

Razionale dell'utilizzo della "bioingegneria tissutale": applicazioni cliniche sui muscoli

Use of "tissue bioengineering": clinical applications on muscles

F. Benazzo
L. Perticarini

RIASSUNTO

Le lesioni muscolari rappresentano una delle più comuni lesioni che si verificano durante l'attività sportiva, con un'incidenza variabile tra il 10 ed il 55% di tutti i traumi. Il processo di guarigione di una lesione muscolare avviene attraverso le fasi di distruzione, riparazione e di rimodellamento. La velocità della progressione di queste fasi dipende dalla severità del trauma, dalla biologia del paziente stesso così come dal protocollo terapeutico e riabilitativo intrapreso. Dal punto di vista terapeutico, i trattamenti standard mirano a ridurre il sanguinamento e la tumefazione associati al trauma. Il trattamento ideale per i traumi muscolari dovrebbe accelerare il processo di guarigione e migliorare la qualità del tessuto riparato intervenendo sull'infiammazione, sulla riparazione del tessuto leso e sulla fibrosi che ne residua. È in questi processi che si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale mediante l'utilizzo terapeutico di fattori di crescita, inibitori della fibrosi, cellule staminali ed attraverso la terapia genica. Il PRP rappresenta una possibile ed efficace opzione terapeutica per stimolare ed accelerare la guarigione e la rigenerazione del tessuto muscolare. Vista la carenza di dati in letteratura, sono necessari studi multicentrici per valutare l'efficacia di queste terapie. Ci sentiamo di riservare l'utilizzo di PRP negli atleti in caso di lesioni muscolari con un protocollo standard di applicazioni.

Parole chiave: lesione muscolare, PRP, gel piastrinico, medicina rigenerativa, bioingegneria tissutale

SUMMARY

Muscle lesions are one of the most common injuries occurring during sports. Their incidence is among 10% and 55% of all injuries. Muscle healing is made of different phases: destruction, repair and remodeling. The rate between these phases depends on severity of the trauma, patients' characteristics, therapeutic pathway and rehabilitation protocol. Standard treatments aim to reduce bleeding and swelling associated with trauma. The ideal treatment for muscle injuries should improve the healing and the quality of the tissue repair by acting on inflammation, on the process repair of the injured tissue and on the residual fibrosis. Regenerative medicine and tissue engineering are able to improve muscle healing phases through the use of growth factors, inhibitors of fibrosis, stem cells and gene therapy. The PRP is an effective therapeutic choice to stimulate and to accelerate the healing and the regeneration of muscle tissue. Because of poor literature, multicentric studies are needed to define the effectiveness of these treatments. We suggest the use of PRP in athletes' muscle injuries with a standardized protocol.

Fondazione IRCCS Policlinico
"San Matteo", Clinica
Ortopedica e Traumatologica,
Università di Pavia

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. F. Benazzo, Fondazione
IRCCS Policlinico
"San Matteo", Clinica
Ortopedica e Traumatologica,
Università di Pavia.
E-mail: fbenazzo@unipv.it

Key words: muscle injury, PRP, platelet-rich plasma, regenerative medicine, tissue bioengineering

Le lesioni muscolari rappresentano una delle più comuni lesioni che si verificano durante l'attività sportiva, con un'incidenza variabile tra il 10 ed il 55% di tutti i traumi¹. Possono essere distinte in contusioni, distrazioni e rotture. Le rotture muscolari sono le meno frequenti, rappresentando meno del 10% di tutte queste delle lesioni².

La contusione muscolare avviene quando un muscolo è sottoposto ad una forza compressiva, improvvisa e violenta, come un colpo diretto. Questo tipo di trauma tipicamente avviene negli sport di contatto.

La distrazione muscolare si ha invece nelle attività sportive in cui si sprints o si salta, nelle quali si può creare una situazione in cui il muscolo è soggetto ad un carico sovramassimale che avviene o durante la fase di contrazione eccentrica, o durante la fase concentrica, nel momento in cui viene espressa la massima velocità. Ne deriva un eccessivo stiramento delle miofibrille ed una conseguente loro rottura generalmente in prossimità della giunzione mio-tendinea³. Ciò avviene tipicamente in muscoli a ponte tra 2 articolazioni, come il retto femorale, il semi-tendinoso ed il gastrocnemio.

Le lesioni muscolari si possono classificare in base all'entità del danno clinico ottenuto in:

- *lievi* (o di I grado);
- *moderate* (o di II grado);
- *severe* (o di III grado).

Le lesioni di I grado sono quelle nelle quali si ha la rottura di solo alcune fibre muscolari, con una piccola tumefazione e lieve dolore accompagnato da una minima o da nessuna perdita di forza e di limitazione del movimento. Nelle lesioni di II grado invece, il coinvolgimento delle miofibrille è maggiore ed il muscolo presenta una chiara riduzione della sua capacità contrattile.

Nelle lesioni di III grado la lesione si estende lungo l'intera sezione del muscolo. Ne risulta una completa perdita della funzione muscolare.

Il processo di guarigione di una lesione muscolare avviene attraverso una serie costante di tappe, indipendentemente dalla causa che ha determinato il danno. Possiamo distinguere in questo processo tre fasi:

- *fase di distruzione*, caratterizzata dalla rottura e dalla conseguente necrosi delle miofibrille, con formazione di un ematoma intralesionale e di una reazione delle cellule infiammatorie;

- *fase di riparazione*, nella quale si ha la fagocitosi del tessuto necrotico, la rigenerazione delle miofibrille e la concomitante produzione di tessuto connettivo cicatriziale, così come la crescita di capillari nell'area lesionata;
- *fase di rimodellamento*, cioè il periodo nel quale si ha la maturazione delle miofibrille rigenerate, la riduzione e la riorganizzazione del tessuto cicatriziale ed il recupero della capacità funzionale del muscolo leso.

Le ultime 2 fasi sono generalmente strettamente associate e sovrapposte.

Queste fasi vengono coordinate da fattori di crescita, quali il *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α , il *Fibroblast Growth Factor* (FGF), l'*Insuline-like Growth Factor* (IGF), il *Transforming Growth Factor* (TGF)- β , l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF), da interleuchine come l'IL-1 β e l'IL-6 e da interazioni cellula-cellula. La guarigione dipende anche dalla vascolarizzazione locale e dalla rigenerazione dei fasci nervosi intramuscolari.

La velocità della progressione di queste fasi dipende dalla severità del trauma, dalla biologia del paziente stesso così come dal protocollo terapeutico e riabilitativo intrapreso. Dal punto di vista terapeutico, i trattamenti standard mirano a ridurre il sanguinamento e la tumefazione associati al trauma. Il trattamento ideale per i traumi muscolari dovrebbe accelerare il processo di guarigione e migliorare la qualità del tessuto riparato.

Per far questo, bisogna intervenire sulle tappe fondamentali del processo riparativo cioè sulla fase infiammatoria, sulla riparazione del tessuto leso e sulla fibrosi che ne residua. È in questi processi che si inseriscono la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale mediante l'utilizzo terapeutico di fattori di crescita, inibitori della fibrosi, cellule staminali e attraverso la terapia genica.

Purtroppo allo stato attuale non ci sono studi clinici prospettici randomizzati che ci diano le giuste indicazioni per favorire ed accelerare il processo di guarigione delle lesioni muscolari.

FATTORI DI CRESCITA E PRP (PLATELET-RICH PLASMA)

Molti studi *in vitro* hanno dimostrato che i fattori di crescita sono in grado di migliorare la rigenerazione muscolare ed aumentare la forza muscolare dopo un trauma.

In studi su modelli murini è stato visto che l'IGF-1, il bFGF e il *Nerve Growth Factor* (NGF) sono potenti stimolatori della proliferazione e della fusione dei mio-

blasti. Nello specifico, l'IGF-1, il bFGF e l'NGF venivano iniettati al secondo, quinto e settimo giorno dopo la lesione, ottenendo un miglioramento della rigenerazione muscolare. Il numero di miofibrille rigenerate incrementava in modo significativo dopo 7 giorni dall'iniezione. Il diametro delle fibre rigenerate nei muscoli trattati era aumentato in maniera significativa, mostrando quindi un'accelerazione della rigenerazione muscolare nei tessuti lesionati ed un complessivo aumento della forza muscolare a 15 giorni dalla lesione.

Una delle problematiche legate all'utilizzo dei fattori di crescita per accelerare il processo riparativo è il fatto che essi necessitano di alte concentrazioni a livello del focolaio leso per essere efficaci. Infatti, è stato dimostrato che i GF somministrati *in vitro* presentano un effetto dose-dipendente sulla proliferazione e sulla differenziazione dei mioblasti mentre, *in vivo*, 3 somministrazioni consecutive a dosi relativamente alte di GF sono di solito richieste per rilevare un miglioramento nella guarigione a livello del muscolo scheletrico nel topo. La rapida *clearance* da parte del sangue delle molecole e la loro breve emivita sono i motivi per cui sono richieste alte concentrazioni di GF nei muscoli lesi⁴⁻⁹. Questi dati confermano quelli ottenuti da lavori precedenti in cui veniva dimostrato che il bFGF stimola la proliferazione dei mioblasti in colture cellulari bovine e che IGF-1 è capace di potenziare la stimolazione della proliferazione e della differenziazione dei mioblasti *in vitro*¹⁰⁻¹⁷.

Il meccanismo per il quale bFGF stimola la proliferazione sembra essere dovuto alla capacità di stimolare il passaggio delle cellule dalla fase G0 alla fase G1 del ciclo cellulare¹⁸⁻¹⁹.

Questi fattori di crescita, insieme ai macrofagi e ai prodotti della via dei COX-2 (ciclo-ossigenasi-2), regolano la fase infiammatoria della guarigione del muscolo scheletrico. Il TGF- β 1 e le prostaglandine di seconda serie (PGE₂) potrebbero anche agire in maniera sinergica per regolare il livello di fibrosi durante la guarigione del muscolo²⁰.

Concentrati di piastrine autologhe sono stati utilizzati per trattare lesioni muscolari in modelli di ratti con contusioni provocate a livello dei gastrocnemi ed è stato evidenziato, rispetto ai gruppi di controllo, un incremento dell'attivazione delle cellule satelliti e dell'ampiezza delle miofibrille²¹.

Carda et al. hanno visto che in lesioni muscolari indotte chirurgicamente in pecore, il trattamento con PRP accelerava il processo di guarigione²².

Hammond et al. hanno promosso un modello sperimentale *in vivo* di ratti nei quali, a livello del tibiale anteriore, è

stata generata una lesione mediante singole o multiple contrazioni eccentriche in modo da riproporre una condizione che sia il più vicino possibile a quella che avviene normalmente nell'uomo. I gruppi di studio sono stati così divisi:

- iniezione di PRP con singola somministrazione nel sito della lesione;
- somministrazioni multiple di PRP intralesionali;
- iniezioni di PPP a livello della lesione;
- nessuna terapia.

È stato visto che il rilascio locale di PRP può accorciare i tempi di recupero dopo una lesione muscolare e che lo stesso è migliore nei protocolli in cui vi sono state applicazioni ripetute di PRP rispetto a quelli sottoposti a monosomministrazione²³.

Nell'uomo, l'accelerazione del recupero funzionale è stata vista in un trial in atleti d'élite nei quali è stato iniettato il PRP sotto guida ultrasonografica in seguito ad una lesione muscolare. Questi atleti sono tornati all'attività sportiva completa nella metà del tempo che ci si poteva attendere per il recupero e senza evidenza di eccesso di fibrosi. Peraltro si tratta di un lavoro presentato alla Seconda Conferenza Internazionale di Medicina Rigenerativa del 2005 sotto forma di poster e mai pubblicato in letteratura scientifica²⁴.

Il PRP rappresenta quindi una possibile opzione terapeutica per stimolare ed accelerare la guarigione e la rigenerazione del tessuto muscolare. Non ci sono comunque studi randomizzati controllati sugli uomini che ne supportino l'uso nelle lesioni muscolari. Alcuni studi sono iniziati ed i loro risultati potranno fare da guida a future indicazioni da fornire in questo tipo di traumi. Sono necessari quindi dati clinici più importanti per determinarne l'efficacia, le preparazioni e le composizioni standardizzate, il timing dell'iniezione di PRP nell'algoritmo terapeutico e gli *outcome* da considerare per paragonare risultati clinici²⁵.

Sarà importante comunque definire qual è il miglior tipo di lesione muscolare da trattare. Ad esempio, Mishra et al. affermano che lesioni muscolari acute a livello della giunzione mio-tendinea potrebbero essere trattate con l'aspirazione dell'ematoma e l'iniezione di PRP²⁶.

Occorrerà definire il valore della guida ultrasonografica o di altri tipi di guide necessarie per iniettare il PRP nell'esatto focus della lesione.

Serviranno inoltre protocolli riabilitativi adeguati per ottenere una ottimale riparazione del tessuto muscolare dopo tali applicazioni.

È da considerare infine il rapporto tra l'iniezione di fattori di crescita e le regole dell'antidoping. Per quel che riguar-

da il PRP, la WADA (*World Anti-Doping Agency*) nella nuova lista di farmaci proibiti per il 2010 recentemente pubblicata, proibisce l'utilizzo intramuscolare di PRP ma viene indicato che l'utilizzo mediante altre vie di somministrazione deve essere dichiarato ed approvato dall'*International Standard for Therapeutic Use Exemptions*.

CELLULE STAMINALI DI DERIVAZIONE MUSCOLARE (MDSC)

Ad oggi, i maggiori risultati della ricerca sull'utilizzo delle cellule staminali per la rigenerazione muscolare sono limitati a modelli animali.

Sebbene i laboratori stiano valutando il ruolo delle MDSC impiantate direttamente sul focolaio muscolare lesionato, i loro benefici non sono stati ancora determinati.

Per le tecniche di ingegneria tissutale il muscolo richiede uno *scaffold* per il supporto strutturale e per regolare la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici muscolari. I dati in letteratura suggeriscono che lo *scaffold* ideale potrebbe essere costituito da un gel di fibrina e un monostrato di cellule muscolari satelliti.

L'ingegneria tissutale muscolare necessita di un'adeguata connessione al sistema vascolare per un trasporto efficiente di ossigeno, CO₂, nutrienti, metaboliti e di una corretta giunzione neuromuscolare. A tale scopo sembra importante applicare stimolazioni meccaniche, elettriche e molecolari durante il processo di sviluppo del costrutto muscolare da impiantare.

A livello del sito di impianto, è fondamentale garantire una corretta vascolarizzazione locale. A tal fine è stato visto che la contrazione muscolare mediante esercizio fisico volontario o con stimolazione elettrica neuromuscolare (NMES) induce la formazione di nuovi vasi e l'espansione del sistema vascolare preesistente^{27 28}.

TERAPIA GENICA

Data l'importanza dell'IGF-1 nella rigenerazione muscolare, sono stati sviluppati degli adenovirus con funzione di *carriers* per il gene dell'IGF-1 ed è stato valutato la capacità di migliorare la qualità del muscolo leso.

In modelli murini, l'iniezione diretta dell'adenovirus vettore di IGF-1 a livello della lesione non aumenta significativamente la forza muscolare a 2 settimane dopo l'applicazione. Tuttavia, il trasferimento genico di adeno-

virus portatore del gene codificante per l'IGF-1 mioblasto-mediato aumenta la guarigione muscolare dopo una lesione in topi immunocompetenti, con evidenza però di fibrosi nel sito di iniezione²⁹.

Questo dimostra come la terapia genica basata sull'IGF-1 può migliorare il processo di guarigione muscolare ma il recupero funzionale rimane incompleto. Lo sviluppo della fibrosi locale potrebbe interferire con l'azione del GF suggerendo che la prevenzione della fibrosi può rappresentare la migliore strategia per migliorare la guarigione delle lesioni muscolari.

Resta però il problema ancora irrisolto dell'utilizzo dei vettori virali in terapia genica, con il rischio di infezioni e il ben più importante rischio cancerogeno che ne può derivare.

INIBITORI DELLA FIBROSI

Per quel che riguarda gli *inibitori della fibrosi*, quelli che da un punto di vista sperimentale si sono dimostrati efficaci sono la decorina, la suramina e l'interferone (INF)- γ .

La decorina inattiva il TGF- β 1 ed è stato visto ridurre la fibrosi muscolare e di conseguenza migliora la guarigione del muscolo scheletrico con un recupero pressoché completo dopo un trauma.

La suramina degrada le fibre collagene dopo la loro deposizione³⁰. Per questo motivo potrebbe essere usata per eliminare cicatrici muscolari già presenti.

Per quel che riguarda l'INF- γ , possiamo dire che è una molecola già utilizzata per trattare la fibrosi epatica nell'uomo (approvato dalla *Food and Drug Administration* [FDA]), e quindi non ci sono problemi al suo utilizzo clinico.

Queste molecole potrebbero diventare un bersaglio per lo sviluppo di strategie di terapia genica locale per prevenire la fibrosi nella guarigione delle lesioni muscolari.

PROPOSTE DI UTILIZZO DEL PRP

Vista la carenza di dati in letteratura, ci sentiamo di riservare l'utilizzo di PRP negli atleti in caso di lesioni muscolari pure, generalmente non di interesse chirurgico, con le seguenti indicazioni:

- lesioni muscolari almeno di II grado;
- entro i 15 giorni dal trauma;
- almeno 2 applicazioni, a distanza di 7-10 giorni l'una dall'altra;

- applicazioni sotto guida ecografica;
- eseguire esame RM prima dell'applicazione del PRP e controllo con nuova RM a 4 settimane dalla prima;
- protocollo riabilitativo: riposo funzionale per 15 giorni, successivamente stretching e potenziamento eccentrico della muscolatura, eventualmente associati a stimolazione elettrica neuromuscolare

Per quel che riguarda le lesioni mio-tendinee dello sportivo invece, vanno distinte quelle di interesse chirurgico, in cui il PRP deve essere applicato in sede intra-operatoria, mentre nel caso delle lesioni non chirurgiche sostanzialmente si può seguire il protocollo scelto per le lesioni muscolari pure. Si può discutere sull'eventualità di una seconda applicazione a livello della lesione nel caso di intervento chirurgico perché si andrebbe a stimolare un sito chirurgico con i rischi che ne conseguono, cioè infettivi e di sofferenza dei tessuti peri-cicatriziali.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Beiner JM, Jokl P. *Muscle contusion injuries: current treatment options*. J Am Acad Orthop Surg 2001;9:227-37.
- 2 Järvinen M, Lehto MUK. *The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries*. Sports Med 1993;15:78-89.
- 3 Benazzo F, Barnabei G, Monti G, et al. *Current thinking on the pathogenesis, progression and treatment of muscle haematomas in athletes*. Italian Journal of Sports Traumatology 1989;11:273-302.
- 4 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Day C, et al. *Biological interventions in muscle healing and regeneration*. Sports Med Arthrosc Rev 1998;6:95-102.
- 5 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, et al. *Development of approaches to improve the healing following muscle contusion*. Cell Transplant 1998;7:585-98.
- 6 Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, et al. *Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury*. Clin Orthop 2000;370:272-85.
- 7 Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day C, et al. *Growth factors improve muscle healing in vivo*. J Bone Joint Surg 2000;82B:131-7.
- 8 Huard J, Li Y, Fu F. *Current concepts review, muscle injuries and repair: current trends in research*. J Bone Joint Surg 2002;84A:822-32.
- 9 Li Y, Cummins J, Huard J. *Muscle injury and repair*. Curr Opin Orthop 2001;12:409-15.
- 10 Florini JR, Magri KA. *Effect of growth factors on myogenic differentiation*. Am J Physiol 1989;256:701-11.
- 11 Allen RE, Boxhorn LK. *Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor 1, and fibroblast growth factor*. J Cell Physiol 1989;138:311-5.
- 12 Ewton DZ, Florini JR. *Relative effects of the somatomedins, multiplication-stimulating activity, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture*. Endocrinology 1980;106:577-83.
- 13 Florini JR, Ewton DZ, Roof SL. *Insulin-like growth factor-1 stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression*. Mol Endocrinol 1991;5:718-24.
- 14 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, et al. *Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor*. Endocr Rev 1987;8:95-114.
- 15 Gospodarowicz D, Weseman J, Moran JS, et al. *Effect of fibroblast growth factor on the division and fusion of bovine myoblasts*. J Cell Biol 1976;70:395-405.
- 16 Kardami E, Spector D, Strohman RC. *Selected muscle and nerve extracts contain an activity which stimulates myoblast proliferation and which is distinct from transferrin*. Dev Biol 1985;112:353-8.
- 17 Kardami E, Spector D, Strohman RC. *Myogenic growth factor present in skeletal muscle is purified by heparin-affinity chromatography*. Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:8044-7.
- 18 Alameddine HS, Dehaupas M, Fardeau M. *Regeneration of skeletal muscle fibers from autologous satellite cells multiplied in vitro: an experimental model for testing cultured cell myogenicity*. Muscle Nerve 1989;12:544-55.
- 19 Jennische E, Hansson HA. *Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I*. Acta Physiol Scand 1987;130:327-32.
- 20 Shen W, Li Y, Zhu J, et al. *Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury*. J Cell Physiol 2008;214:405-12.
- 21 Wright-Carpenter T, Klein P, Schäferhoff P, et al. *Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains*. Int J Sports Med 2004;25:588-93.
- 22 Carda C, Mayordomo E, Enciso M, et al. *Structural effects of the application of a preparation rich in growth factors on muscle healing following acute surgical lesion*. Poster presentation at the 2nd International Conference on Regenerative Medicine, 2005.
- 23 Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, et al. *Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries*. Am J Sports Med 2009;37:1135-42.
- 24 Sanchez M, Azofra J, Anitua E, et al. *Use of a preparation rich in growth factors in the operative treatment of ruptured Achilles tendon*. Poster presentation at the 2nd International Conference on Regenerative Medicine, 2005.
- 25 Hall MP, Band PA, Meislin RJ, et al. *Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine*. J Am Acad Orthop Surg 2009;17:602-8.
- 26 Mishra A, Woodall J, Vieira A. *Treatment of tendon and muscle using platelet-rich plasma*. Clin Sports Med 2009;28:113-25.
- 27 Koning M, Harmsen MC, van Luyn MJ, et al. *Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med 2009;3:407-15.
- 28 Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, et al. *Stem cells for the treatment of skeletal muscle injury*. Clin Sports Med 2009;28:1-11.
- 29 Lee C, Fukushima K, Usas A, et al. *Biological intervention based on cell and gene therapy to improve muscle healing following laceration*. J Musculoskel Res 2000;4:265-77.
- 30 Kloen P, Jennings C, Gebhardt M, et al. *Suramin inhibits growth and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding in osteosarcoma cell lines*. Eur J Cancer 1994;30A:678-82.