

MEDICINA SPERIMENTALE

RIGENERAZIONE CARDIACA: UN TRAGUARDO POSSIBILE

Cardiac regeneration: a possible goal

MAURO GIACCA^{1,2}

¹King's College London, British Heart Foundation Centre of Research Excellence, School of Cardiovascular Medicine & Sciences, London UK;

²Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste e International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste

SUMMARY

Cardiac regeneration has long been considered an arduous to achieve goal in experimental cardiology and a holy grail in the clinic. Failure of clinical trials using adult stem cells and lack of evidence of the actual existence of such cells have fueled the conclusion that the heart is an irreversibly post-mitotic organ. A possible manner to overcome this problem is the implantation of exogenously grown cardiomyocytes obtained from the differentiation of embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells in the laboratory. These cells can be implanted either as suspensions or after the formation of contractile myocardial tissue. An alternative approach is to reawaken the endogenous capacity of cardiomyocytes to proliferate, based on the observation that, in contrast to mammals, other species continue to regenerate their hearts throughout life, and that the mammalian heart itself has regenerative capacity until birth. In these cases, regeneration occurs through the proliferation of already formed cardiomyocytes, which partially revert their terminal differentiation and re-enter the cell cycle. The recent success of both approaches in large animals now fuels the excitement that cardiac regeneration is indeed possible. A few technical hurdles, however, need to be solved before clinical application is eventually successful.

Key words: Cardiac regeneration, experimental cardiology, embryonic stem cell, cardiomyocyte, cardiac failure.

Introduzione

Esiste un bisogno impellente di trovare nuove terapie per lo scompenso cardiaco che in molti pazienti è causato da un infarto al miocardio o da altre patologie che causa-

no la perdita di cardiomiociti. Nonostante l'affinamento dell'approccio farmacologico allo scompenso e il successo delle terapie meccaniche di supporto (1), la prognosi di questa condizione rimane infausta, con un tasso di mortalità che continua a essere stimato intorno al 40% dei pazienti soltanto a 4 anni dopo la diagnosi (2), peggiore quindi che nella maggior parte dei tumori. Lo scompenso cardiaco è anche particolarmente costoso, se si considera che assorbe il 2-3% della spesa dei servizi sanitari nazionali nei paesi industrializzati, con una proie-

Indirizzo per la corrispondenza

Mauro Giacca, MD, PhD
King's College London
School of Cardiovascular Medicine & Sciences
The James Black Centre
125 Coldharbour Lane, London SE5 9NU
E-mail: mauro.giacca@kcl.ac.uk

zione a più che raddoppiare nei prossimi 20 anni (3, 4).

Se si considerano i farmaci attualmente disponibili per lo scompenso cardiaco, questi sono progrediti in maniera soltanto marginale da metà degli anni '90, quando sono stati introdotti i sartani, antagonisti dei recettori per l'angiotensina II (5). La terapia è ancora basata sull'utilizzo cardine di ACE inibitori e beta-bloccanti, il cui sviluppo data alla metà degli anni '70. Mentre viene ora risposta molta speranza nell'effetto cardiovascolare inatteso, e alquanto sorprendente, degli inibitori di SGLT2 (glifozine) (6), non esiste ancora alcuna spiegazione molecolare in grado di giustificare questo effetto. Per quanto riguarda la relativamente recente combinazione tra inibitori del recettore dell'angiotensina e della neprilisina (ARNI) (7), questa si basa su due farmaci anch'essi individualmente sviluppati negli anni '90. Per lo scompenso cardiaco, non soltanto un numero considerevole di piccole molecole chimiche è fallito in trial clinici di fase III (8), ma non esiste a tutt'oggi nessuna terapia biologica, comprendendo in questa categoria anticorpi monoclonali, proteine ricombinanti, terapia genica e terapia cellulare (9). Più in generale, nell'intero campo delle malattie cardiache, non si è di fatto assistito alla rivoluzione che le terapie biologiche hanno consentito in altri settori della medicina, in particolare nel campo delle malattie oncologiche e reumatologiche.

Il problema della perdita dei cardiomiociti

Sta diventando progressivamente sempre più chiaro che uno dei problemi principali che sottendono allo sviluppo dello scompenso cardiaco è legato al progressivo invecchiamento della popolazione e alla mancanza di capacità rigenerativa del cuo-

re. L'infarto acuto del miocardio può portare a morte fino al 25% dei cardiomiociti del ventricolo sinistro, corrispondente a circa 1 miliardo di cellule (10). La riperfusione mediante cateterismo coronario percutaneo ripristina il flusso ma può essa stessa causare morte dei cardiomiociti tramite l'induzione di stress ossidativo improvviso (11). Oltre a queste condizioni di morte acuta dei cardiomiociti, virtualmente tutte le altre malattie cardiache portano anche a morte le cellule cardiache in maniera progressiva. Questo è il caso delle condizioni da sovraccarico del ventricolo sinistro, come la cardiomiopatia ipertensiva (12) o la stenosi aortica (Hein et al., 2003), o la morte avviene in corso di miocardite (13), sindrome di Takotsubo (14) e cardiomiopatia peri-partum (15). La morte dei cardiomiociti è una costante che accompagna virtualmente anche tutte le forme di cardiomiopatie su base ereditaria, inclusa la distrofia muscolare di Duchenne (16), la cardiomiopatia di Danon (17), o la cardiomiopatia dovuta a difetti della desmina (18). Esistono ampie evidenze di perdita di cardiomiociti sia nei pazienti con cardiomiopatia dilatativa che in quelli con cardiomiopatia ipertrofica o con cardiomiopatia aritmogena del ventricolo destro (ARVD/C) (19). Infine, muore un considerevole numero di cardiomiociti durante gli interventi di cardiocirurgia, in particolare dopo la riperfusione, e nei pazienti trattati con terapie antineoplastiche, in particolare utilizzando antracicline (20). Più in generale, la perdita di cardiomiociti è un inevitabile correlato dell'invecchiamento a livello cardiaco (21).

La perdita di cardiomiociti, acuta o cronica, non è accompagnata nei mammiferi, e quindi nell'uomo, da una significativa generazione di nuove cellule. Questa conclusione deriva da almeno tre livelli di evidenza scientifica. Primo, la datazione con carbonio 14 del DNA umano indica che il tasso di rin-

novamento dei cardiomiociti in individui di oltre 70 anni è di meno del 50%, il che di fatto indica che la maggior parte di queste cellule in un individuo adulto è la stessa generata al momento della nascita (22). Secondo, misurazioni ottenute tramite *imaging* con spettrometria di massa (una tecnologia, peraltro, non di comune utilizzo) hanno indicato che il tasso di riproduzione dei cardiomiociti è di circa 1% per anno, con aumento a circa il 3% dopo un infarto del miocardio; questi valori sono in linea con quelli ottenuti con la datazione usando l'isotopo del carbonio. Terzo, la medesima informazione è stata anche ottenuta in diversi studi che hanno analizzato il tasso di sintesi del DNA, quale indicatore della duplicazione delle cellule, direttamente nel cuore del topo (23).

La mancanza di rinnovamento del cuore riflette l'incapacità di replicarsi dei cardiomiociti. Queste cellule si duplicano attivamente durante la vita embrionale, fetale e quella immediatamente seguente alla nascita, ma cessano di farlo repentinamente nei primi giorni o settimane dopo la nascita (24). Di conseguenza, il cuore è capace di rigenerarsi se danneggiato prima e immediatamente dopo la nascita, ma cessa di farlo successivamente. Ad una settimana dopo la nascita nel topo, un danno al miocardio è invariabilmente riparato con la formazione di una cicatrice. Osservazioni simili sono anche riportate nei maiali (25). Un caso aneddotico in un neonato che era andato incontro a un infarto cardiaco per una condizione familiare che predisponeva alla trombosi indica che una simile caratteristica rigenerativa è propria anche dell'uomo nell'immediato periodo postnatale (26).

L'incapacità del cuore dei mammiferi di rigenerarsi nella vita adulta è in palese contrasto con quanto accade in alcuni pesci e negli anfibi, nei quali la capacità rigenerativa persiste durante tutta la vita (27, 28). A questo proposito, è interessante osservare

come la rigenerazione in questi animali è sostenuta dalla de-differenziazione limitata e parziale dei cardiomiociti preesistenti e non dalla presenza o dal reclutamento di cellule staminali (29, 30). Nel topo adulto, esiste ancora un limitato stimolo rigenerativo nella regione che circonda un infarto (23, 31), ma questo è abortivo e il numero di nuovi cardiomiociti che si vengono a formare è largamente al di sotto di quanto sarebbe necessario per ottenere la formazione di una quantità sufficiente di tessuto miocardico in grado di avere un impatto dal punto di vista clinico.

Negli ultimi 10 anni la ricerca dei motivi per cui i cardiomiociti sono in grado di replicarsi prima e immediatamente dopo la nascita mentre perdono questa capacità successivamente è stata intensa. È opinione prevalente in questo momento che la perdita di capacità proliferativa è legata a una serie di eventi molecolari e biochimici che avvengono in maniera subitanea al momento della nascita stessa. L'aumento nel post-carico pressorio a livello delle camere cardiache (32), la mancanza di fattori o cellule prodotte dalla madre (come le cellule T-regolatorie (33)), l'aumento improvviso della tensione di ossigeno (il cuore del feto nel ventre della madre è un organo venoso) (34), il cambiamento repentino nella situazione ormonale (35) o l'improvviso cambiamento dell'assetto metabolico dal consumo di zuccheri (glicolisi) a quello di acidi grassi (beta ossidazione dei lipidi) (36) sono tutti eventi potenzialmente correlati con la perdita di capacità proliferativa dei cardiomiociti. Con ogni probabilità, i motivi sono molteplici e combinatori di questi fattori. Di fatto, dopo la nascita, la stimolazione dei cardiomiociti risulta in un aumento delle loro dimensioni e nell'assemblaggio della struttura sarcomerica (ipertrofia) anziché nella duplicazione cellulare.

Fattori e vie metaboliche che regolano la proliferazione dei cardiomiociti

Non diversamente da tutti gli altri tipi di cellule, la regolazione della proliferazione dei cardiomiociti nella vita fetale e neonatale dipende dall'azione combinata di molteplici fattori che, dall'esterno della cellula, segnalano attraverso la membrana plasmatica e inducono delle vie di trasduzione del segnale che alla fine arrivano al nucleo e stimolano l'entrata delle cellule nel ciclo cellulare. Le principali di queste vie di segnalazione sono riassunte in questa sezione e riassunte nella *Figura 1*.

Fattori di crescita e loro recettori

Sono diversi i fattori di crescita in grado di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti embrionali e neonatali, condizioni nelle quali la duplicazione di queste cellule può avvenire spontaneamente. Queste in-

cludono l'interleuchina 6 (IL-6) (37, 38), platelet-derived growth factor (PDGF) (39), alcuni membri della famiglia del fibroblast growth factor (FGF) (40, 41), follistatin-like 1 (Fstl1) (42) e neuregulin-1 (NRG1) (43-45). La capacità di controllare in maniera paracrina la proliferazione dei cardiomiociti è stata anche riportata per fattori secreti dalle cellule T regolatorie (33) e dai monociti residenti nel parenchima cardiaco (46). Infine, la duplicazione dei cardiomiociti è anche stimolata da cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare, in particolare mediati dalla proteina agrin (47). Questo fattore, che è un componente della matrice extracellulare neonatale, stimola la proliferazione dei cardiomiociti attraverso un meccanismo che coinvolge il disassemblaggio del complesso cui è ancorata da un lato la laminina e dall'altro la distrofina (il dystrophin-glycoprotein complex, DGC (47)).

Vie di trasduzione del segnale

È noto che almeno tre principali vie di trasduzione del segnale possono prendere parte nella regolazione della proliferazione dei cardiomiociti durante la vita embrionale, fetale e immediatamente dopo la nascita. Durante lo sviluppo embrionale, la proliferazione dei cardiomiociti è regolata dal *pathway di Wnt* e della β -catenina. In assenza di Wnt, i livelli della β -catenina nel citoplasma sono bassi, dal momento che questa proteina viene distrutta da un complesso proteico che comprende la proteina GSK-3 β (48). Nei cardiomiociti, l'inibizione di GSK-3 β utilizzando tecniche genetiche (49) o grazie all'effetto dell'inibitore biochimico BIO (50) determina la stabilizzazione dei livelli di β -catenina e la conseguente traslocazione di questa proteina nel nucleo, dove agisce da co-attivatore trascrizionale dei membri della famiglia del *T cell factor (TCF)/Lymphoid enhancer factor (LEF)*,

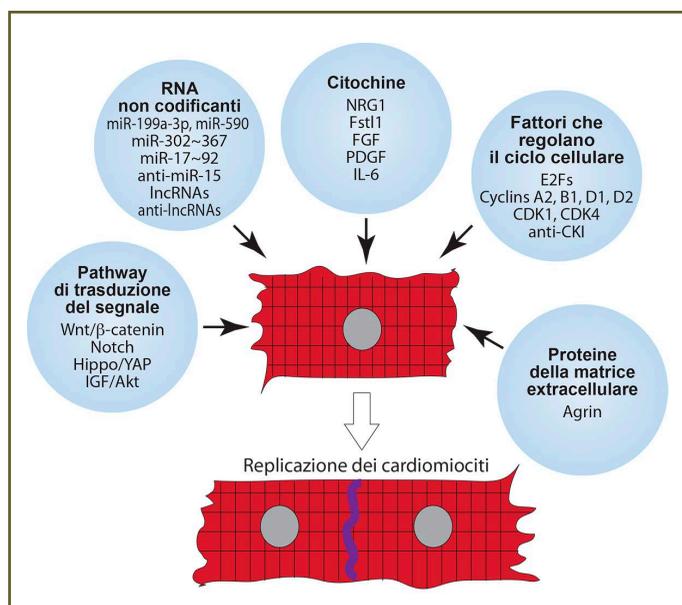


Figura 1 - Proteine intracellulari ed extracellulari, geni e RNA non-codificanti che regolano la proliferazione dei cardiomiociti e la rigenerazione cardiaca.

cui consegue l'attivazione della proliferazione cellulare.

Un secondo meccanismo importante che regola la proliferazione dei cardiomiociti è quello che deriva dall'attivazione della via di trasduzione del segnale regolata da Notch. Questa via richiede il contatto cellula-cellula, dal momento che dipende dal legame del recettore Notch, espresso dai cardiomiociti, con uno dei suoi interattori, in particolare la proteina Jagged1 nel cuore. A questa interazione fa seguito la traslocazione del dominio intracellulare del recettore Notch (Notch intracellular domain, ICD) nel nucleo, dove questa proteina agisce da co-attivatore trascrizionale (51). Questa via di trasduzione del segnale regola la proliferazione dei cardiomiociti durante la vita fetale e neonatale (52-54).

Una terza via biochimica essenziale nella regolazione dei cardiomiociti converge nell'attivazione di un altro co-attivatore trascrizionale, la proteina YAP, e il suo fattore strutturalmente simile TAZ. Queste proteine rappresentano gli effettori del *pathway* di Hippo, noto per controllare la proliferazione di molteplici tipi cellulari nell'organismo, incluse diverse cellule tumorali. Nei cardiomiociti usciti dal ciclo cellulare, la proteina YAP è mantenuta inattiva da parte di una serie di protein-chinasi che prevengono la sua traslocazione all'interno del nucleo e stimolano altresì la sua degradazione. Queste chinasi includono le proteine LATS1/2 e il loro co-fattori MOB1 e MST1/2 (quest'ultimo chiamato Hippo nella *Drosophila*, da cui il nome della via metabolica), insieme all'ulteriore co-fattore SAV1. Altre proteina-chinasi con attività inibitoria comprendono le proteine TAOK1 e STKL38. La regolazione tramite la via di Hippo rappresenta la principale modalità con cui le cellule rispondono agli stimoli meccanici, in grado di trasdurre la sensazione di stiramento e tensione dalla matrice extracellulare fino all'interno del

nucleo della cellula. La delezione per via genetica di MST1, SAV1 e LATS determina un aumento del numero delle cellule (iperplasia cellulare) (55), mentre, al contrario, l'iperpressione di MST1 (56) o LATS2 (57) causa cardiomiopatia dilatativa dopo la nascita. Allo stesso modo, animali transgenici che esprimono una forma sempre attiva di YAP (YAPS112A) sviluppano proliferazione anormale dei cardiomiociti (58, 59).

Regolatori del ciclo cellulare

In maniera non dissimile da tutti gli altri tipi cellulari, la regolazione della proliferazione dei cardiomiociti è anche controllata da una serie di attivatori e inibitori del ciclo cellulare che convergono, nella loro azione, sul controllo delle chinasi regolate da ciclina (Cyclin/CDK). Numerose pubblicazioni negli ultimi anni hanno dimostrato come l'iperpressione dei fattori di trascrizione della famiglia di E2F (60-62), o della ciclina D1 o D2 (63-65) possono determinare iperproliferazione dei cardiomiociti. Risultati analoghi sono determinati dalla soppressione dell'espressione degli inibitori delle chinasi dipendenti da ciclina $p21^{WAF1/CIP1}$, $p27^{KIP1}$ e $p57^{KIP2}$ (66), o da quella di Meis1, un fattore di trascrizione omeotico che attiva l'espressione di $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1/CIP1}$ (67). Topi transgenici che esprimono alti livelli di ciclina A2 (68, 69), $cdk2$ (70), ciclina D1 (63) e ciclina D2 (71, 72) sviluppano iperproliferazione dei cardiomiociti.

Cellule staminali e geni che stimolano la rigenerazione cardiaca

A partire dagli anni 2000, la comunità cardiologica ha iniziato a sviluppare un grande interesse verso lo sviluppo di strategie atte a stimolare la rigenerazione cardiaca. Sedotte dall'idea, largamente erronea, che tutti gli organi potessero contenere cellule staminali e che queste addirittura circo-

lassero nel sangue, diverse sperimentazioni cliniche si sono basate sulla somministrazione di presunte cellule staminali prelevate dal midollo osseo (cellule totali, purificate per esprimere l'antigene c-kit o marcatori di cellule mesenchimali stromali (73, 74)) subito dopo l'infarto del miocardio o in corso di scompenso cardiaco conclamato. Altre sperimentazioni si sono anche basate sulla presunta e altrettanto erronea idea che il cuore stesso potesse contenere cellule staminali con potenziale rigenerativo (75, 76).

Nonostante un'evidenza del tutto marginale di un possibile beneficio, legato sostanzialmente a un transitorio effetto paracrino (77, 78), l'esito di queste sperimentazioni si è rivelato largamente fallimentare. Esiste oggi un consenso esteso sulla conclusione che non esistono cellule staminali in grado di rigenerare il cuore se non nelle prime fasi dello sviluppo embrionale, e certamente non nel midollo, nel cuore o in altri organi adulti (79). Una commissione d'inchiesta che ha analizzato alcune delle sperimentazioni originali ha rivelato l'esistenza di incongruenze tali da richiedere la ritrazione di un numero considerevole di studi scientifici originariamente pubblicati anche in riviste di primo piano (<http://circ.ahajournals.org/content/129/16/e466.full.pdf+html>) e messo in dubbio la correttezza di altri ([http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60608-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60608-5)).

La formazione di nuovi cardiomiociti, peraltro, può essere ottenuta da cellule staminali embrionali (ES) o cellule funzionalmente analoghe a queste ottenute con la tecnologia delle cellule iPS. Questi nuovi cardiomiociti possono essere iniettati nel cuore infartuato per ottenerne una parziale rigenerazione. Questo approccio è stato utilizzato in alcuni interessanti esperimenti preliminari nelle scimmie a Seattle (80, 81) ed è attualmente perseguito a livello di sperimentazione clinica. Le principali problematiche di

questa strategia sono due. Primo, che i cardiomiociti che si ottengono in laboratorio dalle cellule ES o iPS hanno caratteristiche largamente embrionali, e quindi si integrano con difficoltà con il tessuto miocardico preesistente; secondo, che l'inoculo di un numero così grande di cellule, tale da rigenerare un cuore adulto (dell'ordine di un miliardo di cellule), causa importanti fenomeni aritmici nelle prime due settimane dall'inoculo.

Una strategia più complessa, ancora basata sull'utilizzo di cellule ES o iPS, consiste nella formazione di foglietti tri-dimensionali di tessuto cardiaco in grado di integrare cardiomiociti, fibroblasti e, potenzialmente, anche altri tipi cellulari (82, 83). Questo approccio è molto promettente per ottenere strati di miocardio contrattile, che possono essere suturati dall'esterno al tessuto infartuato o cicatriziale, ottenendo anche una minima (almeno per ora) integrazione elettrica e funzionale con il preesistente miocardio. Le prime sperimentazioni cliniche con questo tipo di tessuto ingegnerizzato sono attualmente in corso a Goettingen, in Germania.

L'idea di ovviare alla perdita di tessuto miocardico per un danno acuto (infarto) o cronico mediante la somministrazione di nuovi cardiomiociti è intuitiva, ma non necessariamente riflette quanto accade in natura nelle condizioni in cui avviene la rigenerazione cardiaca. Come discusso in precedenza, sia i mammiferi alla nascita sia pesci e anfibi rigenerano un danno al miocardio mediante la proliferazione delle cellule cardiache esistenti. Per decenni, tuttavia, si è ritenuto impossibile che questo possa avvenire anche nel cuore adulto di un mammifero. Tuttavia, recenti risultati sperimentali hanno infranto questo paradigma. Topi transgenici in grado di riattivare YAP o inibire la proteina Salvador, in cofattore di MST1 (cfr. in precedenza) sono in grado di rigenerare il proprio miocardio

anche quando il danno è già stato riparato con una cicatrice (59, 84, 85). Inoltre, la rigenerazione miocardica è stata anche osservata somministrando un cocktail di fattori in grado di stimolare l'ingresso dei cardiomiociti nel ciclo cellulare (86). Nel loro insieme, questi studi indicano che probabilmente la strada più percorribile per ottenere la rigenerazione cardiaca è quella di risvegliare il potenziale proliferativo dei cardiomiociti adulti sopravvissuti a un danno, proprietà che pesci e anfibi mantengono per tutta la vita.

Riattivare la proliferazione dei cardiomiociti per rigenerare il cuore è possibile in alcuni modelli murini. Ad esempio, questo avviene in topi geneticamente modificati in cui l'espressione di YAP viene attivata a distanza di molti giorni dall'infarto, o in topi in cui viene deletato il gene per la chinasi inibitoria Mst-1 o quello che codifica per il cofattore di Mst-1 Salvador (59, 84, 85). Inoltre, rigenerazione miocardica è stata osservata dopo il trasferimento di alcuni geni che codificano per proteine che regolano il ciclo cellulare e quindi stimolano i cardiomiociti a proliferare (86). Questi approcci, tuttavia, sono complicati da trasferire alla clinica nell'uomo, visto che richiedono un'alta efficienza di trasferimento genico, non possono essere controllati nel tempo e pongono problemi di sicurezza se i vettori che vengono utilizzati per il trasferimento genico dovessero anche trasdurre altri tipi cellulari o cellule di tumori già esistenti e latenti.

Stimolazione del potenziale rigenerativo endogeno del cuore utilizzando microRNA

Una strategia potenzialmente molto interessante per ottenere la rigenerazione cardiaca è quella di stimolare il potenziale proliferativo dei cardiomiociti modulando il network dei microRNA. Questi sono corti

segmenti di RNA a doppio filamento che controllano virtualmente tutti gli aspetti della biologia delle cellule, dallo sviluppo alla trasformazione neoplastica, inclusa ovviamente la proliferazione. Il genoma umano codifica per oltre 2600 microRNA diversi, ciascuno dei quali ha la proprietà di legarsi a decine o anche centinaia di RNA messaggeri diversi, e di conseguenza diminuirne i livelli. I microRNA, quindi, rappresentano una sorta di reostati che indirizzano il fenotipo, anche complesso, di una cellula verso una specifica funzione. Dal momento che queste molecole possono essere facilmente ottenute per sintesi chimica vista la loro ridotta lunghezza (tipicamente, da 21 a 23 nucleotidi per ciascuno dei due filamenti, con un appaiamento imperfetto e la presenza di estremità sporgenti), sono disponibili collezioni di microRNA che possono essere usate per eseguire screening in vitro al fine di identificare una specifica funzione desiderata. Tramite questo approccio, il mio laboratorio ha identificato una serie di microRNA che sono in grado di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti e quindi possono essere utilizzati per la rigenerazione cardiaca (87).

I microRNA che stimolano la proliferazione dei cardiomiociti possono essere classificati in tre diverse categorie (88). La prima comprende molecole che sono normalmente espresse nelle cellule staminali embrionali e rivestono un ruolo importante nel mantenimento della pluripotenza di queste cellule. Questi comprendono membri delle famiglie dei microRNA miR-302~367 e miR-miR-290, che possiedono la medesima sequenza di riconoscimento per gli mRNA bersaglio (la sequenza cosiddetta "seed", posizionata dal nucleotide 2 al nucleotide 8) (89, 90). L'attivazione del cluster miR-302-367 dopo l'infarto nel topo induce rigenerazione cardiaca, al pari della somministrazione di alcuni di questi microRNA

ottenuti per via sintetica (91). Un secondo gruppo di microRNA in grado di indurre rigenerazione cardiaca comprende alcuni microRNA coinvolti nella trasformazione tumorale. Questi comprendono il cluster miR-17~92 (anche chiamato OncomiR1) (92, 93), e i cluster paraloghi a questo miR-106b~25 e miR-106a~363 (94, 95). Anche in questo caso, l'espressione per via genetica del cluster miR-17~92 (96) o la somministrazione dei membri di questo cluster miR-19a/19b (97) determina rigenerazione cardiaca. Un terzo gruppo di microRNA è stato identificato tramite due screening che sistematicamente hanno analizzato tutti i microRNA umani (87, 98). Il più studiato dei microRNA identificati da questi studi è miR-199a-3p, che i nostri studi hanno dimostrato essere efficace nello stimolare la rigenerazione cardiaca dopo infarto sia nei topi che nei maiali quando espresso tramite un vettore virale AAV (87, 99) e, per ora soltanto nei topi, anche mediante una singola iniezione di microRNA sintetico veicolato mediante l'utilizzo di lipidi (100).

L'identificazione di microRNA con il potenziale di stimolare la proliferazione dei cardiomiociti e ottenere la rigenerazione cardiaca è particolarmente interessante dal punto di vista traslazionale, dal momento che queste molecole possono essere sviluppate come dei veri e propri farmaci, in grado di funzionare virtualmente in tutti i pazienti anche senza personalizzazione e estensiva manipolazione in laboratorio (al contrario delle terapie cellulari). I microRNA con funzione rigenerativa possono essere somministrati come molecole sintetiche. Evidenze già disponibili indicano che una singola iniezione nel miocardio infartuato, nel topo, di miR-199a-3p o miR-590-3p usando una formulazione lipidica è in grado di stimolare una risposta rigenerativa (100). Analoghi risultati sono stati ottenuti mediante una singola iniezione intramiocardi-

ca di miR-19a/19b (97) o miR-302b/c (101) o mediante la somministrazione endovenosa giornaliera di miR302b/c (91), miR-19a/19b (97) o miR-708 (102).

Prospettive cliniche

Il concetto che la rigenerazione del muscolo cardiaco possa essere ottenuta tramite l'impianto di cardiomiociti ottenuti in laboratorio a partire dalle cellule staminali embrionali o mediante la stimolazione del potenziale proliferativo dei cardiomiociti è decisamente una prospettiva innovativa ed eccitante. Mette in discussione diverse decenni di osservazioni che avevano ritenuto che il danno miocardico non fosse reversibile e offre speranze di trattamento a un vasto numero di pazienti con cardiomiopatia ischemica post-infarto. Nel caso dei cardiomiociti derivati dalle cellule staminali, i principali problemi che devono essere risolti riguardano la difficoltà di ottenere grandi numeri di cellule, la loro immunogenicità e quindi la necessità di immunosopprimere il ricevente al pari di un trapianto d'organo, e il fatto che i cardiomiociti derivati dalle cellule ES o iPS hanno caratteristiche embrionali e quindi immature, per cui la loro integrazione elettrica e meccanica nel tessuto cardiaco dove vengono iniettate è problematica e ha il potenziale di generare gravi aritmie.

Nel caso della rigenerazione cardiaca ottenuta stimolando la capacità endogena dei cardiomiociti di proliferare, il problema principale è quello dell'efficienza del trasferimento genico al miocardio. Fattori con attività stimolante la proliferazione possono essere iniettati tramite cateterismo coronario immediatamente dopo la PCI, o mediante mini toracotomia, o direttamente nel miocardio per via transendocardica utilizzando sistemi come il NOGA e il catetere Myostar (103). Per quanto riguarda l'effi-

cienza di internalizzazione di microRNA all'interno delle cellule cardiache, questo si può avvalere degli enormi progressi fatti in questo campo grazie all'introduzione in terapia delle nanoparticelle lipidiche (lipid nanoparticles, LNP) ottenute con la tecnologia SNALP (Stable Nuclei Acid Lipid Particle) (104). Questa tecnologia consente la generazione di particelle formate da un guscio lipidico che, al suo interno, può contenere acidi nucleici, in particolare mRNA, *short interfering RNA* (siRNA) o microRNA. Questa è la stessa tecnologia che ha consentito, nel 2018, l'approvazione clinica della prima terapia basata su un siRNA (per l'amiloidosi epatica dovuta all'accumulo di transtiretina) (105) e, nel corso del 2020, dei vaccini per COVID-19 di Pfizer/BioNTech e Moderna. Le LNP che si formano grazie alla tecnologia SNALP godono del fatto che uno dei lipidi utilizzati ha carica positiva a pH acido, in modo da complessarsi con gli acidi nucleici (mRNA, microRNA, siRNA) che portano una carica uniformemente negativa grazie ai fosfati dello scheletro degli acidi nucleici. A pH fisiologico, invece, la carica esterna della particella di-

venta neutra, riducendo la tossicità e gli effetti avversi, mentre l'acido nucleico rimane intrappolato all'interno.

Se la rigenerazione cardiaca potrà essere ottenuta sostituendo le cellule perse dall'esterno o piuttosto stimolando la proliferazione di quelle sopravvissute al danno rimane oggi una eccitante sfida. Certo è che, in ambedue i casi, il traguardo sembra oggi come mai in passato raggiungibile.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato reso possibile dall'Advanced Grant 787971 "CuRE" dell'European Research Council (ERC); dal Programme Grant RG/19/11/34633 della British Heart Foundation e dai grant 825670 "CardioReGenix" aned 874764 "REANIMA" del Programma Horizon 2020 della Commissione Europea, insieme al continuo e generoso supporto della Fondazione CRTrieste.

Conflitti di interesse

Mauro Giacca è un membro del Scientific Advisory Boards di Trizell Holding SA, Lausanne and DINAQR AG, Zurich-Lon-

RIASSUNTO

La rigenerazione cardiaca è stata a lungo considerata un traguardo impossibile da raggiungere sperimentalmente e un miraggio nella pratica clinica. Il fallimento delle sperimentazioni cliniche basate sulle cellule staminali cardiache e l'evidenza che queste cellule con ogni probabilità nemmeno esistono in natura hanno rinforzato la conclusione che il cuore è un organo irreversibilmente post-mitotico. Una possibile maniera di superare questo problema è il trapianto di cardiomiociti ottenuti in laboratorio dal differenziamento di cellule embrionali staminali, ottenute dagli embrioni direttamente o grazie alle tecniche di transdifferenziamento. Queste cellule possono essere trapiantate sia sotto forma di sospensioni sia dopo la formazione di tessuto tridimensionale cardiaco contrattile in laboratorio. Un approccio alternativo è quello di riattivare la capacità endogena dei cardiomiociti di replicarsi. Quest'ultima possibilità è basata sull'osservazione che animali di altre specie, ed anche i mammiferi fino alla nascita, sono capaci di rigenerare il cuore tramite il parziale de-differenziamento dei cardiomiociti già formati e la loro duplicazione. Il successo recente di entrambi gli approcci nella rigenerazione del cuore in modelli di animali di grande taglia suggerisce che la rigenerazione cardiaca è possibile. Diversi problemi tecnici, tuttavia, devono ancora essere risolti prima di raggiungere con successo un'estesa applicazione clinica.

Parole chiave: *Rigenerazione cardiaca, cardiologia sperimentale, cellule staminali embrionali, cardiomiociti, insufficienza cardiaca.*

don, due aziende che operano nel settore della terapia genica. È il fondatore e consulente di Purespring Therapeutics, che opera nel campo della terapia genica del rene, e di Forcefield Therapeutics, che sviluppa molecole con attività cardioprotettiva, entrambe con sede a Londra.

Bibliografia

1. Birks EJ. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res.* 2013; 113: 777-791.
2. Roger VL. Epidemiology of heart failure. *Circ Res.* 2013; 113: 646-659.
3. Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al. American Heart Association Advocacy Coordinating C, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular R, Intervention, Council on Clinical C, Council on E, Prevention, Stroke C. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail.* 2013; 6: 606-619, 2013.
4. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, et al. Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70: 1-25.
5. Gottlieb SS, Dickstein K, Fleck E, et al. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1993; 88: 1602-1609.
6. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, et al. Committees D-HT, Investigators. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *N Engl J Med.* 2019; 381: 1995-2008.
7. Califf RM. LCZ696: too good to be true? *Eur Heart J.* 2015; 36: 410-412.
8. Kaye DM, Krum H. Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 127-139.
9. Packer M. The Future Treatment of Heart Failure? *Eur Heart J.* 2018; 39: 5-7.
10. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 1777-1785.
11. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 1999; 138: S69-75.
12. Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, et al. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 549-562.
13. Kyto V, Saraste A, Saukko P, et al. Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *Am J Cardiol.* 2004; 94: 746-750.
14. Nef HM, Mollmann H, Hilpert P, et al. Activated cell survival cascade protects cardiomyocytes from cell death in Tako-Tsubo cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2009; 11: 758-764.
15. Stapel B, Kohlhaas M, Rieke-Hoch M, et al. Low STAT3 expression sensitizes to toxic effects of beta-adrenergic receptor stimulation in peripartum cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2017; 38: 349-361.
16. Townsend D, Yasuda S, McNally E, Metzger JM. Distinct pathophysiological mechanisms of cardiomyopathy in hearts lacking dystrophin or the sarcoglycan complex. *FASEB J.* 2011; 25: 3106-3114
17. Hashem SI, Perry CN, Bauer M, et al. Brief Report: Oxidative Stress Mediates Cardiomyocyte Apoptosis in a Human Model of Danon Disease and Heart Failure. *Stem Cells.* 2015; 33: 2343-2350.
18. Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation.* 2005; 112: 3451-3461.
19. Yamaji K, Fujimoto S, Ikeda Y, et al. Apoptotic myocardial cell death in the setting of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Acta Cardiol.* 2005; 60: 465-470.
20. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52: 1213-1225.
21. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1995; 26: 1068-1079.
22. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009; 324: 98-102.
23. Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol.* 1997; 272: H220-226.
24. Sedmera D, Reckova M, DeAlmeida A, et al. Thompson RP. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 274: 773-777.
25. Ye L, D'Agostino G, Loo SJ, et al. Early Regenerative Capacity in the Porcine Heart. *Circulation.* 2018; 138: 2798-2808.
26. Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, et al. Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2016; 118: 216-221.

27. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science*. 2002; 298: 2188-2190.
28. Oberpriller JO, Oberpriller JC. Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool*. 1974; 187: 249-253.
29. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature*. 2010; 464: 601-605.
30. Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010; 464: 606-609.
31. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013; 493: 433-436.
32. Canseco DC, Kimura W, Garg S, et al. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation. *J Am Coll Cardiol*. 2015; 65: 892-900.
33. Zacchigna S, Martinelli V, Moimas S, et al. Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction. *Nature communications*. 2018; 9: 2432.
34. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al. The Oxygen-Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell-Cycle Arrest through DNA Damage Response. *Cell*. 2014; 157: 565-579.
35. Hirose K, Payumo AY, Cutie S, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science*. 2019; 364: 184-188.
36. Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010; 56: 130-140.
37. Zhou B, Honor LB, He H, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest*. 2011; 121: 1894-1904.
38. Przybyt E, Krenning G, Brinker MG, Harmsen MC. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *J Transl Med*. 2013; 11: 39.
39. Hinrichsen R, Haunso S, Busk PK. Different regulation of p27 and Akt during cardiomyocyte proliferation and hypertrophy. *Growth Factors*. 2007; 25: 132-140.
40. Kardami E, Banerji S, Doble BW, et al. PKC-dependent phosphorylation may regulate the ability of connexin43 to inhibit DNA synthesis. *Cell Commun Adhes*. 2003; 10: 293-297.
41. Engel FB, Hsieh PC, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 15546-15551.
42. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature*. 2015; 525: 479-485.
43. Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, et al. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273: 10261-10269.
44. Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. 2009; 138: 257-270.
45. D'Uva G, Aharonov A, Lauriola M, et al. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol*. 2015; 17: 627-638.
46. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111: 16029-16034.
47. Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*. 2017; 547: 179-184.
48. Kim SE, Huang H, Zhao M, et al. Wnt stabilization of beta-catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science*. 2013; 340: 867-870.
49. Singh AP, Umbarkar P, Guo Y, et al. Inhibition of GSK-3 to induce cardiomyocyte proliferation: a recipe for in situ cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*. 2019; 115: 20-30.
50. Tseng AS, Engel FB, Keating MT. The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem Biol*. 2006; 13: 957-963.
51. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999; 398: 518-522.
52. Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, Giacca M. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 2008; 183: 117-128.
53. Croquelois A, Domenighetti AA, Nemir M, et al. Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway. *J Exp Med*. 2008; 205: 3173-3185.
54. Campa VM, Gutierrez-Lanza R, Cerignoli F, et al. Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 2008; 183: 129-141.

55. Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011; 332: 458-461.
56. Yamamoto S, Yang G, Zablocki D, et al. Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1463-1474.
57. Matsui YY, Nakano NN, Shao DD, et al. Lats2 is a negative regulator of myocyte size in the heart. *Circ Res*. 2008; 103: 1309-1318.
58. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal*. 2011; 4: ra70.
59. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 13839-13844.
60. Kirshenbaum LA, Abdellatif M, Chakraborty S, Schneider MD. Human E2F-1 reactivates cell cycle progression in ventricular myocytes and represses cardiac gene transcription. *Dev Biol*. 1996; 179: 402-411.
61. Agah R, Kirshenbaum LA, Abdellatif M, et al. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2722-2728.
62. van Amerongen MJ, Diehl F, Novoyatleva T, et al. E2F4 is required for cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc Res*. 2010; 86: 92-102.
63. Soonpaa MH, Koh GY, Pajak L, et al. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1997; 99: 2644-2654.
64. Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakit P, et al. Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res*. 2003; 92: e12-19.
65. Busk PK, Hinrichsen R, Bartkova J, et al. Cyclin D2 induces proliferation of cardiac myocytes and represses hypertrophy. *Exp Cell Res*. 2005; 304: 149-161.
66. Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, et al. Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. *J Biol Chem*. 2011; 286: 8644-8654.
67. Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 2013; 497: 249-253.
68. Chaudhry HW, Dashoush NH, Tang H, et al. Cyclin A2 mediates cardiomyocyte mitosis in the postmitotic myocardium. *J Biol Chem*. 2004; 279: 35858-35866.
69. Woo YJ, Panlilio CM, Cheng RK, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation*. 2006; 114: 206-213.
70. Liao HS, Kang PM, Nagashima H, et al. Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes. *Circ Res*. 2001; 88: 443-450.
71. Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res*. 2005; 96: 110-118.
72. Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, et al. Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2008; 78: 18-25.
73. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004; 95: 9-20.
74. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010; 107: 913-922.
75. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763-776.
76. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011; 378: 1847-1857.
77. Zimmet H, Porapakham P, Porapakham P, et al. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail*. 2012; 14: 91-105.
78. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015; 116: 1413-1430.
79. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation*. 2017; 136: 680-686.
80. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014; 510: 273-277.
81. Liu YW, Chen B, Yang X, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*. 2018; 36: 597-605.
82. Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, et al. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*. 2017; 135: 1832-1847.
83. Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, et al. Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*. 2016; 8: 363ra148.

84. Heallen T, Morikawa Y, Leach J, et al. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development*. 2013; 140: 4683-4690.
85. Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature*. 2017; 550: 260-264.
86. Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, et al. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration. *Cell*. 2018; 173: 104-116 e112.
87. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*. 2012; 492: 376-381.
88. Braga L, Ali H, Secco I, Giacca M. Non-coding RNA therapeutics for cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*. 2021; 117: 674-693.
89. Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle*. 2009; 8: 394-398.
90. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet*. 2008; 40: 1478-1483.
91. Tian Y, Liu Y, Wang T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med*. 2015; 7: 279ra238.
92. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 2257-2261.
93. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005; 435: 828-833.
94. Gruszka R, Zakrzewska M. The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. *Int J Mol*. 2018; Sci. 19: 879.
95. Mehlich D, Garbicz F, Wlodarski PK. The emerging roles of the polycistronic miR-106b approximately 25 cluster in cancer - A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018; 107: 1183-1195.
96. Chen J, Huang ZP, Seok HY, et al. mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*. 2013; 112: 1557-1566.
97. Gao F, Kataoka M, Liu N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nature communications*. 2019; 10: 1802.
98. Diez-Cunado M, Wei K, Bushway PJ, et al. miRNAs that Induce Human Cardiomyocyte Proliferation Converge on the Hippo Pathway. *Cell reports*. 2018; 23: 2168-2174.
99. Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature*. 2019; 569: 418-422.
100. Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, et al. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017; 120: 1298-1304.
101. Wang LL, Liu Y, Chung JJ, et al. Local and sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischemic injury. *Nat Biomed Eng*. 2017; 1: 983-992.
102. Deng S, Zhao Q, Zhen L, et al. Neonatal Heart-Enriched miR-708 Promotes Proliferation and Stress Resistance of Cardiomyocytes in Rodents. *Theranostics*. 2017; 7: 1953-1965.
103. Cannata A, Ali H, Sinagra G, Giacca M. Gene Therapy for the Heart Lessons Learned and Future Perspectives. *Circ Res*. 2020; 126: 1394-1414.
104. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. *Nucleic Acid Ther*. 2018; 28: 146-157.
105. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018; 379: 11-21.