



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Scienze

Corso di laurea in Scienze Biologiche

iPSC: Uno Strumento Potente per l'Ingegneria del
Tessuto Muscolare Scheletrico

Tesi di laurea di:
Erisa Selita

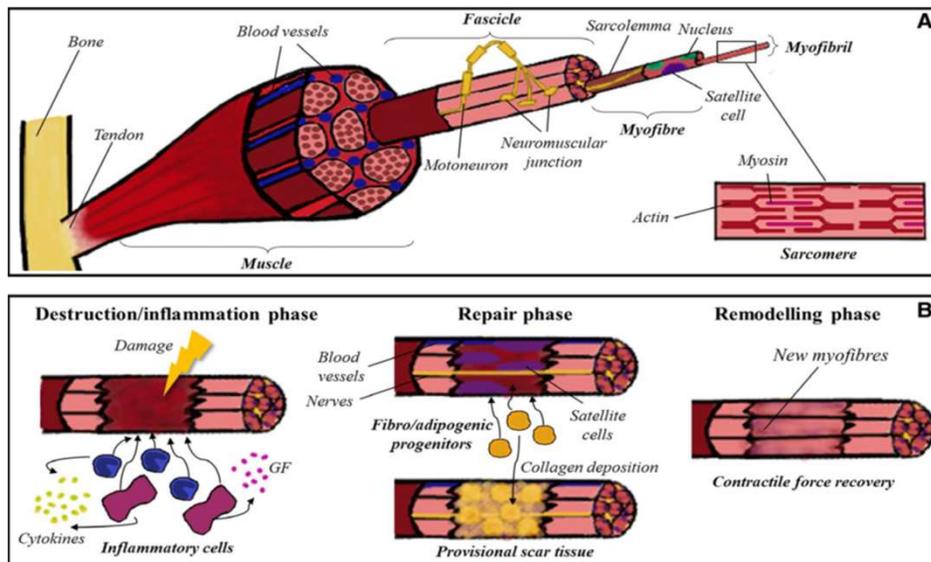
Relatore:
Dott.sa Maria Assunta Biscotti

A.A. 2020/2021

PANORAMICA DEL MUSCOLO SCHELETRICO

Il muscolo scheletrico è costituito da fibre muscolari di forma allungata, unite alla loro estremità a tessuto connettivo denso. Il citoplasma di tali fibre è occupato da fasci di miofibrille deputate alla contrazione e al rilassamento del muscolo. A un esame microscopico si possono individuare nelle fibrille diverse bande chiare e bande scure che si ripetono regolarmente. Queste bande sono poi delimitate da due linee sottili, dette linee Z, costituite da proteine di ancoraggio. I sarcomeri sono poi costituiti da fasci di filamenti paralleli e alterni di due tipi:

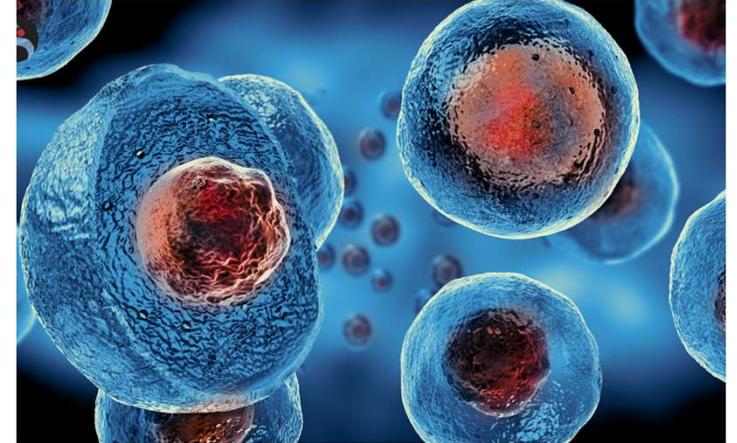
- i filamenti sottili, costituiti da actina, attorcigliati ad un filamento di una proteina regolatrice, la tropomiosina;
- i filamenti spessi sono invece costituiti principalmente dalla miosina.



Le cellule satellite sono cellule staminali muscolari residenti tra la lamina basale e il sarcolemma. Queste cellule possono differenziarsi e proliferare, promuovendo crescita muscolare e rigenerazione o auto-rinnovamento per mantenere una continua riserva di cellule satellite.

iPSC, LA CHIAVE PER LA MEDICINA PERSONALIZZATA.

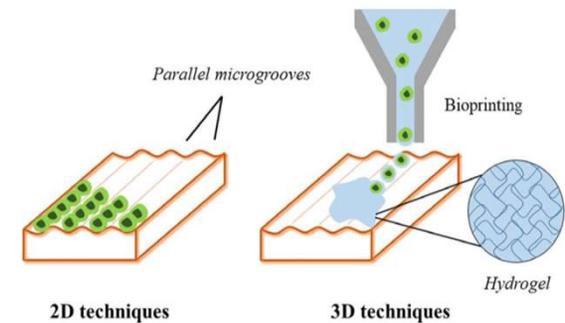
- ❑ La scoperta delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) è un passo in avanti per quanto riguarda la ricerca biomedica. Nel 2006, fibroblasti murini adulti sono stati riprogrammati con successo introducendo solo quattro fattori di trascrizione (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4) nelle cellule usando vettori retrovirali.
- ❑ L'enorme potenziale delle iPSC si basa sia sulla loro capacità di autorinnovamento e la loro capacità di differenziarsi praticamente in qualsiasi tipo di cellula.
- ❑ Le cellule somatiche di un paziente con una certa malattia di interesse possono essere riprogrammate a diventare iPSC e, successivamente, differenziate nella cellula di interesse, sviluppando un modello in vitro in grado di ricapitolare le caratteristiche principali della malattia. Diversi modelli di iPSC sono già stati sviluppati per un'ampia varietà di malattie, come quelle neurologiche, atrofie ottiche, mitocondriopatie e persino disturbi psichiatrici.



LE BASI DELL' INGEGNERIA DEL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO: SCAFFOLD

Per ottenere un tessuto muscolare ingegnerizzato simile a quello nativo, è essenziale progettare e fabbricare uno scaffold appropriato. Uno **scaffold** è definito come un biomateriale solido tridimensionale (3D) che svolge un ruolo indispensabile nella rigenerazione dei tessuti, cercando di imitare la **matrice extracellulare**, in quanto entrambi presentano funzioni analoghe. Le caratteristiche principali che devono essere prese in considerazione nella progettazione e nella scelta di quest'impalcatura sono:

- 1) L'architettura.
- 2) La biocompatibilità.
- 3) La biodegradabilità.
- 4) La bioattività.
- 5) Le proprietà meccaniche.



Dopo la generazione del costruito muscolare, sono possibili due diverse strategie con l'uso di iPSC. Potrebbero essere seminate direttamente sullo scaffold per promuovere la loro differenziazione o, al contrario, i precursori miogenici generati da quelle iPSC potrebbero essere seminati per completare il processo di differenziamento nell'ambiente 3D. Lo scaffold dovrebbe comportarsi come una nicchia di cellule staminali muscolari, ricreando il microambiente nativo.

LE BASI DELL' INGEGNERIA DEL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO: MATRICE ARTIFICIALE

I diversi materiali utilizzati per la creazione della matrice artificiale nell'ingegneria del tessuto muscolare scheletrico possono essere separati in quattro gruppi principali:

Polimeri naturali: collagene, gelatina, alginato, fibrina e chitosano, ognuno con le proprie caratteristiche specifiche.

Scaffold decellularizzati: sono, sostanzialmente, tessuti o organi che hanno subito un processo di rimozione del contenuto cellulare e nucleare al fine di lasciare solo la struttura e la composizione di base della matrice extracellulare. Pertanto, le proprietà biomeccaniche del tessuto vengono conservate.

Polimeri sintetici: poli (acido glicolico) (PGA) e poli (acido lattico-co-glicolico) (PLGA).

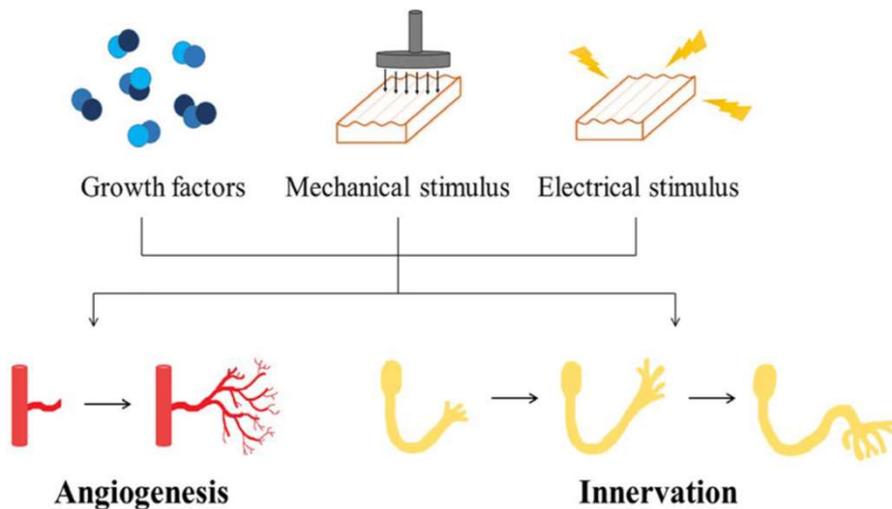
Materiali ibridi: la combinazione di materiali sintetici e naturali come compositi può avere molti vantaggi, beneficiando delle caratteristiche di ogni componente.

LE BASI DELL' INGEGNERIA DEL TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO: COMPONENTE CELLULARE

- ❑ Per quanto riguarda i tipi cellulari da utilizzare nell'ingegneria del tessuto muscolare scheletrico, quelli preferiti sono le cellule autologhe. Le caratteristiche più importanti che la componente cellulare deve avere sono l'elevata capacità proliferativa e la capacità di differenziarsi efficacemente in cellule muscolari scheletriche, al fine di ottenere un enorme pool di cellule precursori muscolari innestabili. Le cellule satellite sono state il serbatoio cellulare di partenza più regolarmente studiato per questa applicazione.
- ❑ Tuttavia, le cellule satelliti sono difficili da isolare e purificare e la loro capacità proliferativa è limitata in vitro. Oggigiorno, la maggior parte delle strategie propone cellule staminali per la rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico, ad esempio le cellule staminali mesenchimali, una popolazione di cellule staminali adulte multipotenti che ha mostrato capacità di differenziazione miogenica. Il problema è che queste cellule non presentano una modalità di somministrazione ottimale e il loro contributo terapeutico a lungo termine è limitato. Perciò, ci concentriamo sull'uso delle **iPSC** nell'ingegneria del tessuto muscolare.

DA iPSC A MUSCOLO SCHELETRICO

Fino ad oggi, diversi tentativi di produrre muscolo scheletrico in vitro sono stati eseguiti con successo in colture sia 2D che 3D con linee cellulari di mioblasti di muscolo scheletrico, come la linea cellulare di mioblasti di topo ampiamente utilizzata **C2C12**, mioblasti scheletrici umani o anche con cellule satellite purificate. Ci sono tre punti che rendono le **iPSC** una scelta migliore per l'ingegneria del muscolo scheletrico, invece dei mioblasti adulti: capacità proliferativa illimitata, fonte non invasiva di cellule donatrici e risultati migliori quando testati su modelli murini.



L'innervazione del tessuto ingegnerizzato è essenziale per la sopravvivenza a lungo termine e per il recupero e il mantenimento dell'attività contrattile. A tal fine, esistono alcune strategie per migliorare la generazione di forza e sviluppare le giunzioni neuromuscolari, ad esempio, la co-coltura di mioblasti e cellule neurali o l'utilizzo di biofattori che promuovono il raggruppamento di recettori dell'acetilcolina. Il muscolo scheletrico progettato in 3D deve essere vascularizzato e innervato per maturare e assumere la funzione muscolare adulta nativa.

CONCLUSIONI

La traduzione alle cliniche non è semplice e ci sono molti aspetti che devono essere presi in considerazione:

- (a) Le **iPSC** dovrebbero essere verificate in modo esauriente per garantire che non siano tumorigeniche.
- (b) Poiché a volte le **iPSC** mantengono la memoria epigenetica dalle cellule somatiche originali, è importante assicurare che sia stata raggiunta una popolazione omogenea in termini di firme epigenetiche.
- (c) Il rigetto immunitario potrebbe essere una delle principali preoccupazioni nell'applicazione delle **iPSC** in clinica.

Sebbene i progressi nell'ingegneria del tessuto muscolare scheletrico siano stati notevoli, rimangono ancora molti aspetti che potrebbero essere implementati.

Non c'è dubbio che, una volta aggiornati questi aspetti, l'ingegneria del tessuto muscolare scheletrico utilizzando le iPSC porterà a un enorme passo avanti nel campo della medicina personalizzata.

RIASSUNTO

Sia la **perdita muscolare volumetrica** (VML) che le **malattie degenerative muscolari** portano ad un'importante diminuzione della massa muscolare scheletrica, condizione che oggi giorno manca di un trattamento ottimale.

Ci si aspetta che la medicina rigenerativa guarisca pazienti con queste malattie difficili da trattare, con l'obiettivo di ripristinare o riparare i tessuti danneggiati o degenerati (e persino gli organi) mediante il trapianto di cellule nel sito di lesione o degenerazione. Per realizzare questo, è necessario avere accesso a un numero illimitato di cellule funzionali su richiesta per ricostituire le cellule perse a causa della malattia.

Le cellule staminali pluripotenti umane sembrano essere fonti cellulari utili per la rigenerazione cellulare, data la loro capacità di autorinnovarsi e di differenziarsi potenzialmente in tutti i tipi cellulari di tessuti adulti. Nello specifico, le **iPSC** risultano essere l'alternativa più adatta per queste applicazioni, considerando che le cellule trapiantate nei pazienti sarebbero direttamente differenziate dalle **iPSC** generate dalla riprogrammazione delle loro cellule somatiche.

BIBLIOGRAFIA

- ❑ Del Carmen Ortuño-Costela M, García-López M, Cerrada V, Gallardo ME. iPSCs: A powerful tool for skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2019 Jun;23(6):3784-3794. doi: 10.1111/jcmm.14292. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30933431; PMCID: PMC6533516.
- ❑ Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663-676.
- ❑ Liu P, Li K, Xu S. The future of iPS cells in advancing regenerative medicine. *Genet Res (Camb).* 2016;98:e4.
- ❑ Fuoco C, Petrilli LL, Cannata S, et al. Matrix scaffolding for stem cell guidance toward skeletal muscle tissue engineering. *J Orthop Surg Res.* 2016;11:1.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!