011$, PM, $0,429 \pm 0,030$, PRP 1:50, $0,401 \pm 0,032$, PRP 1:100, $0,335 \pm 0,023$, $p < 0,05$ PM, PRP 1:50 e PRP 1:100 vs SF; $p < 0,05$ PRP 1:100 contro PM e vs PRP 1:50). L'effetto del PRP alla diluizione 1:50 sulla vitalità cellulare era paragonabile a quello delle cellule coltivate in PM. Inoltre, il PRP 1:50 dopo 24 ore di coltura, era in grado di aumentare significativamente la capacità proliferativa dei mioblasti C2C12 rispetto alle cellule di controllo coltivate in terreno SF e in PM. Tale capacità è stata dimostrata da: i) l'aumento del numero di cellule ottenuto mediante conta cellulare (Figura 1a, e), ii) la maggiore percentuale di cellule in fase S valutata mediante saggio fluorescente d'incorporazione nel DNA di analoghi dei nucleotidi, gli EdU (Figura 1b, f) e iii) la maggiore percentuale di cellule positive per Ki67, una proteina nucleare presente durante tutte le fasi del ciclo cellulare (G1, S, G2 e mitosi), ma assenti nelle cellule in fase di riposo (G0) (Figura 1c, g). L'effetto del PRP 1:100 sulla proliferazione cellulare era paragonabile a quello del PM (Figura 1a-c, e-g).

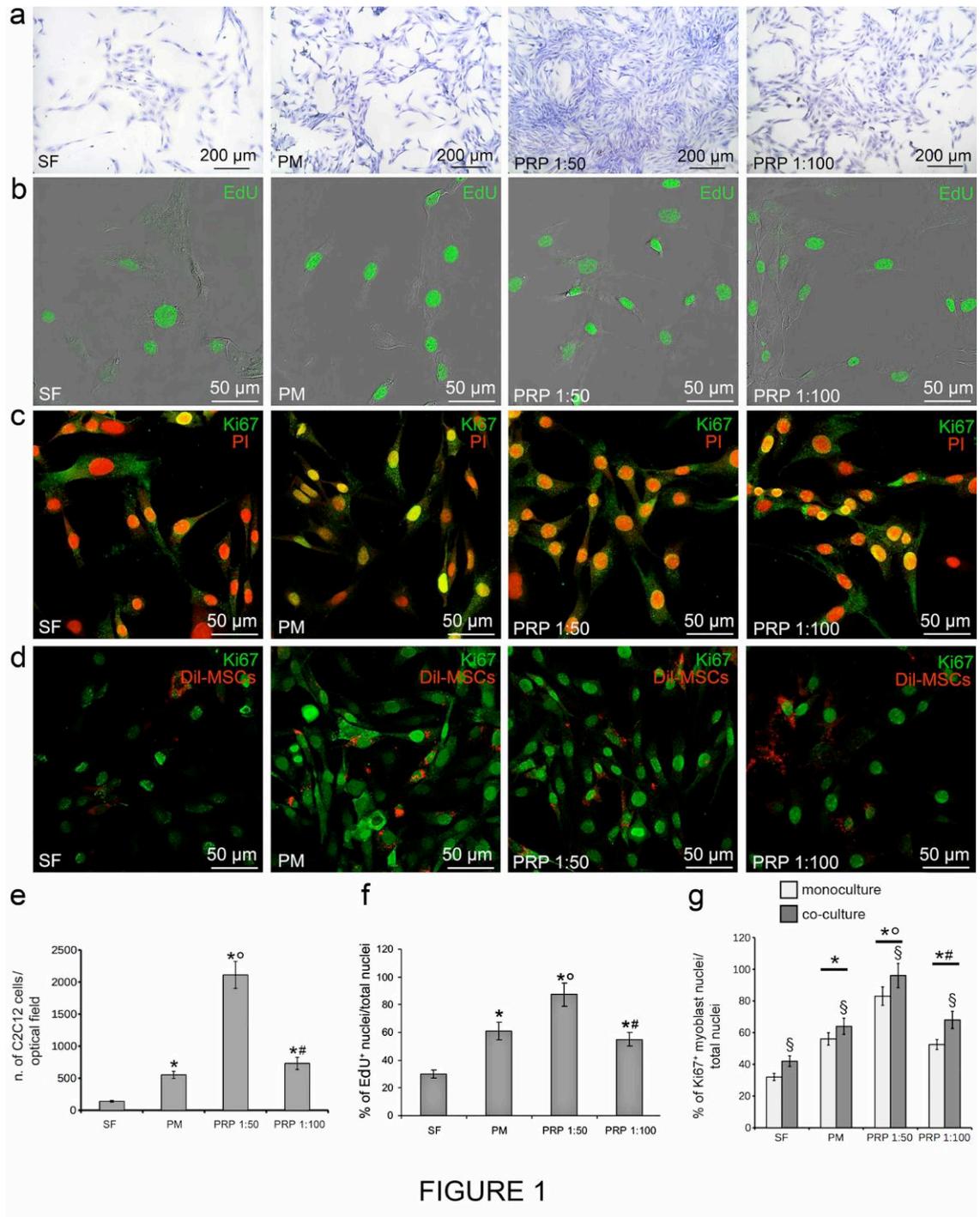


Figura 1. Effetti del PRP sulla proliferazione di mioblasti C2C12. Le cellule C2C12 in monocultura o in co-cultura con cellule BM-MSC marcate con colorante rosso fluorescente, Dil (Dil-MSCs), sono state coltivate in DMEM senza siero (SF) o addizionato con FBS 10% (PM) o con PRP 1:50 e 1:100 per 24 ore. a) Immagini ottenute al microscopio ottico di cellule C2C12 colorate con blu di toluidina. b) Sovrapposizione con immagini di ottiche di contrasto interferenziale (DIC) e immagini ottenute mediante immunofluorescenza confocale di cellule C2C12 che mostrano l'incorporazione nucleare di EdU (verde). c), d) Immagini rappresentative al microscopio confocale di cellule C2C12 in co-cultura con Dil-MSC (rosso), e immunomarcate con anticorpo anti Ki67 (verde). In c), i nuclei sono stati marcati in rosso con ioduro di propidio (PI); il colore giallo indica la co-localizzazione dei segnali di fluorescenza rossi e verdi. e) Analisi quantitativa del numero di cellule per campo microscopico ottico. f) Analisi quantitativa del numero di mioblasti con nucleo positivo per EdU espressi come percentuale del numero totale di nuclei. g) Analisi quantitativa del numero di mioblasti con nucleo positivo per Ki67 espressi come percentuale del numero totale di nuclei. I dati rappresentano i risultati di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati simili. Significatività: * $p < 0,05$ vs SF; ° $p < 0,05$ vs PM; # $p < 0,05$ vs PRP 1:50; § $p < 0,05$ vs monocultura.

Abbiamo poi osservato che entrambe le diluizioni erano anche in grado di promuovere il programma di differenziamento miogenico delle cellule mioblastiche C2C12.

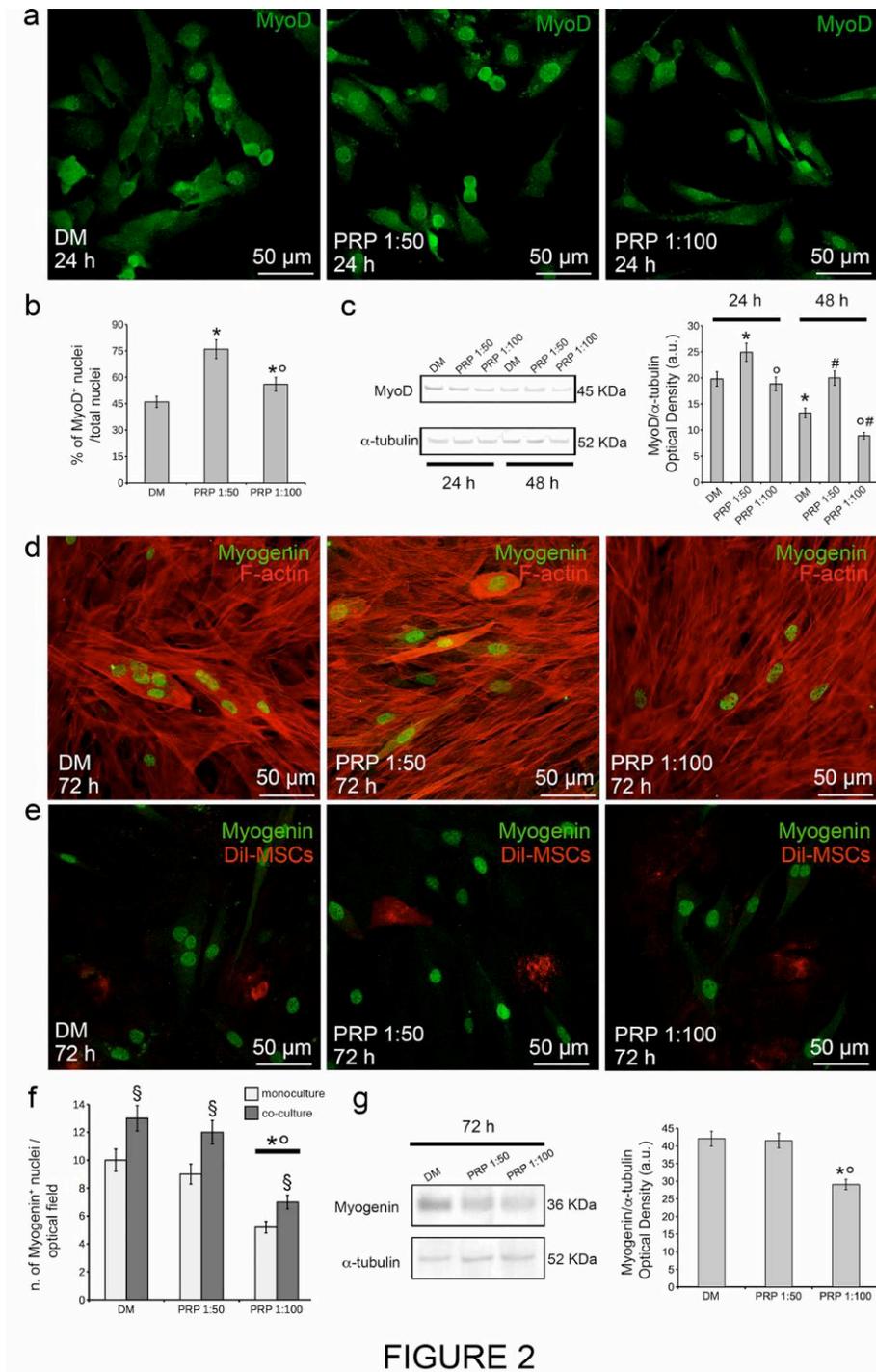


FIGURE 2

Figura 2. Effetti del PRP sull'espressione di MyoD e miogenina da parte di mioblasti C2C12. Le cellule C2C12 in monocultura o in co-cultura con cellule BM-MSC marcate con un colorante rosso fluorescente, Dil (Dil-MSC), sono state coltivate in DMEM addizionato con HS 2% (DM) o con PRP (1:50 e 1:100) per 24, 48 e 72 ore. a) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di mioblasti C2C12 in monocultura nelle condizioni

sperimentali indicate, immunomarcate con anticorpo anti MyoD (verde). b) Analisi quantitativa del numero di mioblasti con nucleo positivo per MyoD espressi come percentuale del numero totale di nuclei. c) Analisi di Western blotting dell'espressione di MyoD nei mioblasti C2C12 in monocultura nelle condizioni sperimentali indicate. L'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulina sono riportate nell'istogramma. d, e) Immagini rappresentative al microscopio confocale di cellule C2C12 in monocultura (d) o in co-cultura (e) con cellule Dil-MSC (rosso) nelle condizioni sperimentali indicate, e immunomarcate con anticorpo anti miogenina (verde). In (d) le cellule sono state fissate e marcate con Falloidina TRITC (rosso) al fine di rivelare i filamenti di F-actina. f) Analisi quantitativa del numero di mioblasti con nucleo positivo per la miogenina per campo ottico. g) Analisi di Western blotting dell'espressione di miogenina nei mioblasti C2C12 in monocultura nelle condizioni sperimentali indicate. L'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulina sono riportate nell'istogramma. I dati rappresentano i risultati di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati simili. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività: in b, f, g: * $p < 0,05$ vs DM; $^{\circ}$ $p < 0,05$ vs PRP 1:50; § $p < 0,05$ vs la monocultura; in c, * $p < 0,05$ vs DM 24 h; # $p < 0,05$ rispetto al tempo precedente; $^{\circ}$ $p < 0,05$ vs PRP 1:50.

Infatti, come mostravano le analisi di immunofluorescenza confocale e di western blotting, le cellule C2C12 trattate con PRP esprimevano fattori di regolazione miogenici primari e secondari, quali MyoD (Figura 2a-c) e miogenina (Figura 2d, f, g). In particolare, le cellule trattate per 24 e 48 ore con PRP 1:50 mostravano un aumento significativo dell'espressione di MyoD rispetto alle cellule coltivate in DM (controllo Figura 2a-c) mentre l'espressione di miogenina nelle cellule coltivate per lo stesso tempo in DM (Figura 2d, f, g). Inoltre, abbiamo anche dimostrato mediante analisi di immunofluorescenza confocale che dopo 5 giorni di trattamento con PRP, le cellule si fondevano per formare miotubi esprimenti actina α -sarcomerica (Figura 3a, c).

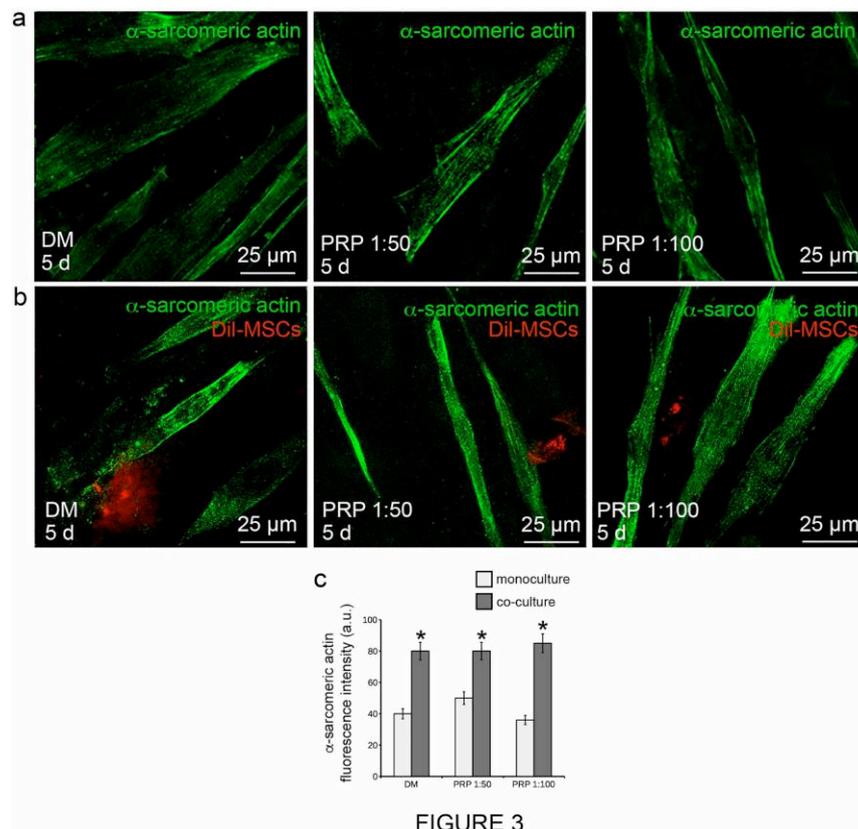


Figura 3. Effetti del PRP sull'espressione di actina α -sarcomerica parte di mioblasti da C2C12. Le cellule C2C12 in monocultura o in co-cultura con DiI-MSD, sono state coltivate in DMEM addizionato con HS 2% (DM) o con PRP1:50 o 1: 100 per 5 giorni. a, b) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di mioblasti C2C12 immunomarcati con anticorpo anti actina α -sarcomerica (verde). c) L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale di fluorescenza relativo all'actina α -sarcomerica eseguito su immagini digitalizzate è riportata nell'istogramma. Le immagini rappresentano almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività: * $p < 0.05$ vs monocultura.

In alcune cellule, si osservavano fascetti di miofilamenti molto simili a quelli descritti durante le prime fasi di assemblaggio dei sarcomeri. Infine, abbiamo valutato la capacità del PRP di influenzare l'espressione da parte dei mioblasti della metalloproteasi di matrice (MMP)-2, il cui ruolo durante la miogenesi è stato ben descritto. (Oh et al., 2004, Lluri et al., 2005; Ohtake et al., 2006; Nishimura et al., 2008; Chen e Li 2009, Miyazaki et al., 2011; Thomas et al., 2015). Infatti, l'espressione e l'attività della MMP-2 durante la fase terminale del processo di differenziamento miogenico è un prerequisito critico per completare la successiva migrazione e fusione dei mioblasti. In accordo con i dati riportati in letteratura (Oh et al., 2004; Lluri et al., 2005; Ohtake et al., 2006; Nishimura et al., 2008; Chen e Li 2009, Miyazaki et al., 2011) e con le nostre precedenti osservazioni (Sassoli et al., 2014b), abbiamo dimostrato mediante analisi di immunofluorescenza confocale (Figura 4a-d) e di western blotting (Figura 4f), che l'espressione di MMP-2 nelle cellule C2C12 aumentava nel tempo durante il differenziamento cellulare e raggiungeva la massima espressione nei miotubi ben differenziati. Nelle cellule coltivate con PRP l'espressione di MMP-2, nonché la sua distribuzione temporale e subcellulare erano simili a quelle osservate nelle cellule di controllo coltivate in DM (Figura 4a-d, f). Tali risultati nel complesso suggeriscono che il PRP è in grado di influenzare positivamente la proliferazione dei mioblasti così come il loro differenziamento miogenico.

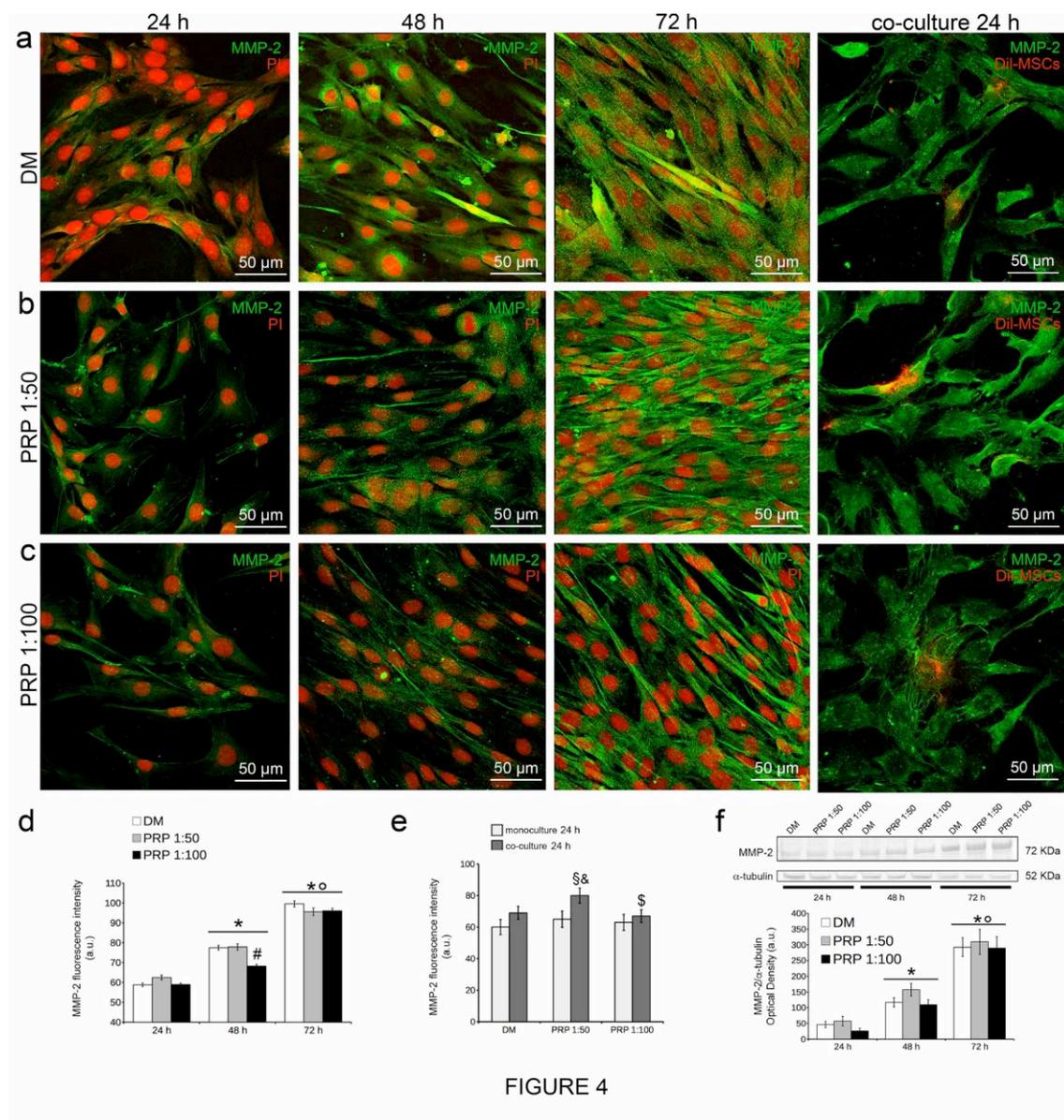


FIGURE 4

Figura 4. Effetti del PRP sull'espressione di MMP-2 da parte di mioblasti C2C12. Le cellule C2C12 in monocoltura o in co-coltura con BM-MSc marcate con colorante fluorescente rosso, Dil (Dil-MSc), sono state coltivate in DMEM addizionato con HS 2% (DM) o con PRP1:50 o 1:100 ai tempi indicati. a-c) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di mioblasti C2C12 immunomarcate con anticorpo anti MMP-2 (verde). I nuclei delle cellule C2C12 in monocoltura sono stati marcati in rosso con ioduro di propidio (PI). d, e) L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale di fluorescenza relativo a MMP-2 eseguito su immagini digitalizzate è riportata nell'istogramma. f) Analisi di Western blotting dell'espressione di MMP-2 nelle cellule C2C12 in monocoltura nelle condizioni sperimentali indicate. L'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulina sono riportate nell'istogramma. I dati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività: in d, f * $p < 0,05$ vs 24 h; $^{\circ}$ $p < 0,05$ vs 48 h; # $p < 0,05$ vs DM; in e, $\$$ $p < 0,05$ vs DM (co-coltura); $\$$ $p < 0,05$ vs PRP 1:50 (co-coltura); & $p < 0,05$ vs monocoltura.

IL PRP MODULA VITALITÀ, PROLIFERAZIONE E SOPRAVVIVENZA DI CELLULE BM-MSC.

Mediante saggio MTS per la vitalità cellulare, abbiamo dimostrato che il PRP ad entrambe le diluizioni (1:50 e 1:100) induceva un aumento della vitalità delle cellule BM-MSC rispetto alle cellule coltivate nel mezzo di coltura SF e paragonabile a quella delle cellule coltivate nello specifico PM (DMEM addizionato con FBS 20%; valori di assorbanza a 492 nm: SF, $0,131 \pm 0,008$, PM, $0,354 \pm 0,037$, PRP 1:50, $0,309 \pm 0,025$, PRP 1: 100, $0,271 \pm 0,024$, $p < 0,05$ PM, PRP 1:50 e PRP 1: 100 vs SF; test di confronto multipli ANOVA e Newman-Keuls). Tal effetto si associava ad un aumento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare come dimostrato dall'espressione nucleare di Ki67 (Figura 5a, c) e dall'attivazione di vie di segnalazione coinvolte in tali processi come quelle mediate da Notch-1 (Figura 5b, d, e) (Giannelli et al., 2013; Liu et al., 2013) e da AKT (Chen et al., 2013; Figura 6).

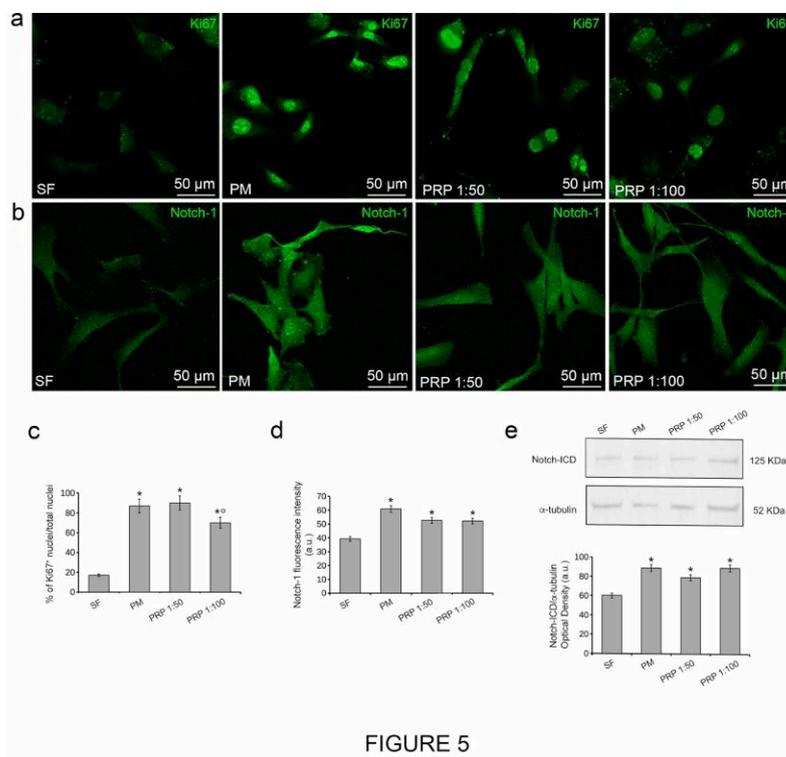


FIGURE 5

Figura 5. Effetto del PRP sulla proliferazione di cellule BM-MSC. Le cellule sono state coltivate in DMEM senza siero (SF) o addizionato con FBS 20% (PM) o con PRP 1:50 o 1:100 per 24 ore. a, b) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di cellule BM-MSC immunomarcate con anticorpo anti (a) Ki67 (verde) o (b) Notch-1 (verde). c) Analisi quantitativa del numero di nuclei Ki67 positivi espressi come percentuale del numero totale di nuclei. d) L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale di fluorescenza relativo a Notch-1 è riportata nell'istogramma. e) Analisi di Western blotting dell'espressione del dominio intracellulare di Notch-1 (Notch-ICD). L'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulina sono riportate nell'istogramma. I dati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività: * $p < 0,05$ vs SF; ° $p < 0,05$ vs PRP 1:50

In particolare, l'analisi al microscopio confocale mostrava che il numero di cellule BM-MSK con nucleo positivo per Ki67 aumentava dopo trattamento con PRP rispetto alle cellule coltivate in terreno SF e che l'effetto del PRP 1:50 risultava paragonabile a quello delle cellule coltivate in PM (Figura 5a, c). Inoltre, mediante analisi di immunofluorescenza confocale, usando un anticorpo specifico in grado di riconoscere sia il recettore Notch-1 che la sua forma attivata, Notch-ICD, abbiamo osservato che i livelli di Notch-ICD nel citoplasma e nel nucleo di cellule BM-MSK trattate con PRP aumentavano notevolmente rispetto a quelli delle cellule coltivate in mezzo di coltura SF ed erano paragonabili rispetto a quelli delle cellule coltivate in PM (Figura 5b, d). Tale dato è stato poi confermato mediante analisi di western blotting (Figura 5e). Infine, in accordo con tali dati, dall'analisi di immunofluorescenza confocale e di western blotting è stato interessante notare che nelle cellule trattate con PRP per 24 ore, i livelli di espressione di AKT (Figura 6a, c, e), così come i livelli della forma fosforilata attivata nucleare, p-AKT aumentavano rispetto alle cellule coltivate in terreno SF (Figura 6b, d, f). Tutti questi dati hanno suggerito che il PRP è in grado di stimolare vitalità, sopravvivenza e proliferazione di cellule BM-MSK.

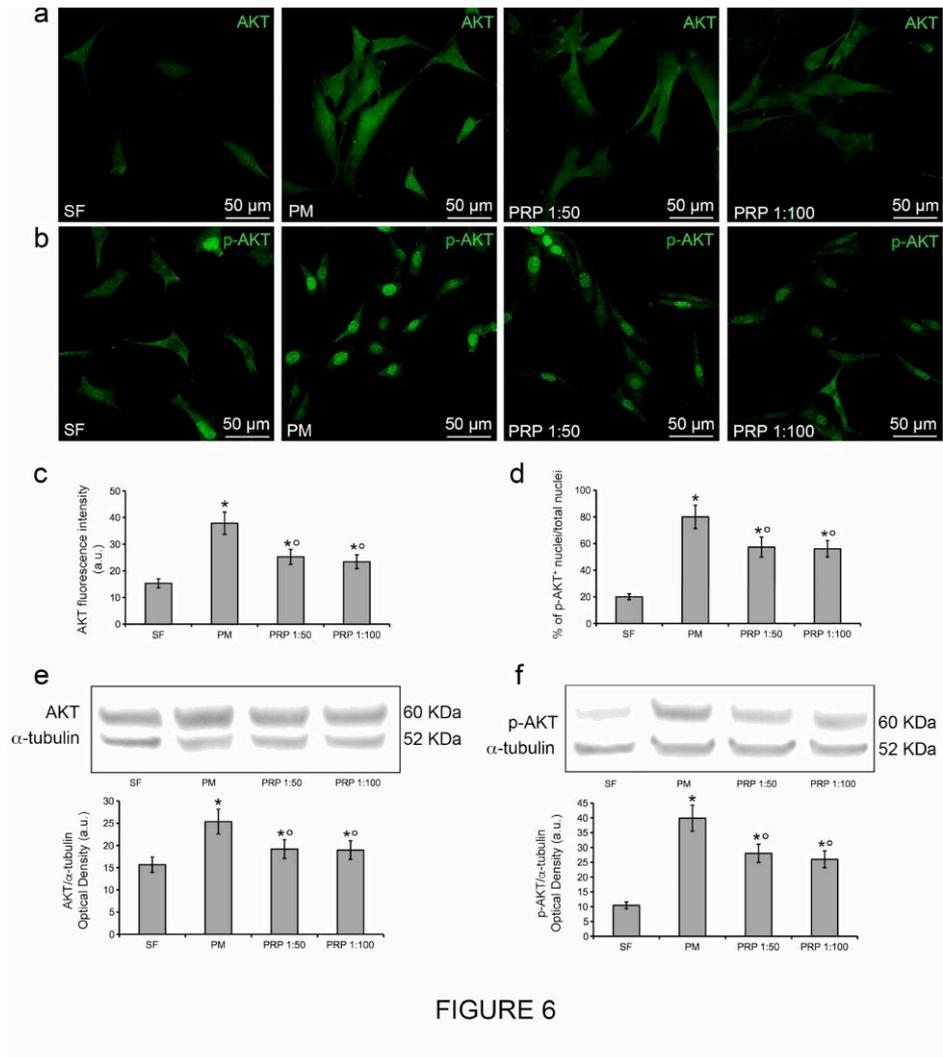


FIGURE 6

Figura 6. Effetto del PRP sull'espressione e attivazione di AKT in cellule BM-MSC. Le cellule sono state coltivate in DMEM senza siero (SF) o addizionato con FBS 20% (PM) o con PRP 1:50 o 1:100 per 24 ore. a, b) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di cellule BM-MSC immunomarcate con anticorpo per (a) AKT (verde) o (b) la forma fosforilata attivata di AKT, p-AKT (verde). c) L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale di fluorescenza relativo ad AKT eseguito su immagini digitalizzate è riportata nell'istogramma. d) Analisi quantitativa del numero di cellule BM-MSC con nucleo positivo per p-AKT espresso come percentuale del numero totale di nuclei. e, f) Analisi di Western blotting dell'espressione di (e) AKT e (f) p-AKT. L'analisi densitometrica delle bande normalizzate per α -tubulina sono riportate nell'istogramma. I dati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. . Significatività: * $p < 0,05$ vs SF; ^o $p < 0,05$ vs PM.

LA COMBINAZIONE PRP/BM-MSC STIMOLA LA PROLIFERAZIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DI MIOBLASTI C2C12

Sulla base dei risultati ottenuti e di nostri studi precedenti che dimostravano la capacità delle cellule BM-MSC di stimolare la proliferazione e il differenziamento di mioblasti C2C12 (Sassoli et al., 2012a; Sassoli et al., 2014a), sono stati condotti ulteriori esperimenti al fine di valutare gli effetti dell'uso combinato delle cellule BM-MSC con il PRP sugli stessi processi cellulari. A tale scopo, abbiamo allestito un modello di co-coltura diretta di cellule C2C12 e cellule BM-MSC marcate con un colorante fluorescente, Dil (Dil-MSC), al fine di distinguere i due tipi di cellule in coltura (Sassoli et al., 2012a). Come nelle monoculture, le cellule C2C12 e Dil-MSC sono state co-coltivate in presenza di differenti diluizioni di PRP (1:50 e 1:100) per tempi diversi (24, 48, 72 ore e 5 giorni). Le co-culture in terreno SF, PM o in DM erano considerate come controllo. In primo luogo, abbiamo dimostrato tramite analisi di immunofluorescenza confocale che i mioblasti in co-coltura rispetto a quelli in monocultura mostravano un aumento della capacità proliferativa, come si osservava dalla maggiore percentuale di cellule C2C12 esprimenti il marker nucleare Ki67 (Figura 1c, d, g). Il trattamento con PRP 1:50 aumentava la capacità proliferativa dei mioblasti in co-coltura rispetto a quelli coltivati in PM, mentre il PRP 1:100 aveva un effetto paragonabile agli stessi (Figura 1c, d, g). Interessante è stato osservare che l'utilizzo combinato delle cellule BM-MSC con il PRP era in grado di potenziare la proliferazione mioblastica rispetto al solo trattamento con PRP, suggerendo quindi una possibile interazione sinergica tra l'azione paracrina/iuxtacrina delle cellule BM-MSC e i fattori contenuti nel PRP. Successivamente abbiamo anche osservato che la presenza di cellule BM-MSC era in grado di promuovere il differenziamento dei mioblasti. Infatti, rispetto alle monoculture, nelle co-culture si osservava un maggior numero di cellule C2C12 che esprimevano miogenina (Figura 2d-f) e una maggior espressione da parte dei mioblasti di actina α -sarcomerica (Figura 3a, b). In particolare, in presenza di PRP 1:50 l'espressione di questi marker di differenziamento da parte dei mioblasti in co-coltura era paragonabile a quella delle cellule co-coltivate in DM (Figure 2, 3) e si osservava un aumento dell'espressione di MMP-2 rispetto alla monocultura (Figura 4a-e). Inoltre, l'analisi di immunofluorescenza confocale mostrava come nelle cellule C2C12 co-coltivate con Dil-MSC in PM si attivava la via di segnalazione di AKT (Figura 7) che, oltre al suo ruolo nel processo di sopravvivenza e proliferazione cellulare, è stato dimostrato essere coinvolta anche nella promozione della miogenesi (Kaneko et al., 2016). Le cellule

C2C12 in co-cultura trattate con PRP (1:50 o 1:100) mostravano livelli di AKT e p-AKT paragonabili a quelli delle cellule di controllo co-coltivate in PM (Figura 7). Da notare che il trattamento delle cellule con PRP continuava a stimolare la proliferazione delle cellule BM-MSK anche in presenza dei mioblasti C2C12 (Figura 1d; % dei nuclei Ki67 + BM-MSK in co-cultura: SF, $24,7 \pm 3,1$, PM, $84 \pm 7,56$, PRP 1:50, $80,1 \pm 6,39$, PRP 1: 100, $63 \pm 5,87$, $p < 0,05$ PM, PRP 1:50 e PRP 1: 100 vs SF; $p > 0,05$ PRP 1 : 50 vs PM, $p < 0,05$ PRP 1: 100 vs PM, test di confronto multipli ANOVA e Newman-Keuls) e che le cellule BM-MSK in co-cultura non esprimevano i marker di differenziamento miogenico, indicando quindi che nelle nostre condizioni sperimentali queste cellule non erano in grado di differenziarsi verso un fenotipo mioblastico.

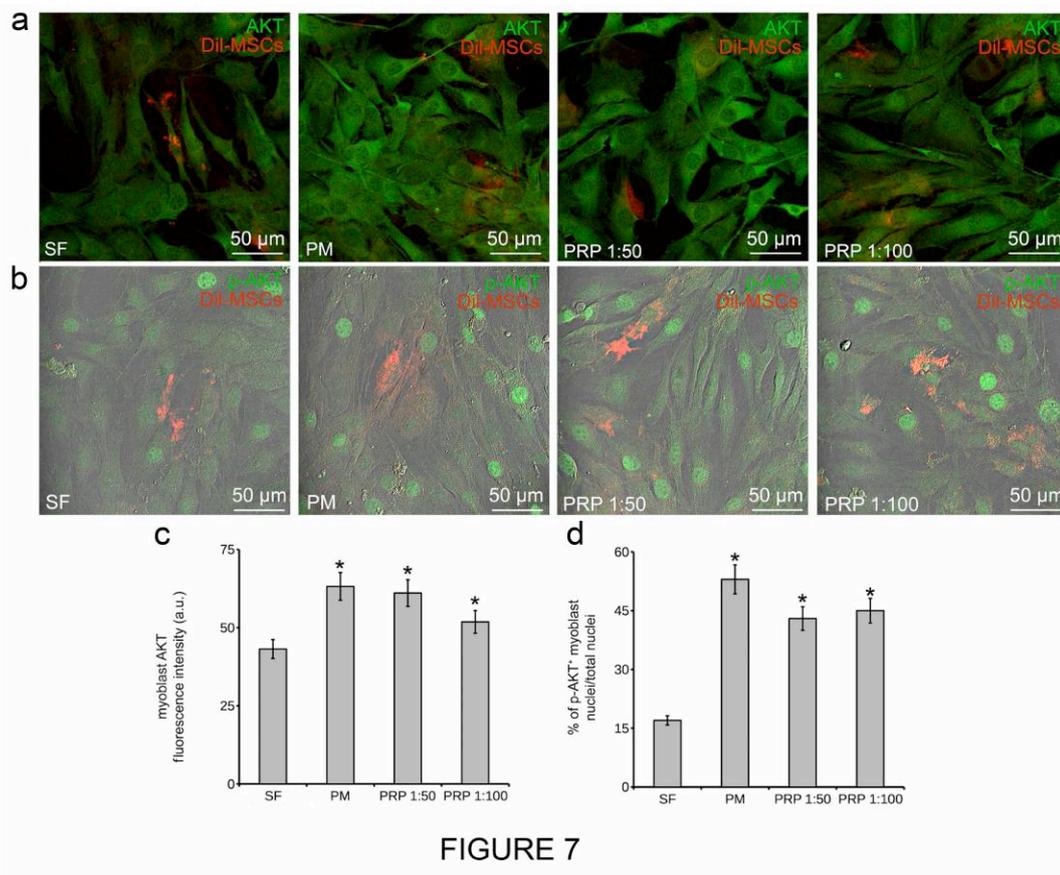


Figura 7. Effetti del trattamento combinato PRP/cellule BM-MSK sull' attivazione della via segnalazione mediata da AKT in mioblasti C2C12. Le cellule C2C12 e BM-MSK marcate con un colorante fluorescente rosso Dil (Dil-MSK) sono state co-coltivate in DMEM senza siero (SF) o addizionato con FBS 10% (PM) o con PRP (1:50 e 1: 100) per 24 h. a, b) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di cellule BM-MSK immunomarcate con anticorpo anti (a) AKT (verde), (b) e p-AKT (verde). In (b) le immagini di fluorescenza confocale sono sovrapposte a quelle DIC c) L'analisi densitometrica dell'intensità del segnale di fluorescenza relativo AKT eseguito su immagini digitalizzate è riportata nell'istogramma. d) Analisi quantitativa del numero di cellule C2C12 con nucleo positivo per p-AKT espresso come percentuale del numero totale di nuclei. I dati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività* $p < 0,05$ vs SF.

LA COMBINAZIONE PRP/BM-MSC STIMOLA L'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE SATELLITI

Al fine di estendere e ampliare ulteriormente le conoscenze sugli effetti delle cellule BM-MSC e PRP sulla proliferazione e sul differenziamento di cellule mioblastiche abbiamo valutato se i trattamenti fossero in grado di influenzare l'attivazione di cellule satelliti isolate da singole fibre muscolari. A tale scopo abbiamo coltivato le cellule in assenza o in presenza di Dil-MSC nel loro specifico PM o con PRP 1:50 e abbiamo poi analizzato l'espressione di Pax-7, marker miogenico e di autorinnovamento delle cellule satelliti, Ki67 marker di proliferazione e MyoD, espresso dalle cellule entrate nel programma di differenziamento miogenico (Tierney e Sacco 2016). Mediante analisi di immunofluorescenza confocale abbiamo osservato che in presenza di PRP il numero di cellule satelliti in monocultura esprimenti Pax-7 (Figura 8a, d), Ki67 (Figura 8b, e) e MyoD (Figura 8c, f) era più elevato rispetto a quello delle cellule coltivate in PM. Inoltre, il numero delle cellule positive per questi marker aumentava ulteriormente nelle co-culture e in particolare dopo trattamento con PRP. Questi dati suggeriscono quindi che l'uso combinato di cellule BM-MSC e PRP potrebbe indurre attivazione delle cellule satelliti.

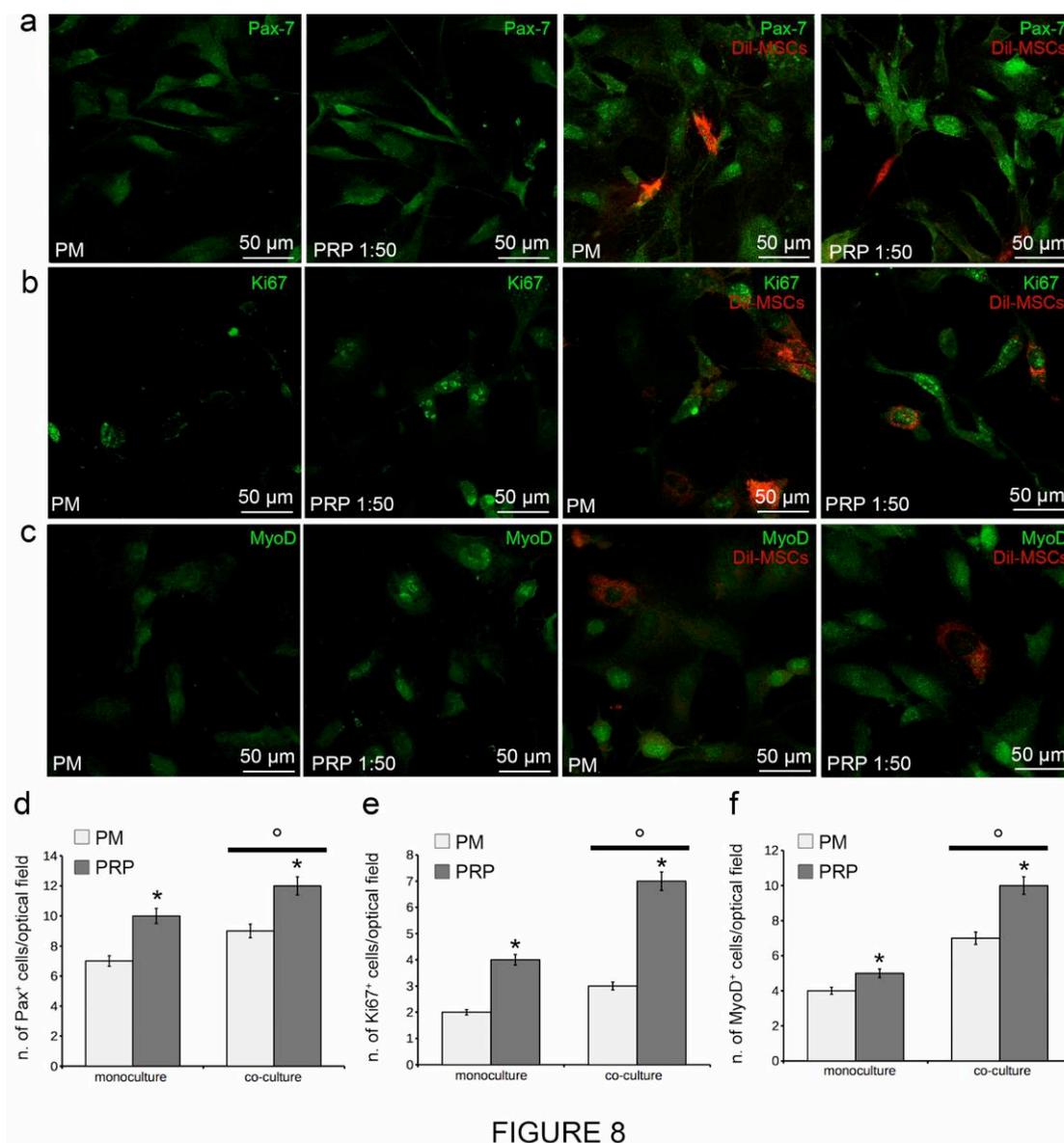


FIGURE 8

Figura 8. Effetti del trattamento combinato PRP/cellule BM-MSc sull'attivazione di cellule satelliti. Le cellule satelliti isolate dalla singola fibra muscolare scheletrica sono state coltivate in monocultura o in co-cultura con cellule BM-MSc marcate con colorante rosso fluorescente, Dil (Dil-MSc), nel loro mezzo di proliferazione (PM) o in DMEM addizionato con PRP 1:50. a-c) Immagini rappresentative di immunofluorescenza confocale di cellule satelliti immunomarcate con anticorpo anti (a) Pax-7 (verde), (b) Ki67 (verde) e (c) MyoD (verde). d-f) istogrammi che mostrano l'analisi quantitativa del numero di cellule d) Pax-7, (e) Ki67 e (f) MyoD positive valutate per campo microscopico ottico. I dati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti, eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come media \pm S.E.M. Significatività: * $p < 0,05$ vs PM; ° $p < 0,05$ contro la monocultura.

DISCUSSIONE

Nel presente studio, abbiamo dimostrato che *in vitro*, l'uso combinato di cellule BM-MSK e PRP è in grado di stimolare proliferazione e differenziamento di cellule mioblastiche della linea C2C12 e di promuovere l'attivazione di cellule satelliti. In particolare, il trattamento combinato PRP/BM-MSK risulta essere più efficace del solo trattamento con PRP. In quest'ottica, i risultati ottenuti sono in accordo con precedenti osservazioni del nostro gruppo di ricerca in cui si evidenziava l'abilità delle cellule BM-MSK di interagire con cellule staminali/progenitrici (Sassoli et al., 2011b; Sassoli et al., 2012a), ed estendono l'elenco degli effetti benefici delle cellule BM-MSK (Sassoli et al., 2012b; Bashir et al., 2014; Kobolak et al., 2016) e del PRP sul tessuto muscolare scheletrico (Dimauro et al., 2014; Guevara-Alvarez et al., 2014; Anitua et al., 2015; Li et al., 2016; McClure et al., 2016; Tsai et al., 2017). Numerose ricerche sembrano indicare che l'azione benefica delle BM-MSK nel recupero funzionale del muscolo scheletrico sia legata non tanto alla loro multipotenza e possibilità di transdifferenziare in cellule muscolari ma piuttosto alla loro capacità di secernere fattori paracrini che svolgono molteplici effetti sul microambiente tissutale tra cui: i) la modulazione dell'infiammazione e delle reazioni immunitarie; ii) la promozione dell'angiogenesi e della vasculogenesi; iii) il rimodellamento della matrice extracellulare e l'inibizione della fibrosi; iv) l'inibizione della risposta da stress e dell'apoptosi nonché la stimolazione dei meccanismi di riparazione endogena (Sassoli et al., 2012a; Nakamura et al., 2015; Konala et al. 2016).

In questo contesto, studi *in vitro* del nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che le cellule BM-MSK sono capaci di stimolare la proliferazione e differenziamento di cellule mioblastiche scheletriche e cellule satelliti attraverso il rilascio del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il lipide bioattivo sfingosina 1-fosfato (S1P) (Sassoli et al., 2012a; Sassoli et al., 2014a; Bei et al., 2015); esse sono inoltre in grado di regolare in cellule del tessuto muscolare scheletrico (mioblasti e fibroblasti) l'espressione e l'attività di enzimi coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare, le metalloproteasi MMP e i loro inibitori tissutali TIMP, il cui equilibrio dinamico svolge un ruolo preminente per la migrazione degli elementi cellulari coinvolti nei processi riparativi a livello del sito di lesione e per la modulazione della risposta fibrotica (Sassoli et al., 2014b). A supportare ulteriormente l'azione trofica di queste cellule, i dati del nostro studio mostrano inoltre come le cellule BM-MSK in co-coltura con

cellule C2C12 in presenza o meno del PRP non esprimono marker di differenziamento miogenico e non tendono a fondersi con i mioblasti differenzianti. In accordo con questa linea di pensiero, ci sono dati in letteratura che mostrano l'esistenza di una stretta relazione tra cellule satelliti e cellule stromali all'interno della nicchia del muscolo scheletrico e nell'ambiente immediatamente circostante e attribuiscono alle cellule stromali la funzione di supporto naturale per la proliferazione delle cellule staminali con cui interagiscono, contribuendo anche al loro reclutamento (Joe et al., 2010; Popescu et al., 2011; Bojin et al., 2011, Bentzinger et al., 2013; Judson et al., 2013; Bei et al., 2015). Si può dunque supporre che anche le cellule stromali residenti del tessuto muscolare potrebbero trarre vantaggio dal trattamento con PRP, incrementando i dati a favore di una azione benefica della terapia con PRP nelle patologie muscolari.

I fattori e i meccanismi molecolari tramite i quali il trattamento combinato PRP/BM- MSC esercita la propria azione sulle cellule mioblastiche rimangono ancora da chiarire pienamente. È possibile che esista un'interazione sinergica tra i fattori di crescita presenti nel PRP e quelli rilasciati dalle cellule BM- MSC. È, infatti, ben noto che il PRP è una fonte di VEGF (Hosny et al., 2015) e di biolipidi, tra cui S1P (Hoeflerlin et al., 2015; Nagura et al., 2016). In presenza di cellule BM- MSC i livelli di questi due fattori potrebbero aumentare e conseguentemente i loro effetti sulle cellule mioblastiche potrebbero a loro volta risultare amplificati. Inoltre, S1P potrebbe promuovere l'attività secretoria delle cellule BM- MSC. È stato, infatti, dimostrato che tali cellule esprimono i recettori per S1P e la capacità di tale lipide bioattivo di modulare diversi processi cellulari delle cellule BM- MSC è stata sperimentalmente dimostrata (Yang et al., 2012; Kong et al., 2014; Lu et al., 2015 Marycz et al., 2015). Come osservato in altri tipi di cellule, S1P potrebbe stimolare l'espressione e il rilascio di VEGF da parte delle cellule BM- MSC (Balthasar et al., 2008; Sun et al., 2010; Ryu et al., 2014; Chumanevich et al., 2016). D'altra parte, il VEGF potrebbe a sua volta regolare l'espressione del recettore 1 di S1P (S1P1) (Tanimoto et al., 2002; Igarashi et al., 2003; Fieber et al., 2006; Ryu et al., 2014), aumentare l'attivazione di AKT indotta da S1P (Tanimoto et al., 2002; Balthasar et al., 2008; Igarashi et al., 2003) e aumentare la concentrazione intracellulare di S1P promuovendo l'attivazione della sfingosina chinasi (SphK) (Balthasar et al., 2008). Inoltre, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che la via di segnalazione S1P/S1P1 è in grado di regolare l'espressione e il rilascio della MMP-2 da parte delle cellule BM- MSC (dati non pubblicati). Questi risultati potrebbero quindi proporre ulteriori meccanismi attraverso i quali il trattamento combinato PRP/BM- MSC

potrebbe esercitare il proprio effetto sui mioblasti. Questo è legato anche al fatto che è stata dimostrata l'esistenza di un'interazione tra MMP-2 e sindecano 4 (Manon-Jensen et al., 2013), proteoglicano transmembrana in grado di influenzare sopravvivenza, attivazione, proliferazione e differenziamento delle cellule satelliti (Tanaka et al., 2009; Rønning et al., 2015). Tuttavia, ulteriori studi sono indispensabili per verificare se il PRP sia in grado o meno di indurre cambiamenti nel secretoma delle BM-MSCs.

Inoltre, il PRP è noto contenere fattori di crescita (Amable et al., 2013; Nagura et al., 2016; Kobayashi et al., 2016) diversi da VEGF e S1P (Deasy et al., 2009; Sassoli et al., 2011a; Sassoli et al., 2012a; Sassoli et al., 2014a), in grado di promuovere la proliferazione dei mioblasti e la progressione di questi nel programma di differenziamento miogenico, tra cui il PDGF (Li et al., 2013), l'IGF-1 (Duan et al., 2009), l'HGF (Zhang et al., 2013; Walker et al., 2015) e il b-FGF (Cassano et al., 2011; McClure et al., 2016). Bisogna peraltro sottolineare che diversi studi mostrano che il PRP contiene il TGF- β 1, noto inibitore della miogenesi (van den Dolder et al., 2006; Sartori et al., 2014). Questo dato, potrebbe quindi giustificare l'inefficacia del PRP riportata in alcuni studi, nella riparazione e rigenerazione del tessuto muscolare (Moraes et al., 2014; Reurink et al., 2014; Mosca e Rodeo 2015; Guillodo et al., 2016; Navani et al., 2017) e la necessità di utilizzare molecole/farmaci in grado di inibire l'azione del TGF- β 1 (Terada et al., 2013; Kelc et al., 2015; Li et al., 2016). Tuttavia, in questo studio, abbiamo dimostrato che il PRP è in grado di promuovere il differenziamento di mioblasti. È possibile, infatti, che il protocollo di preparazione e la composizione del PRP possano presentare variabilità. Ad esempio, è stato dimostrato che il metodo scelto per la preparazione e per l'attivazione del PRP influenza sia la sua morfologia, il contenuto di fattori di crescita che la cinetica di rilascio (Li et al., 2013, Mosca e Rodeo 2015, Cavallo et al., 2016). È possibile inoltre, che nel nostro modello coltura di cellule mioblastiche, lo stesso PRP possa downregolare l'espressione di TGF- β , come è stato dimostrato in mioblasti della linea cellulare cd56 (Kelc et al. 2015). A tal proposito, sono attualmente in corso nel nostro laboratorio esperimenti mirati a quantificare i fattori di crescita e citochine nel PRP utilizzato e a valutare gli effetti di singoli fattori sui mioblasti utilizzando specifici anticorpi neutralizzanti o antagonisti recettoriali. D'altra parte, non si può escludere che nella combinazione PRP/BM-MSCs, alcuni fattori di crescita rilasciati dalle cellule BM-MSCs possano di per sé antagonizzare la via di segnalazione mediata dal TGF- β . In linea con questo, è stato osservato che esiste un antagonismo tra la via di segnalazione mediata dal fattore FGF, un componente del

secretoma delle BM-MSC (Sassoli et al., 2012a) e la via di segnalazione del TGF- β (Chen et al., 2016), come anche, è possibile ipotizzare un *cross talk* tra TGF- β e VEGF in tipi cellulari diversi (Ferrari et al., 2006; Krishnan et al., 2015). La terapia combinata con PRP e cellule BM-MSC come fonte di numerosi fattori di crescita che interagiscono tra loro e che agiscono su più vie di segnalazione, potrebbe rappresentare uno strumento terapeutico innovativo e promettente rispetto all'utilizzo dei singoli fattori di crescita ricombinanti che agiscono su un'unica via di segnalazione.

I risultati di questo studio, che dimostrano capacità del PRP di promuovere sopravvivenza e proliferazione di cellule BM-MSC appaiono particolarmente promettenti: è, infatti, una delle principali sfide per l'applicazione clinica di BM-MSC, quella di poter amplificare in modo efficace *in vitro* queste cellule evitando l'uso di sieri animali e quindi il rischio di contaminazione con patogeni e proteine esogene, così come quella di incrementare la loro scarsa sopravvivenza dopo il trapianto nel tessuto ospite a seguito di apoptosi o senescenza. In questo contesto, il trattamento con PRP potrebbe offrire due vantaggi: potrebbe rappresentare un buon sostituto del siero animale per l'espansione *in vitro* di cellule BM-MSC, in accordo con precedenti osservazioni del nostro e di altri gruppi di ricerca (Formigli et al., 2012; Amable et al., 2014; Rubio-Azpeitia e Andia 2014; Formigli et al., 2015) e, allo stesso tempo, potrebbe mantenere e stimolare la funzionalità delle cellule BM-MSC una volta trapiantate nel tessuto muscolare danneggiato. Infine, il PRP è stato anche proposto quale veicolo in forma di gel per *cell-delivery* in corso di trapianto (Kasten et al., 2006; Niemeyer et al., 2010; Jalowiec et al., 2016).

Occorre in ogni caso sottolineare che l'applicazione clinica della combinazione PRP/BM-MSC sia da considerare con cautela e siano necessari studi a lungo termine per chiarire meglio gli effetti collaterali e per convalidare la sicurezza delle BM-MSC per la rigenerazione dei tessuti. Un altro punto di cui tenere conto per il passaggio alla fase clinica, risiede nel fatto che, in uno studio *in vitro*, vengono comunque a mancare i meccanismi responsabili di protezione cellulare o quelli che regolano le interazioni cellulari, normalmente presenti al livello tissutale.

Si deve anche tenere conto, in questo contesto, una delle limitazioni del PRP è rappresentata dalla sua eterogeneità, dovuta principalmente alle diverse procedure di preparazione e quindi alla mancanza di protocolli standardizzati. Risulta quindi evidente la necessità di ulteriori studi volti a determinarne, per l'ottimizzazione dei risultati, la

dose e i tempi di somministrazione, nonché le peculiarità di utilizzo per i diversi tessuti o organi.

CONCLUSIONE

In conclusione i nostri dati indicano che il PRP *in vitro* è in grado di favorire vitalità, sopravvivenza e proliferazione delle cellule BM-MSC e di promuovere proliferazione e differenziamento di cellule mioblastiche, in particolar modo quando utilizzato in combinazione con cellule BM-MSC, sostanziando quindi il suo potenziale nella rigenerazione muscolare scheletrica e nella promozione della funzionalità delle BM-MSC. Questi dati potrebbero rappresentare una prima tappa nella progettazione di protocolli terapeutici innovativi mirati a promuovere le capacità endogene di riparazione/ rigenerazione in ambito di medicina rigenerativa muscolare.

BIBLIOGRAFIA

Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4:67.

Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PLoS One.* 2014; 9:e104662.

Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell.* 2000; 11:859-1874.

Anderson JE. Hepatocyte Growth Factor and Satellite Cell Activation. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 900:1-25.

Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005; 23:281-286.

Anitua E, Pelacho B, Prado R, Aguirre JJ, Sánchez M, Padilla S, Aranguren XL, Abizanda G, Collantes M, Hernandez M, Perez-Ruiz A, Peñuelas I, Orive G, Prosper F. Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *J Control Release.* 2015; 202:31-39.

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007; 28(31):4551-4560.

Arien-Zakay H, Lecht S, Nagler A, Lazarovici P. Human umbilical cord blood stem cells: rational for use as a neuroprotectant in ischemic brain disease. *Int J Mol Sci.* 2010; 11:3513-3528.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007; 204:1057-1069.

Balthasar S, Bergelin N, Löf C, Vainio M, Andersson S, Törnquist K. Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor signalling in ML-1 follicular thyroid carcinoma cells. *Endocr Relat Cancer.* 2008; 15:521-534.

Bashir J, Sherman A, Lee H, Kaplan L, Hare JM. Mesenchymal stem cell therapies in the treatment of musculoskeletal diseases. *PM R.* 2014; 6(1):61-69.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol.* 2000; 151:1221-1234.

Bei Y, Wang F, Yang C, Xiao J. Telocytes in regenerative medicine. *J Cell Mol Med.* 2015; 201519:1441-1454.

Beier JP1, Bitto FF, Lange C, Klumpp D, Arkudas A, Bleiziffer O, Boos AM, Horch RE, Kneser U. Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with primary myoblasts. *Cell Biol Int.* 2011; 35(4):397-406.

Bentzinger CF, Wang YX, Von Maltzahn J, Rudnicki MA. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapy. *Bioessays.* 2013; 35(3):231-241

Bernuzzi G, Petraglia F, Pedrini MF, De Filippo M, Pogliacomi F, Verdano MA, Costantino C. Use of platelet-rich plasma in the care of sports injuries: our experience with ultrasound-guided injection. *Blood Transfus.* 2014; 12(1):229-234.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001; 105:829-841.

Bojin FM, Gavriiliuc O, Cristea M, Tanasie G, Tatu CS, Panaitescu C, Paunescu V. Telocytes within human skeletal muscle stem cell niche. *J Cell Mol Med.* 2011; 15:2269-2272.

Boni A, Urbanek K, Nascimbene A, Hosoda T, Zheng H, Delucchi F, Amano K, Gonzalez A, Vitale S, Ojaimi C, Rizzi R, Bolli R, Yutzey KE, Rota M, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:15529-534.

Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci;* 2009; 66:1631-1646.

Borzini P, Mazzucco L, Giampaolo A, Hassan HJ. Platelet gel-the Italian way: a call for procedure standardization and quality control. *Transfus Med.* 2006; 16:303-304.

Brack AS, Conboy IM, Conboy MJ, Shen J, Rando TA. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell.* 2008; 2:50-59.

Buas MF, Kadesch T. Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Exp Cell Res.* 2010; 316(18):3028-3033.

Bubnov R, Yevseenko V, Semeniv I. Ultrasound guided injections of platelets rich in plasma for muscle injury in professional athletes: comparative study. *Med Ultrasound.* 2013; 15(2):101-105.

Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2006; 16:525-532.

Butterfield TA, Best TM, Merrick MA. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J Athl Train.* 2006; 41:457-465.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2011; 10:35-42.

Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of Platelet Rich Plasma Gel on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eplasty.* 2011; 11:e38.

Cashman TJ, Gouon-Evans V, Costa KD. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Therapy: Practical Challenges and Potential Mechanisms. *Stem Cell Rev.* 2013; 9(3):254-265.

Cassano M, Dellavalle A, Tedesco FS, Quattrocchi M, Crippa S, Ronzoni F, Salvade A, Berardi E, Torrente Y, Cossu G, Sampaolesi M. Alpha sarcoglycan is required for FGF-dependent myogenic progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Development.* 2011; 138:4523-4533.

Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G. (2016) Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:6591717.

Cave JW. Selective repression of Notch pathway target gene transcription. *Dev Biol.* 2011; 360:123-131.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25:2739-2749.

Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* 2003, 5: 1028-1038.

Chargè SB and Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84:209-238.

Chen BY, Wang X, Chen LW, Luo ZJ. Molecular Targeting Regulation of Proliferation and Differentiation of the Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells or Mesenchymal Stromal Cells. *Curr Drug Targets.* 2012; 13:561-571.

Chen J, Crawford R, Chen C, Xiao Y. The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013; 19:516-528.

Chen PY, Qin L, Li G, Tellides G, Simons M. Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGF β)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation. *Sci Rep.* 2016; 6:33407.

Chen X, Li Y. Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle: migration, differentiation, regeneration and fibrosis. *Cell Adh Migr.* 2009; 3:337-341.

Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res.* 2010; 106:971-980.

Chumanevich A, Wedman P, Oskeritzian CA. Sphingosine-1-Phosphate/Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Axis Can Promote Mouse and Human Primary Mast Cell Angiogenic Potential through Upregulation of Vascular Endothelial

Growth Factor-A and Matrix Metalloproteinase-2. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016:1503206.

Collins-Hooper H, Woolley TE, Dyson L, Patel A, Potter P, Baker RE, Gaffney EA, Maini PK, Dash PR, Patel K. Age-related changes in speed and mechanism of adult skeletal muscle stem cell migration. *Stem Cells.* 2012; 30:1182-1195.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science.* 2003; 302:1575-1577.

Corbu A, Scaramozza A, Badiali-DeGiorgi L, Tarantino L, Papa V, Rinaldi R, D'Alessandro R, Zavatta M, Laus M, Lattanzi G, Cenacchi G. Satellite cell characterization from aging human muscle. *Neurol Res.* 2010; 32:63-72.

Cornelison DD and Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol.* 1997; 191(2):270-283.

Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol.* 2001; 239(1):79-94.

Cossu, Sampaolesi. New therapies for muscular dystrophy: Cautious optimism. *Trends Mol Med.* 2004; 10:516-520.

Costamagna D, Berardi E, Ceccarelli G, Sampaolesi M. Adult Stem Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Curr Gene Ther.* 2015; 15:348-363.

Covault J and Sanes JR. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1986; 102:716-730.

Darmani H, Crossan J, McLellan SD, Meek D, Adam C. Expression of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta in crush-injured tendon and synovium. *Mediators Inflamm.* 2004; 13:299-305.

De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells.* 2016; 8:73-87.

de la Garza-Rodea AS, van der Velde I, Boersma H, Gonçalves MA, van Bekkum DW, de Vries AA, Knaän-Shanzer S. Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice. *Cell Transplant.* 2011; 20:217-231.

De Strooper B, Annaert W. Where Notch and Wnt signaling meet. The presenilin hub. *J Cell Biol.* 2001; 152: F17-20.

Deasy BM, Feduska JM, Payne TR, Li Y, Ambrosio F, Huard J. Effect of VEGF on the regenerative capacity of muscle stem cells in dystrophic skeletal muscle. *Mol Ther.* 2009; 17:1788-1798.

Delaney K, Kasprzycka P, Ciemerych MA, Zimowska M. The role of TGF- β 1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int.* 2017;41(7):706-715.

Deponti D, Buono R, Catanzaro G, De Palma C, Longhi R, Meneveri R, Bresolin N, Bassi MT, Cossu G, Clementi E, Brunelli S. The low-affinity receptor for

neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA. *Mol Biol Cell*. 2009; 20:3620–3627.

Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, Ide C, Nabeshima Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*. 2005; 309:314-317.

Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, Geuna S, Di Gianfrancesco A, Caporossi D, Pigozzi F, Borrione P. Platelet-rich plasma and skeletal muscle healing: a molecular analysis of the early phases of the regeneration process in an experimental animal model. *PLoS One*. 2014; 9:e102993.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D.J, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315-317.

Doyle MJ, Zhou S, Tanaka KK, Pisconti A, Farina NH, Sorrentino BP, Olwin BB. Abcg2 labels multiple cell types in skeletal muscle and participates in muscle regeneration. *J Cell Biol*. 2011; 195:147–163.

Duan C, Ren H, Gao S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol*. 2010; 167:344-351.

Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development* 2015; 142:1572-1581.

El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, Yacoub MH. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71:1724-1733.

Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overdevest EP, Box HA, van Zundert A. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006; 38:174-187.

Faussone-Pellegrini MS, Popescu LM. Telocytes. *BioMol Concepts*. 2011; 2:481-489.

Feng SW, Lu XL, Liu ZS, Zhang YN, Liu TY, Li JL, Yu MJ, Zeng Y, Zhang C. Dynamic distribution of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and change of pathology after infusing into mdx mice. *Cytotherapy*. 2008; 10:254-264.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279:1528-1530.

Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:17260-17265.

Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, Henriquet F, Venere G, Spagnolo S, Grasso MA, Panzani I. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich

plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987; 10(1):47-50.

Fieber CB, Eldridge J, Taha TA, Obeid LM, Muise-Helmericks RC. Modulation of total Akt kinase by increased expression of a single isoform: requirement of the sphingosine-1-phosphate receptor, Edg3/S1P3, for the VEGF-dependent expression of Akt3 in primary endothelial cells. *Experimental Cell Research*. 2006; 312:1164-1173.

Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*. 2009; 21:157-163.

Formigli L, Benvenuti S, Mercatelli R, Quercioli F, Tani A, Mirabella C, Dama A, Saccardi R, Mazzanti B, Cellai I, Zecchi-Orlandini S. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012; 6(2):125-134.

Formigli L, Paternostro F, Tani A, Mirabella C, Quattrini Li A, Nosi D, D'Asta F, Saccardi R, Mazzanti B, Lo Russo G, Zecchi-Orlandini S. MSCs seeded on bioengineered scaffolds improve skin wound healing in rats. *Wound Repair Regen*. 2015; 23:115-12.3

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6:230-247.

Frykberg RG, Driver VR, Carman D, Lucero B, Borris-Hale C, Fylling CP, Rappell LM, Clausen PA. Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: a prospective case series. *Ostomy Wound Manage*. 2010; 56:36-44.

Fuchs E., Tumber T., Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116: 769-778.

Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R, Williams RS. Persistent expression of MNF identifies myogenic stem cells in postnatal muscles. *Dev Biol*; 1997; 188:280-294.

Geisler F and Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology*. 2015; 61(1): 382-392.

Gentile P, De Angelis B, Agovino A, Orlandi F, Migner A, Di Pasquali C, Cervelli V. Use of Platelet Rich Plasma and Hyaluronic Acid in the Treatment of Complications of Achilles Tendon Reconstruction. *World J Plast Surg*. 2016; 5(2):124-132.

Gentile P, Di Pasquali C, Bocchini I, Floris M, Eleonora T, Fiaschetti V, Floris R, Cervelli V. Breast reconstruction with autologous fat graft mixed with platelet-rich plasma. *Surg Innov*. 2013; 20(4):370-376.

Gentile P, Garcovich S, Bielli A, Scioli MG, Orlandi A, Cervelli V. The Effect of Platelet-Rich Plasma in Hair Regrowth: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4(11):1317-1323.

Gering M, Patient R. Notch signalling and haematopoietic stem cell formation during embryogenesis. *J Cell Physiol*; 2010, 222:11-16.

Germani A, Di Carlo A, Mangoni A, Straino S, Giacinti C, Turrini P, Biglioli P, Capogrossi MC. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am J Pathol*. 2003; 163:1417-1428.

Giannelli M, Chellini F, Sassoli C, Francini F, Pini A, Squecco R, Nosi D, Bani D, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: Effects and mechanisms of action. *J. Cell. Physiol*. 2013; 228(1):172-181.

Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA, Greco F, Mattioli-Belmonte M. Platelet rich fibrin matrix effects on skeletal muscle lesions: an experimental study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012; 26(3):475-484.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau V. Paracrine mechanism in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circ Res*. 2008; 103:1204-1219

Goldring K, Partridge T, Watt D. Muscle stem cells. *J Pathol*. 2002; 197:457-67.

Gonçalves MA, de Vries AA, Holkers M, van de Watering MJ, van der Velde I, van Nierop GP, Valerio D, Knaän-Shanzer S. Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement Duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion. *Hum Mol Genet*. 2006; 15:213-221.

Grassel S, Ahmed N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci*. 2007; 12:4946-4956.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17:212-219.

Guevara-Alvarez A, Schmitt A, Russell RP, Imhoff AB, Buchmann S. Growth factor delivery vehicles for tendon injuries: Mesenchymal stem cells and Platelet Rich Plasma. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014; 4:378-385.

Guillodo Y, Madouas G, Simon T, Le Dauphin H, Saraux A. Platelet-rich plasma (PRP) treatment of sports-related severe acute hamstring injuries. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2016; 5:284-288.

Haack-Sørensen M, Hansen SK, Hansen L, Gaster M, Hyttel P, Ekblond A, Kastrup J. Mesenchymal stromal cell phenotype is not influenced by confluence during culture expansion. *Stem Cell Rev*. 2013; 9(1):44-58.

Hamilton B, Knez W, Erale C, Chalabi H. Platelet enriched plasma for acute muscle injury. *Am J Sports Med*. 2010; 37(9):1135-1142.

Hammond JW, Hinton RY, Ann Curl L, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Ann Acad Med Singap*. 2009; 38(8):733-734.

Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:139-150.

Harel I, Nathan E, Tirosh-Finkel L, Zigdon H, Guimarães-Camboa N, Evans SM, Tzahor E . Distinct origins and genetic programs of head muscle satellite cells. *Dev Cell.* 2009; 16:822–832.

Hoeflerlin LA, Huynh QK, Mietla JA, Sell SA, Tucker J, Chalfant CE, Wijesinghe DS. The Lipid Portion of Activated Platelet-Rich Plasma Significantly Contributes to Its Wound Healing Properties. *Advance Wound Care (New Rochelle).* 2015; 4:100-109.

Hosny N, Goubran F, BadrEldin Hasan B, Kamel N. Assessment of Vascular Endothelial Growth Factor in Fresh versus Frozen Platelet Rich Plasma. *J Blood Transfus.* 2015; 2015:706903.

Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:10664-10669.

Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, Verrier S, Herrmann M. An in vitro investigation of platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery vehicle for tissue engineering. *Tissue Eng Part C: Methods.* 2016; 22:49-58.

Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005; 33:745-764.

Jesse TL, LaChance R, Iademarco MF, Dean DC. Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol.* 1998; 140:1265-1276.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells.* 2004; 22:415-427.

Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 2010; 12:153-163.

Judson RN, Zhang RH, Rossi FM. Tissue-resident mesenchymal stem/progenitor cells in skeletal muscle: collaborators or saboteurs? *FEBS J.* 2013; 280:4100-4108.

Kaneko S, Feldman RI, Yu L, Wu Z, Gritsko T, Shelley SA, Nicosia SV, Nobori T, Cheng JQ. Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter. *J Biol Chem.* 2016; 291:22850.

Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, Kramer M, Leo A, Richter W. Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. *Cells Tissues Organs.* 2006; 183:68-79.

Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF- β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One*. 2015; 10:e0117302.

Kherif S, Lafuma C, Dehaupas M, Lachkar S, Fournier JG, Verdiere-Sahuque M, Fardeau M, Alameddine HS. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol*. 1999; 205:158-170.

Kim CH, Neiswender H, Baik EJ, Xiong WC, Mei L. Beta-catenin interacts with MyoD and regulates its transcription activity. *Mol Cell Biol*. 2008; 28:2941-2951.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109:1543-1549.

Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, Takaku T, Komatsu N, Kaneko K. (2016) Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci*. 21:683-689.

Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. 2016; 99:62-68.

Kong Y, Wang H, Lin T, Wang S. Sphingosine-1-phosphate/S1P receptors signaling modulates cell migration in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:565369.

Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 2001; 98:2900-2908.

Krishnan S, Szabo E, Burghardt I, Frei K, Tabatabai G, Weller M. Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF- β in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2015; 6:22480-22495.

Kuang S, Kuroda K, Le Grand, Rudnicki MA. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 2007; 129:999-1010.

Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med*. 2008; 14:82-91.

LaPar DJ, Kron IL, Yang Z. Stem cell therapy for ischemic heart disease: where are we? *Curr Opin Organ Transplant*. 2009; 14:79-84

Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 383-396.

Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scime A, Rudnicki MA. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 4:535-547.

Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, Hogan MV, Huard J. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor β 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials*. 2016; 87:147-156.

Li H, Usas A, Poddar M, Chen CW, Thompson S, Ahani B, Cummins J, Lavasani M, Huard J. Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One*. 2013; 8:e64923.

Li Q, Bai Y, Xu Y, Yu H. Autografting satellite cells to repair damaged muscle induced by repeated compression: an animal model. *Foot Ankle Int*. 2010a; 31:706-711.

Li Y, Zhang D, Zhang Y, He G, Zhang F. Augmentation of neovascularization in murine hindlimb ischemia by combined therapy with simvastatin and bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation. *J Biomed Sci*. 2010b; 17:75.

Li Z, Liu HY, Lei QF, Zhang C, Li SN. Improved motor function in dko mice by intravenous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2011; 13:69-77.

Liu LY, Hou YS, Chai JK, Hu Q, Duan HJ, Yu YH, Yin HN, Hao DF, Feng G, Li T, Du JD. Basic fibroblast growth factor/vascular endothelial growth factor in the serum from severe burn patients stimulates the proliferation of cultured human umbilical cord mesenchymal stem cells via activation of Notch signaling pathways. *J Trauma Acute Care Surg*. 2013; 75:789-797.

Lluri G, Jaworski DM. Regulation of TIMP-2, MT1-MMP, and MMP-2 expression during C2C12 differentiation. *Muscle Nerve*. 2005; 32:492-499.

Loo WL, Lee DY, Soon MY. Plasma rich in growth factors to treat adductor longus tear. *Acta Orthop Belg*. 2010; 76(4):443-448.

Lu W, Xiu X, Zhao Y, Gui M. Improved Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Into Vascular Endothelial Cells With Sphingosine 1-Phosphate. *Transplant Proc*. 2015; 47:2035-2040.

Mackey AL, Kjaer M, Charifi N, Henriksson J, Bojsen-Moller J, Holm L, Kadi F. Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies. *Muscle Nerve*. 2009; 40: 455-465.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999; 103:697-705.

Manon-Jensen T, Multhaupt HA, Couchman JR. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J*. 2013; 280:2320-2331.

Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4):489-496.

Marycz K, Śmieszek A, Jeleń M, Chrzastek K, Grzesiak J, Meissner J. The effect of the bioactive sphingolipids S1P and C1P on multipotent stromal cells - new opportunities in regenerative medicine. *Cell Mol Biol Lett.* 2015; 20:510-533.

Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng.* 2006; 12:361-367.

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9:493-495.

McClure MJ, Garg K, Simpson DG, Ryan JJ, Sell SA, Bowlin GL, Ericksen JJ. The influence of platelet-rich plasma on myogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016; 10(4):E239-49.

Menasche P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; 50:7-17.

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010; 466:829-834.

Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006; 34(11):1774-1778.

Miyazaki D, Nakamura A, Fukushima K, Yoshida K, Takeda S, Ikeda S. Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient mdx muscles reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers. *Hum Mol Genet.* 2011; 20:1787-1799.

Miyazono K, Takaku F. Platelet-derived growth factors. *Blood Rev.* 1989; 3:269-276.

Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumanò A, Partridge T, Buckingham M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science.* 2005; 309:2064-2067.

Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; doi: 10.1002/14651858.CD010071.pub3

Mosca MJ, Rodeo SA. Platelet-rich plasma for muscle injuries: game over or time out? *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2015; 8:145-153.

Moss FP, Leblond CP. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol.* 1970; 44:459-462.

Mousavi K, Jasmin BJ. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci.* 2006; 26:5739-5749.

Nagura Y, Tsuno NH, Kano K, Inoue A, Aoki J, Hirowatari Y, Kaneko M, Kurano M, Matsubashi M, Ohkawa R, Tozuka M, Yatomi Y, Okazaki H. Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction. *Transfus Med.* 2016; 26:365-372.

Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng.* 2004; 10:1093-1112.

Navani A, Li G, Chrystal J. Platelet Rich Plasma in Musculoskeletal Pathology: A Necessary Rescue or a Lost Cause? *Pain Physician.* 2017; 20:E345-356.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* 2004; 303:1483-1487.

Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2010; 31:3572-3579.

Nishimura T, Nakamura K, Kishioka Y, Kato-Mori Y, Wakamatsu J, Hattori A. Inhibition of matrix metalloproteinases suppresses the migration of skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2008; 29:37-44.

Oh J, Takahashi R, Adachi E, Kondo S, Kuratomi S, Noma A, Alexander DB, Motoda H, Okada A, Seiki M, Itoh T, Itohara S, Takahashi C, Noda M. Mutations in two matrix metalloproteinase genes, MMP-2 and MT1-MMP, are synthetic lethal in mice. *Oncogene.* 2004; 23:5041-5048.

Ohtake Y, Tojo H, Seiki M. Multifunctional roles of MT1-MMP in myofiber formation and morphostatic maintenance of skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2006; 119:3822-3832.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004; 22:377-384.

Otto A, Schmidt C, Luke G, Allen S, Valasek P, Muntoni F, Lawrence-Watt D, Patel K. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J Cell Sci.* 2008; 121:2939-2950.

Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature.* 1989; 337:176-179.

Pawlikowski B, Vogler TO, Gadek K, Olwin BB. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Dev Dyn.* 2017; 246(5):359-367.

Perez-Ruiz A, Ono Y, Gnocchi VF, Zammit PS. beta-Catenin promotes self-renewal of skeletal-muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 2008; 121:1373-1382.

Peters R, Wolf MJ, van den Broek M, Nuvolone M, Dannenmann S, Stieger B, Rapold R, Konrad D, Rubin A, Bertino JR, Aguzzi A, Heikenwalder M, Knuth AK. Efficient generation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood in stroma-free liquid culture. *PLoS One*; 5(12):e15689. doi:10.1371/journal.pone.0015689.

Popescu LM, Manole E, Serboiu CS, Manole CG, Suciuc LC, Gherghiceanu M, Popescu BO. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(6):1379-1392.

Quattrocchi M, Cassano M, Crippa S, Perini I, Sampaolesi M. Cell therapy strategies and improvements for muscular dystrophy. *Cell Death Differ*. 2010; 17:1222-1229.

Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrkowski Z, Peiper S, Janowska-Wieczorek A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*. 2003; 21:363-371.

Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JA, Bierma-Zeinstra SM, Maas M, Tol JL; Dutch Hamstring Injection Therapy (HIT) Study Investigators. Platelet rich plasma injections in muscle injury. *N Engl J Med*. 2014; 370(26):2546-2547.

Reznik M. Thymidine-³H uptake by satellite cells of regenerating skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1969; 40:568-571.

Richardson JD, Nelson AJ, Zannettino AC, Gronthos S, Worthley SG, Psaltis PJ. Optimization of the Cardiovascular Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells-Taking the Next Step. *Stem Cell Rev*. 2013; 9(3):281-302.

Ro‘man P, Bolta Z. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries. *Acta Dermatoven APA*. 2007; 16:156-165.

Rønning SB, Carlson CR, Stang E, Kolset SO, Hollung K, Pedersen ME. Syndecan-4 Regulates Muscle Differentiation and Is Internalized from the Plasma Membrane during Myogenesis. *PLoS One*. 2015; 10:e0129288.

Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974; 71:1207-1210.

Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci*. 2000; 20:2589-2601.

Rubinstein I, Z. Abassi, R. Coleman, F. Milman, J. Winaver, O.S. Better, Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin. Invest*. 1998; 101:1325-1333.

Rubio-Azpeitia E, Andia I. Partnership between platelet-rich plasma and mesenchymal stem cells: in vitro experience. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014; 4:52-62.

Ryu JM, Baek YB, Shin MS, Park JH, Park SH, Lee JH, Han HJ. Sphingosine-1-phosphate-induced Flk-1 transactivation stimulates mouse embryonic stem cell proliferation through S1P1/S1P3-dependent β -arrestin/c-Src pathways. *Stem Cell Res.* 2014; 12:69-85.

Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010; 28:585-596.

Sammels LM, Bosio E, Fragall CT, Grounds MD, van Rooijen N, Beilharz MW. Innate inflammatory cells are not responsible for early death of donor myoblasts after myoblast transfer therapy. *Transplantation.* 2004; 77:1790-1797.

Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendonears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007, 35:245-251.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000; 16: 247-256.

Sartori R, Gregorevic P, Sandri M. TGF β and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25:464-471.

Sassoli C, Formigli L, Bini F, Tani A, Squecco R, Battistini C, Zecchi Orlandini S, Francini F; Meacci E. Effects of S1P on skeletal muscle repair/regeneration during eccentric contraction. *J Cell Mol Med.* 2011a; 15:2498-2511.

Sassoli C, Frati A, Tani A, Anderloni G, Pierucci F, Matteini F, Chellini F, Zecchi Orlandini S, Formigli L, Meacci E. Mesenchymal stromal cell secreted sphingosine 1-phosphate (S1P) exerts a stimulatory effect on skeletal myoblast proliferation. *PLoS One.* 2014a; 9:e108662

Sassoli C, Nosi D, Tani A, Chellini F, Mazzanti B, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells. *Exp Cell Res.* 2014b; 323: 297-313.

Sassoli C, Pini A, Chellini F, Mazzanti B, Nistri S, Nosi D, Saccardi R, Quercioli F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PloS One.* 2012a; 7:e37512.

Sassoli C, Pini A, Mazzanti B, Quercioli F, Nistri S, Saccardi R, Zecchi-Orlandini S, Bani D, Formigli L. Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: clues for cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 2011b; 51:399-408.

Sassoli C, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Trophic actions of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for muscle repair/regeneration. *Cells*. 2012b; 1:832-850.

Schiaffino S, Pereira MG, Ciciliot S, Rovere-Querini P. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. *FEBS J*. 2017; 284(4):517-524.

Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; 109:1291-1302.

Sell SA, Ericksen JJ, Reis TW, Droste LR, Bhuiyan MB, Gater DR. A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers. *J Spinal Cord Med*. 2011; 34:122-127.

Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Canoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2008; 7:33-44.

Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006; 20(13):1692-1708.

Sincennes MC, Brun CE, Rudnicki MA. Concise Review: Epigenetic Regulation of Myogenesis in Health and Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5(3):282-290.

Skuk D, Goulet M, Roy B, Piette V, Cote CH, Chapdelaine P, Hogrel JY, Paradis M, Bouchard JP, Sylvain M, Lachance JG, Tremblay JP. First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscul.Disord*. 2007; 17:38-46.

Snow MH. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II An autoradiographic study. *Anat Rec*. 1977; 188: 201-217.

Soleimani VD, Punch VG, Kawabe Y, Jones AE, Palidwor GA, Porter CJ, Cross JW, Carvajal JJ, Kockx CE, van IJcken WF, Perkins TJ, Rigby PW, Grosveld F, Rudnicki MA. Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Dev Cell*. 2012; 22(6):1208-1220.

Suchánková Kleplová T, Soukup T, Řeháček V, Suchánek J. Human plasma and human platelet-rich plasma as a substitute for fetal calf serum during long-term cultivation of mesenchymal dental pulp stem cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2014; 57(3):119-126.

Sun HY, Wei SP, Xu RC, Xu PX, Zhang WC. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 395:361-366.

Takahashi A, Kureishi Y, Yang J, Luo Z, Guo K, Mukhopadhyay D, Ivashchenko Y, Branellec D, Walsh K. Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 4803-4814.

Tanaka KK, Hall JK, Troy AA, Cornelison DD, Majka SM, Olwin BB. Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:217-225.

Tanimoto T, Jin ZG, Berk BC. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem.* 2002; 277:42997-43001.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol.* 1998; 194:114-128.

Tatsumi R, Sankoda Y, Anderson JE, Sato Y, Mizunoya W, Shimizu N, Suzuki T, Yamada M, Rhoads RP, Jr, Ikeuchi Y, Allen RE. Possible implication of satellite cells in regenerative motoneuritogenesis: HGF upregulates neural chemorepellent Sema3A during myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297:C238-C252.

Tedesco FS, Dellavalle A, Diaz-Manera J, Messina G, Cossu G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J Clin Invest.* 2010; 120:11-19.

Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 2010; 224:7-16.

Terada S, Ota S, Kobayashi M, Kobayashi T, Mifune Y, Takayama K, Witt M, Vadalà G, Oyster N, Otsuka T, Fu FH, Huard J. Use of an antifibrotic agent improves the effect of platelet-rich plasma on muscle healing after injury. *J Bone Joint Surg.* 2013; 95:980-988.

Thomas K, Engler AJ, Meyer GA. Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connect Tissue Res.* 2015; 56:1-8

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr. Comp Physiol.* 2005; 288:R345-R353.

Tierney MT, Sacco A. Satellite Cell Heterogeneity in Skeletal Muscle Homeostasis. *Trends Cell Biol.* 2016; 26(6):434-44.

Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol.* 2008; 52:1023-1032.

Tsai WC, Yu TY, Lin LP, Lin MS, Tsai TT, Pang J. Platelet rich plasma promotes skeletal muscle cell migration in association with up-regulation of FAK, paxillin, and F-Actin formation. *J Orthop Res.* 2017; doi: 10.1002/jor.23547

Turner NJ and Badyak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 2012; 347:759-74.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36:2566-2573.

Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(24):9226-31.

van den Dolder J, Mooren R, Vloon AP, Stoeltinga PJ, Jansen JA. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng.* 2006; 12:3067-3073.

Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop.* 2006; 77:806-812.

von Bahr L, Sundberg B, Lönnies L, Sander B, Karbach H, Hägglund H, Ljungman P, Gustafsson B, Karlsson H, Le Blanc K, Ringdén O. Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18:557-564.

von Roth P, Duda GN, Radojewski P, Preininger B, Perka C, Winkler T. Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improve muscular regeneration in both male and female rats. *Gend Med.* 2012; 9:129-136.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995, 18:1417-1426.

Walker N, Kahamba T, Woudberg N, Goetsch K, Niesler C. Dose-dependent modulation of myogenesis by HGF: implications for c-Met expression and downstream signalling pathways. *Growth Factors.* 2015; 33:229-241.

Wang W, Pan H, Murray K, Jefferson BS, Li Y. Matrix metalloproteinase-1 promotes muscle cell migration and differentiation. *Am J Pathol.* 2009, 174:541-549.

Wetzel RJ, Patel RM, Terry MA. Platelet-rich plasma as an effective treatment for proximal hamstring injuries. *Orthopedics.* 2013; 36(1):e64-70.

Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda GN, Perka C. Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012; doi:10.1002/term.1542

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61: 364-370.

Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: animal experiments using a muscle contusion model. *Int J Sports Med.* 2004; 25:582-587.

Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, Shefer G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci.* 2008; 86(14 Suppl):E207-16.

Yamada M, Sankoda Y, Tatsumi R, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Sunagawa K, Allen RE. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle

satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40: 2183-2191.

Yang L, Chang N, Liu X, Han Z, Zhu T, Li C, Yang L, Li L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate to hepatic myofibroblasts by transforming growth factor- β 1 via sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor axis. *Am J Pathol.* 2012; 181:85-97.

Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013; 93:23-67.

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.* 2006; 54:1177-1191.

Zhang J, Middleton KK, Fu FH, Im HJ, Wang JH. HGF mediates the anti-inflammatory effects of PRP on injured tendons. *PLoS One.* 2013; 8:e67303.

Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J.* 2007; 21:3197-3207.

Zhironkina, O.A.; Shipounova, I.N.; Bigildeev, A.E.; Sats, N.V.; Petinati, N.A.; Drize, N.I. Proliferative potential of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Bull Exp Biol Med.* 2012; 152:543-547.

Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000; 50:139-148.

Zimowska M, Swierczynska M, Ciemerych MA. Nuclear MMP-9 role in the regulation of rat skeletal myoblasts proliferation. *Biol Cell.* 2013; 105(8):334-44.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13:4279-4295.

RINGRAZIAMENTI

In queste righe colgo l'occasione di ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine in questi tre anni di dottorato.

Desidero innanzitutto ringraziare la professoressa Sandra Zecchi-Orlandini, mio tutore, per la grande disponibilità, l'aiuto, e la pazienza dimostratami durante questo lungo percorso e durante la stesura della tesi.

Un grazie sentito inoltre, alle Dott.sse Chiara Sassoli, Flaminia Chellini e Alessia Tani, per il loro sostegno e per tutti i loro numerosi consigli e suggerimenti.

Inoltre, i miei più preziosi ringraziamenti vanno a mia madre e mio padre che hanno sempre creduto in me, per avermi dato la forza di superare ogni difficoltà e per i loro grandi sforzi grazie ai quali sono riuscita a raggiungere questo traguardo importante.

Ringrazio poi tutti i miei amici che in un modo o nell'altro hanno condiviso con me tutti questi anni e Marino che mi ha continuamente supportato, spronato e anche sopportato durante questi ultimi difficili mesi.

Infine, un ringraziamento speciale va a Lucia Formigli straordinaria donna, che mi ha accolto qualche anno fa in questo laboratorio e mi ha offerto l'opportunità di poter entrare a far parte di questo gruppo di ricerca e di cominciare questa straordinaria esperienza.

