

# il Diabete

Vol. 35, N. 4, dicembre 2023



## – RASSEGNE

Update sulla malattia renale diabetica (DKD): focus sulla DKD non albuminurica e il rischio cardiovascolare

Il ruolo dello svuotamento gastrico nell'omeostasi e nella controregolazione glucidica

## – EDITORIALI

Indicazioni cliniche sull'uso della metformina in gravidanza e nel periodo periconcezionale

## – AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ

La medicina cardiometabolica nell'obesità

## – AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA

Uso della metformina in gravidanza: revisione sistematica dei dati da modelli animali

## – JOURNAL CLUB

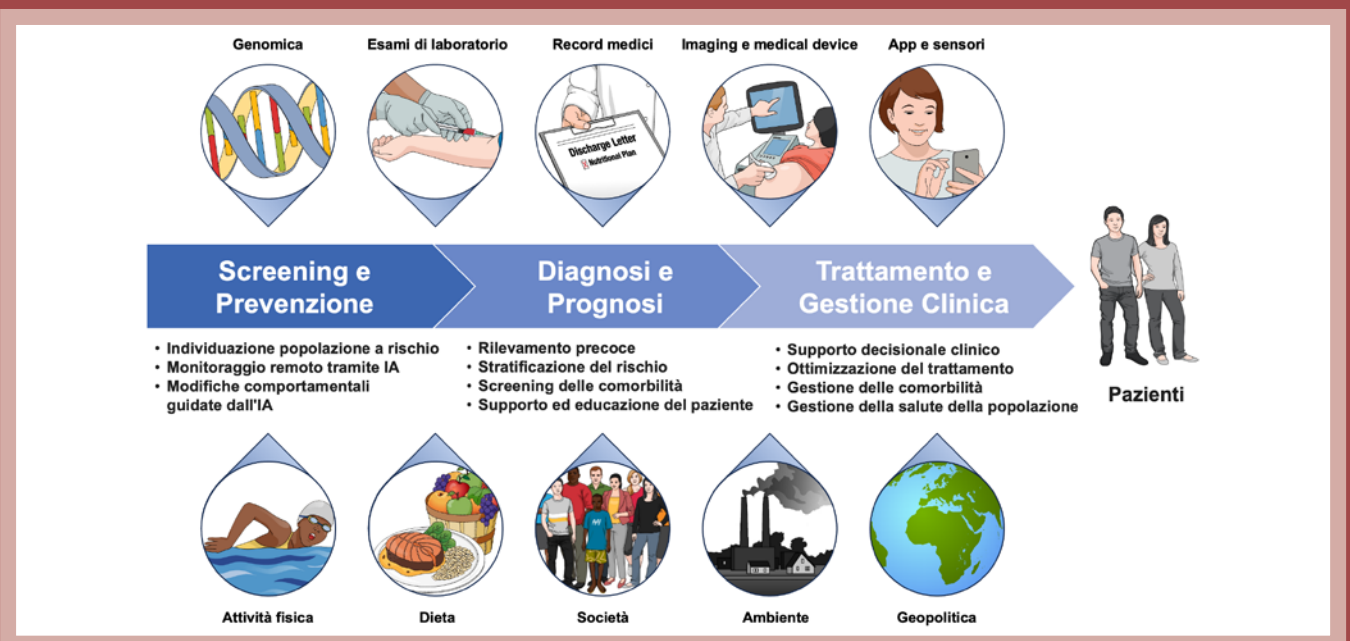
## – MEDICINA TRASLAZIONALE

La rigenerazione del miocardio nello scompenso cardiaco: ieri, oggi e domani

## – AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE

Intelligenza Artificiale per la cura del diabete mellito: opportunità e prospettive future

## – LA VITA DELLA SID



# il Diabete

Organo ufficiale della  
Società Italiana di Diabetologia

## *Direttore Scientifico*

Sebastiano Squatrito (Catania)

## *Co-direttori*

Luca D'Onofrio (Roma, YoSID)

Carla Greco (Modena, YoSID)

Giuseppe Defeudis (Roma)

Gloria Formoso (Chieti)

Lucia Frittitta (Catania)

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

## *Comitato di Redazione*

Benedetta Bonora (Padova)

Fabio Broglio (Torino)

Stefano Ciardullo (Milano)

Francesca Cinti (Roma-Cattolica)

Giuseppe Daniele (Pisa)

Angela Dardano (Pisa)

Ilaria Dicembrini (Firenze)

Antonio Di Pino (Catania)

Francesca Fiory (Napoli)

Luigi Laviola (Bari)

Anna Leonardini (Bari)

Roberta Lupoli (Napoli-Federico II)

Ernesto Maddaloni (Roma-Sapienza)

Daria Maggi (Roma-Campus)

Alessandro Mantovani (Verona)

Lorella Marselli (Pisa)

Matteo Monami (Firenze)

Mario Luca Morieri (Padova)

Antonio Nicolucci (Pescara)

Emanuela Orsi (Milano)

Pia Clara Pafundi (Napoli-Vanvitelli)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Francesca Porcellati (Perugia)

Ivana Rabbone (Torino)

Elena Succurro (Catanzaro)

Dario Tuccinardi (Roma-Campus)

## **CONSIGLIO DIRETTIVO SID**

### *Presidente*

Angelo Avogaro (Padova)

### *Presidente Eletto*

Raffaella Buzzetti (Roma)

### *Tesoriere*

Marta Letizia Hribal (Catanzaro)

### *Segretario*

Saula Vigili de Kreutzenberg (Padova)

### *Consiglieri*

Gloria Formoso (Chieti)

Mariangela Ghiani (Cagliari)

Luigi Laviola (Bari)

Giuseppe Lepore (Bergamo)

Maria Ida Maiorino (Napoli)

Raffaele Napoli (Napoli)

Andrea Natali (Pisa)

Lorenzo Piemonti (Milano)

Salvatore Piro (Catania)

Sabrina Prudente (Roma)

Elena Succurro (Catanzaro)

## **UFFICIO DI PRESIDENZA SID 2022-2024**

Angelo Avogaro (Padova)

Agostino Consoli (Chieti)

Raffaella Buzzetti (Roma)

## *Responsabili di Redazione*

Andrea Tumminia (Catania)

Agostino Milluzzo (Catania)

Rosario Le Moli (Catania)

## Sommario

– **RASSEGNE** A CURA DI LUCIA FRITTITTA E SEBASTIANO SQUATRITO

220 **Update sulla malattia renale diabetica (DKD): focus sulla DKD non albuminurica e il rischio cardiovascolare**

*Sabrina Scilletta, Maurizio Di Marco, Nicoletta Miano, Agnese Filippello, Stefania Di Mauro, Alessandra Scamporrino, Marco Musmeci, Giuseppe Coppolino, Francesco Di Giacomo Barbagallo, Giosiana Bosco, Roberto Scicali, Salvatore Piro e Francesco Purrello e Antonino Di Pino*

239 **Il ruolo dello svuotamento gastrico nell'omeostasi e nella controregolazione glucidica**

*Michelantonio De Fano, Massimo Malara, Carmine G. Fanelli, Geremia B. Bolli e Francesca Porcellati*

253 – **EDITORIALI** A CURA DI SEBASTIANO SQUATRITO

**Indicazioni cliniche sull'uso della metformina in gravidanza e nel periodo periconcezionale**

*a cura del Gruppo di Studio interassociativo AMD-SID Diabete e Gravidanza: Laura Sciacca, Cristina Bianchi, Silvia Burlina, Gloria Formoso, Elisa Manicardi, Maria Angela Sculli, Veronica Resi*

267 – **AGGIORNAMENTI IN TEMA DI OBESITÀ** A CURA DI LUCIA FRITTITTA

**La medicina cardiometabolica nell'obesità**

*Dario Tuccinardi, Mikiko Watanabe, Silvia Manfrini*

280 – **AGGIORNAMENTO DALLA LETTERATURA** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

**Uso della metformina in gravidanza: revisione sistematica dei dati da modelli animali**

282 – **JOURNAL CLUB** A CURA DI MARTA LETIZIA HRIBAL

286 – **MEDICINA TRASLAZIONALE: APPLICAZIONI CLINICHE DELLA RICERCA DI BASE**

A CURA DI CARLA GRECO E LUCA D'ONOFRIO

**La rigenerazione del miocardio nello scompenso cardiaco: ieri, oggi e domani**

*Rossella D'Oria, Isabella Calderoni, Luigi Laviola, Francesco Giorgino*

299 – **AGGIORNAMENTO IN TEMA DI TECNOLOGIE** A CURA DI GLORIA FORMOSO

**Intelligenza Artificiale per la cura del diabete mellito: opportunità e prospettive future**

*Ludovico Di Gioia, Irene Caruso, Caterina Sanasi, Carmine Piccolo, Francesco Giorgino, Luigi Laviola*

– **LA VITA DELLA SID**

311 **Congresso Interassociativo AMD-SID Lombardia, Coccaglio (BS), 20-21 ottobre 2023**

**Per una nuova Diabetologia in equilibrio fra tecnologia e centralità del paziente**

GOLDEN CIRCLE



# il Diabete

---

Vol. 35, N. 4, dicembre 2023

## **Direzione Scientifica**

Sebastiano Squatrito, Catania

## **Direttore Responsabile**

Stefano Melloni

Associato all'Unione Stampa Periodica Italiana



Copyright © 2023 SID

Società Italiana di Diabetologia

CC BY 4.0 License

ISBN online 979-12-5477-378-9

ISSN online 1720-8335

DOI 10.30682/ildia2304

Nessuna parte può essere duplicata o riprodotta senza l'autorizzazione scritta dell'Editore.

## **Fondazione Bologna University Press**

Via Saragozza 10, 40123 Bologna

tel. (+39) 051 232 882; fax (+39) 051 221 019

e-mail: [info@buponline.com](mailto:info@buponline.com)

[www.buponline.com](http://www.buponline.com)

*Periodico riconosciuto "di elevato valore culturale" dal Ministero per i Beni e le Attività Culturali*

Autorizzazione Tribunale di Milano

n. 706 del 2/11/1988

## **Avvertenza ai lettori**

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni in merito a dosaggio e impiego di prodotti eventualmente citati negli articoli, e invita il lettore a controllarne personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

a cura di Carla Greco<sup>1</sup>, Luca D'Onofrio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia; <sup>2</sup>Unità di Diabetologia, AOU Policlinico Umberto I di Roma e Sapienza Università di Roma

## La rigenerazione del miocardio nello scompenso cardiaco: ieri, oggi e domani ♦ *Myocardial regeneration in heart failure: yesterday, today and tomorrow*

Rossella D'Oria, Isabella Calderoni, Luigi Laviola, Francesco Giorgino

Sezione di Medicina Interna, Endocrinologia, Andrologia e Malattie Metaboliche, Dipartimento di Medicina di Precisione e Rigenerativa e Area Jonica - (DiMePRE-), Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2304f>

### ABSTRACT

*Heart failure is the leading cause of death worldwide, due to the limited capacity of the adult heart to regenerate. Today, the treatment of heart failure is based on the use of devices, pharmacological therapy of symptoms, and heart transplantation. However, these approaches do not represent a long-term solution and the availability of heart donors is inadequate. For this reason, there is great interest in regenerative medicine to treat heart failure. This review summarizes primary strategies of cardiac regenerative medicine, their present status, and future perspectives and challenges.*

### KEYWORDS

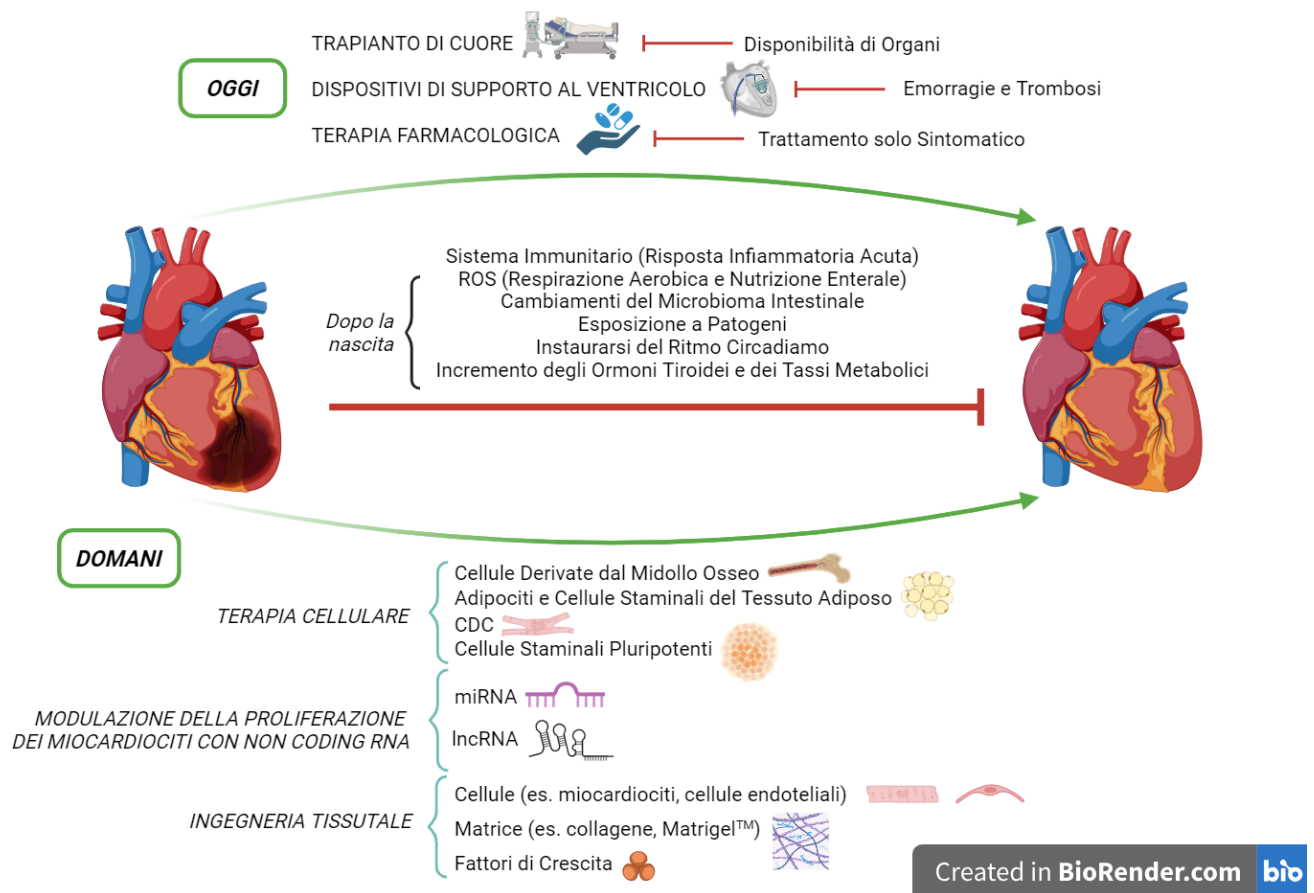
*Heart failure, heart transplantation, cardiac regenerative medicine, cardiac tissue engineering.*

### INTRODUZIONE

L'insufficienza cardiaca, o scompenso cardiaco, rappresenta una condizione morbosa che oggi ha raggiunto dimensioni pandemiche con un incremento della prevalenza, della mortalità e della morbidità. Il motivo per cui ancora oggi le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte in tutto il mondo risiede, in parte, nella limitata capacità del cuore adulto di rigenerarsi. Nel corso degli ultimi decenni si è cercato di comprendere quali fossero i fattori e i meccanismi responsabili del limitato potenziale rigenerativo cardiaco nell'uomo. A differenza di quanto accade nel mammifero adulto, dove il danno a carico del miocardio si traduce nella necrosi dei miocardiociti, nella fibrosi e nell'insufficienza cardiaca, nel mammifero neonato la capacità dei miocardiociti di proliferare non viene persa, almeno nei primi giorni di vita. Haubner et al. riportano che anche il miocardio dei neonati umani è in grado di rigenerare in seguito a infarto rispetto a quello degli adulti grazie alla capacità dei miocardiociti maturi di de-differenziare nello stato di progenitore e di proliferare, analogamente a quanto accade nei vertebrati inferiori (1-2). Tuttavia, dopo la prima settimana di vita, il danno a carico del miocardio non si traduce nella proliferazione dei miocardiociti, bensì nella fibrosi del tessuto cardiaco (2-3).

La ricerca condotta negli ultimi due decenni ha evidenziato che uno dei fattori responsabili del limitato potenziale rigenerativo cardiaco nei mammiferi è rappresentato dall'attività del sistema immunitario (Fig. 1). In seguito a un

Figura 1 ◆



Sono molteplici i fattori che limitano il potenziale rigenerativo del cuore nei mammiferi adulti, tra cui la risposta infiammatoria acuta che si innesca in seguito all'infarto del miocardio con produzione di ROS e citochine e altri fattori che entrano in gioco subito dopo la nascita. Tra questi ultimi compaiono (i) i ROS derivanti dalla respirazione aerobica e dall'alimentazione enterale, (ii) la maturazione del sistema immunitario innescata dai cambiamenti nel microbioma intestinale e dall'esposizione ai patogeni, responsabile, a sua volta, dello shift della risposta infiammatoria post-lesione verso la fibrosi, (iii) l'istaurarsi del ritmo circadiano attraverso l'attivazione di specifici geni responsabili anche della soppressione del ciclo cellulare dei miocardiociti, e (iv) l'aumento dei livelli di ROS derivanti dall'intensificarsi dei tassi metabolici per effetto dell'aumento dei livelli di ormoni tiroidei.

Oggi, il trattamento dello scompenso cardiaco si basa principalmente (i) sul trapianto di cuore, (ii) sull'utilizzo dei dispositivi per il supporto meccanico della funzione ventricolare e (iii) sulla terapia farmacologica. Tuttavia, questi approcci non prevencono la progressione dello scompenso cardiaco, e la loro applicazione è limitata da una serie di problematiche e complicanze, tra cui la scarsa disponibilità dei donatori di cuore, il rischio di emorragie e trombosi e il trattamento solo sintomatico, rispettivamente.

Per questo motivo, nel corso degli ultimi anni, la ricerca si sta concentrando su nuovi approcci tra cui (i) la terapia cellulare con diversi tipi di cellule, (ii) la modulazione della proliferazione dei miocardiociti attraverso l'utilizzo dei non-coding RNA, sia miRNA che lncRNA e (iii) l'ingegneria tissutale per l'ottenimento di un organo ingegnerizzato a partire da cellule (es. miocardiociti e cellule endoteliali), matrici (es. collagene e Matrigel™) e fattori di crescita.

lncRNA, long non-coding RNA; miRNA, microRNA; ROS, specie reattive dell'ossigeno.

Figura creata utilizzando il software BioRender.

infarto del miocardio, il sistema immunitario innato avvia una risposta infiammatoria acuta caratterizzata dal reclutamento di neutrofili e monociti (4): i primi rilasciano specie reattive dell'ossigeno (ROS) e citochine, responsabili a loro volta dell'infiammazione nel cuore (5), i secondi si differenziano nei sottotipi M1 ed M2, in grado di secernere altre citochine proinfiammatorie e di attivare i fibroblasti, con successiva secrezione di proteine della matrice extracellulare e formazione di tessuto cicatriziale (6). I vertebrati inferiori, invece, mostrano il reclutamento di eosinofili (7) in grado di secernere citochine antinfiammatorie, innescando così un processo rigenerativo anziché fibrotico nel cuore (8).

Numerosi altri meccanismi sono stati poi identificati come responsabili della perdita del potenziale rigenerativo del cuore nei mammiferi dopo la nascita. Il passaggio dalla respirazione anaerobica a quella aerobica dopo la nascita porta ad un aumento della produzione dei ROS responsabili del danno a carico del DNA, con conseguente arresto del ciclo cellulare dei miocardiociti (9). Allo stesso modo, la transizione dalla nutrizione placentare a quella enterale, con latte materno contenente livelli più elevati di acidi grassi, stimola la maturazione mitocondriale, nonché il rilascio dei ROS (9-10), reputati a loro volta responsabili anche delle modifiche dell'espressione dei geni deputati al controllo del ciclo cellulare dei miocardiociti (11). Un altro importante meccanismo è rappresentato dalla maturazione del sistema immunitario innescata dai cambiamenti nel microbioma intestinale e dall'esposizione ai patogeni dopo la nascita e responsabile, a sua volta, dello shift della risposta infiammatoria post-lesione verso la fibrosi con riduzione del potenziale rigenerativo e angiogenico (12-13). Inoltre, dopo la nascita si assiste anche ad un aumento dei livelli di ormoni tiroidei al fine di incrementare i tassi metabolici necessari per il mantenimento della temperatura al di fuori dell'utero attraverso il signaling beta-adrenergico (14). Tutto questo si traduce nell'inibizione della proliferazione dei miocardiociti (15). Dopo la nascita si assiste anche all'istaurarsi del ritmo circadiano attraverso l'attivazione di due geni, *Period1* e *Period2*, da parte del sistema nervoso simpatico, responsabili anche della soppressione del ciclo cellulare dei miocardiociti (16). Tuttavia, l'istaurarsi del ritmo circadiano sembra essere fondamentale per la promozione della maturazione dei miocardiociti (17-18).

Nonostante i miglioramenti nella definizione degli *standard of care* e le innovazioni sia nel campo della farmacoterapia che in quello della cardiocirurgia, non esiste ancora un trattamento in grado di prevenire in maniera efficace la progressione dell'insufficienza cardiaca. A questo si aggiungono le complicità legate all'utilizzo dei dispositivi per il supporto meccanico della funzione ventricolare, tra cui le emorragie e le trombosi (Fig. 1). L'unico trattamento in grado di ripristinare la funzionalità cardiaca compromessa è rappresentato dal trapianto di cuore. Tuttavia, la disponibilità di donatori di cuore è sempre più sproporzionata rispetto alla loro richiesta. Per questo motivo nel corso degli ultimi anni la ricerca ha focalizzato l'attenzione sul campo delle terapie rigenerative finalizzate alla sostituzione del tessuto miocardico danneggiato e al ripristino della funzionalità cardiaca compromessa.

Il settore della terapia rigenerativa cardiaca ha compiuto passi da gigante negli ultimi 25 anni abbracciando diverse branche, tra cui la terapia cellulare, l'induzione e la regolazione della proliferazione dei miocardiociti attraverso l'utilizzo dei non-coding RNA e l'ingegneria tissutale (Fig. 1). Lo scopo di questa rassegna è quello di fare un punto della situazione di ognuna di queste strategie, evidenziando anche i limiti attuali e le sfide future.

## TERAPIA CELLULARE

La terapia rigenerativa cardiaca basata sull'utilizzo di cellule si basa, ad oggi, su numerosi tipi di cellule adulte, le quali vengono differenziate in miocardiociti maturi e fatte integrare con il miocardio danneggiato con l'obiettivo finale di migliorare la funzionalità cardiaca (Fig. 1).

### Cellule derivate dal midollo osseo

Le cellule staminali derivate dal midollo osseo sono state studiate in numerosi trials clinici al fine di verificare la loro capacità di differenziarsi in miocardiociti maturi (19-20). Il forte entusiasmo iniziale per l'utilizzo di queste cellule, legato alla loro capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari, è stato negli ultimi anni smorzato dalle numerose metanalisi che, pur avendo da una parte dimostrato che le cellule staminali derivate dal midollo osseo hanno un buon profilo di sicurezza, con pochi effetti avversi e con bassissimo rischio di aritmie, hanno d'altra parte evidenziato come il beneficio clinico sia modesto con un miglioramento soltanto lieve della funzionalità del ventricolo sinistro (21-22). Pertanto, la tesi maggiormente accreditata ad oggi è che i benefici della terapia rigenerativa cardiaca con cellule del midollo osseo siano dovuti principalmente a un effetto paracrino sul cuore, con un potenziamento dell'angiogenesi, piuttosto che alla generazione di nuovi miocardiociti (19). Oggi, quindi, il midollo osseo non è più considerato una sorgente di nuovi miocardiociti.



### **Adipociti e cellule staminali adipose**

Numerosi studi hanno suggerito che anche il tessuto adiposo può rappresentare una sorgente di cellule staminali adulte multipotenti (23-26). Tuttavia, due tra i trials clinici più estesi, PRECISE e ATHENA, pur dimostrando che le cellule con potenziale rigenerativo provenienti dal tessuto adiposo attraverso la liposuzione sono sicure quando infuse per via transendocardica nel miocardio di pazienti affetti da cardiomiopatia ischemica, non hanno evidenziato un miglioramento significativo della funzionalità cardiaca (27-28). Inoltre, ad oggi non ci sono evidenze riguardanti la capacità degli adipociti e delle cellule staminali residenti nel tessuto adiposo di transdifferenziare in miocardiociti.

### **Cellule derivate dalle cardiosfere (CDC)**

Negli ultimi anni la ricerca ha focalizzato l'attenzione anche sulle cellule derivate dalle cardiosfere (CDC), una classe di cellule stromali cardiache multipotenti (29), in grado di stimolare i meccanismi endogeni di riparazione cardiaca (reclutamento di cellule staminali c-kit<sup>+</sup>, angiogenesi) e di attenuare il rimodellamento avverso del cuore (30) quando iniettate nel miocardio infartuato di modelli animali sperimentali, sia di piccola che di grande taglia (31-35). Tuttavia, nonostante questi risultati promettenti, il trial clinico ALLSTAR (Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration), condotto con l'obiettivo di valutare la sicurezza e l'efficacia dell'infusione intracoronarica delle CDC allogeneiche in pazienti con disfunzione ventricolare sinistra post-infarto, ha dimostrato che, pur essendo l'utilizzo di queste cellule sicuro e pur riducendo i volumi del ventricolo sinistro e i livelli del peptide natriuretico terminale (NT-proBNP), non consente la riduzione delle dimensioni del tessuto cicatriziale rispetto al placebo a 6 mesi dall'infarto (36). Similmente, il trial clinico CADUCEUS (Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction) ha dimostrato che se da una parte la somministrazione di CDC autologhe tramite infusione intracoronarica in pazienti con infarto acuto del miocardio consente un miglioramento in termini di dimensione del tessuto cicatriziale e dello spessore della parete ventricolare sinistra, dall'altra non modifica significativamente i volumi telediastolici o telesistolici del ventricolo sinistro e la frazione di eiezione (37).

### **Cellule staminali pluripotenti**

Negli ultimi due decenni, la medicina rigenerativa cellulare cardiaca ha compiuto un ulteriore passo in avanti con lo studio dei cardiomiociti derivanti dal differenziamento delle cellule staminali adulte pluripotenti (PSC-CM). Gli studi *in vivo* iniziali condotti su modelli sperimentali animali di piccola taglia hanno mostrato risultati promettenti nel ripristino della funzionalità cardiaca dopo infusione di PSC-CM (38). Tuttavia, studi pre-clinici su animali di grande taglia hanno evidenziato un rischio di aritmie ventricolari dovute all'automaticità dei PSC-CM immaturi nelle prime settimane dopo l'infusione (39-42). La terapia farmacologica e/o l'induzione della maturazione *in vitro* dei PSC-CM prima dell'infusione *in vivo*, insieme alla purificazione finalizzata all'allontanamento delle cellule pacemaker, potrebbero ridurre il rischio dell'insorgenza delle aritmie (43). Il trial ESCORT (Embryonic Stem Cell-derived Progenitors in Severe Heart Failure) rappresenta il primo studio clinico in cui sono state infuse PSC-CM in pazienti con grave insufficienza cardiaca a seguito di infarto del miocardio attraverso l'utilizzo di un patch epicardico (44). Tutti i pazienti arruolati nello studio hanno mostrato un miglioramento della funzione sistolica delle regioni trattate. Soltanto uno di questi pazienti ha sviluppato aritmie in seguito all'uso del patch epicardico, a differenza della maggior parte dei modelli animali che ha manifestato aritmie negli studi preclinici in seguito all'infusione intramiocardica (39-41). Quest'ultimo dato ha suggerito che anche la modalità di somministrazione può incidere sul rischio di manifestazione di aritmie cardiache. La risoluzione della problematica delle aritmie che si verificano subito dopo il trapianto potrebbe rappresentare un passo importante per la traslazione di questo approccio terapeutico innovativo nella pratica clinica.

### **Le sfide future della terapia rigenerativa cellulare cardiaca**

Pur avendo compiuto passi da gigante negli ultimi anni, le sfide che la terapia rigenerativa cellulare deve ancora affrontare sono numerose, tra cui l'individuazione di un protocollo efficiente di differenziamento in senso miocardiociti-

tico e di purificazione in grado di allontanare le cellule pacemaker contaminanti ritenute responsabili dell'insorgenza delle aritmie ventricolari transitorie, chiamate aritmie da attecchimento (EA, Engraftment Arrhythmias), l'incremento della percentuale di ritenzione e di sopravvivenza delle cellule infuse nel microambiente ischemico e l'evasione dal sistema immunitario in modo da ridurre o eliminare la necessità di ricorrere alla terapia immunosoppressiva nel post-trapianto (45). Per quanto concerne quest'ultimo punto, alcuni ricercatori stanno sperimentando il knock down delle molecole HLA di classe I coinvolte nel rigetto nel trapianto allogenico attraverso la presentazione degli antigeni alle cellule T CD8<sup>+</sup> (46-48). Tuttavia, le cellule negative per l'HLA di classe I vengono riconosciute ed eliminate dalle cellule natural killer (NK), motivo per cui si stanno anche ingegnerizzando delle linee di cellule staminali embrionali in modo che siano non immunogeniche e che overesprimano anche le proteine HLA-E, inibitrici della lisi cellulare da parte delle cellule NK. Un ulteriore approccio sperimentale che consentirebbe di evitare la terapia immunosoppressiva post-trapianto risiede nella riprogrammazione diretta dei non-cardiomiociti in cardiomiociti nel cuore. In particolare, è stato dimostrato che la trasduzione di tre fattori di trascrizione, Gata4, Mef2c e Tbx5 (GMT), nei fibroblasti cardiaci neonatali di topo è in grado di riprogrammare direttamente queste cellule in cardiomiociti (49) e che l'editing genetico di questi stessi fattori GMT con i retrovirus, con (50) o senza (51) l'aggiunta del fattore di trascrizione Hand2, può dirigere la transdifferenziazione da fibroblasto a cardiomiocita nei topi *in vivo*. Per quanto concerne i fibroblasti umani, questi sono più difficili da riprogrammare in cardiomiociti rispetto ai fibroblasti cardiaci neonatali di topo, richiedendo fattori aggiuntivi (GMT + ESSRG, MESP1, MYOCD e ZEPM2 in (52), GMT + Hand2, T-box5, miocardina, miRNA-1 (miR-1) e miR-133 in (53), o GMT + miR-133 in (54)).

Per quanto riguarda, invece, la problematica delle EA, in uno studio recente Marchiano et al. hanno effettuato nei PSC-CM il knock down dei geni associati alla depolarizzazione, HCN4, CACNA1H e SLC8A1, insieme alla sovraespressione di KCNJ2, associato all'iperpolarizzazione, creando così delle cellule che mancano di automatismo, ma che si contraggono quando stimolate esternamente. Quando trapiantate queste cellule sono in grado di integrarsi con i cardiomiociti ospiti senza causare EA sostenute (55).

Ulteriori studi saranno necessari per dimostrare e assicurare la sicurezza e l'efficacia di questi approcci sperimentali.

## NON CODING RNA E REGOLAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DEI CARDIOMIOCITI

Fino a poco tempo fa si pensava che i miocardiociti maturi dei mammiferi fossero incapaci di proliferare. Oggi esistono, invece, forti evidenze della capacità dei miocardiociti di rientrare nel ciclo cellulare, seppur con una frequenza che diminuisce progressivamente con l'età (56). Numerosi studi stanno dimostrando che tale capacità può essere potenziata attraverso molteplici interventi, tra cui la regolazione dei fattori di trascrizione (57), l'esposizione a condizioni ipossiche (58), l'attivazione del signaling di specifici fattori di crescita, tra cui il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e l'interleuchina-6, e di specifiche citochine (59-60) o la modulazione dei regolatori del ciclo cellulare (ciclina D1, ciclina D2 e p21).

La regolazione delle suddette vie di segnale può essere ottenuta attraverso varie metodologie, tra le quali la più innovativa è rappresentata dall'utilizzo dei non-coding RNA (ncRNA). I ncRNA rappresentano dei trascritti che non sono in grado di codificare per le proteine, ma che svolgono una funzione regolatoria a livello epigenetico, post-trascrizionale e traduzionale (45). I ncRNA sono classificati in due gruppi a seconda della loro lunghezza: small non-coding RNA (sncRNA) e long non-coding RNA (lncRNAs) (61). I microRNA (miRNA) rappresentano un tipo specifico di sncRNA, altamente conservati, lunghi 18-22 nucleotidi e in grado di regolare l'espressione genica legandosi alla regione 3'-UTR dei loro mRNA bersaglio al fine di indurne la degradazione o l'inibizione della traduzione (61). I lncRNA sono lunghi più di 200 nucleotidi e mostrano un alto grado di specificità tissutale e di conservazione sia del pattern di espressione che della struttura del trascritto, pur avendo una sequenza nucleotidica poco conservata (62-65).

Sia i miRNA che i lncRNA sono stati utilizzati per modulare la proliferazione di miocardiociti maturi, offrendo così i presupposti per un nuovo potenziale approccio terapeutico da utilizzare in sinergia con gli altri per la rigenerazione cardiaca (Fig. 1).

Il lavoro svolto negli ultimi anni ha classificato i miRNA coinvolti nella regolazione della proliferazione dei miocardiociti in miRNA che la promuovono e miRNA che la inibiscono.

Per quanto concerne i miRNA coinvolti nella promozione della proliferazione dei miocardiociti, si è cercato di comprendere quali fossero i meccanismi molecolari attraverso i quali essi svolgono il loro ruolo. Una caratteristica comune della maggior parte di questi miRNA è l'attivazione del cofattore trascrizionale YAP, il quale viene mantenuto inattivo attraverso la fosforilazione da parte di una cascata di chinasi, quali TAOK1, MST1/2 e LATS1/2, il riconoscimento da parte dell'ubiquitina ligasi  $\beta$ -TrCP E3 e la successiva degradazione proteosomiale (66-69). In particolare, il miR-302/367 down-regola MST1, LATS2 e MOB1, mentre il miR-199a-3p down-regola TAOK1 e  $\beta$ -TrCP (70). Oltre all'attivazione di YAP, i miRNA coinvolti nella promozione della proliferazione dei miocardiociti hanno come target l'inibitore ciclina chinasi-dipendente p21 (71) o l'oncosoppressore PTEN (72,73). Un'altra caratteristica di questi miRNA è quella di regolare la polimerizzazione dell'actina. In particolare, i miRNA 199a-3p, 1825 e i miRNA della famiglia 302, down-regolano la Cofilin2 (74-75) coinvolta, a sua volta, nell'inibizione dell'assemblaggio dei monomeri di actina e nella depolimerizzazione dei filamenti di actina (70).

Oltre ai miRNA coinvolti nella promozione della proliferazione, sono stati identificati i miRNA in grado di inibire la proliferazione dei miocardiociti. In particolare, sia il miRNA-1 che il miRNA-133 inibiscono la progressione mitotica attraverso la riduzione dell'espressione della ciclina D1: il miRNA-1 ha come target molecolare diretto la ciclina D1, mentre il miRNA-133 inibisce la transizione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S attraverso Sp1, un mediatore della trascrizione della ciclina D1 (76). È stato dimostrato che il miRNA-133 è in grado anche di controllare i livelli della ciclina D2 e di SRF (77). Anche i membri della famiglia dei miRNA-15 (miRNA-15a, miRNA-15b, miRNA-16-1, miRNA-16-2, miRNA-195 e miRNA-497) regolano negativamente il ciclo cellulare dei miocardiociti maturi, attraverso la modulazione di numerosi geni, tra cui Chek1, Cdc2a, Birc5, Nusap1 e Spag5 (78). In particolare, nel modello sperimentale animale è stato dimostrato che l'inibizione della famiglia dei miRNA-15 subito dopo la nascita consente di incrementare la proliferazione dei miocardiociti anche in età adulta, nonché di migliorare la funzionalità del ventricolo sinistro dopo induzione dell'infarto del miocardio (79). Anche miRNA-99/100 partecipano all'inibizione della proliferazione dei miocardiociti, attraverso la modulazione dei loro target Smarca5 ed Fntb (80). In particolare, è stato dimostrato che la downregolazione di questi miRNA consente l'espressione di GATA4, coinvolta nell'embriogenesi e nella differenziazione del miocardio e di numerosi altri markers indici di proliferazione cellulare.

La proliferazione dei miocardiociti è controllata anche da numerosi lncRNA. Il lncRNA AZIN2-sv lega il miRNA-214 bloccando la sua funzione inibitoria su PTEN, che a sua volta agisce come inibitore del pathway di PI3K/Akt (81). Pertanto, la deplezione di questo lncRNA promuove la proliferazione dei miocardiociti. Il lncRNA CAREL lega e blocca il miRNA-296 facendo venir meno l'interazione con i suoi mRNA target Trp53inp1 e Itm2a87, coinvolti, rispettivamente, nell'arresto del ciclo cellulare in fase G1 (82) e nell'espressione di una proteina transmembrana associata all'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M (83). Topi transgenici che overesprimono CAREL nei miocardiociti mostrano alterazioni del ciclo cellulare e della rigenerazione cardiaca nel periodo perinatale. Il lncRNA NR\_045363 rappresenta un lncRNA altamente conservato che interagisce con il miRNA-216a, che a sua volta inibisce la via di segnale JAK2/STAT3 coinvolta nella proliferazione cellulare. La sua somministrazione, mediante l'utilizzo di vettori associati ad adenovirus, inibisce l'apoptosi dei miocardiociti, ne induce la proliferazione e ripristina la funzionalità cardiaca dopo infarto del miocardio nel topo neonato (84). Anche il lncRNA Sirt1-AS (silent information regulator factor 2 related enzyme 1 antisense) rappresenta un lncRNA pro-proliferativo. Esso si lega alla regione 3'-UTR dell'mRNA che codifica per SIRT1, aumentandone la stabilità, e questo a sua volta è in grado di promuovere la proliferazione cellulare. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che Sirt1-AS quando overespresso induce un incremento della proliferazione dei miocardiociti, un potenziamento della capacità rigenerativa del cuore, e anche una riduzione dell'area cicatriziale e della fibrosi in seguito a infarto del miocardio (85). Un ulteriore esempio di lncRNA in grado di promuovere la proliferazione dei miocardiociti è rappresentato da ECRAR (Endogenous Cardiac Regeneration-Associated Regulator), coinvolto nella sintesi del DNA e nella mitosi nei miocardiociti di ratto attraverso il legame e la fosforilazione di ERK1/2, con conseguente attivazione a valle delle cicline D1 ed E1 e del fattore trascrizionale E2F1 (45). Esperimenti condotti sui modelli animali

hanno evidenziato come l'overespressione di ECRAR fosse in grado di stimolare la rigenerazione del miocardio, nonché il recupero della funzionalità cardiaca dopo infarto del miocardio (85); al contrario, il knockdown di ECRAR inibisce sia la proliferazione dei miocardiociti che il recupero dopo infarto del miocardio.

È bene sottolineare come i ncRNA con un ruolo regolatorio nei confronti della proliferazione e della rigenerazione cardiaca noti ad oggi siano davvero numerosi e come alle tipologie suddette vadano aggiunti anche i siRNA, i piRNA (piwi-interacting RNA) e i circRNA (circular RNA) (86-87). Inoltre, prima che i ncRNA possano essere proposti come opzione terapeutica innovativa per la rigenerazione del miocardio è necessario che vengano chiariti gli aspetti legati alla sicurezza e all'efficacia. Infatti, ad oggi, la maggior parte degli esperimenti è stata condotta o *in vitro* o *in vivo* su modelli animali di piccola taglia e, nonostante i risultati promettenti, spesso si verificavano anche la formazione di masse tumorali o il decesso dell'animale. Altri aspetti importanti da affrontare negli studi futuri sono legati all'instabilità dei ncRNA, all'effetto off-target in seguito alla loro somministrazione e all'attivazione del sistema immunitario dell'ospite con produzione di citochine proinfiammatorie e anticorpi.

## INGEGNERIA TISSUTALE

Ad oggi gli studi pre-clinici e clinici relativi agli approcci terapeutici basati sull'utilizzo di cellule staminali per la rigenerazione del miocardio hanno mostrato miglioramenti della funzionalità cardiaca soltanto di lieve entità a causa di molteplici fattori limitanti, tra cui il basso tasso di ritenzione e sopravvivenza delle cellule infuse nell'area ischemica, la mancata maturità strutturale e funzionale dei miocardiociti ottenuti dalle cellule staminali, lo scarso accoppiamento elettromeccanico delle cellule infuse con il tessuto ospite, responsabile a sua volta degli episodi di aritmie. Oggi, l'ingegneria tissutale cardiaca sta cercando di risolvere queste problematiche mediante la progettazione di un tessuto miocardico ingegnerizzato che consenta una migliore ritenzione delle cellule, promuova la loro differenziazione e maturazione, fornisca un supporto meccanico al tessuto danneggiato e rappresenti una piattaforma per il rilascio controllato di specifici farmaci. Oltre alla scelta della tipologia di cellule da utilizzare, la progettazione del tessuto miocardico ingegnerizzato pone molta attenzione anche alla scelta della matrice (88) (Fig. 1). Nello specifico, la scelta e la composizione della matrice sono importanti per assicurare un microambiente idoneo per la sopravvivenza delle cellule e il loro assemblaggio in strutture tridimensionali (89). Tra le sostanze maggiormente utilizzate ad oggi ritroviamo il collagene in virtù delle sue caratteristiche, tra cui la facilità di ottenimento dal tessuto connettivo e la capacità di fornire un supporto meccanico resistente e con un ruolo pilota nello sviluppo dell'organo (90-91). Tra le altre sostanze utilizzate ad oggi con successo spiccano la fibrina e il Matrigel™, una membrana basale solubile estratta dal tumore EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), un tumore ricco di proteine della matrice extracellulare (92-93). Per quanto concerne la componente cellulare, il tessuto miocardico ingegnerizzato viene ottenuto utilizzando numerosi tipi cellulari, compresi i miocardiociti, le cellule stromali con fenotipo fibroblastico e le cellule endoteliali (88). Queste ultime svolgono un ruolo chiave sia intervenendo nel processo di vascolarizzazione, sia secernendo molecole con effetto paracrino sui miocardiociti fondamentale per la loro sopravvivenza, proliferazione e differenziazione.

In uno dei primi studi di applicazione delle tecnologie di ingegneria tissutale cardiaca è stata utilizzata una matrice extracellulare ottenuta con biomateriali e arricchita con FGF- $\beta$  in un modello murino di infarto del miocardio ottenuto con la legatura delle coronarie (94). La valutazione dell'infiammazione, della fibrosi e della performance del miocardio dopo 16 settimane dal trattamento hanno evidenziato la capacità di questo nuovo trattamento chirurgico di attenuare il rimodellamento cardiaco avverso conseguente all'infarto del miocardio nel modello sperimentale animale (94).

Recentemente è stato completato il primo trial clinico condotto nell'uomo finalizzato alla valutazione dell'iniezione transendocardica del VentriGel, una particolare matrice extracellulare ottenuta dal miocardio decellularizzato di suino, nei pazienti con disfunzione ventricolare sinistra dopo infarto del miocardio (95). L'applicazione di questa nuova strategia terapeutica si è dimostrata sicura e fattibile. Inoltre, un'analisi post hoc ha evidenziato come il VentriGel

consenta un miglioramento dei risultati del test del cammino e una riduzione della classe NYHA (New York Heart Association) nell'intera coorte dei pazienti, e una riduzione dei livelli di BNP (Brain Natriuretic Peptide), indice di miglioramento del rimodellamento del ventricolo sinistro, nei pazienti trattati da più di un anno.

Un approccio simile è stato utilizzato in uno studio clinico di fase 1, concluso di recente, denominato PERISCOPE (Pericardial Matrix With Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Patients With Infarcted Myocardial Tissue). Nello specifico, gli investigatori hanno valutato la sicurezza dell'utilizzo di cellule staminali mesenchimali isolate dal tessuto connettivo che circonda i grandi vasi del cordone ombelicale (2 arterie e 1 vena) e seminate su una matrice extracellulare decellularizzata in pazienti che hanno subito un infarto del miocardio in un arco temporale totale di 12 mesi (96). Di recente è stato concluso anche il trial clinico di fase 1-2 denominato BioVAT-HF (Safety and Efficacy of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Engineered Human Myocardium as Biological Ventricular Assist Tissue in Terminal Heart Failure) che ha esaminato l'efficacia dell'utilizzo del muscolo cardiaco ingegnerizzato, costruito da cardiomiociti differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte e da cellule stromali poste in un idrogel di collagene bovino di tipo I, nel processo di rigenerazione cardiaca in pazienti affetti da insufficienza cardiaca avanzata con frazione di eiezione ridotta (HFrEF; EF:  $\leq 35\%$ ) (97).

Tuttavia, nonostante i numerosi dati entusiasmanti, sono ancora molti i quesiti a cui dare una risposta prima di procedere con l'applicazione clinica. Tra questi ritroviamo l'individuazione di un materiale che possa garantire una più alta efficienza di ritenzione delle cellule infuse, di interazione e integrazione con il tessuto ospite, nonché di vascolarizzazione, lo sviluppo di protocolli che consentano la riduzione dell'aritmogenicità e della tumorigenicità delle cellule trapiantate, l'evasione delle cellule immunitarie e il rispetto degli standard GMP (Good Manufacturing Practise). Un altro importante aspetto da considerare è rappresentato dall'assenza, ad oggi, di studi a lungo termine su larga scala. Le risposte ai suddetti quesiti saranno fondamentali per l'applicabilità di questi approcci terapeutici innovativi nella pratica clinica.

## CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Nonostante la ricerca abbia compiuto passi da gigante nel settore della terapia rigenerativa cardiaca negli ultimi vent'anni, sono ancora numerosi gli aspetti da chiarire prima che si possa realizzare la traslazione di questi approcci nella pratica clinica. Tra questi ritroviamo in primis la definizione dei protocolli ad alta efficienza per la somministrazione sia delle cellule con potenziale rigenerativo sia dei ncRNA, la progettazione di un tessuto miocardico ingegnerizzato funzionale e la definizione delle tipologie di pazienti da sottoporre ad un determinato trattamento terapeutico (Fig. 1). Altri aspetti che stanno assumendo un'importanza sempre maggiore riguardano lo studio del ruolo dell'epigenetica (metilazione del DNA, acetilazione delle proteine istoniche, attività degli RNA non codificanti), del ruolo dei signaling metabolici innescati dall'esposizione ai nutrienti e ai ROS, del ruolo delle vescicole extracellulari secrete dalle cellule staminali mesenchimali cardiache dopo un infarto del miocardio, e del ruolo del rilascio intracoronarico dei mitocondri autologhi nei processi rigenerativi del miocardio e di come questi possano essere sfruttati. Inoltre, molti studi condotti negli ultimi anni stanno evidenziando il ruolo fondamentale anche delle cellule residenti nel miocardio e diverse dai cardiomiociti nel supportare la funzionalità cardiaca. Pertanto, la ricerca di nuove strategie per la terapia rigenerativa cardiaca non può prescindere anche da quest'ultimo aspetto.

È bene anche evidenziare che gli attuali modelli animali utilizzati per lo studio dell'insufficienza cardiaca prevedono la legatura dell'arteria coronaria per simulare la cardiomiopatia ischemica o la costrizione aortica trasversale per simulare il sovraccarico pressorio osservato nella stenosi aortica, ma non replicano esattamente la fisiopatologia dello scompenso cardiaco. Pertanto, sarà necessario lavorare anche su questo aspetto al fine di ottenere un modello *in vivo* che non solo rappresenti al meglio l'insufficienza cardiaca umana, ma che consenta anche di eseguire dei test più accurati e precoci mirati alla valutazione dell'efficacia delle nuove potenziali terapie.

Se il futuro prossimo della rigenerazione cardiaca si baserà probabilmente su un approccio terapeutico combinatorio, il futuro remoto consisterà nella definizione di una terapia sicura ed efficace possa diventare lo *standard of care* per i

pazienti con insufficienza cardiaca allo stadio terminale, superando così in maniera definitiva il grave limite attuale della ridotta disponibilità degli organi da trapiantare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lam NT, Sadek HA. Neonatal Heart Regeneration: Comprehensive Literature Review. *Circulation* 138(4): 412-423, 2018.
2. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331(6020): 1078-1080, 2011.
3. Zogbi C, Satrio de Carvalho AET, Nakamuta JS, Caceres V de M, Prando S, Giorgi MCP, et al. Early postnatal rat ventricle resection leads to long-term preserved cardiac function despite tissue hypoperfusion. *Physiol Rep* 2(8): e12115, 2014.
4. Farache Trajano L, Smart N. Immunomodulation for optimal cardiac regeneration: insights from comparative analyses. *NPJ Regen Med* 6(1): 8, 2021.
5. Ma Y. Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction. *Cells* 10(7): 1676, 2021.
6. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 116(6): 1101-1112, 2020.
7. Bevan L, Lim ZW, Venkatesh B, Riley PR, Martin P, Richardson RJ. Specific macrophage populations promote both cardiac scar deposition and subsequent resolution in adult zebrafish. *Cardiovasc Res* 116(7): 1357-1371, 2020.
8. Toor IS, Rückerl D, Mair I, Ainsworth R, Meloni M, Spiroski AM, et al. Eosinophil Deficiency Promotes Aberrant Repair and Adverse Remodeling Following Acute Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 5(7): 665-681, 2020.
9. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 157(3): 565-579, 2014.
10. Zhao Q, Sun Q, Zhou L, Liu K, Jiao K. Complex Regulation of Mitochondrial Function During Cardiac Development. *J Am Heart Assoc* 8(13): e012731, 2019.
11. Sim CB, Ziemann M, Kaspi A, Harikrishnan KN, Ooi J, Khurana I, et al. Dynamic changes in the cardiac methylome during postnatal development. *FASEB J* 29(4): 1329-1343, 2015.
12. Sattler S, Rosenthal N. The neonate versus adult mammalian immune system in cardiac repair and regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1863(7 Pt B): 1813-1821, 2016.
13. Das S, Goldstone AB, Wang H, Farry J, D'Amato G, Paulsen MJ, et al. A Unique Collateral Artery Development Program Promotes Neonatal Heart Regeneration. *Cell* 176(5): 1128-1142.e18, 2019.
14. Payumo AY, Chen X, Hirose K, Chen X, Hoang A, Khyeam S, et al. Adrenergic-Thyroid Hormone Interactions Drive Postnatal Thermogenesis and Loss of Mammalian Heart Regenerative Capacity. *Circulation* 144(12): 1000-1003, 2021.
15. Hirose K, Payumo AY, Cutie S, Hoang A, Zhang H, Guyot R, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science* 364(6436): 184-188, 2019.
16. Tampakakis E, Gangrade H, Glavaris S, Htet M, Murphy S, Lin BL, et al. Heart neurons use clock genes to control myocyte proliferation. *Sci Adv* 7(49): eabh4181, 2021.
17. Bray MS, Shaw CA, Moore MWS, Garcia RAP, Zanquetta MM, Durgan DJ, et al. Disruption of the circadian clock within the cardiomyocyte influences myocardial contractile function, metabolism, and gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2): H1036-1047, 2008.
18. Durgan DJ, Trexler NA, Egbejimi O, McElfresh TA, Suk HY, Petterson LE, et al. The circadian clock within the cardiomyocyte is essential for responsiveness of the heart to fatty acids. *J Biol Chem* 281(34): 24254-2469, 2006.
19. Michler RE. The current status of stem cell therapy in ischemic heart disease. *J Card Surg* 33(9): 520-531, 2018.
20. Pompilio G, Nigro P, Bassetti B, Capogrossi MC. Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: The Never Ending Story. *Circ Res* 117(6): 490-493, 2015.
21. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167(10): 989-997, 2007.
22. Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials. *Circ Res* 117(6): 558-575, 2015.

23. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 13(12): 4279-4295, 2002.
24. Jun Hong S, Rogers PI, Kihlken J, Warfel J, Bull C, Deuter-Reinhard M, et al. Intravenous xenogeneic transplantation of human adipose-derived stem cells improves left ventricular function and microvascular integrity in swine myocardial infarction model. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 86(2): E38-48, 2015.
25. Yu LH, Kim MH, Park TH, Cha KS, Kim YD, Quan ML, et al. Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissue-derived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 139(2): 166-172, 2010.
26. Araña M, Gavira JJ, Peña E, González A, Abizanda G, Cilla M, et al. Epicardial delivery of collagen patches with adipose-derived stem cells in rat and minipig models of chronic myocardial infarction. *Biomaterials* 35(1): 143-151, 2014.
27. Henry TD, Pepine CJ, Lambert CR, Traverse JH, Schatz R, Costa M, et al. The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 89(2): 169-177, 2017.
28. Perin EC, Sanz-Ruiz R, Sánchez PL, Lasso J, Pérez-Cano R, Alonso-Farto JC, et al. Adipose-derived regenerative cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The PRECISE Trial. *American Heart Journal* 168(1): 88-95.e2, 2014.
29. Marbán E, Liao K. On the cellular origin of cardiosphere-derived cells (CDCs). *Basic Res Cardiol* 117(1): 12, 2022.
30. Sousonis V, Nanas J, Terrovitis J. Cardiosphere-derived progenitor cells for myocardial repair following myocardial infarction. *Curr Pharm Des* 20(12): 2003-2011, 2014.
31. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation* 125(1): 100-112, 2012.
32. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115(7): 896-908, 2007.
33. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, Terrovitis J, Sun B, Galang G, et al. Allogeneic Cardiospheres Safely Boost Cardiac Function and Attenuate Adverse Remodeling After Myocardial Infarction in Immunologically Mismatched Rat Strains. *Journal of the American College of Cardiology* 61(10): 1108-1119, 2013.
34. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, Yee K, Seinfeld J, Tseliou E, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation* 128(25): 2764-2775, 2013.
35. Grigorian-Shamagian L, Liu W, Fereydooni S, Middleton RC, Valle J, Cho JH, et al. Cardiac and systemic rejuvenation after cardiosphere-derived cell therapy in senescent rats. *European Heart Journal* 38(39): 2957-2967, 2017.
36. Makkar RR, Kereiakes DJ, Aguirre F, Kowalchuk G, Chakravarty T, Malliaras K, et al. Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *European Heart Journal* 41(36): 3451-3458, 2020.
37. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet* 379(9819): 895-904, 2012.
38. Lalit PA, Hei DJ, Raval AN, Kamp TJ. Induced pluripotent stem cells for post-myocardial infarction repair: remarkable opportunities and challenges. *Circ Res* 114(8): 1328-1345, 2014.
39. Chong JJH, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510(7504): 273-277, 2014.
40. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 36(7): 597-605, 2018.
41. Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, et al. Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 12(5): 967-981, 2019.

42. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, et al. Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538(7625): 388-391, 2016.
43. Nakamura K, Neidig LE, Yang X, Weber GJ, El-Nachef D, Tsuchida H, et al. Pharmacologic therapy for engraftment arrhythmia induced by transplantation of human cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 16(10): 2473-2487, 2021.
44. Menasché P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 71(4): 429-438, 2018.
45. Pezhouman A, Nguyen NB, Kay M, Kanjilal B, Noshadi I, Ardehali R. Cardiac regeneration - Past advancements, current challenges, and future directions. *J Mol Cell Cardiol* 182: 75-85, 2023.
46. Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, Rioloobos L, Lopes VS, Manske G, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35(8): 765-772, 2017.
47. Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, Zumaquero E, Lund FE, Randall TD, et al. Human leukocyte antigen class I and II knockout human induced pluripotent stem cell-derived cells: Universal donor for cell therapy. *Journal of the American Heart Association* 7(23), 2018.
48. Deuse T, Hu X, Cravina A, Wang D, Tediashvili G, De C, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol* 37(3): 252-258, 2019.
49. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142(3): 375-386, 2010.
50. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 485(7400): 599-604, 2012.
51. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485(7400): 593-598, 2012.
52. Fu JD, Stone NR, Liu L, Spencer CI, Qian L, Hayashi Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports* 1(3): 235-247, 2013.
53. Nam YJ, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth K, West K, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(14): 5588-5593, 2013.
54. Zhou Y, Liu Z, Welch JD, Gao X, Wang L, Garbutt T, et al. Single-Cell Transcriptomic Analyses of Cell Fate Transitions during Human Cardiac Reprogramming. *Cell Stem Cell* 25(1): 149-164.e9, 2019.
55. Marchiano S, Nakamura K, Reinecke H, Neidig L, Lai M, Kadota S, et al. Gene editing to prevent ventricular arrhythmias associated with cardiomyocyte cell therapy. *Cell Stem Cell* 30(4): 396-414.e9, 2023.
56. Garbern JC, Lee RT. Heart regeneration: 20 years of progress and renewed optimism. *Dev Cell* 57(4): 424-439, 2022.
57. Padula SL, Velayutham N, Yutzey KE. Transcriptional Regulation of Postnatal Cardiomyocyte Maturation and Regeneration. *Int J Mol Sci* 22(6): 3288, 2021.
58. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, Abdilsalaam S, Asaithamby A, Santos CX, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature* 541(7636): 222-227, 2017.
59. D'Uva G, Aharonov A, Lauriola M, Kain D, Yahalom-Ronen Y, Carvalho S, et al. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol* 17(5): 627-638, 2015.
60. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cuñado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 525(7570): 479-485, 2015.
61. Braga L, Ali H, Secco I, Giacca M. Non-coding RNA therapeutics for cardiac regeneration. *Cardiovasc Res* 117(3): 674-693, 2021.
62. Washietl S, Kellis M, Garber M. Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals. *Genome Res* 24(4): 616-628, 2014.
63. Marques AC, Ponting CP. Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness. *Genome Biology* 10(11): R124, 2009.



64. Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. Conserved Function of lincRNAs in Vertebrate Embryonic Development despite Rapid Sequence Evolution. *Cell* 147(7): 1537-1550, 2011.
65. Kapusta A, Feschotte C. Volatile evolution of long noncoding RNA repertoires: mechanisms and biological implications. *Trends in Genetics* 30(10): 439-452, 2014.
66. Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell* 21(5): 888-895, 2011.
67. Plouffe SW, Meng Z, Lin KC, Lin B, Hong AW, Chun JV, et al. Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol Cell* 64(5): 993-1008, 2016.
68. Poon CLC, Lin JI, Zhang X, Harvey KF. The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. *Dev Cell* 21(5): 896-906, 2011.
69. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang CY, Guan KL. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* 24(1): 72-85, 2010.
70. Torrini C, Cubero RJ, Dirkx E, Braga L, Ali H, Prosdocimo G, et al. Common Regulatory Pathways Mediate Activity of MicroRNAs Inducing Cardiomyocyte Proliferation. *Cell Rep* 27(9): 2759-2771.e5, 2019.
71. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Belloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 40(12): 1478-1483, 2008.
72. Alexander MS, Casar JC, Motohashi N, Vieira NM, Eisenberg I, Marshall JL, et al. MicroRNA-486-dependent modulation of DOCK3/PTEN/AKT signaling pathways improves muscular dystrophy-associated symptoms. *J Clin Invest* 124(6): 2651-2667, 2014.
73. Chen J, Huang ZP, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, et al. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circulation research* 112(12), 2013.
74. Bernstein BW, Bamberg JR. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20(4): 187-195, 2010.
75. Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MAO, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(7): 405-415, 2013.
76. Zhang D, Li X, Chen C, Li Y, Zhao L, Jing Y, et al. Attenuation of p38-mediated miR-1/133 expression facilitates myoblast proliferation during the early stage of muscle regeneration. *PLoS One* 7(7): e41478, 2012.
77. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 22(23): 3242-3254, 2008.
78. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circulation Research* 109(6): 670-679, 2011.
79. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(1): 187-192, 2013.
80. Aguirre A, Montserrat N, Zacchigna S, Nivet E, Hishida T, Krause MN, et al. In Vivo Activation of a Conserved MicroRNA Program Induces Mammalian Heart Regeneration. *Cell Stem Cell* 15(5): 589-604, 2014.
81. Li X, He X, Wang H, Li M, Huang S, Chen G, et al. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration. *Cardiovasc Res* 114(12): 1642-1655, 2018.
82. Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, et al. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* 24(55): 8093-8104, 2005.
83. Nguyen TMH, Shin IW, Lee TJ, Park J, Kim JH, Park MS, et al. Loss of ITM2A, a novel tumor suppressor of ovarian cancer through G2/M cell cycle arrest, is a poor prognostic factor of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 140(3): 545-553, 2016.
84. Wang J, Chen X, Shen D, Ge D, Chen J, Pei J, et al. A long noncoding RNA NR\_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 127: 105-114, 2019.
85. Li B, Hu Y, Li X, Jin G, Chen X, Chen G, et al. Sirt1 antisense long noncoding rna promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of sirt1. *Journal of the American Heart Association* 7(21), 2018.

86. Huang S, Li X, Zheng H, Si X, Li B, Wei G, et al. Loss of Super-Enhancer-Regulated circRNA Nfix Induces Cardiac Regeneration After Myocardial Infarction in Adult Mice. *Circulation* 139(25): 2857-2876, 2019.
87. Zhou Y, Fang Y, Dai C, Wang Y. PiRNA pathway in the cardiovascular system: a novel regulator of cardiac differentiation, repair and regeneration. *J Mol Med* 99(12): 1681-1690, 2021.
88. Fujita B, Zimmermann WH. Myocardial tissue engineering strategies for heart repair: current state of the art. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 27(6): 916-920, 2018.
89. Mn G, C A, T C, Ht T. Current state of the art in myocardial tissue engineering. *Tissue engineering* [Internet]. agosto 2007 [citato 13 novembre 2023];13(8). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17518754/>.
90. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13(7): 1637-1652, 1989.
91. Carver W, Terracio L, Borg TK. Expression and accumulation of interstitial collagen in the neonatal rat heart. *Anat Rec* ;236(3): 511-520, 1993.
92. Navaee F, Renaud P, Kleger A, Braschler T. Highly Efficient Cardiac Differentiation and Maintenance by Thrombin-Coagulated Fibrin Hydrogels Enriched with Decellularized Porcine Heart Extracellular Matrix. *Int J Mol Sci* 24(3): 2842, 2023.
93. Johnson TD, Christman KL. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin Drug Deliv* 10(1): 59-72, 2013.
94. Mewhort HEM, Turnbull JD, Meijndert HC, Ngu JMC, Fedak PWM. Epicardial infarct repair with basic fibroblast growth factor-enhanced CorMatrix-ECM biomaterial attenuates postischemic cardiac remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 147(5): 1650-1659, 2014.
95. Traverse JH, Henry TD, Dib N, Patel AN, Pepine C, Schaer GL, et al. First-in-Man Study of a Cardiac Extracellular Matrix Hydrogel in Early and Late Myocardial Infarction Patients. *JACC: Basic to Translational Science*. 4(6): 659-669, 2019.
96. Study Details | Pericardial Matrix With Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Patients With Infarcted Myocardial Tissue | [ClinicalTrials.gov](https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT03798353?distance=50&term=Wharton%27s%20jelly-derived%20mesenchymal%20stem%20cells%20from%20human%20umbilical%20cords&cond=Heart%20Diseases&rank=3) [Internet]. [citato 13 novembre 2023]. <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT03798353?distance=50&term=Wharton%27s%20jelly-derived%20mesenchymal%20stem%20cells%20from%20human%20umbilical%20cords&cond=Heart%20Diseases&rank=3>.
97. Study Details | Safety and Efficacy of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Engineered Human Myocardium as Biological Ventricular Assist Tissue in Terminal Heart Failure | [ClinicalTrials.gov](https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT04396899?distance=50&term=collagen-based%20and%20stromal%20cells%20&cond=Heart%20Diseases&rank=1) [Internet]. [citato 13 novembre 2023]. <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT04396899?distance=50&term=collagen-based%20and%20stromal%20cells%20&cond=Heart%20Diseases&rank=1>.