



Universidad de Jaén

Área de Biología celular

Departamento de Biología Experimental

Facultad de Ciencias Experimentales

La Dra. Amelia Aránega Jiménez, Profesora Titular del Área Biología Celular de la Universidad de Jaén y el Dr. Jorge Nicolás Domínguez Macías certifican que la Tesis Doctoral titulada: **“Análisis *in vitro* e *in vivo* del papel de los microRNAs 23b, 27b y 200b en cardiogénesis”**, que presenta José Manuel Vilches Godoy para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para esta presentación.

Jaén, 11 de Marzo de 2020

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. Amelia Aránega Jiménez

Dr. Jorge Nicolás Domínguez
Macías

Memoria presentada por el licenciado

José Manuel Vilches Godoy

Abril de 2020



**ANÁLISIS IN VITRO E IN VIVO DEL PAPEL DE LOS MIRNAS
23b, 27b Y 200b EN CARDIOGÉNESIS**

Tesis doctoral

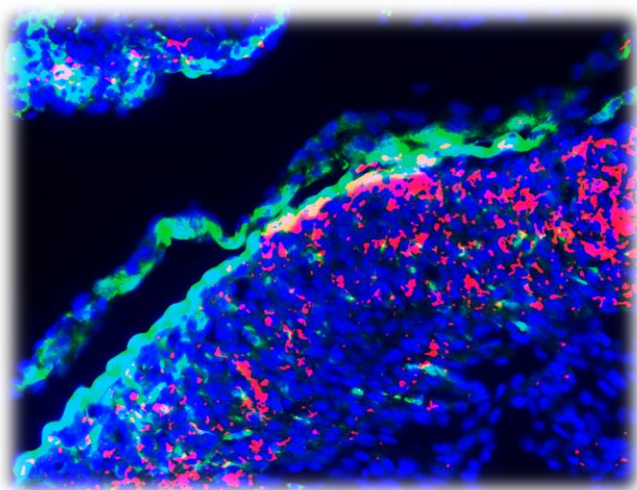
José Manuel Vilches Godoy

Directora: Dra. Amelia Aránega Jiménez

Co-director: Dr. Jorge Nicolás Domínguez Macías

Enero de 2020

**Este trabajo ha sido llevado a cabo en el laboratorio de Biología
Celular del Departamento de Biología Experimental de la
Universidad de Jaén.**



Contenido

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL 8

1.1 Desarrollo embrionario del corazón..... 9

- 1.1.1 Campos cardiacos y configuración del corazón
embrionario..... 9
- 1.1.2 Formación del epicardio y células derivadas de epicardio
..... 16

1.2 Células madre como modelos *in vitro* de cardiogénesis: paradigma para la regeneración cardiaca 22

- 1.2.1 Células madre embrionarias (ESCs) 22
- 1.2.2 Modelos *in vitro* e *in vivo* de las células derivadas del
epicardio (EPDCs)..... 30

1.3 MicroARNs..... 39

- 1.3.1 MicroARNs en ESCs e inducción de cardiomiocitos...41
- 1.3.2 MicroARNs en la morfogénesis cardiaca 46

1.4 Bibliografía 56

2. CAPITULO II: MIR-27B Y MIR-23B MODULAN LA DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN..... 85

MIR-27B Y MIR-23B MODULAN LA DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN 86

2.1 Introducción 86

2.2 Hipótesis	88
2.3 Objetivos.....	89
2.4 Material y métodos.....	90
2.4.1 Cultivo de ESCs y transfección de microARNs ...	90
2.4.2 Extracción de RNA, retrotranscripción y PCR cuantitativa	91
2.4.3 Análisis de datos, análisis estadístico y representación gráfica.....	93
2.5 Resultados	93
2.5.1 miR-27b inhibe la diferenciación cardiaca in vitro a través de la regulación de la vía de señalización Wnt- β Catenina..	93
2.5.2 mir-23b regula el fenotipo contráctil durante la diferenciación in vitro a cardiomiocitos a partir de ESCs....	97
2.6 Discusión.....	104
2.7 Conclusiones	106
2.8 Bibliografía.....	107
 CAPITULO III: MIR-200B EN LA ESPECIFICACIÓN Y DESTINO CELULAR DE LAS POBLACIONES DERIVADAS DEL EPICARDIO....	
3.1 Introducción.....	113
3.2 Hipótesis:	118
3.4 Material y métodos.....	119
3.4.1 Obtención de corazones embrionarios	119

3.4.2 Extracción de RNA, RT-PCR y PCR cuantitativa a tiempo real.....	120
3.4.3 LNA Hibridación In Situ.....	122
3.4.4 Cultivos de células de epicardio desde explantes de ventrículo.	124
3.4.5 Transfecciones de pre-miR-200b y anti-miR-200b.....	125
3.4.6 Inmunocitoquímica	127
3.4.7 Análisis estadístico	128
3.5 Resultados.....	128
3.5.1 miR-200b se expresa entre los estadios E12.5 y E16.5 durante el desarrollo cardiaco.....	128
3.5.2 miR-200b está presente mayoritariamente en una subpoblación de células del epicardio y su progenie.....	136
3.5.3 El miR-200b juega un papel en la movilidad de las células epicárdicas.....	142
3.6 Discusión	151
3.7 Conclusiones.....	160
3.8 Bibliografía	160
 MIR-27B AND MIR-23B MODULATE CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION FROM MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS. ...	167
 CONTRIBUTION OF MIRNAS TO ION-CHANNEL REMODELLING IN ATRIAL FIBRILLATION.	179
 PAPEL FUNCIONAL DE ARN NO CODIFICANTES EN EL DESARROLLO Y LA PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR.....	188

AGRADECIMIENTOS	218
------------------------------	------------

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1 Desarrollo embrionario del corazón

1.1.1 Campos cardiacos y configuración del corazón embrionario

El corazón es un órgano altamente especializado que funciona como una bomba para permitir la circulación sanguínea en el cuerpo de todos los vertebrados, así como en la regulación del sistema pulmonar en animales pulmonados. Es el primer órgano que se forma como tal durante la embriogénesis de los vertebrados (Sissman, 1970; Brand, 2003). La función adecuada del corazón no sólo es esencial para la vida de los animales vertebrados, sino también para el desarrollo de sus embriones, siendo su función en éstos vital para la circulación de nutrientes y para la eliminación de sustancias de desecho (Moorman, 2003).

Por lo que respecta al tejido cardiaco, el corazón es una estructura que comprende muchos tipos de células diferentes con funciones altamente especializadas. Su formación requiere la coordinación de varios procesos complejos que abarcan desde la diferenciación de la denominada cresta precardiaca, hasta la completa formación de un corazón con cuatro cámaras y sus correspondientes válvulas (revisado en Sedmera, 2011). Los errores en este proceso pueden provocar malformaciones cardiacas congénitas, que representan una importante proporción de anomalías de desarrollo de significado clínico.

Durante la edad adulta, las alteraciones funcionales y/o estructurales de los corazones formados de manera anormal causan un espectro complejo de enfermedades cardiovasculares, una de las causas principales de problemas relacionados con el corazón en países desarrollados (Bruneau *et al.*, 2008).

El desarrollo cardíaco comprende una serie de procesos que incluye polarización y migración celular, la fusión de poblaciones celulares y la formación de conductos, así como la curvatura de los mismos (Garcia-Martinez *et al.*, 1993). En este complejo proceso, el cual requiere de la diferenciación y el crecimiento de distintas estructuras embrionarias, podrían distinguirse varias etapas que son (Figura 1.1): **formación de la cresta precardiaca, formación del tubo cardíaco primitivo, torsión o “looping” cardíaco, formación del corazón embrionario, tabicación y remodelación interna** (Vincent *et al.*, 2010).

Durante las primeras etapas del desarrollo, las células progenitoras cardíacas derivadas del mesodermo se localizan en una porción medial y posterior del embrión. Uno de los primeros marcadores de las células progenitoras cardíacas es **Mesp1**, el cual es requerido para la delaminación de células del mesodermo desde la línea primitiva, y que es esencial para el desarrollo del mesodermo cardíaco (Kitajima *et al.*, 2000). Por

otra parte, la señalización de las proteínas **Wnt** que regula la proliferación celular durante la embriogénesis temprana, también es necesaria para la formación de la línea primitiva y la inducción del mesodermo cardiogénico. La señalización de Wnt se origina a través de la ruta **Wnt/ β -catenina**; entre los ligandos de Wnt que activan esta ruta están **Wnt1**, **Wnt3a** y **Wnt8a** (Naito *et al.*, 2006).

Tras la inducción del mesodermo cardiogénico, las células precursoras del corazón embrionario se sitúan simétricamente en una estructura bilateral denominada **cresta precardiaca**, situada en el mesodermo esplácnico subyacente a los pliegues cefálicos. Estas células precursoras recibirán señales del ectodermo y endodermo para transformarse en miocardiocitos (Hutson *et al.*, 2007). A continuación, esta cresta precardiaca gira hacia la parte interior para colocarse debajo de los pliegues cefálicos y, mediante un complejo proceso morfogénético, se transforma posteriormente en el **tubo cardiaco** inicial y lineal, constituido externamente por el miocardio e internamente por endocardio, y ambas capas separadas por una matriz acelular llamada gelatina cardiaca (Forouhar *et al.*, 2006) (Figura 1.1).

Para el correcto crecimiento del tubo cardiaco, se requiere de la contribución de una población extracardiaca de células progenitoras definidas por la expresión de **Islet1**, que

tienen gran capacidad proliferativa y promueven la elongación y del corazón (Männer, 2000). Estas células constituyen el denominado **Campo Cardíaco Secundario (SHF)** y se sitúa en los polos anterior y posterior del tubo cardíaco (Mjaatvedt *et al.*, 2001; Waldo *et al.*, 2001; Buckingham *et al.*, 2005; Kelly, 2012; Kelly *et al.*, 2014;). Por otro lado, las que se localizan en las cresta precardiaca y en el tubo cardíaco temprano constituyen el denominado **Campo Cardíaco Primario (FHF)** (Buckingham *et al.*, 2005). En el embrión de ratón, el tubo cardíaco a temprana edad posee principalmente una identidad ventricular izquierda y su expansión depende de las contribuciones del SHF (Buckingham *et al.*, 2005). Así, el tubo cardíaco inicial derivado del FHF proporciona un andamiaje para el crecimiento posterior (Chong *et al.*, 2014) (Figura 1.1). Por el contrario, las células derivadas del SHF contribuyen principalmente a la formación de los atrios, ventrículo derecho y tracto de salida (revisado en Buckingham *et al.*, 2005). Este tubo cardíaco comienza ya a mostrar una contracción espontánea (Gourdie *et al.*, 2003).

Poco después de la formación del tubo cardíaco, éste sufre una torsión hacia la derecha que recibe el nombre de **torsión o looping cardíaco**. Esta torsión culmina con la formación del corazón embrionario en el que se comienzan a distinguir diferentes regiones miocárdicas: tracto de entrada, atrio embrionario, canal atrioventricular, ventrículo embrionario

y tracto de salida (Moorman, 2003). Cada una de estas regiones miocárdicas presenta un patrón de expresión génica diferencial, así como unas características funcionales distintas. En esta etapa, el factor de transcripción **Pitx2c**, es uno de los responsables del establecimiento del eje derecha-izquierda, así como del desarrollo asimétrico del corazón (Ai et al., 2006). La torsión hacia la derecha del tubo cardíaco inicial constituye el primer signo de asimetría observada durante el desarrollo embrionario, obteniendo así el embrión identidad derecha-izquierda (Ai et al., 2006). Este proceso es de vital importancia para el futuro desarrollo del corazón, ya que fallos producidos en esta torsión originan diferentes tipos de cardiopatías congénitas (Ai et al., 2006; Ocaña et al., 2017). Las paredes miocárdicas del tubo cardíaco en esta etapa están formadas por el llamado miocardio primario (Christoffels et al., 2000).

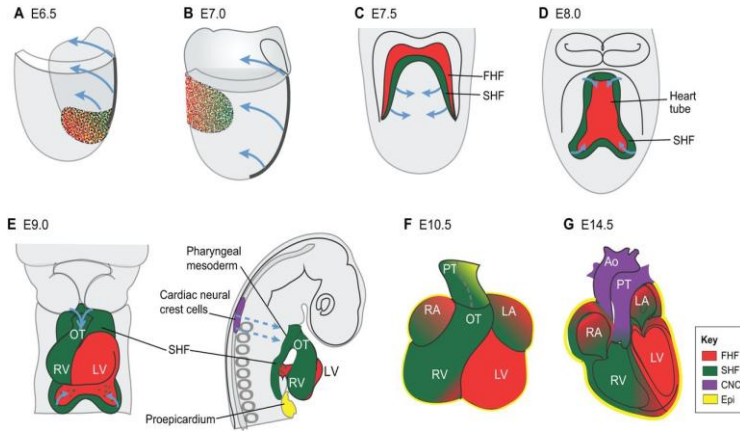


Figura 1.1. (A-D) Durante la gastrulación en E6.5-E7.0 (A, B), las células mesodérmicas y endodérmicas correspondientes a los distintos órganos, incluyendo células progenitoras del campo cardíaco primario (FHF, rojo) y del campo cardíaco secundario (SHF, verde), experimentan migración lateral (flechas), alejándose de la línea primitiva (línea negra gruesa). (C) Formación de la cresta cardíaca constituido principalmente por células del FHF y localización del SHF. (D) Formación del tubo cardíaco. Las células procedentes del FHF forman el tubo cardíaco primario al cual se le van añadiendo células del SHF (flechas sólidas) que se agregan a través de ambos polos del tubo cardíaco. (E) Vista frontal y lateral de la región del corazón en E9.0 mostrando la torsión del tubo cardíaco. Las flechas discontinuas indican la migración de las células de la cresta neural cardíaca al corazón. (F, G) El corazón ya compartimentado en cuatro cámaras en E10.5 (F) y maduro en E14.5 (G), con linajes celulares procedentes de FHF, SHF, cresta neural cardíaca (CNC) y epicardio (Epi). Ao, aorta; RA, aurícula derecha; RV, ventrículo derecho; LA, aurícula izquierda; VI, ventrículo izquierdo; OT, tracto de salida; PT, tronco pulmonar (imagen tomada de Chong *et al.*, 2014).

El desarrollo posterior de las cámaras cardíacas se produce por la expansión de regiones del tubo cardíaco, además de una septación y formación de válvulas que dará lugar a un corazón maduro (Christoffels *et al.*, 2000). Mediante el proceso de **tabicación** se formará un corazón funcional con dos circuitos: uno sistémico donde circulará la sangre oxigenada, y otro pulmonar, correspondiente a la sangre venosa. La tabicación del ventrículo primitivo generará los dos ventrículos (derecho e izquierdo) mediante el crecimiento del septo interventricular. El atrio primitivo, a su vez, se dividirá en derecho e izquierdo mediante la formación de los septos interatriales primario y secundario (Anderson *et al.*, 2014). De este proceso resultará un corazón funcional formado por dos cámaras atriales y dos ventriculares cada una con un tracto de entrada y otro de salida (Anderson *et al.*, 2014).

Poco después de la torsión del tubo cardíaco, la contracción asincrónica observada en etapas anteriores da paso a una contracción secuencial y coordinada de las cámaras cardíacas (Moorman *et al.*, 1994). Esto ocurre gracias a la configuración y maduración del denominado **sistema de conducción cardíaca** (SCC), responsable de la contracción coordinada de las distintas cámaras cardíacas (van Weerd *et al.*, 2016). También es importante la expresión de diferentes genes relacionados con la conductividad eléctrica del corazón. La

conexina 45 es la primera conexina que se expresa en el SCC, siendo la única conexina que se expresa continuamente en todo el sistema de conducción (Coppén et al., 2001). También se activan otros genes que codifican para las subunidades de las uniones *gap* **Conexina 40** (cx40 o GJA5) y **Conexina 43** (Cx43 o GJA1) (Hervé et al., 2008) y el canal de sodio cardíaco **Scn5a** (también Nav1.5) (Domínguez et al., 2008), todos ellos esenciales para la conducción eléctrica en el corazón.

1.1.2 Formación del epicardio y células derivadas de epicardio

Durante las primeras etapas del desarrollo, como ya habíamos dicho anteriormente, el corazón está formado por una capa interna de endocardio y otra de miocardio, ambas derivadas de los denominados Campos Cardíacos (FHF & SHF). Otra población celular participa en la configuración y desarrollo del corazón embrionario. Estas células constituyen un primordio externo al corazón, localizado en porciones caudales del tubo cardíaco, que entra en contacto con la superficie miocárdica y da lugar a un mesotelio que crece y recubre progresivamente al miocardio (Männer, 2004). Esta estructura, denominada **proepicardio** (PE), disemina sus células desde el surco atrioventricular hacia los ventrículos, para finalmente terminar recubriendo los atrios (Männer, 2004). Este mesotelio que ya se distingue en ratón en estadios E9.0-9.5 del desarrollo, constituye entonces la capa

más externa del corazón, la cual pasa a denominarse **epicardio** (Muñoz-Chápuli *et al.*, 2002; Masters *et al.*, 2014) (Figura 1.2).

Una vez el epicardio ha recubierto la superficie externa del corazón, se queda un espacio entre el revestimiento epicárdico y el miocardio, que es rápidamente ocupado por células procedentes del epicardio a través de un proceso denominado **transición epitelio-mesénquima (EMT)** (Pérez-Pomares y Muñoz-Chápuli, 2002), proceso mediante el cual se produce una sobreexpresión de genes de expresión mesenquimática y una desregulación de genes epiteliales (Schöck *et al.*, 2002). Para someterse a la EMT, las células epiteliales deben deshacer las uniones que la conectan con las células vecinas. Tras esto, las células sufren cambios en la expresión génica y en el citoesqueleto, adquiriendo así un fenotipo móvil. La acción de las enzimas de la matriz extracelular (ECM) facilita la degradación de la membrana basal, permitiendo que la célula mesenquimal naciente salga del epitelio y migre hacia el tejido subyacente (revisado en Friedl, 2004). A nivel molecular, dos eventos claves están implicados en la EMT: regulación a la baja de las uniones de adhesión intercelular y la expresión de factores de transcripción que inducen EMT (Thiery y Sleeman, 2006). La proteína de adhesión celular **E-cadherina** es la proteína de adhesión epitelial más importante, y la regulación a la baja de esta proteína es un

evento clave en la EMT en muchos contextos diferentes ya que, además de formar uniones intercelulares que ayudan a restringir las células a la capa epitelial, la E-cadherina probablemente participa en vías de señalización intracelular que promueven la identidad epitelial o reprimen la identidad mesenquimal (Peinado *et al.*, 2004).

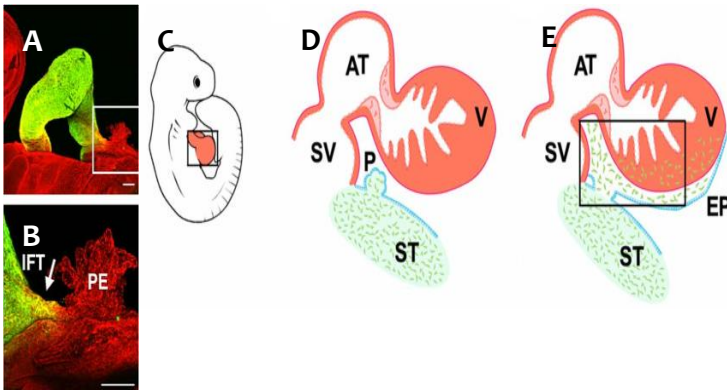


Figura 1.2. (A) Embrión de pollo (HH16-17) teñido con citoqueratina (rojo) y MF20 (verde). (B) imagen ampliada de (A) de la región caudal del tracto de entrada (IFT) donde se observa claramente el proepicardio (PE). (C-D) Modelo explicativo sobre la formación del epicardio a partir del proepicardio (aquí P), así como de la invasión del miocardio por parte de células derivadas de epicardio o EPDCs. IFT: tracto de entrada; PE/P: proepicardio; SV: seno venoso; AT: atrio, ST: *septum transversum*; V: ventrículo; EP: epicardio. Imágenes tomadas de Kruithof *et al.*, 2006 (A y B) y Cano *et al.*, 2016 (C-E).

Entre los factores de transcripción que regulan la EMT encontramos las proteínas **Snail** (codificadas por *Snai1* y *Snai2*),

las cuales inducen la EMT (Barrallo-Gimeno, 2005). Snail se activa mediante estímulos que inducen EMT, como **Tgf- β** y **Notch**. También, Snail reprime la transcripción de E-cadherina y regula al alza la expresión de **RhoA** y **Vimentina**, que estimulan la remodelación del citoesqueleto, y activa la expresión de las metaloproteasas de matriz, que degradan la membrana basal y facilitan la migración celular (Von Gise *et al.*, 2012). Por lo tanto, Snail y otros factores de transcripción inductores de EMT similares coordinan la reprogramación de las células epiteliales hacia un fenotipo mesenquimático (Von Gise *et al.*, 2012). Existen otros elementos con un papel relevante en la EMT que sufre el epicardio durante el desarrollo embrionario. Así, el factor de transcripción Snail es regulado por otro factor de transcripción denominado **Wt1** (Martínez-Estrada *et al.*, 2010). En el contexto cardíaco, Wt1 es solamente expresado en epicardio y células derivadas del epicardio (EPDCs). Wt1 no sólo es un activador de Snail, sino que también es un represor de E-cadherina, participando en el mantenimiento de las EPDC en un estado mesenquimático (Martínez-Estrada *et al.*, 2010) (ver Figura 1.3).

Por otro lado, miembros de la familia T-box, como **Tbx2**, **Tbx5**, **Tbx18** y **Tbx20** median también los procesos de EMT en epicardio (Greulich *et al.*, 2012). Concretamente, Tbx18, en combinación con otros miembros de la familia T-box, mantiene el carácter precursor de las células epicárdicas, lo cual permite la

movilización y diferenciación de éstas y, por ende, contribuye a la formación de fibroblastos cardíacos y parte de la vasculatura coronaria (Greulich *et al.*, 2012).

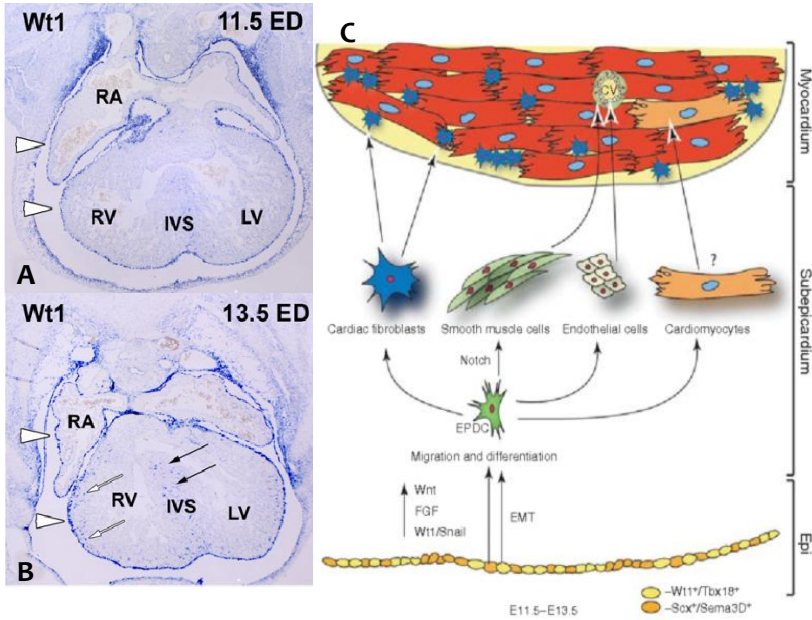


Figura 1.3. (A-B) Imágenes de hibridación in situ en secciones en las que se muestra la expresión de wt1 en epicardio (cabeza de flechas) y en EPDCs (flechas) en dos estadios del desarrollo embrionario de ratón. (C) Formación de las EPDCs. Entre los estadios E11.5-13.5 de ratón, las células epicárdicas sufren EMT mediada por las señales Wnt, FGF y Wt1/Snail. Como consecuencia, las EPDCs surgen en el espacio subepicárdico, para diferenciarse posteriormente hacia varios tipos de células. Como se indica en la figura, las EPDCs pueden contribuir a la formación de células de musculatura lisa, células endoteliales y fibroblastos cardíacos. La diferenciación de EPDC hacia el linaje miocárdico sigue aun siendo objeto de estudio. RA: atrio

derecho; RV: ventrículo derecho; IVS: septo intervenricular; LV: ventrículo izquierdo.
(Imágenes tomadas de Wessels *et al.*, 2012 (A y B) y Brade *et al.*, 2013 (C).

Como resultado de la activación de la EMT, las células epiteliales del epicardio adquieren una capacidad invasiva que les permite adentrarse en el miocardio a través de la pared ventricular y después por la aurícula llegando hasta los cojines endocárdicos, estructuras a partir de las cuales se originarán las válvulas cardíacas (Eisenberg y Markwald, 1995). Esta capacidad de invasión de **células derivadas del epicardio (EPDC)** a tejidos miocárdicos es esencial para la compactación miocárdica del ventrículo. El proceso de EMT en el epicardio también proporciona células de la vasculatura coronaria así como de los tejidos conectivos del corazón (Brade *et al.*, 2013) (Figura 1.4).

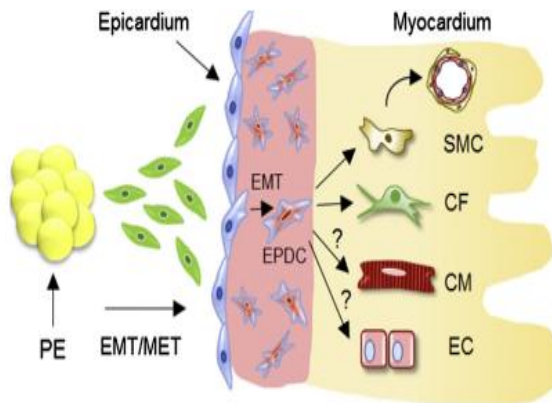


Figura 1.4. El epicardio se origina a partir del proepicardio (PE). Las células proepicárdicas sufren en primera instancia una transición epitelio-mesénquima

(EMT), donde las células migran, se adhieren y recubren la superficie miocárdica tras sufrir el proceso inverso (transición mesénquima-epitelial (MET)). Como resultado, se forma una capa de tejido epitelial, denominada epicardio, que constituye la capa más externa del corazón. Mientras el epicardio permanece intacto, algunas de las células epiteliales pasarán por un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y migrarán hacia la matriz subepicárdica (en rosa). Estas células derivadas del epicardio (EPDCs) se diferenciarán en células del músculo liso (SMCs), contribuyendo a la vasculatura coronaria, y en fibroblastos cardiacos (CF) del corazón maduro. La contribución de las EPDCs a las células endoteliales cardiacas (ECs) y a cardiomiocitos (CM) ha sido descrita pero aún hoy sigue siendo objeto de debate (tomado de Smits *et al.*, 2018).

1.2 Células madre como modelos in vitro de cardiogénesis: paradigma para la regeneración cardiaca

1.2.1 Células madre embrionarias (ESCs)

Las **células madre** o **stem cells** son una población de células indiferenciadas caracterizadas por la habilidad de proliferar de forma considerable. Generalmente surgen de una sola célula y se diferencian en varios tipos celulares y tejidos (Thomson, 1998). Las *stem cells* se encuentran presentes tanto en el estadio embrionario como en fetal y adulto, y dan lugar a células diferenciadas con capacidad para formar tejidos y órganos, lo que las hace una excelente herramienta terapéutica para reparar lesiones en órganos dañados (Cahan *et al.*, 2013).

Las características de las *stem cells* incluyen la habilidad de proliferar ampliamente (**autorrenovación**), que de una única célula puedan surgir muchas más (**clonalidad**), y la capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares (**multipotencialidad**) (Daley, 2015). Según su origen, las *stem cells* pueden clasificarse en **células madre embrionarias (ESCs)**, **células madre adultas** y **células madre de pluripotencia inducida (iPSCs)**. Otra forma de clasificar las células madre viene determinada por los tipos celulares a los que puede diferenciarse. Las **células madre totipotentes** son capaces de formar estructuras embrionarias y extraembrionarias. Este es el caso de las células obtenidas a partir de cigotos a los pocos días de su formación. Por otro lado, las **células madre pluripotentes** son aquellas que, si bien puede originar todos los tipos celulares del organismo, no ocurre lo mismo con membranas extraembrionarias. Este es el caso de las ESCs o iPSCs. Por último, encontramos las **células madre multipotentes**, capaces de diferenciarse a varios tipos celulares de un mismo linaje. Es el caso de las células madre hematopoyéticas (revisado en Nadig, 2009; Zakrsewski et al., 2019).

La generación de hiPSCs fue establecida en el año 2006 con el uso de un “cocktail” de genes que convertían células somáticas en células con propiedades de *stem cells* (Takahashi y Yamanaka, 2006). Estos factores de transcripción incluían a

Oct3/4, Sox2, Klf4, y c-Myc. Por otro lado, las ESC se obtienen de la masa celular interna (ICM) del blastocisto antes de su implantación (Figura 1.5). Bajo condiciones apropiadas de cultivo in vitro, las ESCs presentan una capacidad de autorrenovación de forma ilimitada, y al mismo tiempo retienen su capacidad pluripotente (Smith, 2001). Las ESCs procedentes de ratón fueron establecidas en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Años después se pudo obtener ESCs procedente de humanos y rata (Thomson et al., 1998; Buehr et al., 2008; Li et al., 2008). Es destacable reseñar que las ESCs procedentes de estos modelos, requieren condiciones de cultivos distintas para mantener sus propiedades pluripotentes. En este sentido, se han utilizado diversos factores de crecimientos y citoquinas para activar o inhibir diversas vías de señalización con el propósito de mantener el estado de autorrenovación de estas ESCs (ver Huang et al., 2015). Entre las vías de señalización reportadas para jugar un papel importante en la capacidad de autorrenovación y pluripotencialidad de ESCs encontramos LIF/STAT3, Wnt/ β -catenina, FGF/ERK, TGF/SMAD y la vías de señalización PKC (ver Huang et al., 2015).

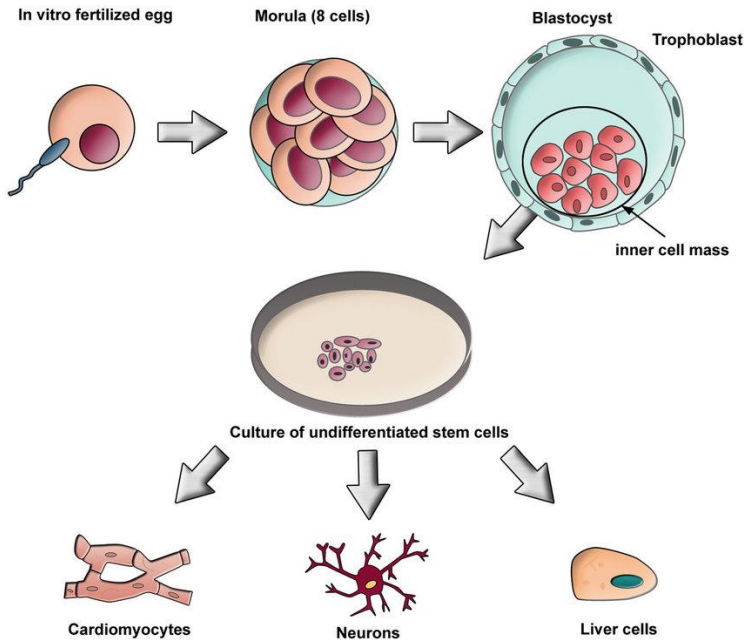


Figura 1.5. Generación de células madre embrionarias. Se permite que un óvulo fertilizado se desarrolle hasta la etapa de blastocisto. La masa celular interna se disocia del trofoblasto mediante disección con láser o digestión enzimática. Las células aisladas se cultivan en este estado pluripotente durante un largo período de tiempo en presencia de factores de crecimiento. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en varios linajes celulares, como cardiomiocitos, neuronas o células hepáticas (Abou-Saleh *et al.*, 2018) .

El método convencional para conseguir la diferenciación de las ESC es a través de la formación de **cuerpos embrionarios (EB, embryoid bodies)**, los cuales son cultivados en suspensión como agregaciones de ESCs (revisado en Egashira *et al.*, 2011). La diferenciación y obtención de un determinado tipo celular a partir de células madre pluripotentes, ya sean ESCs o

iPSCs, ha sido ya descrita para determinados tipos celulares tales como neuronas, hepatocitos, cardiomiocitos, etc. (Muller , 2000; Reubinoff , 2000; Rambhatla , 2003; Xu , 2002). Esto puede ofrecer una potencial fuente ilimitada de un determinado tipo celular que podrían ser utilizadas para regenerar y reparar tejidos dañados o enfermos. Además de las implicaciones desde el punto de vista de la medicina regenerativa, células obtenidas a partir a partir de iPSCs de un paciente pueden ser utilizados para la búsqueda del mejor candidato terapéutico que trate la enfermedad que padece dicho paciente (Später *et al.*, 2014). En el caso de ESCs, el beneficio terapéutico es limitado, habida cuenta de que la obtención de ESCs implica la destrucción de embriones, con el consecuente dilema moral que esto genera. Además, el control del crecimiento y diferenciación de las ESCs puede conllevar la aparición de teratomas (revisado en Nadig, 2009). A pesar de ello, las ESCs suponen una importante herramienta para ser estudiadas como modelos de regeneración cardíaca *in vitro*. Además, los mecanismos de diferenciación de las células madre pluripotentes son similares a los mecanismos que regulan el desarrollo temprano del embrión, por lo que las ESCs constituyen además un perfecto modelo para el estudio de la morfogénesis *in vitro* (Kuzmenkin *et al.*, 2009; Yokoo *et al.*, 2009; Van Laake *et al.*, 2010; Xi *et al.*, 2010). Un mejor conocimiento de los mecanismos de especificación y/o diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, son de

gran ayuda a la hora de llevar a cabo estudios *in vitro* con ESCs y, en un contexto cardiaco, para la obtención de cardiomiocitos en el laboratorio a partir de células madre (Später et al., 2014).

En este sentido, varios estudios utilizando moléculas implicadas en el desarrollo cardiaco ponen de manifiesto su papel en la cardiogénesis *in vitro*, observándose que, entre varias proteínas, Wnt/ β -catenina (Klaus et al., 2007; Ueno et al., 2007), activina/nodal (Parisi et al., 2003; Yang et al., 2008) y BMP (Hao et al., 2008), así como la familia de los genes **T-box** al que pertenecen al gen **Brachyury** (T) (Smith, 1997), son cruciales en el desarrollo normal del corazón, por lo que, el uso estas proteínas en cultivos de ESCs e iPSC podría ayudar a la diferenciación hacia cardiomiocitos a partir de ESCs.

Otro elemento a tener en cuenta a la hora de diferenciar ESCs hacia cardiomiocitos, es el hecho de que estas células madre son particularmente sensibles al ambiente externo, tomando una especial relevancia el momento en el que están activos determinadas rutas de señalización o presentes determinados factores de crecimiento, todos ellos esenciales para la especificación hacia un linaje cardiaco (revisado en Später et al., 2014). De hecho, la obtención de cardiomiocitos en determinadas líneas humanas de ESCs, requiere primero de una activación y posterior inactivación de la vía de señalización Wnt (Lian et al., 2012, 2013). Este mecanismo de regulación bifásico a

partir de Wnt es también observado durante el desarrollo, de tal forma que la actividad de esta vía de señalización varía dependiendo de la etapa del desarrollo en el que se encuentre (Naito *et al.*, 2006; Ueno *et al.*, 2007). Esto nos indica la importancia de conocer los mecanismos que regulan la especificación y diferenciación cardíaca durante el desarrollo *in vivo*, para poder así trasladarlos a nuestros modelos *in vitro*.

A pesar de todo lo que se ha avanzado en el conocimiento de las ESCs, en la actualidad aún no conseguimos una eficiencia alta en la obtención de células diferenciadas a partir de células madre, tal y como ocurre con cardiomiocitos (Später *et al.*, 2014). Cada línea células de ESCs requiere de protocolos específicos de optimización de crecimiento y diferenciación. Esto imposibilita aún hoy día plantear posibles terapias regenerativas en el corazón, salvando los obstáculos ya mencionados, o utilizar estas células madre como una nueva plataforma para el estudio de patologías cardíacas y su tratamiento. Los diversos estudios revelan la necesidad de añadir diversas moléculas en un momento preciso para mejorar la eficiencia de diferenciación de las ESCs hacia un linaje cardíaco (Nosedá *et al.*, 2011). La adición de factores de crecimiento como FGF, VEGF, junto con la inhibición de Nodal, permite obtener valores de eficiencia de diferenciación cardíaca del orden del 50%. Los mejores resultados se han obtenido en ESCs humanas

mediante la modulación de la vía Wnt/ β -catenina, llegando a valores de entre el 80 y el 98% de eficiencia en la obtención de cardiomiocitos a partir de ESCs (Lian *et al.*, 2012, 2013).

Finalmente, con el objetivo de usar las células madre y su diferenciación en terapias regenerativas, no sólo es importante obtener una población enriquecida de cardiomiocitos *in vitro*; también será necesario poder disponer de protocolos para la obtención de los distintos tipos de cardiomiocitos que constituyen el corazón. En este sentido, si bien los cardiomiocitos originados a partir de células madre comparten características moleculares, eléctricas, mecánicas y ultraestructurales con cardiomiocitos *in vivo*, los primeros son más parecidos a cardiomiocitos fetales al ser comparados con adultos (Später *et al.*, 2014). Por otro lado, el infarto de miocardio o el fallo cardíaco afecta principalmente a los ventrículos. Los protocolos de obtención de cardiomiocitos a partir de células madre tendrán que ser optimizados para la obtención de cultivos enriquecidos con cardiomiocitos ventriculares, evitando así posibles efectos adversos a la hora de ser trasplantados en el corazón enfermo (revisado en Später *et al.*, 2014).

En resumen, aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la

autorrenovación y pluripotencialidad de las ESCs, como hemos visto aún quedan muchos aspectos que aclarar para poder usar estas células madre como un buen modelo de regeneración y patología cardíaca. Nuevas herramientas moleculares basadas en el uso de plásmidos, retrovirus, proteínas recombinantes o microARNs, se postulan como nuevos instrumentos a la hora de poder generar grandes cantidades de cardiomiocitos a partir de ESCs, así como elementos esenciales para controlar el tipo y características de las células cardíacas obtenidas.

1.2.2 Modelos *in vitro* e *in vivo* de las células derivadas del epicardio (EPDCs)

Como hemos dicho anteriormente, las EPDCs tienen capacidad de invadir tejidos miocárdicos después de la formación inicial del epicardio (Pérez-Pomares *et al.*, 2002). Estas EPDCs tienen capacidad de generar diferentes tipos cardíacos, tales como fibroblastos y músculo liso (Zhou *et al.*, 2008; Groot *et al.*, 2010; Wessels *et al.*, 2012) si bien, a día de hoy, aún no está claro su participación en la formación de endotelio y miocardio (Christoffels *et al.*, 2009; Duim *et al.*, 2015) La capacidad de generar distintos tipos celulares, añadido al hecho de que algunas EPDCs permanecen en un estado más o menos indiferenciado, ha hecho que algunos autores lleguen a considerarlas como “verdaderas *stem cells*” (Wessels y Pérez-Pomares, 2004).

El estudio de células epicárdicas, de cómo estas sufren EMT, migran y se diferencian a determinados linajes celulares cardiovasculares, ha sido abordado usando tanto modelos *in vitro* como *in vivo*. Los modelos *in vitro* utilizan corazones embrionarios, alrededor de 11.5 ó 12.5 días *post coitum*, los cuales son dispuestos en placas con pocillos cubiertos con una matriz de colágeno (Ramesh *et al.*, 2016; Trembley *et al.*, 2016). Estos corazones embrionarios se dejan incubar varios días para que las células superficiales del corazón, las cuales corresponden al epicardio, delaminen y terminen tapizando la matriz de colágeno. La monocapa de células epicárdicas que se forma, identificadas con marcadores característicos de epicardio como Tbx18 o Wt1 (Ramesh *et al.*, 2016), puede ser estimulada para que sufran EMT tras la adición de factores de crecimiento como el TFGβ. Como consecuencia, las células epiteliales que cubren la matriz de colágeno adquieren un fenotipo mesenquimal, migrando hacia el interior del colágeno (Ramesh *et al.*, 2016; Trembley *et al.*, 2016) (ver Figura 1.6).

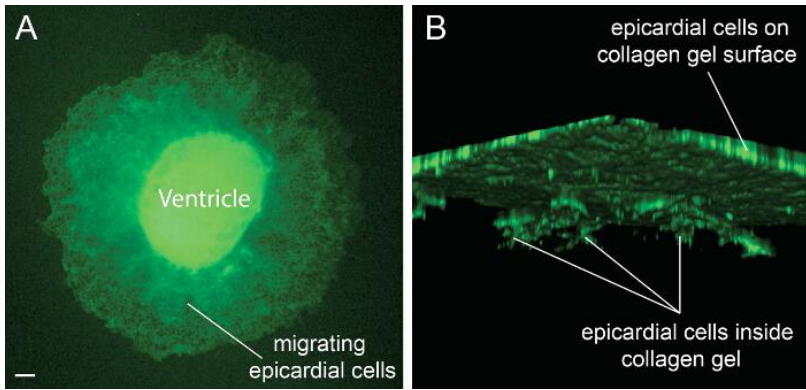


Figura 1.6. Migración de células epicárdicas en la superficie del gel de colágeno. Los ventrículos de embriones E12.5 se cultivaron en una matriz de gel de colágeno tridimensional y se tiñeron con Alexa Fluor 488-faloidina para visualizar la migración y penetración celular derivada del epicardio (A). Se utilizaron imágenes confocales para construir una imagen tridimensional para determinar la penetración celular a lo largo de los ejes z (B). Barra de escala = 50 μm . (Imagen tomada de (Ramesh *et al.*, 2016).

Además de conservar su capacidad migratoria, las EPDCs obtenidas *in vitro* también preservan su capacidad de diferenciación a músculo liso y fibroblastos (van Tuyn *et al.*, 2007; Austin *et al.*, 2008; Bax *et al.*, 2011). La adición de otros factores tales como timosina $\beta 4$, VEGF o FGF7, puede incrementar el número de células diferenciadas de un determinado linaje (Smart *et al.*, 2007). Aún siendo controvertido, un trabajo publicado por el grupo de William Pu (Zhou *et al.*, 2008) demostró *in vitro* la diferenciación de células wt1+ hacia cardiomiocitos.

Estos modelos *in vitro* para el estudio de las células epicárdicas y EPDCs son excelentes herramientas para analizar los mecanismos moleculares que regulan la EMT y la diferenciación de EPDCs hacia los distintos linajes cardiacos. Sin embargo, no debemos olvidar que, debido a las condiciones artificiales del modelo, puede que no se recapitule exactamente todos los eventos que tienen lugar en las EPDCs *in vivo*.

En este sentido, varios modelos animales han contribuido a una mejor comprensión de la contribución de las EPDCs a los distintos linajes celulares cardiovasculares. Estos modelos *in vivo* se basan en el uso de Cre-recombinasa, la cual actuaría bajo la acción del promotor de algún marcador epicárdico (Smits *et al.*, 2018). El uso de la herramienta Cre-loxP nos ha permitido llevar a cabo estudios de linajes celulares a partir de células epicárdicas, en el que un marcador fluorescente es activado por Cre bajo la dirección del promotor específico epicárdico. Los análisis de linaje de carácter genético mediante este sistema nos han permitido llevar exhaustivos análisis de linaje celular a partir de epicardio, no, sin antes, presentar algunos inconvenientes. De hecho, existen discrepancias en los resultados obtenidos en cuanto a la contribución del epicardio a un tipo celular u otro, discrepancias que vienen determinados por el modelo o promotor utilizado para dirigir la acción de Cre-recombinasa (Smits *et al.*, 2018).

Uno de los promotores epicárdicos más utilizado para el diseño de líneas Cre-loxP es el de Wt1. Estos animales nos han permitido consensuar el origen epicárdico de los fibroblastos y de la musculatura lisa en el corazón en desarrollo (Smits *et al.*, 2018). El análisis de los distintos modelos demuestra que la mayoría de las células epicárdicas y EPDCs localizadas en la región subepicárdica expresan el gen marcador o *reporter* (Zhou *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2016). En estadios posteriores (E12.5 días post coitum), cuando la EMT en epicardio es evidente, comienzan a observarse células positivas para el *reporter* dentro de la pared miocárdica. Estas EPDCs fueron descritas por presentar marcadores específicos de fibroblastos cardiacos (Wessels *et al.*, 2012) y músculo liso (Zhou *et al.*, 2008), indicándonos el origen epicárdico de ambos tipos celulares.

La contribución del linaje epicárdico a las células endoteliales ha sido y es objeto de debate aún (Smits *et al.*, 2018). Sin embargo, un trabajo reciente publicado por el grupo de Pérez-Pomares (Cano *et al.*, 2016), en el cual se utilizó el modelo Wt1-Cre-YFP+, ha demostrado, además de la contribución de epicardio a la musculatura lisa del corazón y la contribución del linaje epicárdico al endotelio de células coronarias, las cuales colocalizaron con el marcador endotelial CD31 (YFP+/CD31+) (Cano *et al.*, 2016) (Figura 1.7).

Si las células miocárdicas proceden o no del linaje epicárdico no está del todo claro. Los modelos animales que utilizan el promotor de *Wt1* para dirigir la actividad Cre-recombinasa no son idóneos para poder responder esta pregunta. Algo similar ocurre con los modelos que utilizan el promotor de *Tbx18*. Esto es debido, simplemente, a que algunos autores han podido demostrar la expresión de *Wt1* (Rudat y Kispert, 2012) y *Tbx18* (Christoffels *et al.*, 2009) en cardiomiocitos, lo cual estaría activando a Cre-recombinasa, y por ende, al *reporter*, sugiriéndonos erróneamente el origen epicárdico de los cardiomiocitos.

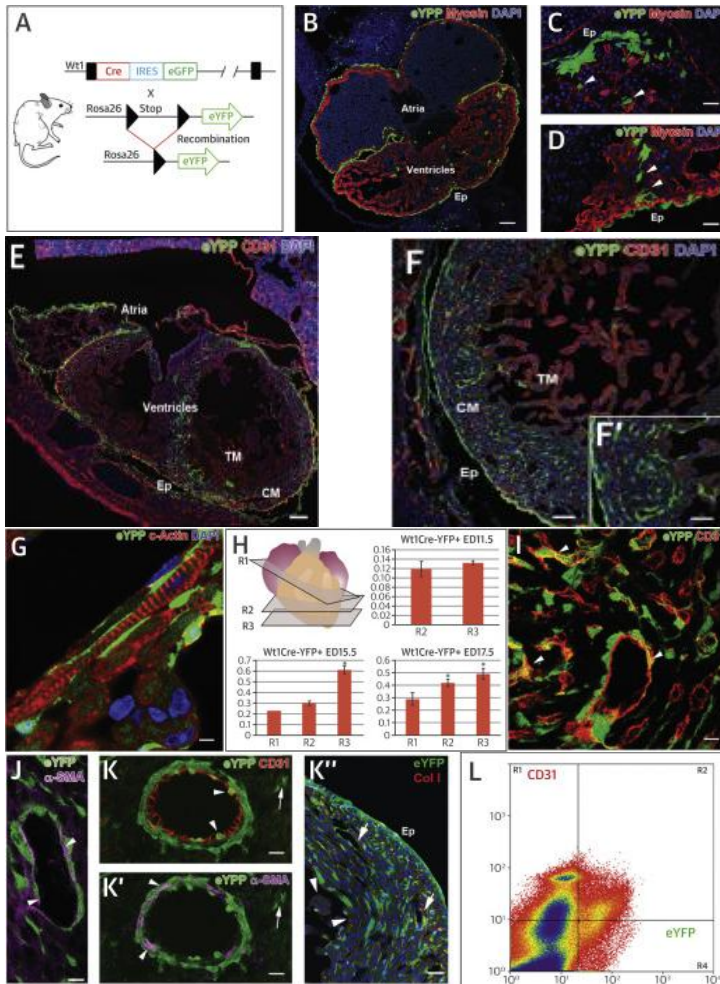


Figura 1.7. (A) Los ratones Wt1Cre-YFP se generaron con la expresión activada permanentemente de la proteína amarilla fluorescente (eYFP+YFP⁺). (B a D) Epicardio (Ep) y células derivadas de epicardio (EPDC) (puntas de flecha) expresan YFP en el estadio E-11.5. También en los estadios E-15.5 (E); E17.5 (F) y post-natal (G) colonizan el miocardio ventricular. (H) El área de eYFP⁺ se normaliza con respecto al

área total de DAPI⁺ en diferentes ubicaciones del corazón. Las células eYFP⁺ ventriculares adultas se integran en el endotelio de los vasos sanguíneos coronarios (I a K; puntas de flecha), la pared muscular (J, K, K'; puntas de flecha) o el intersticio cardíaco (K y K', flecha). Este último tipo de célula intersticial no expresa el colágeno I (Col I), presente en el subendocardio (K'', puntas de flecha) o formando vasos coronarios (K'', flechas). (L) Las células CD31⁺ de corazones adultos son el 37% de células eYFP⁺ de la población intersticial (Ruiz-Villalba *et al.*, 2015).

Otro modelo utilizado para estudiar el origen epicárdico de las células cardíacas es el G2-Gata4Cre. En este modelo, un activador del gen Gata4, denominado G2, dirige la actividad Cre-recombinasa, y ha sido descrito anteriormente en otros estudios de linajes celulares (Cañete *et al.*, 2017). El grupo de Pérez-Pomares (Cano *et al.*, 2016) ha caracterizado este modelo después de ser cruzado con animales Rosa26-YFP. Los embriones resultantes dobles positivos (Cre+/YFP+), mostraron expresión del *reporter* en proepicardio, epicardio y EPDCs. Curiosamente, algunas células que expresaban Wt1, fueron G2-CreYFP-, indicando que la expresión de Wt1 puede ocurrir en células epicárdicas que no pertenecen a la población G2-Gata4. Conforme avanza el desarrollo, estos autores encontraron células G2-CreYFP+ en la región subepicárdica y migrando en la capa muscular del corazón. De forma similar a lo que habían descrito con el modelo Wt1-Cre-YFP+, células G2-CreYFP+ procedentes del miocardio contribuyeron a la formación de los vasos coronarios (Cano *et al.*, 2016).

A pesar de que aún quedan algunos aspectos que aclarar, como hemos visto, en cuanto a la contribución del epicardio a cada uno de los tipos celulares cardiovasculares, se hace patente que las células epicárdicas juegan un papel importante en la configuración del corazón embrionario.

Por último, habría que indicar que el epicardio permanece en estado quiescente después en etapa adulta (revisado en Smits *et al.*, 2018). Análisis usando modelos en los que la actividad de Cre-recombinasa es medida por la adición de tamoxifeno, ponen de manifiesto que no existe contribución de las células epicárdicas a la capa muscular del corazón después del nacimiento (Zhou *et al.*, 2011). Sólo en condiciones de isquemia, las células epicárdicas reactivan su programa molecular embrionario para sufrir EMT y migrar hacia el miocardio, en un intento de regenerar la zona lesionada (Zhou *et al.*, 2011; Smits y Riley, 2014). Por ello que, nuevamente, tome especial relevancia descifrar los mecanismos moleculares y celulares que dirigen la EMT en epicardio, la formación de EPDCs y diferenciación de éstas hacia distintos tipos celulares durante el desarrollo embrionario. Los hallazgos obtenidos en este tipo de estudios durante el desarrollo, puede aportarnos nuevas herramientas para activar el epicardio e intentar regenerar el corazón infartado.

1.3 MicroARNs

Los microARNs son pequeñas moléculas monocatenarias de entre 22 y 24 ribonucleótidos que no codifican para una proteína y que actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica (revisado en Islas y Moreno-Cuevas, 2018), ya que son capaces de interferir en la estabilidad del ARN mensajero y/o del proceso traduccional a nivel de mensajero (Bartel, 2009; Sohnel, 2016).

La biogénesis de los microARNs comienza con la transcripción de la secuencia a partir del ADN. Como consecuencia se origina un precursor del microARN, un pri-microARN, que posee un tamaño aproximado de unos 70 nucleótidos. Este precursor es editado en el núcleo de la célula en sus extremos por la enzima Drosha y *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8), para pasar posteriormente al citoplasma celular gracias a la acción de la Exportina 5 en forma de pre-microARN. Es en el citoplasma de la célula cuando la enzima Dicer se encarga de la edición del microARN para obtener una versión madura y funcional de este ARN no codificante (revisado en Tian *et al.*, 2017)(Katz *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018) (Figura 1.8).

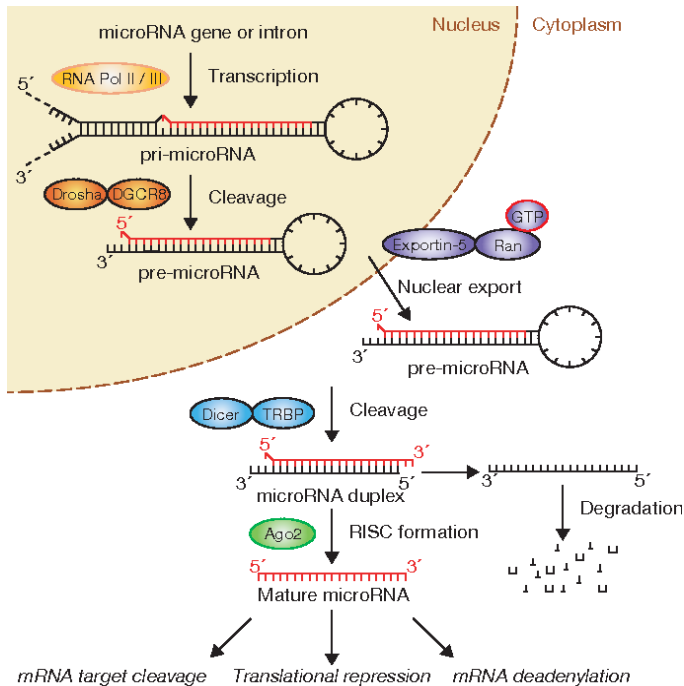


Figura 1.8. La vía canónica "lineal" del procesamiento de microARNs. La ruta de procesamiento de microARNs ha sido vista como lineal y universal para todos los microARNs de mamíferos. Esta maduración canónica incluye la producción de la transcripción primaria del microARN (pri-miARN) por la ARN polimerasa II o III y la escisión del pri-miARN por el complejo de microprocesador Droscha-DGCR8 (Pasha) en el núcleo. La horquilla precursora resultante, el pre-miARN, se exporta desde el núcleo por Exportin-5-Ran-GTP. En el citoplasma, la RNasa Dicer en complejo con la proteína de unión a ARN bicatenaria TRBP escinde la horquilla pre-miARN a su longitud madura. La cadena funcional del microARN maduro se carga junto con proteínas Argonaute (Ago2) en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC), donde guía a RISC para silenciar los ARNm objetivo a través de la escisión del ARN mensajero, la represión traduccional o la deadenilación, mientras que la otra hebra del dúplex (negro) es degradada (Winter et al., 2009).

La regulación de la expresión génica por parte de microARNs dependerá de la complementariedad microARN-ARN mensajero o del número de microARNs unidos al transcrito (Sandberg *et al.*, 2008). En este sentido, si la complementariedad secuenciadiana es completa se producirá la degradación de los transcritos, mientras que una complementariedad parcial derivará en la inhibición de la traducción (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006).

Los microARNs fueron descubiertos en nematodos en la década de los 90 (Lee *et al.* 1993). Hoy día sabemos que una tercera parte de un genoma completo puede ser regulada por microARNs (Lewis *et al.*, 2003). Desde su descubrimiento, nuestra comprensión de la biología, los mecanismos y las funciones de los microARNs ha crecido de manera exponencial. Numerosos estudios indican que los microARNs están implicados en una gran variedad de procesos biológicos básicos, como el metabolismo, proliferación, diferenciación, estrés celular, apoptosis, cáncer, etc. (Osada y Takahashi, 2007), así como en otros procesos desde la embriogénesis hasta la vida adulta (Lee *et al.*, 1993; Kwon *et al.*, 2005; Van Rooij *et al.*, 2006)

1.3.1 MicroARNs en ESCs e inducción de cardiomiocitos

Los microARNs son esenciales para el mantenimiento de la pluripotencialidad de células progenitoras jugando, por ende, un papel fundamental durante el desarrollo embrionario. De hecho, animales nulos para *Dicer*, en los cuales se bloquea la

maduración de los microARNs, mostraron letalidad embrionaria en ratón en un estadio E7.5 (Bernstein *et al.*, 2003). Cuando se analizan ratones heterocigotos, se observa una reducción en los niveles de expresión de Oct4, lo cual nos indicaría una pérdida de células madre en el embrión (revisado en Pang *et al.*, 2019).

Los altos niveles de expresión de algunos microARNs en células madre ponen de manifiesto su importante papel en el mantenimiento de la capacidad pluripotencial de éstas. Este es el caso de microARNs como miR-34a y la familia del miR-290 (miR-291-3p, miR-294, miR-295) (Judson *et al.*, 2009; Li y He, 2012; Choi *et al.*, 2017). microARNs como miR-134, miR-296, y miR-470 modulan la pluripotencialidad de las células madre mediante la regulación de factores de transcripción que imprimen carácter pluripotencial a las células, tales como Nanog, Oct4 y Sox2 (Tay *et al.*, 2008). De hecho, un estudio ha demostrado que Oct4, Sox2, Nanog y el Factor de transcripción 3 (Tcf3) poseen sitios de unión para microARNs que se expresan de forma preferencial o exclusiva en ESCs (Marson *et al.*, 2008). Además de controlar la acción de factores de transcripción, un reciente trabajo demuestra como la familia del miR-290 afecta a la pluripotencialidad y diferenciación de las ESCs mediante regulación epigenética (Sinkkonen *et al.*, 2008).

Por otro lado, los microARNs son indispensables para poder llevar a cabo la reprogramación celular a partir de células

madre, así como también modular la diferenciación de estas células progenitoras hacia distintos tipos celulares. Un estudio llevado a cabo con fibroblastos en los que la expresión de *Dicer* estaba bloqueada, demostró que estas células no podían ser reprogramadas a iPSCs usando el método tradicional de sobreexpresión de factores, sugiriendo el papel obligado de los microARNs durante la reprogramación celular (Kim *et al.*, 2012) Por ejemplo, la familia del microARN-302 y 372 parecen ser elementos claves en la eficiencia de reprogramación de célula pluripotenciales inducidas (Subramanyam *et al.*, 2011; Heinrich y Dimmeler, 2012) La combinación de estos microARNs junto con otros también expresados de forma importante en iPSCs y ESCs, es suficiente para reprogramar células somáticas murinas y humanas a un estado de pluripotencia (Miyoshi *et al.*, 2011).

La desregulación de los genes que confieren pluripotencialidad a las células madre conlleva un descenso de la capacidad de autorreplicación de esas células progenitoras e induce su diferenciación hacia un determinado linaje celular. Este es el caso del microARN-145, el cual se une al extremo 3'UTR de Oct4, Sox2 y Klf4 (Xu *et al.*, 2009), reprimiendo su expresión. Numerosos estudios comienzan a perfilar un listado de microARNs que participan en la diferenciación hacia un determinado tipo celular a partir de células madre; microARN-22 para células de musculatura lisa (Zhao *et al.*, 2015), microARN

26a y 26b en la diferenciación hacia adipocitos (Karbiener *et al.*, 2014), etc.

En un contexto cardíaco, y dada las limitadas posibilidades de regenerar el corazón, la diferenciación hacia un linaje cardíaco a partir de células somáticas o células madre, ha sido un campo ampliamente explorado por muchos grupos en los últimos años (Guo *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2013). La diferenciación directa hacia un linaje cardíaco a partir de células somáticas fue llevado a cabo en origen con factores de transcripción con un papel relevante en la especificación y desarrollo cardíaco (Srivastava y Ieda, 2012), sin tener en cuenta otros elementos regulatorios como los microARNs (Christoforou *et al.*, 2013; Xin *et al.*, 2013; Belian *et al.*, 2015). Un estudio pionero llevado a cabo por el grupo de DZau demostraba que sólo la sobreexpresión del miR-1 era suficiente para transdiferenciar fibroblastos cardíacos a cardiomiocitos (Jayawardena *et al.*, 2012). Este y otro microARN, como el miR-133, se expresan de forma específica en músculo cardíaco y esquelético, siendo regulados por alguno de los elementos más importantes en la diferenciación muscular como MyoD o Mef2 (Rao *et al.*, 2006). Mientras el miR-1 provoca la diferenciación de progenitores cardíacos (Kwon *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007), el miR-133 inhibe la diferenciación de los mioblastos esqueléticos, manteniéndolos en un estado proliferativo (Chen

et al., 2006). La expresión de ambos microARNs en ESCs promueve la expresión de genes mesodérmicos, inhibiendo la diferenciación hacia un linaje ecto o endodérmico.

Otro estudio llevado a cabo en esta década, demuestra como el microARN-1 y el microARN-499 son capaces de modular la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras cardíacas, disminuyendo su expresión la capacidad proliferativa en estos progenitores cardíacos y ESCs, así como aumentando la diferenciación cardiogénica. La expresión de estos microARNs en cardiomiocitos derivados de ESCs controlan principalmente aspectos eléctricos de las células cardíacas, promoviendo la expresión de canales iónicos como Kir2.1, Kv1.4, HERG, etc. (Fu *et al.*, 2010; Lieu *et al.*, 2013). Además, el microARN-499 ha sido implicado en la expresión de proteínas estructurales tales como MHC6 (α MHC), MHC7 (β MHC), MLC2 y TNNT2 (Xin *et al.*, 2013).

En resumen, los trabajos sobre el papel de los microARNs en ESCs o células progenitoras cardiovasculares son relativamente recientes. Por otro lado, algunos de los eventos biológicos característicos del desarrollo embrionario, tales como proliferación, especificación y diferenciación celular, comparten mecanismos moleculares idénticos a los observados en ESCs. Habida cuenta de la imposibilidad en estos momentos de disponer terapias regenerativas en el corazón, los microARNs se postulan como unos buenos candidatos para seguir

estudiándolos tanto *in vitro* con ESCs como *in vivo* durante la embriogénesis, con el objetivo final de mejorar la eficiencia en la obtención de distintos tipos de cardiomiocitos a partir de células madre.

1.3.2 MicroARNs en la morfogénesis cardíaca

Como hemos comentado ya, los microARNs confieren propiedades particulares a las células madre y participan en los procesos de diferenciación de éstas. Las rutas moleculares por las cuales los microARNs regulan la pluripotencialidad y diferenciación de las *stem cells* son similares a las que acontecen durante la embriogénesis a partir de los progenitores embrionarios, en procesos tales como proliferación, apoptosis, diferenciación o migración. De forma general, las primeras etapas del desarrollo embrionario implican la generación de distintos tipos de células a partir de una sola célula totipotente, mediante el establecimiento de gradientes de morfógeno para transmitir información posicional dentro del embrión (Gregor et al., 2007). Experimentos llevados a cabo en pez cebra indica la presencia del microARN-430, un represor tanto del agonista como del antagonista de Nodal, determinante del eje derecha-izquierda del embrión (Brennan et al., 2002), actuando a modo de “amortiguador” de las fluctuaciones transitorias de este morfógeno y, por ende, evitando errores de patrones en el embrión (Choi et al., 2007) Por otro lado, los microARNs

también pueden facilitar la descomposición de los ARN mensajeros de morfógenos existentes cuando ya no son necesarios. Por lo tanto, en el contexto del desarrollo, los microARNs son cruciales para el ajuste fino de los gradientes de morfógenos que permitan la especificación precisa del destino y la diferenciación de progenitores embrionarios (revisado en Pang et al., 2019).

El desarrollo cardíaco es un proceso complejo de morfogénesis en el que la expresión génica está controlada tanto espacial como temporalmente en las distintas regiones cardíacas (Franco et al., 2002). Además de factores de transcripción y otras moléculas que controlan el desarrollo del corazón (Srivastava, 2006) los microARNs juegan un papel esencial durante la cardiogénesis (Katz et al., 2016) (revisado en Islas y Moreno-Cuevas, 2018). Esto se pone de manifiesto en estudios llevados a cabo *in vivo* en animales mutantes condicionales. La delección de *Dicer* usando Cre-recombinasa bajo el promotor de *Nkx2.5*, provoca un retraso en el desarrollo de los ventrículos, edema en pericardio y conlleva la muerte de los embriones de ratón a los 12.5 días *post coitum* (Zhao et al., 2007) Cuando se llevaron a cabo ensayos similares pero deleccionando *Dicer* bajo la acción de Troponina cardíaca T, los embriones mostraron letalidad en E15.5, revelándose importantes defectos en miocardio acompañado de una

reducida tasa de proliferación celular (Peng *et al.*, 2014). Estos y otros estudios (Chinchilla *et al.*, 2011), evidencian la complejidad del papel que juegan los microARNs a lo largo de la configuración del corazón embrionario, así como también su expresión diferencial durante la cardiogénesis (ver figura 1.9).

Los microARNs específicos de músculo o miomiRs (miR-1, miR133a, miR208a, miR208b y miR-499) juegan un papel importante en la especificación cardíaca, siendo esenciales para una correcta configuración del corazón embrionario (Ohtani y Dimmeler, 2011) (Figura 1.9). Tal y como describimos en el apartado anterior, el microARN-1 y microARN-133 son dos de los microARNs con un papel más crítico en la formación de cardiomiocitos. Estos microARNs son fundamentales en la proliferación y regulación transcripcional de las células musculares, modulando la actividad de genes tales como *Miocardina*, *Hand2*, *Mef2c*, *Serum Response Factor* (SRF) o *MyoD* (revisado en Islas y Moreno-Cuevas, 2018). El microARN-1 regula el factor de transcripción *Hand2* (Zhao *et al.*, 2005), el cual es esencial para la expansión de los cardiomiocitos ventriculares (Srivastava *et al.*, 1997; Yamagishi *et al.*, 2001; McFadden *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Animales mutantes nulos para el microARN-1-2 muestran importantes alteraciones a nivel morfogénico, con una anormal configuración del sistema de conducción cardíaco e hipoplasia ventricular (Zhao *et al.*, 2007).

Por el contrario, la sobreexpresión del microARN-1 en animales conlleva una reducción de la proliferación de cardiomiocitos (Meder *et al.*, 2008). De forma similar, el microARN-133 inhibe la proliferación de los miocardiocitos (Meder *et al.*, 2008). Animales dobles mutantes para el microARN-133a y microARN-133b muestran importantes defectos septales a nivel ventricular y cardiomiopatía dilatada cuando estos llegan a sobrevivir hasta el nacimiento. Por el contrario, la sobreexpresión de este miR produce letalidad embrionaria debido a la baja proliferación de los cardiomiocitos (Liu *et al.*, 2008).

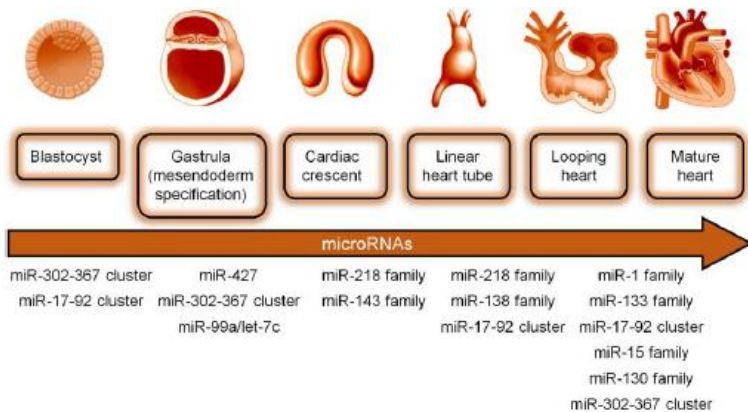


Figura 1.9. Algunos microARNs identificados por jugar un papel importante en distintas etapas del desarrollo cardíaco (Rotini *et al.*, 2018).

Además de estos dos microARNs bien estudiados durante cardiogénesis, existen ya numerosos trabajos que

describen el papel de otros microARNs en distintos aspectos de la biología cardíaca. Por ejemplo, la inducción y represión de la cardiogénesis ha sido también relacionada con la expresión del miR-let7a y el miR-99a, respectivamente (Coppola *et al.*, 2014). De hecho, algunos autores sugieren que es la desregulación de este *cluster* de microARNs la responsable de las malformaciones congénicas cardíacas observadas en sujetos con síndrome de Down (Coppola *et al.*, 2014). El miR-27b ha sido descrito por ser un elemento modulador del factor de transcripción Mef2c, esencial, como hemos visto durante la cardiogénesis (Chinchilla *et al.*, 2011). El miR17-92 promueve la proliferación de los cardiomiocitos en etapas embrionarias y postnatales, protegiendo al corazón infartado cuando es sobreexpresado (Chen *et al.*, 2013). Otros microARNs descritos por participar en la regulación de la capacidad proliferativa de los cardiomiocitos son el miR98, miR-128 y el miR-142, los cuales actúan a través de la actividad de TFG β en el miocardio en desarrollo (Peng *et al.*, 2014). En corazones postnatales y adultos, la capacidad de proliferar por parte de los cardiomiocitos parece estar dirigida, al menos en parte, por los microARNs miR-590 y miR-199a (Eulalio *et al.*, 2012).

También han sido descritos microARNs que regulan negativamente el ciclo celular en cardiomiocitos. La familia del miR-15 parece inhibir la proliferación en células cardíacas

mediante la represión de múltiples reguladores del ciclo celular (Porrello *et al.*, 2011), induciendo, además, a la entrada de las células cardíacas en apoptosis mediante la regulación del factor Bcl2 (Cimmino *et al.*, 2005). De hecho, la sobreexpresión del miR-195, un miembro de la familia del miR-15, ya sea en etapas embrionarias o postnatales, conlleva la aparición de hipertrofia y fallo cardíaco (Van Rooij *et al.*, 2006; Porrello *et al.*, 2011). Otro microARN, el miR-320, también ha sido descrito por regular la muerte celular en cardiomiocitos, habiéndose sugerido como una posible diana molecular para tratar enfermedades cardiovasculares de tipo isquemia (Ren *et al.*, 2009).

Una característica importante de las células cardíacas que se están diferenciando es la adquisición de la maquinaria molecular que le permita contraerse. En este sentido, dos isoformas de miosina, la β MHC y la α MHC se expresan en el corazón de ratón en etapas embrionarias y en corazón adulto, respectivamente (Lompre *et al.*, 1984). Algunos miembros de la familia miomiRs, tales como miR-208a, miR-208b y el miR-499, se expresan a partir de secuencias localizadas en regiones intrónicas de estas miosinas. Su expresión durante el desarrollo embrionario o en caso de patología cardíaca sigue paralela a la de estas proteínas estructurales a las cuales regulan (Callis *et al.*, 2009). De hecho, se ha puesto de manifiesto que en caso de estrés cardíaco, miR-208 es responsable de la aparición de

fibrosis y re-expresión de la isoforma fetal de miosina β MHC, algo característico cuando se produce una reactivación del programa molecular fetal en patologías cardíacas (Van Rooij *et al.*, 2007; Callis *et al.*, 2009; van Rooij *et al.*, 2009). Nuevamente, alteraciones de alguno de estos microARNs son responsables de importantes alteraciones cardíacas. Aunque se ha constatado que el miR-208 no es esencial durante el desarrollo embrionario (Van Rooij *et al.*, 2007; Callis *et al.*, 2009;), sí se ha evidenciado que este ARN no codificante es esencial en la respuesta a estrés por parte del miocardio (Van Rooij *et al.*, 2007), de tal forma que animales nulos para miR-208 no desarrollan hipertrofia o fibrosis inducida por calcineurina. Por el contrario, animales que sobreexpresaron miR-208a, mostraron un patrón cardíaco compatible con hipertrofia (Callis *et al.*, 2009).

Además de imprimir propiedades específicas a las células progenitoras cardíacas y a los cardiomiocitos que se diferencian a partir de éstas, el papel de los microARNs se hace también muy evidente en eventos morfogenéticos característicos del desarrollo cardíaco. Tal es el caso de la elongación del tubo cardíaco en etapas tempranas del desarrollo cardíaco. El crecimiento del tubo cardíaco se produce por ambos polos gracias a la adición de las ya mencionadas células procedentes del SHF (revisado en Buckingham *et al.*, 2005). El análisis de un modelo animal con una delección

simultánea de Bmp2 y Bmp4 bajo la acción del promotor específico del SHF, Mef2c-AHF-Cre (Wang *et al.*, 2010), evidenció un descenso importante de la expresión de algunos miembros de la familia miR-17-92. La reducción de la expresión de estos microARNs fue concomitante con una importante alteración de la diferenciación miocárdica (Wang *et al.*, 2010). Este mismo trabajo demuestra que microARNs de la familia del miR-17-92 regulan negativamente la expresión de Islet1 y Tbx1, genes importantes en la formación del SHF (Wang *et al.*, 2010). En este sentido, animales nulos para miR-17-92 sobreexpresan los dos factores de transcripción mencionados anteriormente, inhibiéndose, por ende, la diferenciación a un linaje cardíaco del SHF. Estos animales mueren poco después del nacimiento debido a defectos en la tabicación ventricular y a la presencia de una doble salida de ventrículo derecho (Mendell, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Otros eventos que tiene lugar durante la cardiogénesis y que son esenciales para la correcta configuración del corazón embrionario son el proceso de torsión cardíaca y la EMT a partir de células de epicardio. Un estudio llevado a cabo en pez cebra demostró como miembros de la familia del miR-218, vía regulación del factor de transcripción Tbx5, participan de forma activa en el *looping* cardíaco (Chiavacci *et al.*, 2012). Los animales con una reducción en los niveles de expresión de miR-218

presentaron además importantes alteraciones morfológicas en las cámaras cardiacas. De forma similar, la expresión del microARN miR-143 al comienzo del *looping* parece jugar un papel esencial en la correcta formación y función de las cámaras del corazón embrionario (Deacon *et al.*, 2010). Es por ello que algunos autores sugieran a estos microARNs, o más bien a su desregulación, como elementos clave en el origen de muchas malformaciones congénitas cardiacas (Chiavacci *et al.*, 2012).

Por otro lado, la EMT tiene lugar en células del epicardio para contribuir a la compactación ventricular, desarrollo de vasos coronarios y cojines endocárdicos, así como ser el origen de los fibroblastos cardiacos. Nuevamente, el papel de los microARNs en la capa externa del corazón se hace evidente al deleccionar *Dicer* de forma específica en el epicardio. En estos animales mutantes el proceso de EMT se encuentra severamente afectado, con una expresión alterada de reguladores de EMT tales como *Wt1*, *Snail1* o *E-cadherina* (Singh *et al.*, 2011). Como consecuencia, los animales nulos para *Dicer* en epicardio mostraron una baja tasa de proliferación y diferenciación en células epicárdicas acompañada de defectos en la formación de vasos coronarios, lo cual producía la muerte de estos animales poco después del nacimiento (Singh *et al.*, 2011). Ya han sido descritos algunos microARNs como reguladores potenciales de la EMT, como son el miR-21, miR23b,

miR-31, miR-103/107, miR-155, miR-199 y la familia del miR-200 (Singh *et al.*, 2011; Brønnum *et al.*, 2013; Brønnum *et al.*, 2013; Bonet *et al.*, 2015). La expresión ectópica en células epicárdicas del miR-21 promueve la EMT mientras que su antagonista bloquea este efecto (Brønnum *et al.*, 2013). Por el contrario, otros estudios indican la regulación negativa de la EMT, como es el caso del miR23b y miR-199 durante la EMT en cojines endocárdicos (Bonet *et al.*, 2015). De forma similar, el miR-31 inhibe la EMT a través de la represión del factor de transcripción Islet1 (Brønnum *et al.*, 2013).

Especial interés tienen los microARNs de la familia del miR-200. Esta familia de microARNs está compuesta por el miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c y el miR-429. Estos microARNs han sido estudiados ampliamente en cáncer, dada su participación de forma importante en procesos tales como movilidad y migración celular, EMT y metástasis en células de diversos tipos de tumores (revisado en Senfter *et al.*, 2016) En la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha, las células tumorales que presentan alguna de las características mencionadas, como movilidad o EMT, fueron descritas por mostrar unos niveles de expresión de miR-200 a la baja. Por el contrario, un estudio llevado a cabo por Guo y colaboradores (Guo *et al.*, 2015) demostraba altos niveles de expresión de estos microARNs en células de cáncer de pulmón. En un contexto

cardíaco, un solo estudio demuestra que los miembros de la familia del miR-200 presentan una disminución de los niveles de expresión durante la EMT epicárdica cuando ésta es inducida con factores de crecimiento (Singh *et al.*, 2011). Dada la controversia observada en estos estudios, algunos autores no descartan un papel diferencial de la familia del mir-200 en distintos contextos celulares (revisado en Senfter *et al.*, 2016)

En resumen, en los últimos años hemos acumulado un gran conocimiento sobre la biología de los microARNs. Estos ARN no codificantes juegan un papel relevante en la modulación de la expresión génica, habiendo propiciado muchos trabajos que han aportado una valiosa información sobre como la cardiogénesis es regulada a través de microARNs. Debemos seguir trabajando para descifrar los mecanismos por los cuales estas moléculas de microARNs regulan la biología celular en un contexto cardíaco, con el fin último de comprender el origen de determinadas malformaciones congénitas, así como acumular conocimiento para el uso de células madre con fines terapéuticos.

1.4 Bibliografía

1. Abou-Saleh H, Zouein FA, El-Yazbi A, Sanoudou D, Raynaud C, Rao C, *et al.* The march of pluripotent stem cells in

cardiovascular regenerative medicine. Stem Cell Research and Therapy. 2018.

2. Ai D, Liu W, Ma L, Dong F, Lu MF, Wang D, et al. Pitx2 regulates cardiac left-right asymmetry by patterning second cardiac lineage-derived myocardium. Dev Biol. 2006;296(2):437–49.
3. Anderson RH, Spicer DE, Brown NA, Mohun TJ. The development of septation in the four-chambered heart. Anat Rec. 2014.
4. Austin AF, Compton LA, Love JD, Brown CB, Barnett J V. Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGF β . Dev Dyn. 2008.
5. Barrallo-Gimeno A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. Development. 2005.
6. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Cell. 2009.
7. Bax NAM, Van Oorschot AAM, Maas S, Braun J, Van Tuyn J, De Vries AAF, et al. In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGF β -signaling and WT1. Basic Res Cardiol. 2011.

8. Belian E, Nosedá M, Abreu Paiva MS, Leja T, Sampson R, Schneider MD. Forward programming of cardiac stem cells by homogeneous transduction with MYOCD plus TBX5. PLoS One. 2015.
9. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. *Dicer* is essential for mouse development. Nat Genet. 2003.
10. Bonet F, Dueñas Á, López-Sánchez C, García-Martínez V, Aránega AE, Franco D. MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation. Dev Dyn. 2015.
11. Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. Vol. 3, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2013.
12. Brand T. Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Developmental Biology. 2003.
13. Brennan J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. Genes Dev. 2002.
14. Brønnum H, Andersen DC, Schneider M, Sandberg MB, Eskildsen T, Nielsen SB, et al. miR-21 Promotes Fibrogenic

- Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Epicardial Mesothelial Cells Involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. PLoS One. 2013.
15. Brønnum H, Andersen DC, Schneider M, Yaël Nossent A, Nielsen SB, Sheikh SP. Islet-1 is a dual regulator of fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition in epicardial mesothelial cells. Exp Cell Res. 2013.
 16. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. Nature. 2008.
 17. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Vol. 6, Nature Reviews Genetics. 2005. p. 826–35.
 18. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, et al. Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts. Cell. 2008.
 19. Cahan P, Daley GQ. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2013.
 20. Callis TE, Pandya K, Hee YS, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest. 2009.

21. Cano E, Carmona R, Ruiz-Villalba A, Rojas A, Chau Y-YY, Wagner KD, et al. Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio-venous connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016.
22. Cañete A, Carmona R, Ariza L, Sánchez MJ, Rojas A, Muñoz-Chápuli R. A population of hematopoietic stem cells derives from GATA4-expressing progenitors located in the placenta and lateral mesoderm of mice. *Haematologica*. 2017.
23. 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. *Circ Res*. 2013.
24. Chiavacci E, Dolfi L, Verduci L, Meghini F, Gestri G, Evangelista AMM, et al. MicroRNA 218 Mediates the Effects of Tbx5a Over-Expression on Zebrafish Heart Development. *PLoS One*. 2012.
25. Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, Esteban FJ, Crist C, Aranega AE, et al. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: A role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovasc Res*. 2011.

26. Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. Target protectors reveal dampening and balancing of nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* (80-). 2007.
27. Choi YJ, Lin CP, Risso D, Chen S, Kim TA, Tan MH, et al. Deficiency of microRNA miR-34a expands cell fate potential in pluripotent stem cells. *Science* (80-). 2017.
28. Chong JJH, Forte E, Harvey RP. Developmental origins and lineage descendants of endogenous adult cardiac progenitor cells. Vol. 13, *Stem Cell Research*. 2014. p. 592–614.
29. Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MTM, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature*. 2009.
30. Christoffels VM, Habets PEMH, Franco D, Campione M, De Jong F, Lamers WH, et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol*. 2000.223(2):266–78.
31. Christoforou N, Chellappan M, Adler AF, Kirkton RD, Wu T, Addis RC, et al. Transcription Factors MYOCD, SRF, Mesp1 and SMARCD3 Enhance the Cardio-Inducing Effect of

- GATA4, TBX5, and MEF2C during Direct Cellular Reprogramming. PLoS One. 2013.
32. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005.
 33. Coppen SR, Gourdie RG, Severs NJ. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. Exp Clin Cardiol. 2001.
 34. Coppola A, Romito A, Borel C, Gehrig C, Gagnebin M, Falconnet E, *et al.* Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. Stem Cell Res. 2014.
 35. Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015.
 36. Deacon DC, Nevis KR, Cashman TJ, Zhou Y, Zhao L, Washko D, *et al.* The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis. Development. 2010.
 37. Domínguez JN, De La Rosa Á, Navarro F, Franco D, Aránega AE. Tissue distribution and subcellular localization of the

- cardiac sodium channel during mouse heart development. Cardiovasc Res. 2008.
38. Duim SN, Kurakula K, Goumans MJ, Kruithof BPT. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1. Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. J Mol Cell Cardiol. 2015.
 39. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiovascular Medicine. Stem Cells Int. 2011.2011:1–7.
 40. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. Circulation Research. 1995.
 41. Eulalio A, Mano M, Ferro MD, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. Nature. 2012.
 42. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981.
 43. Forouhar AS, Liebling M, Hickerson A, Nasiraei-Moghaddam A, Tsai HJ, Hove JR, et al. The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump. Science (80-). 2006.

44. Franco D, Domínguez J, Castro M del P, Aránega A. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55(2):167–84.
45. Friedl P. Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology.* 2004.
46. Fu JD, Jiang P, Rushing S, Liu J, Chiamvimonvat N, Li RA. Na⁺/Ca²⁺ exchanger is a determinant of excitation-contraction coupling in human embryonic stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells Dev.* 2010.
47. Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol.* 1993.
48. Gourdie RG, Harris BS, Bond J, Justus C, Hewett KW, O'Brien TX, et al. Development of the cardiac pacemaking and conduction system. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews.* 2003.
49. Gregor T, Tank DW, Wieschaus EF, Bialek W. Probing the Limits to Positional Information. *Cell.* 2007.

50. Greulich F, Farin HF, Schuster-Gossler K, Kispert A. Tbx18 function in epicardial development. *Cardiovasc Res*. 2012.96(3):476–83.
51. Groot ACG de, Winter EM, Poelmann RE. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010.
52. Guo L, Wang J, Yang P, Lu Q, Zhang T, Yang Y. MicroRNA-200 promotes lung cancer cell growth through FOG2-independent AKT activation. *IUBMB Life*. 2015.
53. Guo XM, Zhao YS, Chang HX, Wang CY, En LL, Zhang XA, *et al*. Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. *Circulation*. 2006.
54. Hao J, Daleo MA, Murphy CK, Yu PB, Ho JN, Hu J, *et al*. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2008.3(8).
55. Heinrich EM, Dimmeler S. MicroRNAs and stem cells: Control of pluripotency, reprogramming, and lineage commitment. *Circulation Research*. 2012.

56. Hervé J-C, Derangeon M, Théveniau-Ruissy M, Miquerol L, Sarrouilhe D, Gros D. [Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development]. *Pathol Biol.* 2008.
57. Huang G, Ye S, Zhou X, Liu D, Ying QL. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: From signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2015.
58. Hutson MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2007.
59. Islas JF, Moreno-Cuevas JE. A MicroRNA perspective on cardiovascular development and diseases: An update. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018.
60. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Alan Payne J, Pandya K, *et al.* MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res.* 2012.

61. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blueloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol.* 2009.
62. Karbiener M, Pisani DF, Frontini A, Oberreiter LM, Lang E, Vegiopoulos A, et al. MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. *Stem Cells.* 2014.
63. Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, Hajjar RJ, Bridges CR. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2016.
64. Kelly RG. The Second Heart Field. In: *Current Topics in Developmental Biology.* 2012.
65. Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF. Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.
66. Kim BM, Thier MC, Oh S, Sherwood R, Kanellopoulou C, Edenhofer F, et al. MicroRNAs are indispensable for reprogramming mouse embryonic fibroblasts into induced stem cell-like cells. *PLoS One.* 2012.

67. Kitajima S, Takagi a, Inoue T, Saga Y. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*. 2000.127(15):3215–26.
68. Klaus A, Saga Y, Taketo MM, Tzahor E, Birchmeier W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007.104(47):18531–6.
69. Kruithof BPT, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Pérez Pomares JM, Weesie F, et al. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol*. 2006.
70. Kuzmenkin A, Liang H, Xu G, Pfannkuche K, Eichhorn H, Fatima A, et al. Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro. *FASEB J*. 2009.
71. Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005.
72. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993.

73. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003.
74. Li MA, He L. microRNAs as novel regulators of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *BioEssays*. 2012.
75. Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, *et al*. Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell*. 2008.
76. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, *et al*. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012.
77. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, *et al*. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. 2013.
78. Lieu DK, Fu JD, Chiamvimonvat N, Tung KC, McNerney GP, Huser T, *et al*. Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2013.

79. 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.* 2008.
80. Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984.
81. Männer J. Cardiac looping in the chick embryo: A morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec.* 2000.
82. Männer J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol (Berl).* 2004.
83. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2008.
84. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981.

85. Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet.* 2010.42(1):89–93.
86. Masters M, Riley PR. The epicardium signals the way towards heart regeneration. *Stem Cell Research.* 2014.
87. McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development.* 2005.
88. Meder B, Katus HA, Rottbauer W. Right into the heart of microRNA-133a. *Genes and Development.* 2008.
89. Mendell JT. miRiad Roles for the miR-17-92 Cluster in Development and Disease. *Cell.* 2008.
90. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell.* 2011.
91. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, et al. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 2001.

92. Moorman A. Development of the heart: formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart*. 2003.
93. Moorman AFM, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 1994.
94. Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, *et al*. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J*. 2000.
95. Muñoz-Chápuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, María Pérez-Pomares J. El epicardio y las células derivadas del epicardio: múltiples funciones en el desarrollo cardíaco. *Rev Española Cardiol*. 2002.
96. Nadig R. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009.
97. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, *et al*. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2006.103(52):19812–7.
98. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, *et al*. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/ β -catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006.

99. Nosedá M, Peterkin T, Simões FC, Patient R, Schneider MD. Cardiopoietic factors extracellular signals for cardiac lineage commitment. *Circulation Research*. 2011.
100. Ocaña OH, Coskun H, Minguillón C, Murawala P, Tanaka EM, Galcerán J, et al. A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature*. 2017.549(7670):86–90.
101. Ohtani K, Dimmeler S. Control of cardiovascular differentiation by microRNAs. *Basic Research in Cardiology*. 2011.
102. Pang JKS, Phua QH, Soh BS. Applications of miRNAs in cardiac development, disease progression and regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2019.
103. Parisi S, D’Andrea D, Lago CT, Adamson ED, Persico MG, Minichiotti G. Nodal-dependent Cripto signaling promotes cardiomyogenesis and redirects the neural fate of embryonic stem cells. *J Cell Biol*. 2003.163(2):303–14.
104. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*. 2004.

105. Peng Y, Song L, Zhao M, Harmelink C, Debeneditis P, Cui X, et al. Critical roles of miRNA-mediated regulation of TGF β signalling during mouse cardiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2014.
106. Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R. Epithelial-mesenchymal transitions: A mesodermal cell strategy for evolutive innovation in metazoans. *Anat Rec.* 2002.
107. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011.
108. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant.* 2003.
109. Ramesh S, Singh A, Cibi DM, Hausenloy DJ, Singh MK. In vitro culture of epicardial cells from mouse embryonic heart. *J Vis Exp.* 2016.
110. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006.
111. Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, et al. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac

- ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein
20. Circulation. 2009.
112. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol. 2000.
113. Rudat C, Kispert A. Wt1 and epicardial fate mapping. Circ Res. 2012.
114. Ruiz-Villalba A, Simón AM, Pogontke C, Castillo MI, Abizanda G, Pelacho B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. J Am Coll Cardiol. 2015; 65(19):2057–66.
115. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. Science (80-). 2008.
116. Schöck F, Perrimon N. Molecular Mechanisms of Epithelial Morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002.
117. Sedmera D. Function and form in the developing cardiovascular system. Cardiovascular Research. 2011.

118. Senfter D, Madlener S, Krupitza G, Mader RM. The microRNA-200 family: Still much to discover. *Biomol Concepts*. 2016.
119. Singh MK, Lu MM, Massera D, Epstein JA. MicroRNA-processing enzyme *Dicer* is required in epicardium for coronary vasculature development. *J Biol Chem*. 2011.
120. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, *et al*. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2008.
121. Sissman NJ. Developmental landmarks in cardiac morphogenesis: Comparative chronology. *Am J Cardiol*. 1970.
122. Smith AG. Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001.
123. Smith J. Brachyury and the T-box genes. Vol. 7, *Current Opinion in Genetics and Development*. 1997. p. 474–80.
124. Smits AM, Dronkers E, Goumans MJ. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their

- origin, role and fate. Vol. 127, Pharmacological Research. 2018. p. 129–40.
125. Smits AM, Riley PR. Epicardium-derived heart repair. Journal of Developmental Biology. 2014.
126. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. Achiev Life Sci. 2016.
127. Später D, Hansson EM, Zangi L, Chien KR. How to make a cardiomyocyte. Dev. 2014.
128. Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. Cell. 2006.
129. Srivastava D, Ieda M. Critical factors for cardiac reprogramming. Circulation research. 2012.
130. Srivastava D, Thomas T, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. Nat Genet. 1997.
131. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372

- promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nat Biotechnol. 2011.
132. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell. 2007.
133. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Nature. 2008.
134. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2006.
135. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998.
136. Tian J, An X, Niu L. Role of microRNAs in cardiac development and disease (Review). Exp Ther Med. 2017.
137. Trembley MA, Velasquez LS, Small EM. Epicardial outgrowth culture assay and ex vivo assessment of epicardial-derived cell migration. J Vis Exp. 2016.

138. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, et al. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(23):9685–90.
139. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, et al. Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007.
140. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes and Development*. 2006.
141. Van Laake LW, Qian L, Cheng P, Huang Y, Hsiao EC, Conklin BR, et al. Reporter-based isolation of induced pluripotent stem cell-and embryonic stem cell-derived cardiac progenitors reveals limited gene expression variance. *Circ Res*. 2010.
142. Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006.

143. Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007.
144. van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, van der Velde-van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NAM, et al. Epicardial Cells of Human Adults Can Undergo an Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Obtain Characteristics of Smooth Muscle Cells In Vitro. *Stem Cells*. 2007.
145. van Weerd JH, Christoffels VM. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development*. 2016.143(2):197–210.
146. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart. The origin and regulation of cardiac progenitor cells. In: *Current Topics in Developmental Biology*. 2010.
147. Von Gise A, Pu WT. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res*. 2012.
148. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001.

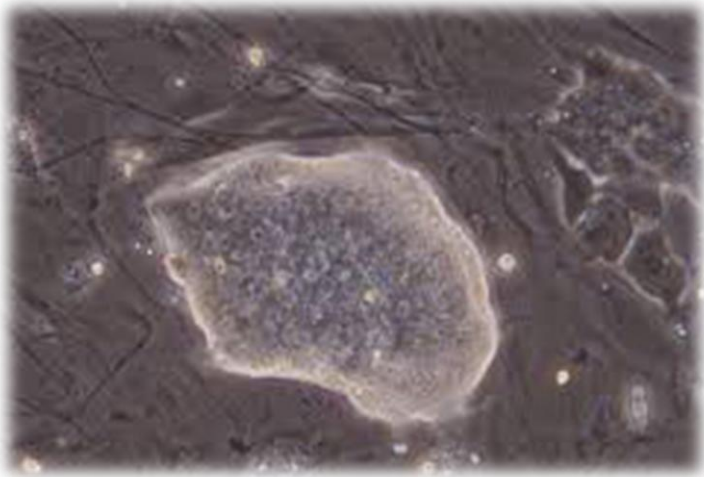
149. Wang J, Greene SB, Bonilla-Claudio M, Tao Y, Zhang J, Bai Y, et al. Bmp Signaling Regulates Myocardial Differentiation from Cardiac Progenitors Through a MicroRNA-Mediated Mechanism. *Dev Cell*. 2010.
150. Wessels A, Pérez-Pomares JM. The Epicardium and Epicardially Derived Cells (EPDCs) as Cardiac Stem Cells. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2004.
151. Wessels A, van den Hoff MJB, Adamo RF, Phelps AL, Lockhart MM, Sauls K, et al. Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Dev Biol*. 2012.
152. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009.
153. Xi J, Khalil M, Shishechian N, Hannes T, Pfannkuche K, Liang H, et al. Comparison of contractile behavior of native murine ventricular tissue and cardiomyocytes derived from embryonic or induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 2010.
154. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: Cardiac development as a basis for adult heart

- regeneration and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013.
155. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*. 2009.
156. Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, *et al*. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol*. 2002.
157. Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D. The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Dev Biol*. 2001.
158. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, *et al*. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008.453(7194):524–8.
159. Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, *et al*. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009.

160. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (80-). 2007.
161. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019.
162. Zhao H, Wen G, Huang Y, Yu X, Chen Q, Afzal TA, et al. MicroRNA-22 regulates smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting methyl CpG-Binding protein 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015.
163. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007.
164. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005.
165. Zhou B, Honor LB, He H, Qing M, Oh JH, Butterfield C, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest*. 2011.

166. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*. 2008.
167. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, et al. MiRNAS in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges review-article. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018.

2. CAPITULO II: miR-27b y miR-23b modulan la diferenciación a cardiomiocitos a partir de células madre embrionarias de ratón



miR-27b y miR-23b modulan la diferenciación a cardiomiocitos a partir de células madre embrionarias de ratón

2.1 Introducción

El desarrollo cardíaco se origina a partir de un complejo proceso en el que se pueden distinguir varias etapas que incluyen la inducción del mesodermo cardíaco, la formación de las células progenitoras cardíacas y el compromiso celular de éstas hacia linajes vasculares. Cada etapa está específicamente regulada a varios niveles, incluyendo los mecanismos a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-transduccional (Srivastava, 2006).

Los microARNs (microARNs) están implicados en la regulación a nivel post-transcripcional de muchos de genes durante el transcurso de las distintas etapas de la formación del corazón, así como también en el desarrollo de patologías cardíacas. El papel de los microARNs en el desarrollo cardíaco en fases tempranas fue revelado por primera vez en un estudio en el que se bloqueaba la acción de la enzima encargada de procesar los microARNs, denominada *Dicer* (Bernstein *et al.*, 2003).

Otro tipo de estudios llevaron al descubrimiento de microARNs con un papel relevante en la regulación de diferentes etapas de la cardiogénesis en vertebrados, tales como miR-1, miR-15, miR-133, miR-138 y miR-218 (Zhao *et al.*, 2007; Ivey *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Cordes *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estos datos, se puede afirmar que los microARNs constituyen actualmente un importante grupo de elementos reguladores necesarios para que el desarrollo cardiaco se complete de forma adecuada. Además, su conocimiento ha revolucionado nuestro entendimiento de las diversas funciones de RNAs no codificantes en biología cardiaca. Aún queda mucho por aprender del genoma humano y de ratón ya que éstos codifican más de 4.000 microARNs, de los cuales solo unos pocos han sido aún estudiados en un contexto cardiaco.

Por otro lado, las células madre o *stem cells* representan una fuente potencialmente atractiva para la obtención de células cardíacas con el objetivo de tratar de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la mayoría de los beneficios funcionales encontrados para las *stem cells* han sido modestos y, principalmente, debidos a efectos paracrinos más que a una diferenciación directa de éstas a cardiomiocitos.

Durante esta década, los esfuerzos de nuestro grupo de investigación han estado centrados en estudiar el papel de algunos microARNs en un contexto cardiogénico. En este

sentido, en el año 2011 (Chinchilla *et al.*, 2011) llevamos a cabo un análisis exhaustivo del perfil de expresión de microARNs durante la maduración cardíaca. Este estudio mostró que sólo un grupo relativamente pequeño de microARNs mostraba un incremento en los niveles de expresión, mientras que ninguno manifestaba niveles de expresión disminuidos, apoyando la idea de que el aumento de los niveles de expresión de microARNs proporciona un medio para bloquear y/o inhibir ciertos programas transcripcionales a lo largo del tiempo.

En esta Tesis Doctoral, ponemos de manifiesto que los microARNs que muestran perfiles de expresión diferencial temprana durante la maduración cardíaca, como miR-27b, inhiben la diferenciación cardíaca de las ESCs de ratón, mientras que los microARNs que muestran perfiles de expresión diferencial tardía, como miR-23b, regulan *in vitro* el fenotipo de contracción durante diferenciación cardíaca de estas ESCs. Estos datos apoyan la idea de que el aumento de los niveles de expresión de microARNs en puntos específicos del desarrollo temporal durante la diferenciación cardíaca *in vitro*, modula progresivamente determinadas vías de señalización, lo que puede alterar la diferenciación del linaje cardiogénico.

2.2 Hipótesis

Los microARNs se han postulado como unos importantes reguladores de la expresión génica en multitud de procesos

biológicos. De hecho, se estima que dos tercios de los ARN mensajeros en mamíferos se encuentran regulados por microARNs (Friedman *et al.*, 2009).

En la actualidad ya conocemos un listado de microARNs con un papel relevante en etapas tempranas del desarrollo cardiaco, como la especificación del mesodermo cardiogénico o la formación del corazón embrionario (Rotini *et al.*, 2018).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado anteriormente la expresión diferencial de microARNs durante distintas etapas de la cardiogénesis (Chinchilla *et al.*, 2011). En el estudio pretendemos analizar la hipótesis de que los miRNAs miR-23b y miR-27b juegan un papel en los procesos de diferenciación y maduración de cardiomiocitos, modulando la adquisición de un fenotipo cardiaco a partir de células madre embrionarias de ratón.

2.3 Objetivos

El objetivo general de este estudio ha sido el de modular los niveles de expresión de miR-23b y miR-27b en ESCs de origen murino y describir la adquisición de un fenotipo cardiaco en dichas células.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- Transfectar ESCs de origen murino con los microARNs miR-23b y miR-27b.
- Determinar por PCR cuantitativa que las células madre transfectadas con el miR-27b inhiben la diferenciación cardiaca a través de la regulación de vía de señalización Wnt- β Catenina.
- Determinar por PCR cuantitativa que las células madre transfectadas con miR-23b modifican el fenotipo contráctil en dichas células a través de la regulación de genes diana implicados en los canales iónicos cardiacos.

2.4 Material y métodos

2.4.1 Cultivo de ESCs y transfección de microARNs

La línea R1-ESC, derivada de la cepa 129 S1/SvImJ, fue proporcionada amablemente por Andras Nagy (Instituto de Investigación Samuel Lunenfeld, Hospital Mount Sinai, Toronto, Canadá). Las ESCs de la línea R1 se cultivaron y se diferenciaron según lo descrito previamente (Lozano-Velasco *et al.*, 2011). Se designó el día 0 cuando los cuerpos embrionarios (EB) (*embryoid bodies*), obtenidos a partir de gotas colgantes (*hanging drops*), se colocaron en placas. Las áreas de contracción espontánea dentro de los EB fueron registradas entre 3-4 días después de ponerlas en cultivo (10-11 días totales).

Los ensayos de transfección de microARN se realizaron cuando se cultivaron los EB (día 0) tal como se describió previamente (Lozano-Velasco *et al.*, 2011). El *pre-miR-27b* y el *pre-miR-23b* así como sus controles negativos se obtuvieron de *Ambion* (*Life Technologies*). Con el fin de mantener los niveles de sobreexpresión de miRNA durante el cultivo de EB, las transfecciones de estos microARNs se llevaron a cabo repetidamente cada dos días de cultivo, renovando también el medio de diferenciación de EB. Los EB o áreas contráctiles (BA, *beating areas*) diseccionados se recogieron a los 7 días de la transfección.

2.4.2 Extracción de RNA, retrotranscripción y PCR cuantitativa

Debido a que los cardiomiocitos que se contraen espontáneamente constituyen solo una pequeña fracción de los EB, las partes de EB que contienen BA se diseccionaron bajo un microscopio binocular. Los EB, así como las áreas diseccionadas, se utilizaron para realizar extracción de ARN y proceder con reacciones retrotranscripción. La extracción de ARN, las reacciones de retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real se realizó como se describió anteriormente (Lozano-Velasco *et al.*, 2011). Los oligonucleótidos específicos para cada gen analizado, así como la temperatura de alineamiento y el tamaño del amplicón, se muestran en la Tabla 2.1.

Oligonucleótidos	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón
Wnt3a	sentido: 5'- TTCTGCAGGAACACGTGGA -3' antisentido: 5'- AGATAGCAGCTGATCCCTCTG-3'	60°C	179 bp
Brachyury	sentido: 5'- CGACCACAAAGATGTAATGGAG-3' antisentido: 5'- AACTGAGGGTGGGAGCTG-3'	59.5°C	120 bp
Kcnk3	sentido: 5'- TGTGCACCTTCACCTACCTG -3' antisentido: 5'- GGTGATGGCGAAGTAGAAGG-3'	59.7°C	203 bp
Kcnh1	sentido: 5'- ACGCCCTTCAGAAAGTGCTA-3' antisentido: 5'- GTGGTCAGGAGGCAGGATAA-3'	62°C	182 bp
C-Troponin T	sentido: 5'- TTCGACCTGCAGGAAAAGTT-3' antisentido: 5'- GCACAGCTTTGACGAGAACA-3'	64°C	133bp
Hcn4	sentido: 5'- CAGCGTCAGAGCGGATACTT-3' antisentido: 5'-TGTGGAGGAGGATGGAGTTC3'	60°C	158bp
Cx40	sentido: 5'-CAGAGCCTGAAGAAGCCAAC-3' antisentido: 5'-ATGCGGAAAATGAACAGGAC-3'	60°C	178bp
Cx43	sentido: 5'-GAGAGCCCCGAACCTCTCCTTT-3' antisentido 5'-TGGAGTAGGCTTGGACCTTG-3'	60°C	158bp
microRNA-27b	5'-UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC -3'	60°C	21 bp
microRNA-23b	5'-AUCACAUUGCCAGGGAUUACC -3'	60°C	21 bp

Tabla 2.1. Oligonucleótidos para genes específicos, temperaturas de alineamiento y tamaño del amplicón para PCR cuantitativa.

2.4.3 Análisis de datos, análisis estadístico y representación gráfica

Los datos de PCR cuantitativa fueron analizados mediante el método de $\Delta\Delta C_t$ descrito con anterioridad (Livak *et al.*, 2001). El análisis estadístico y representación gráfica se llevó a cabo usando el programa *Graphpad Prism 6*.

2.5 Resultados

2.5.1 miR-27b inhibe la diferenciación cardiaca in vitro a través de la regulación de la vía de señalización Wnt- β Catenina

Un análisis previo realizado en nuestro laboratorio sobre el perfil de expresión de microARNs durante la formación de las cámaras cardíacas, llevado a cabo en tres estadios de desarrollo diferentes (E12.5, E15.5 y E18.5), reveló que sólo un grupo, el cual representa el 11% de los microARNs analizados, mostraba un aumento en los niveles de expresión durante esta etapa del desarrollo (Chinchilla *et al.*, 2011). Para explorar más a fondo el papel de este grupo de microARNs en la diferenciación hacia cardiomiocitos, utilizamos el sistema de cultivos *in vitro* para diferenciar a cardiomiocitos ESC murinas. Decidimos analizar primero los efectos de esos microARNs que mostraban perfiles de expresión diferencial temprana, como miR-27b. Para este fin, los EB formados a partir de la línea celular R1 se transfectaron

con pre-miR-27b justo tras ponerlas en placas de cultivo y se mantuvieron durante 7 días en medio de diferenciación. El fenotipo cardíaco se analizó en este paso. Se recogieron áreas contráctiles aisladas (usando el microscopio y reconociendo éstas por su latido) y cuerpos embrionarios para su posterior análisis por qPCR. Tras esto se observó que los EB transfectadas con miR-27b no llegaban a desarrollar áreas contráctiles y además, la expresión de marcadores cardíacos tales como troponina cardiaca se reducía significativamente, lo que sugería que la diferenciación cardíaca estaba inhibida en los EB que sobreexpresaban miR-27b (Figura 2.1 A-C).

Previamente habíamos demostrado que miR-27b regula *Mef2c* en células miogénicas diferenciadas (Chinchilla *et al.*, 2011). Sin embargo, los miembros de la familia del factor de transcripción *Mef2* son prescindibles para la especificación y determinación del linaje cardíaco (Black *et al.*, 1998). Buscamos nuevos genes diana para miR-27b que podrían mediar en la especificación cardíaca temprana. Usando análisis bioinformáticos (software *TargetScan*) identificamos el gen *Wnt3a* como un *target* putativo para miR-27b (Figura 2.2A). El análisis por qPCR de las muestras de EBs mostró que *Wnt3a* estaba claramente regulado a la baja en EB en los que hay sobreexpresión de miR-27b (Figura 2.2B) lo que indica que este

activador de la vía canónica Wnt está regulada por miR-27b en nuestro sistema.

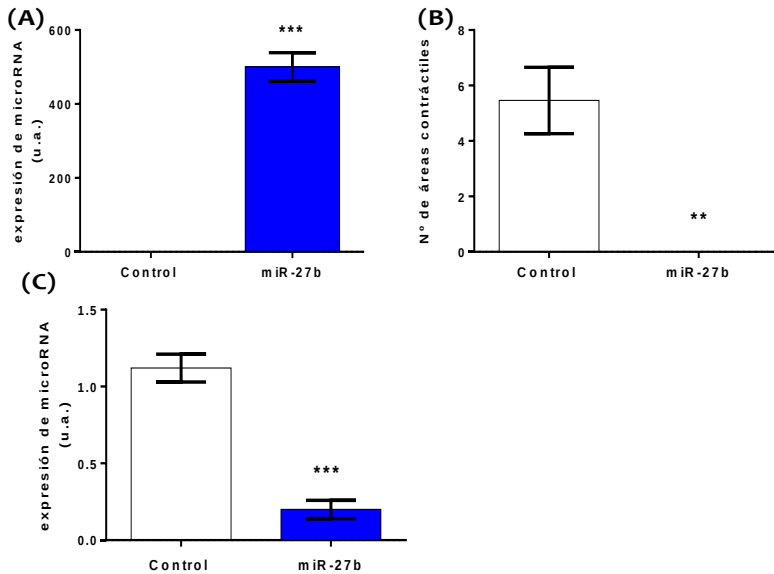


Figura 2.1. (A) Sobreexpresión de miR-27b en cuerpos embrionarios (EB) derivados de células madre embrionarias de ratón (ESC) analizada por PCR cuantitativa a tiempo real. (B) Los EB que sobreexpresaban miR-27b no formaban áreas contráctiles (n=22). (C) Perfiles de expresión de troponina cardiaca en EB que sobreexpresaban miR-27b. (u.a.: unidades arbitrarias). Análisis estadístico *T-student*. Significativo $p < 0.05$.

Por otro lado, dado que en ESC procedentes de ratón la inhibición temprana de la vía canónica Wnt3a bloquea la expresión de genes marcadores específicos de mesodermo, como es el caso de Brachyury (Lindsley, 2006), también

quisimos determinar la expresión de este marcador específico de mesodermo en nuestro modelo experimental de ESCs. Como se muestra en la Figura 2.2 C, los niveles de expresión de Brachyury se redujeron claramente en EB con sobreexpresión de miR-27b, lo que indica que la pérdida de la inducción de mesodermo mediada por Brachyury puede subyacer a la inhibición de la diferenciación cardíaca en este sistema. Estos resultados señalan un papel de miR-27b que regula la especificación del mesodermo y, como consecuencia, la diferenciación cardíaca de los EBs cultivados.

(A)

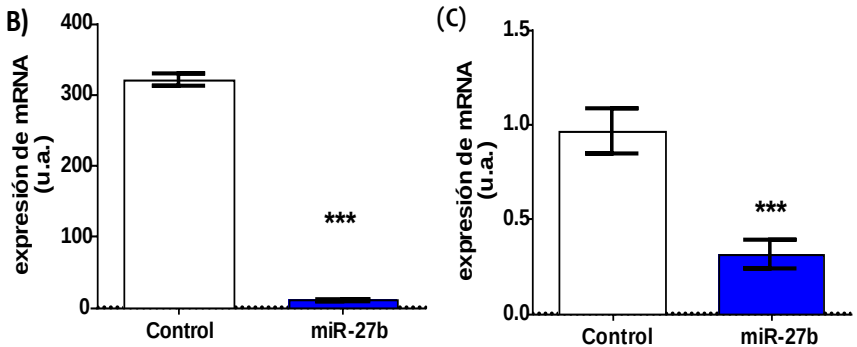
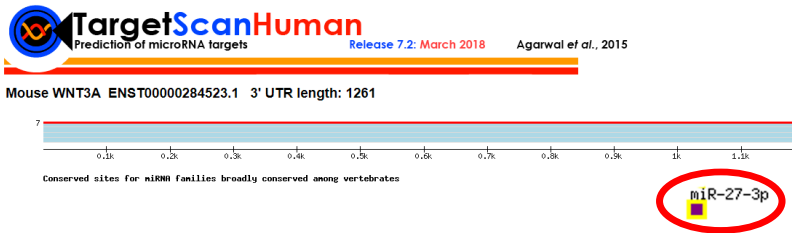


Figura 2.2. (A) Representación esquemática de los sitios de unión de miR-27b en la región 3'-UTR de Wnt3a según el algoritmo de *TargetScan* (www.targetscan.org). Perfiles de expresión de Wnt3a (B) y Brachyury (C) en EB que sobreexpresan miR-27b. (u.a.: unidades arbitrarias). Análisis estadístico *T-student*. Significativo $p < 0.05$.

2.5.2 mir-23b regula el fenotipo contráctil durante la diferenciación *in vitro* a cardiomiocitos a partir de ESCs

Posteriormente, probamos los efectos que se originaban en la diferenciación a cardiomiocitos *in vitro*, transfectando aquellos

microARNs que mostraban los perfiles de expresión tardía durante la maduración cardíaca, como miR-23b (Figura 2.3 A). A diferencia de miR-27b, los EB que sobreexpresaban miR-23b normalmente desarrollaban áreas contráctiles en una proporción similar a los EB de control, lo que sugería que la sobreexpresión de miR-23b no altera la formación de áreas contráctiles (Figura 2.3 B). Sin embargo, el tamaño de estas áreas contráctiles fue significativamente mayor que el tamaño de las áreas en las muestras control (Figura 2.3 C-E) mientras que no se detectaron cambios en los niveles de expresión para genes de diferenciación como troponina cardíaca (Figura 2.4 A). Además, encontramos que el número de latidos por minuto fue significativamente mayor en las áreas de latido que sobreexpresaban miR-23b (Figura 2.4 B), sugiriendo que la sobreexpresión de miR-23b, en lugar de aumentar la diferenciación cardíaca, podría modificar el actividad de latido de cardiomiocitos derivados de ESC.

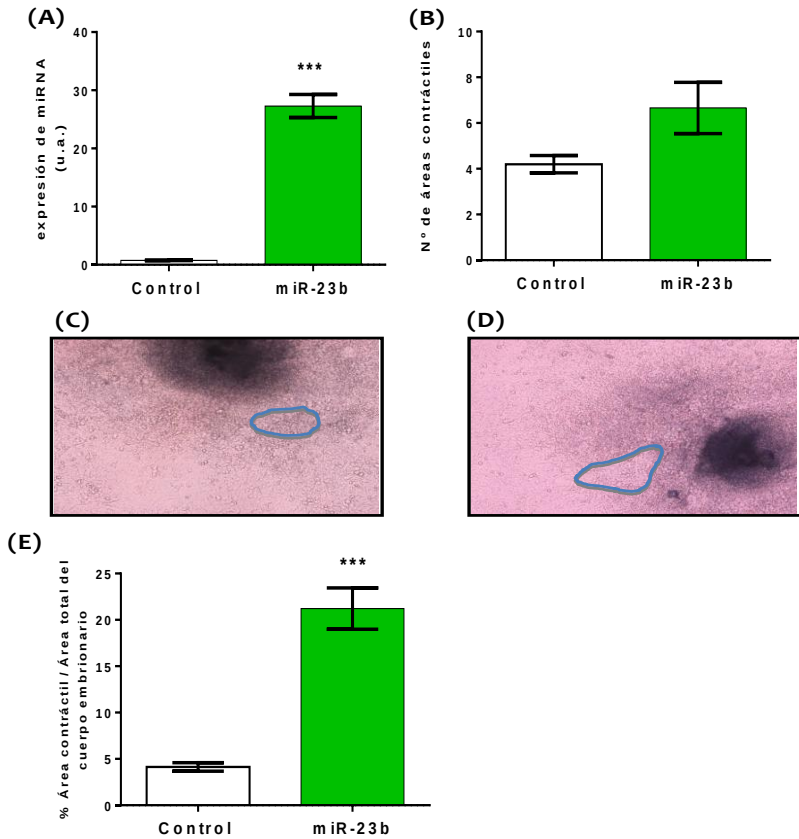


Figura 2.3. Sobreexpresión de miR-23b en EBs derivados de ESCs analizada por PCR cuantitativa a tiempo real (A) y número de áreas contráctiles en EBs que sobreexpresan miR-23b con respecto al control (B). (C-D) Imagen representativa mostrando el tamaño de las áreas contráctiles en EBs que sobreexpresan miR-23b (D) con respecto al control (C). (E) Porcentaje del tamaño de las áreas contráctiles con respecto al área total del EB (n=20). (u.a.: unidades arbitrarias). Análisis estadístico *T-student*. Significativo $p < 0.05$.

Curiosamente, utilizando algoritmos bioinformáticos como se mencionó anteriormente, identificamos *Kcnh1*, *Kcnk3* y *Gja1* como genes diana putativos para miR-23b (Figura 2.5). *Kcnh1* y *Kcnk3*, codifican diferentes canales de potasio, que modifican claramente el potencial de acción de las células excitables (Putzke *et al.*, 2007; Stengel *et al.*, 2012) y *Gja1* codifica para Conexina 43 (Cx43), una de las uniones *gap* de conductancia rápida más ampliamente distribuidas en el miocardio (Boyett *et al.*, 2000). El análisis por qPCR de las muestras de EBs para *Kcnh1*, *Kcnk3* y *Gja1* reveló que *Kcnh1*, *Kcnk3* y más significativamente *Gja1*, estaban regulados negativamente en áreas contráctiles que sobreexpresaban miR-23b (Figura 2.6 A-C). También aparecía regulado negativamente el gen para Conexina 40 (Cx40, *Gja5*), una conexina que, junto con Cx43 se expresa abundantemente en el miocardio y en el sistema de conducción (Boyett *et al.*, 2000) (Figura 2.6 D). Sin embargo, se detectó una regulación al alza para el marcador específico de marcapasos *Hcn4* en áreas de latido que sobreexpresaban miR-23b (Figura 2.6 E). De forma general, estos hallazgos revelan que miR-23b juega un papel en la modulación de las características electrofisiológicas de la diferenciación a cardiomiocitos a partir de células madre embrionarias.

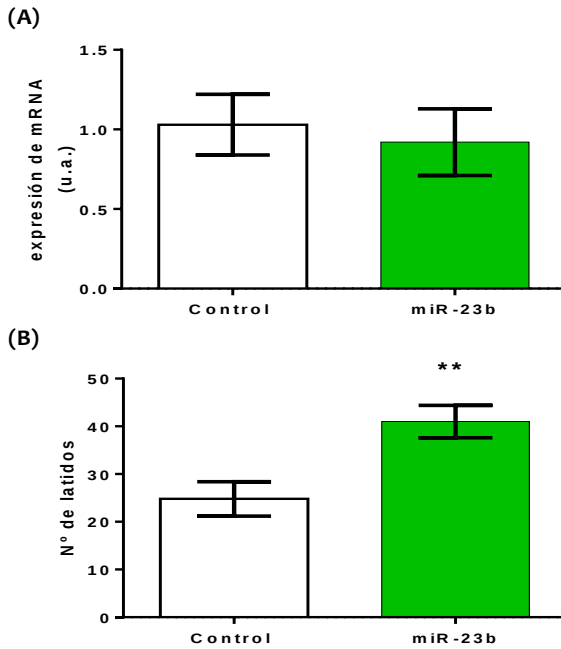


Figura 2.4. (A). Perfil de expresión de troponina cardiaca en EBs que sobreexpresan miR-23b. (B) Cuantificación del número de latidos por minuto en áreas contráctiles de EBs que sobreexpresan miR-23b (n=15) en comparación con áreas contráctiles derivadas de la muestra control (n=13) (u.a.: unidades arbitrarias). Análisis estadístico *T-student*. Significativo $p < 0.05$.

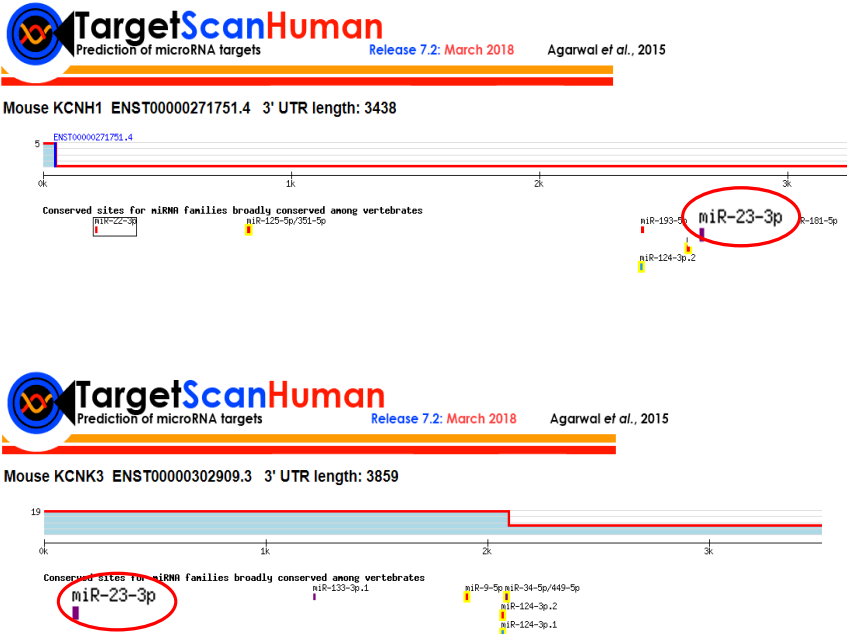


Figura 2.5. Representación esquemática de los sitios de unión de miR-23b en la región 3'-UTR de Kcnh1 y Kcnk3 según el algoritmo de *TargetScan* (www.targetscan.org). (u.a.: unidades arbitrarias).

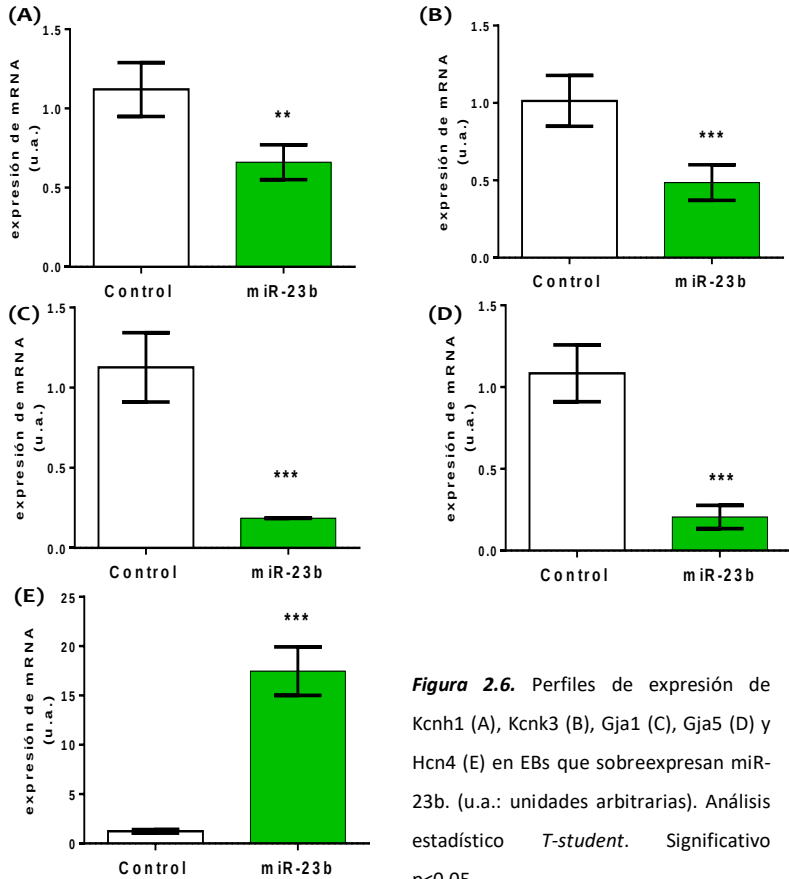


Figura 2.6. Perfiles de expresión de Kcnh1 (A), Kcnk3 (B), Gja1 (C), Gja5 (D) y Hcn4 (E) en EBs que sobreexpresan miR-23b. (u.a.: unidades arbitrarias). Análisis estadístico *T-student*. Significativo $p < 0.05$.

2.6 Discusión

Dado que los beneficios funcionales reportados para las células madre han sido modestos y principalmente debido a los efectos paracrinos en lugar de por diferenciación de éstas hacia cardiomiocitos (Porrello, 2013), se necesitan nuevas herramientas para mejorar la diferenciación de *stem cells* hacia linajes cardiovasculares específicos. En la última década, se ha descubierto que los microARNs desempeñan un papel importante en la regulación de múltiples funciones biológicas, incluido el control de células madre y la diferenciación tisular (Porrello, 2013). Aquí, mostramos el papel de miR-27b y miR-23b en cardiomiogénesis utilizando una estrategia de sobreexpresión en células madre embrionarias murinas.

Al principio del desarrollo, las células progenitoras cardíacas se especifican en la capa germinal mesodérmica y muchos estudios han demostrado que la formación de mesodermo depende de la ruta de señalización canónica Wnt. De hecho, la pérdida de la función *Wnt3a* se acompaña de la ausencia de genes marcadores específicos del mesodermo (Huelsen et al., 2000; Lindsley, 2006). Aquí, hemos demostrado que miR-27b regula la diferenciación cardíaca de células madre embrionarias murinas mediante la modulación de la vía canónica de Wnt. Esto tiene como consecuencia la regulación a la baja de los genes específicos de mesodermo, tales como *Brachyury*.

Nuestros hallazgos revelan funciones desconocidas hasta el momento de miR-27b en la especificación cardíaca temprana.

Por otro lado, la maduración de cardiomiocitos a partir de células madre embrionarias requiere la adquisición de propiedades electrofisiológicas que conducen a la formación de un fenotipo cardíaco específico, como el atrial, el nodal o el ventricular (Van Den Heuvel, *et al.*, 2014). Además, se sabe que otros microARNs como miR-1 y miR-133 pueden regular post-transcripcionalmente las características electrofisiológicas en cardiomiocitos (Belevych *et al.*, 2011). Aquí mostramos que la sobreexpresión de miR-23b modifica el fenotipo de latido durante la diferenciación cardíaca de ESC *in vitro*. También se ha observado que la sobreexpresión de miR-23b disminuye la expresión de sus genes diana como Kcnh1, Kcnk3 y Gja1. El gen Kcnh1 codifica para un canal iónico de potasio altamente expresado en neuronas y está involucrado en la proliferación de células tumorales (Spitzner *et al.*, 2006). Sin embargo, su fisiología en el corazón permanece en gran parte confusa. Kcnk3 codifica para un miembro de la familia de canales de potasio de dos poros, los canales TASK-1, que se ha considerado que están involucrados en la determinación de la duración del potencial de acción (Putzke *et al.*, 2007). También, recientemente se ha visto que la regulación a la baja de Gja1 (Cx43) y Gja5 (Cx40) junto con la sobre-regulación de Hcn4 es crucial para facilitar del proceso

de activación de genes de marcapasos y para la supresión de genes de miocardio en EBs (Hashem *et al.*, 2013). Además de la regulación negativa de *Gja1*, se ha observado que los niveles de expresión para *Gja5* eran más bajos y los niveles de expresión para *Hcn4* más altos en áreas de latido que sobreexpresaban *miR-23b*, lo que sugiere que esta sobreexpresión de *miR-23b* conduce a un fenotipo de marcapasos más definido. Por lo tanto, nuestros hallazgos señalan un papel de *miR-23b* que define las características electrofisiológicas de los cardiomiocitos derivados de las ESC.

2.7 Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este proyecto de investigación son las siguientes:

- 1-. *miR-27b* tiene la capacidad de inhibir la diferenciación cardiaca en ESCs mediante la regulación de la vía de señalización Wnt- β Catenina, inhibiendo así, la expresión de genes precursores de mesodermo como *Brachyury*.
- 2-. *miR-23b* es capaz de regular el fenotipo contráctil de las ESCs diferenciadas a cardiomiocitos a través de la regulación de genes involucrados en las propiedades electromecánicas del corazón, como son *Kcnh1*, *Kcnk3* y *Gja1*.

2.8 Bibliografía

1. Belevych AE, Sansom SE, Terentyeva R, Ho HT, Nishijima Y, Martin MM, et al. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. PLoS One. 2011.
2. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. Nat Genet. 2003.
3. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (mef2) proteins. Annu Rev Cell Dev Biol. 1998.
4. Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. Cardiovascular Research. 2000.
5. Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, Esteban FJ, Crist C, Aranega AE, et al. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: A role for miR-27 modulating Mef2c expression. Cardiovasc Res. 2011.

6. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, *et al.* MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009.
7. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009.
8. Hashem SI, Lam ML, Mihardja SS, White SM, Lee RJ, Claycomb WC. Shox2 Regulates the Pacemaker Gene Program in Embryoid Bodies. *Stem Cells Dev*. 2013.
9. Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. Requirement for β -catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol*. 2000.
10. Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, *et al.* MicroRNA Regulation of Cell Lineages in Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2008.
11. Lindsley RC, Gill JG, Kyba M, Murphy TL, Murphy KM. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*. 2006.

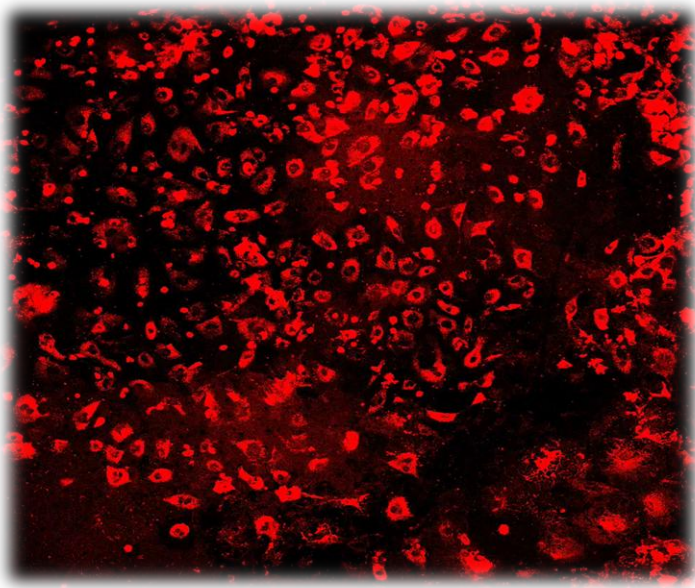
12. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008.
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001.
14. Lozano-Velasco E, Chinchilla A, Martínez-Fernández S, Hernández-Torres F, Navarro F, Lyons GE, et al. Pitx2c modulates cardiac-specific transcription factors networks in differentiating cardiomyocytes from murine embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs.* 2011.
15. Porrello ER. MicroRNAs in cardiac development and regeneration. *Clin Sci.* 2013.
16. Putzke C, Wemhöner K, Sachse FB, Rinné S, Schlichthörl G, Li XT, et al. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res.* 2007.
17. Rotini A, Martínez-Sarrà E, Pozzo E, Sampaolesi M. Interactions between microRNAs and long non-coding RNAs in cardiac development and repair. *Pharmacological Research.* 2018.

18. Spitzner M, Ousingsawat J, Scheidt K, Kunzelmann K, Schreiber R. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J*. 2007.
19. Srivastava D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell*. 2006.
20. Stengel R, Rivera-Milla E, Sahoo N, Ebert C, Bollig F, Heinemann SH, et al. Kcnh1 voltage-gated potassium channels are essential for early zebrafish development. *J Biol Chem*. 2012.
21. Van Den Heuvel NHL, Van Veen TAB, Lim B, Jonsson MKB. Lessons from the heart: Mirroring electrophysiological characteristics during cardiac development to in vitro differentiation of stem cell derived cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014.
22. Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu JD, Sun N, Abilez OJ, et al. Dynamic MicroRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010.
23. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac

Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2.

Cell. 2007

**CAPITULO III: MIR-200B EN LA
ESPECIFICACIÓN Y DESTINO CELULAR DE LAS
POBLACIONES DERIVADAS DEL EPICARDIO.**



3.1 Introducción

Recientemente se ha puesto de manifiesto que el epicardio, la capa externa del corazón, es una población de células progenitoras locales a considerar para la búsqueda terapéutica. Por tanto, comprender cómo las células progenitoras endógenas se comportan localmente y cuáles son sus orígenes constituyen pasos fundamentales en el descubrimiento de métodos para estimular el proceso de reparación intrínseca y tratar de reparar un corazón dañado.

El epicardio deriva de un grupo de células llamado proepicárdico (PE). Después de que el PE se expanda, las células migran de esta estructura para poblar la superficie del corazón sufriendo una transición mesénquima-epitelio y formar el epicardio (Dueñas *et al.*, 2017). Cuando alcanza la superficie del corazón, las células derivadas del proepicárdico se someten a un proceso de diferenciación mecánica indefinido para convertirse en el epicardio maduro. El proceso de migración inicial desde el proepicardio y su posterior unión al corazón parece implicar la integrina $\alpha 4 \beta 1$ (Dueñas *et al.*, 2017). Las células del epicardio maduro producen una capa de matriz extracelular entre ellas y el miocardio, constituyendo así el denominado espacio subepicárdico. Un subconjunto de células epicárdicas se delaminan del epicardio y se someten a un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y posteriormente migran al espacio

subepicárdico denominándose células progenitoras derivadas del epicardio (EPDCs). Durante el desarrollo, las EPDCs pueden migrar al miocardio donde contribuyen a la formación de las células del músculo liso vascular coronario, fibroblastos adventiciales e intersticiales (Figura 3.1). No se ha establecido inequívocamente hasta qué punto las EPDCs pueden participar en la formación de la células endoteliales y cardiomiocitos, así como su participación en la formación de los cojines endocárdicos del canal atrioventricular en ratón. Varios estudios apuntan hacia una posible contribución de las EPDCs a estos linajes (Dueñas *et al.*, 2017), pero los problemas técnicos con los sistemas modelo aplicados han conducido a cuestionar el mapa del destino de las EPDC (Dueñas *et al.*, 2017). Estudios muy recientes con modelos animales de trazado de linaje celular han evidenciado que una subpoblación de células derivadas del epicardio contribuye a la formación del endotelio de la vasculatura coronaria (Sengbusch *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque la contribución directa del epicardio durante el desarrollo cardíaco para la formación de diferentes poblaciones celulares en el miocardio ha sido ampliamente documentada, los mecanismos moleculares que dirigen las decisiones de destino de las EPDCs permanecen desconocidos. Además de actuar como una fuente de células cardiovasculares, el epicardio funciona como un importante centro de señalización, de modo que se intercambian señales bidireccionales (factores de

crecimiento trófico, mitógenos, quimiocinas, etc.) entre el epicardio y el miocardio cruciales para el crecimiento normal del músculo cardíaco y el desarrollo de las coronarias (Dueñas *et al.*, 2017).

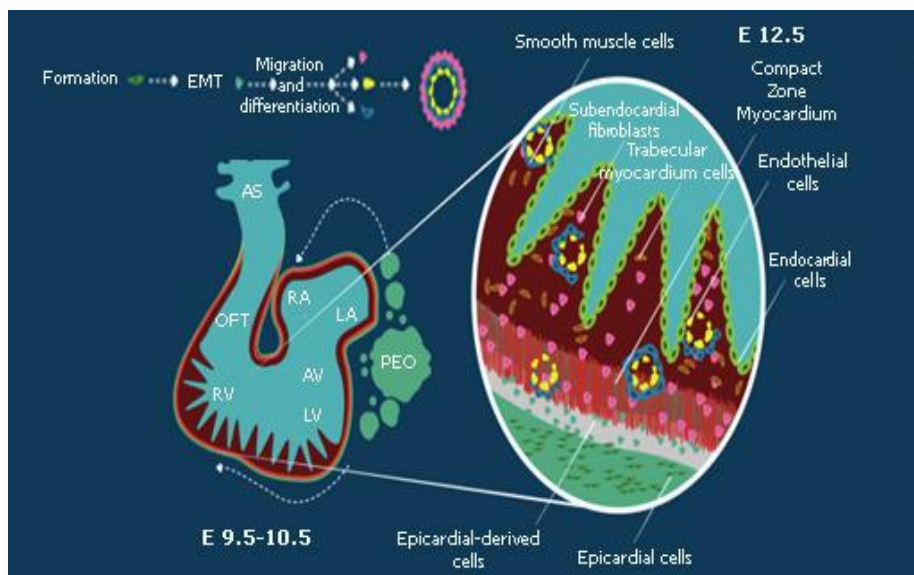


Figura 3.1: Formación del epicardio a partir del órgano proepicárdico (PEO) (Imagen tomada de *LifeMap Sciences, Inc.* <https://discovery.lifemapsc.com/in-vivo-development/lateral-plate-mesoderm/proepicardium>)

Investigaciones recientes en modelos murinos de IM, muestran que la lesión miocárdica conduce a una activación epicárdica incluyendo la proliferación y expansión del epicardio, EMT y la migración de EPDCs. Después de IM, el epicardio

recapitula inicialmente un programa de expresión génica embrionario. Los genes epicárdicos fetales *Wt1*, *Raldh2* y *Tbx18* son activados dentro de los primeros días tras la lesión (Cano *et al.*, 2016). Por lo tanto, la lesión isquémica representa un fuerte activador del epicardio, la pregunta principal pendiente es si las EPDC activadas son capaces de restaurar el tejido cardíaco perdido. En el corazón lesionado adulto, la contribución del epicardio a la población de cardiomiocitos ha sido objeto de debate. Algunos estudios recientes han puesto de manifiesto el potencial de las células epicárdicas para contribuir a la formación de cardiomiocitos y nuevos vasos (neoangiogénesis) después de la lesión (Smits *et al.*, 2014). Además, estudios recientes de trazado de linaje celular han puesto de manifiesto que las EPDCs contribuyen a formar fibroblastos como respuesta celular predominante después de la lesión (Winter *et al.*, 2007), demostrando que las células derivadas del epicardio junto con células mesenquimales derivadas de médula ósea proporcionan el andamio celular requerido para la deposición de colágeno en el remodelado cardíaco post-IM que genera la cicatriz fibrótica (Zhou *et al.*, 2012). Estos autores proponen que la manipulación de esta interacción celular podría ayudar a minimizar las fibrosis y mejorar las terapias basadas en células para reparar el corazón infartado.

Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos moleculares que dirigen las decisiones de destino de las EPDCs puede conducir a la identificación de dianas moleculares que resulten de interés como dianas terapéuticas en la remodelación y reparación de tejido tras un IM.

Por otro lado, varios estudios han proporcionado pruebas de la expresión diferencial de miRNAs durante el desarrollo y la diferenciación del corazón, tanto durante la embriogénesis como en las etapas postnatales (Babiarz *et al.*, 2012; Vacchi-Suzzi *et al.*, 2013), apoyando un papel central de los miRNAs durante la cardiogénesis. Aunque algunos estudios ponen de relieve la importancia de la biogénesis de los miRNAs para el desarrollo del corazón, el papel de los miRNAs individuales en la diferenciación cardíaca sigue siendo en gran parte desconocido.

Tal y como se ha mencionado anteriormente uno de los procesos clave que tienen que llevar a cabo las EPDCs para comenzar los procesos de diferenciación durante el desarrollo del corazón es la EMT. Es interesante señalar que numerosas evidencias previas han puesto de manifiesto que uno de los miRNAs que de forma potente actúa como modulador de la EMT en el contexto de la fibrosis pulmonar y el cáncer es el miR-200b (Li *et al.*, 2019; Ranković *et al.*, 2019; Soung *et al.*, 2019; Ladak *et*

al., 2019), siendo propuesto como un importante candidato para ser propuesto como molécula terapéutica. En el contexto del desarrollo cardíaco, es conocido que la EMT juega un papel fundamental en el desarrollo del epicardio siendo necesaria para la formación del epicardio a partir del proepicardio y para la diferenciación de las EPDCs más tarde (von Gise *et al.*, 2011; Scarpa *et al.*, 2015;). En este sentido, datos recientes obtenidos por nuestro grupo de investigación mediante *RNAseq*, han revelado que el miR-200b es el miRNA más diferencialmente expresado entre proepicardio/epicardio así como entre epicardio/miocardio (Dueñas *et al.*, en preparación).

3.2 Hipótesis:

Aunque la contribución directa del epicardio durante el desarrollo cardíaco a la formación de diferentes poblaciones celulares en el miocardio se ha abordado ampliamente, los mecanismos moleculares subyacentes al destino del epicardio, tanto en el contexto del desarrollo cardíaco como en el seguimiento enfermedad / lesión permanecen sin dilucidar. La EMT es un proceso clave en el inicio de la toma de decisiones de destino de las células del epicardio y evidencias previas señalan al miR-200b como un importante regulador de la EMT en otros contextos biológicos y patológicos. El avance en el conocimiento de los miRNAs que controlan los procesos de especificación de los distintos tipos celulares que conforman el

corazón constituye una pieza clave para el desarrollo de nuevas estrategias que permitan, de forma exitosa, reparar el corazón. Por lo tanto, un hito importante a llevar a cabo en este campo es la identificación de los miRNAs expresados en tipos específicos de células cardíacas y vasculares, así como el análisis de los papeles reguladores de estos miRNAs durante la diferenciación de los cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y la formación de vasos.

Basados en datos preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación, la hipótesis que se plantea en este estudio es que el miR200b puede estar ejerciendo un papel en el inicio de toma de decisiones de destino celular de las EPDCS durante el desarrollo embrionario del corazón.

3.4 Material y métodos

3.4.1 Obtención de corazones embrionarios

Se seleccionaron embriones murinos en diferentes estadios de desarrollo, desde E10.5 hasta E16.5. Los embriones fueron puestos en placas Petri con tampón fosfato salino a pH 7,4 (PBS). Se procedió a la disección y aislamiento de los corazones y a su lavado en el mismo PBS para eliminar los restos de sangre. Tras esto, se realizó la extracción de ARN.

3.4.2 Extracción de RNA, RT-PCR y PCR cuantitativa a tiempo real.

Para el análisis de expresión de miR-200b durante el desarrollo embrionario y fetal, se extrajeron corazones de embriones de ratón en diferentes estadios del desarrollo, desde el E10.5 hasta E16.5 según se describe en el apartado anterior.

Así mismo, también se extrajo el ARN de células YFP positivas e YFP negativas mediante obtenidas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACs; *Fluorescence-Activated Cell sorting*) en corazones de embriones WT1-YFP+.

La extracción de ARN de todas las muestras obtenidas se realizó mediante el kit *High Pure RNA Isolation Kit (Roche)*, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Se utilizaron 2µg de ARN por muestra que fueron cuantificados en *NanoDrop™ 2000/2000c (ThermoFisher)* siguiendo las indicaciones de la casa comercial (*Isogen*). Para llevar a cabo la reacción de la retrotranscriptasa con el kit *Universal cDNA Synthesis Kit II, 8-64 rxns* siguiendo el protocolo obtenido por la casa comercial (*EXIQON*). Posteriormente se realizó una PCR cuantitativa según describimos antes (Lozano-Velasco et al., 2011) con oligonucleótidos específicos para miR-200b que se muestran en la tabla 3.1 usando como

normalizadores los controles *Control primer set*, *U6 snRNA (hsa, mmu)* y *Control primer set, 5S rRNA (hsa)* ambos de la casa comercial *Exiqon*.

También se realizó una qPCR en muestras de células epicárdicas (cuya obtención se describe posteriormente) en el que se midieron los niveles de expresión de N-Cadherina, usando como normalizadores los oligonucleótidos control *Gusb (NM_010368.1) M. musculus* y *Gapdh (NM_008084) M. musculus* ambos de la casa comercial *SigmaAldrich* y cuyas secuencias se muestran en la tabla 3.1.

La PCR cuantitativa se midió en el aparato *BIO-RAD CFX Manager* siguiendo las instrucciones del proveedor y con el kit *GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)*.

Oligonucleótidos	Secuencia	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón
<i>miR-200b</i>	5'- UAAUACUGCCUGGUAAGAUGA-3'	60°C	22pb
<i>N-Cadherina</i>	sentido: 5'-GGGGATATTGGGGACTTCAT- 3'	60°C	150 bp
	antisentido: 5'-ACCGCTACTGGAGGAGTTGA-3'		
<i>Gusb</i>	sentido: 5'-ACGCATCAGAAGCCGATTAT- 3'	60°C	212 bp
	antisentido: 5'-ACTCTCAGCGGTGACTGGTT-3'		
<i>Gapdh</i>	sentido: 5'- CATCACTGCCACCCAGAAGACTG - 3'	60°C	170 bp
	antisentido: 5'- ATGCCAGTGAGCTTCCC GTTCAG -3'		

Tabla 3.1: Oligonucleótidos para genes específicos, temperaturas de alineamiento y tamaño del amplicón para PCR cuantitativa.

3.4.3 LNA Hibridación In Situ

Esta técnica fue realizada usando sondas de detección de ácidos nucleicos (LNA) procedentes de la casa comercial *Exiqon*. Las muestras utilizadas fueron criosecciones de corazón de embrión de ratón de 20 µm de grosor en los estadios E10.5 hasta E16.5, en función de los resultados obtenidos en la cuantificación por qPCR de la expresión de miR-200b durante el desarrollo. La hibridación *in situ* se realizó tal y como se describió anteriormente (Perbellini *et al.*, 2011). También se realizó la hibridación *in situ* en criosecciones de muestras de corazones de

ratones WT1-YFP y G2-GATA4-YFP cedidos amablemente por el grupo de investigación del Dr. Ramón Muñoz-Chápuli y el Dr. José María Pérez Pomares de la Universidad de Málaga.

Secciones de 20 μm fueron secadas durante 30 minutos a 4° C y fijadas en paraformaldehído (PFA) (*PanReac*) al 2% otros 30 minutos. Después se les realizaron 5 lavados de dos minutos cada uno en tampón fosfato salino a pH 7,4 (PBS) e incubadas 10 minutos en una solución de H_2O_2 al 0,03% en PBS a temperatura ambiente. Tras esto, las criosecciones fueron permeabilizadas durante 5 minutos en acetona al 2% en PBS y tratadas con formamida al 30% y 2xSSC (tampón salino sodio-citrato) durante 10 minutos para favorecer la hibridación de la sonda a temperaturas inferiores a 50°C.

Luego, las criosecciones fueron hibridadas con la sonda *LNA-Detection Probe hsa-miR-200b-3p double DIG (digoxigenin)* 20nM de la casa comercial *Exiqon*, durante 2 horas a 37°C. Tras esto, fueron lavadas primero en formamida al 30% en 2xSSC a 45°C durante 30 minutos y 2xSSC a 45°C por 15 minutos. Luego, un lavado en 1xSSC a 45°C 15 minutos y 1xSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las secciones se incubaron después con suero de cabra al 5% y 2% de BSA (albúmina de suero bovino) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente a lo que siguió un tratamiento durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti-digoxigenina (conjugado con fosfatasa

alcalina de la casa comercial Roche, en una concentración 1:2000 en PBS+2% BSA.

La hibridación de la sonda fue visualizada por una reacción de color con NBT (*nitroblue tetrazolium*) y BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato) (*Sigma-Aldrich*) tras una incubación de 8 horas a temperatura ambiente.

3.4.4 Cultivos de células de epicardio desde explantes de ventrículo.

Para el cultivo de células de epicardio se utilizaron ventrículos de embriones de ratón en estadio E12.5. Se extrajeron los corazones de estos embriones y se seccionaron y desecharon las aurículas quedando con la porción ventricular únicamente. Se lavaron en PBS para minimizar la concentración de sangre y se dispusieron boca abajo (con el ápex hacia arriba) en placas de cultivo en medio de cultivo con un 89% de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) de la casa comercial Lonza; un 10% de FBS (Suero bovino fetal) (*Thermo Fisher*) y 1% de Penicilina/estreptomicina (*Sigma-Aldrich*). En este caso se eligieron placas de cultivo de 8 pocillos (8 Well Chamber, removable Ref.:80841) de la casa comercial IBIDI.

Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y el medio de cultivo se renovaba cada tres días. Mediante microscopía óptica se observaba la migración de las células epicárdicas hacia la base

adherente de la placa de cultivo. A las 72 horas se quitaron los ventrículos quedando solamente las células epicárdicas adheridas.

De estos cultivos celulares, una parte se utilizó para realizar inmunocitoquímica según se describe posteriormente, y otra parte fue tratada con Tripsina (*SigmaAldrich*) y FBS con el fin de pasarlas a tubos *Eppendorf* para aislar su ARN y cuantificar su expresión de N-Cadherina mediante qPCR según se describe anteriormente.

3.4.5 Transfecciones de pre-miR-200b y anti-miR-200b

En el momento de la puesta de los ventrículos en cultivo para obtener células de epicardio, se realizó la transfección con pre-miR-200b (*hsa-miR-200b-3p. Pre-miR™ miRNA Precursor. 5nmol*) y anti-miR-200b (*hsa-miR-200b-3p Anti-miR™ miRNA Inhibitor. 5nmol*) ambos de la casa comercial *Thermo Fisher*.

Para ello se utilizó medio de cultivo *Opti-MEM (Reduced Serum Medium)*, medio utilizado con reactivos de transfección de lípidos catiónicos (*Thermo Fisher*) y *Lipofectamina (Lipofectamine 2000)*, compuesto lipídico que se emplea en los experimentos de transfección realizados en células eucariotas (*Invitrogen*).

Para la transfección, se añadieron, por separado, 50 pmol. del pre-microR-200b y otros 50 pmol del anti-miR200b en 250 μ l de medio *Opti-MEM* en dos tubos *eppendorf*. Por otro lado, se añadieron 2.5 μ l de Lipofectamina a 250 μ l de *Opti-MEM* a otros dos tubos *eppendorf*. Tras homogeneizar el contenido de los tubos. La solución que contienen el pre-miR-200b y la que tiene el anti-miR-200b se mezcla con la solución que contiene Lipofectamina y se incuban los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo tiene lugar la formación de los complejos lípido-ARN entre la Lipofectamina y el pre-miR y/o anti-miR, lo cual permitirá más tarde la entrada de éstos en las células. Esta mezcla de 500 μ l de *Opti-MEM* que contiene Lipofectamina y el pre-microRNA se añade a la placa de cultivo en la que previamente se habían añadido, por pocillo, 1,5 ml de medio de cultivo sin penicilina/estreptomicina. Se transfectó un pre-miR y un anti-miR por pocillo, y aparte se realizaron dos pocillos control, en los que se puso Lipofectamina y *Opti-MEM* pero no se añadió ningún pre-miR ni anti-miR. Se incuban las placas a 37°C y 5% de CO₂.

Se repetirá la transfección con su correspondiente cambio de medio de cultivo cada 3 días durante 7 días con el fin de evitar la degradación y desaparición de los pre-miRs y anti-miRs transfectados a lo largo del tiempo.

3.4.6 Inmunocitoquímica

Para verificar que en los cultivos celulares obtenidos a partir de explantes de ventrículos había presencia de células procedentes del epicardio, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con el marcador WT1 a las 24 horas de cultivo de explante y después de retirar los ventrículos. Una vez eliminado el medio de cultivo de la placa, se realizaron dos lavados en PBS para así eliminar los posibles restos de medio de cultivo y se fijaron las células PFA al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tras fijar las células, se elimina el PFA y se volvieron a hacer dos lavados con PBS.

Para permeabilizar las células, se usó 1 ml de una solución de TritónX-100 (*PanReac*) más 50mM de NH_4Cl durante diez minutos a temperatura ambiente. Tras volver a lavar con PBS se aplicó la solución bloqueante compuesta por PBS+0,2% de gelatina (*SigmaAldrich*) durante diez minutos.

Se procedió después a la incubación durante 8 horas a temperatura ambiente del anticuerpo primario *Anti-Wilms Tumor Protein antibody (WT1)* de la casa comercial *Abcam*. El anticuerpo primario se encontraba diluido en la solución bloqueadora de PBS+0,2% de gelatina. Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario y tras lavar la muestra con

PBS, se añadió el anticuerpo secundario con un fluoróforo y se dejó durante treinta minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las muestras y se añadió la tinción nuclear, en este caso usamos DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (*SigmaAldrich*) para visualizar los núcleos celulares.

3.4.7 Análisis estadístico

En todos los experimentos se realizaron 3 réplicas biológicas. Los datos obtenidos fueron analizados usando el software *Prism6* con el que se realizaron los test estadísticos ANOVA y *T-Student*.

3.5 Resultados

3.5.1 miR-200b se expresa entre los estadios E12.5 y E16.5 durante el desarrollo cardíaco.

Para dilucidar si el miR-200b se expresa en el corazón durante el desarrollo embrionario, se llevó a cabo una qRT-PCR en corazones embrionarios de ratón a diferentes estadios del desarrollo. Como muestra la Figura 3.2, el miR-200b comienza a expresarse en corazones embrionarios a E12.5, se mantiene a E13.5 y presenta un pico de expresión a E15.5 siendo indetectable desde E16.5. Estos resultados demuestran que el miR-200b presenta un perfil de expresión muy restringido durante la carcinogénesis.

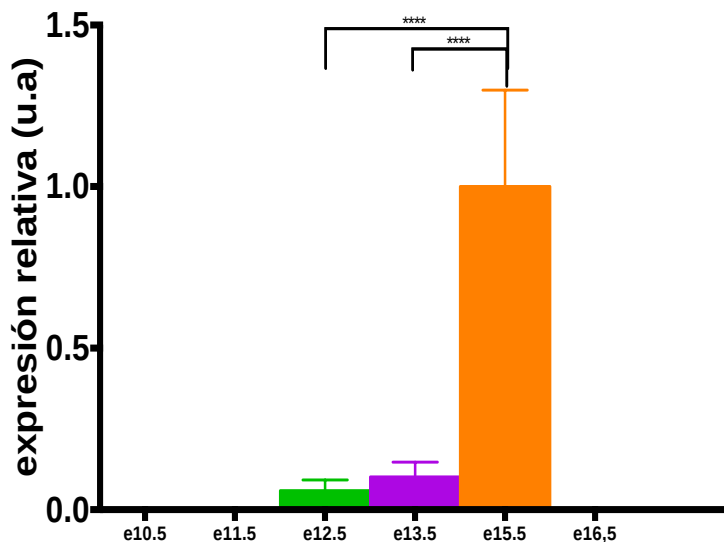


Figura 3.2. Expresión de miR-200b durante el desarrollo cardiaco. Test estadístico ANOVA

Uno de los eventos biológicos más significativos que ocurre durante la cardiogénesis entre los estadios E12.5 y E15.5 es que, una vez que se establece el epicardio, las células epicárdicas comenzarán directamente a participar en la formación de la composición celular del miocardio. Durante estos estadios del desarrollo, un subconjunto de las células epicárdicas se someterá a una EMT; las células epicárdicas adquieren características de células mesenquimales; obtienen una morfología en forma de huso y adquieren la capacidad de migrar primero hacia el espacio subepicárdico (EPDCs) y después hacia

el intersticio miocárdico, donde pueden diferenciarse en diferentes tipos de células y contribuir al desarrollo y la maduración del miocardio (von Gise et al., 2011; Scarpa et al., 2015). Teniendo en cuenta que la expresión del miR-200b coincide con el inicio de la EMT en las EPDCs; para corroborar los perfiles de expresión de este miRNA e investigar su localización en el tejido cardíaco realizamos un análisis de expresión mediante *LNA-in situ*.

A E10.5 no se detectó ninguna señal de expresión para miR-200-b en el corazón embrionario (Figura 3.3) corroborando que el miR-200b no se expresa en el corazón a este estadio del desarrollo.

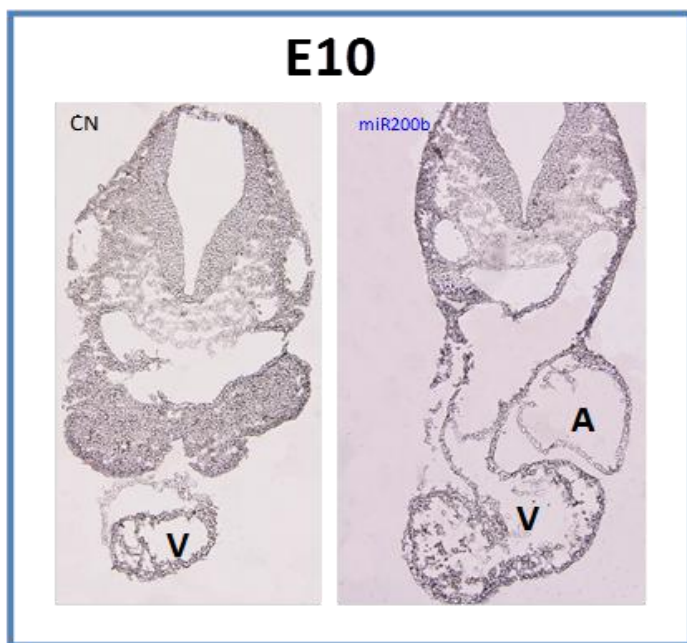


Figura 3.3.: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazón a E10.5. CN: Control negativo. A: atrio común. V: ventrículo común.

Sin embargo, a E12.5 la hibridación *LNA in situ* mostró señal de expresión de miR-200b en células de la capa más externa de corazón, compatible con la localización de las células epicárdicas (Figura 3.4-flechas azules). Así mismo detectamos señal de hibridación en algunas células en el interior del miocardio (Figura 3.4-flechas rojas).

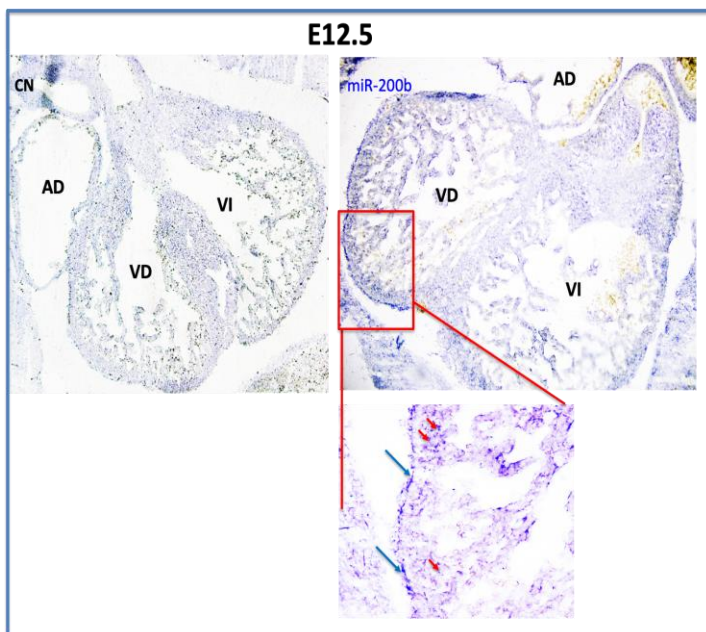


Figura 3.4: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazón a E12.5. CN: Control negativo. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo.

De forma semejante, los perfiles semejantes de expresión para miR-200b por hibridación *LNA-in situ* a E13.5 indican que este miRNA se expresa en algunas células de la envuelta externa del corazón en aurículas y ventrículos; así como en algunas células en el interior del miocardio (Figura 3.5).

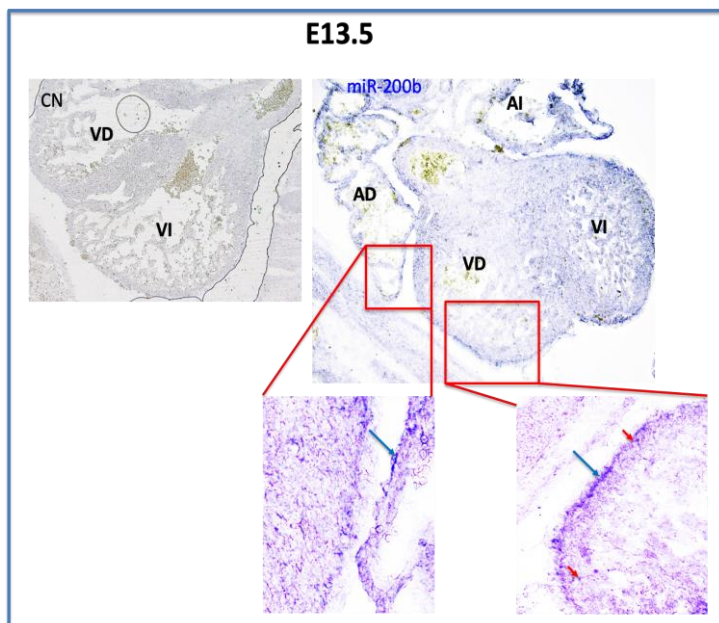


Figura 3.5: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazón a E13.5. CN: Control negativo. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo.

Así mismo, a E15.5 el miR-200b presentó una expresión similar en el corazón a este estadio del desarrollo (Figura 3.6).

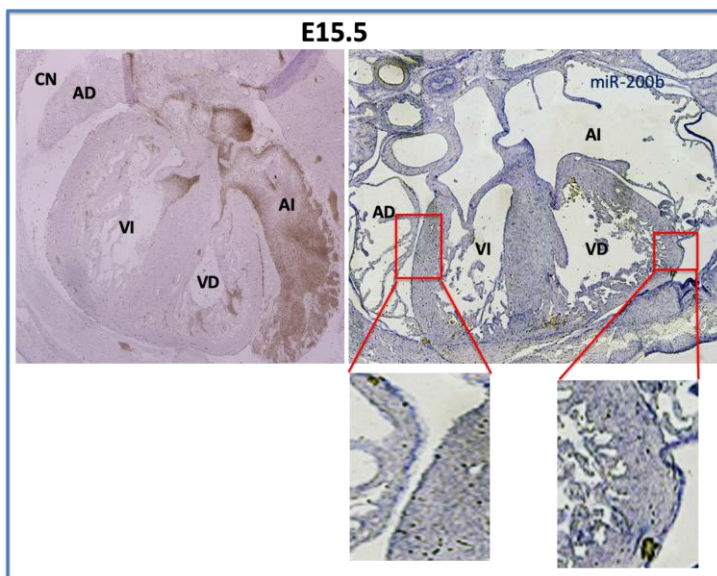


Figura 3.6: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazón a E15.5. CN: Control negativo. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo.

Sin embargo, a E16.5 no se detectó marcaje para el miR-200b en el corazón, indicando que este miRNA deja de expresarse en el corazón a este estadio del desarrollo (Figura 3.7).

E16.5

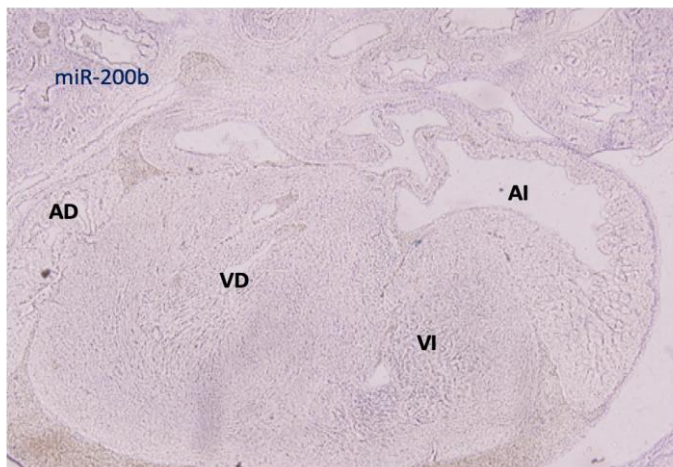


Figura 3.7: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazón a E16.5. CN: Control negativo. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo.

En conjunto estos resultados indican que el miR-200b se expresa en el corazón en desarrollo entre los estadios E12.5 y E15.5 en una subpoblación de células que recubre la capa externa del corazón (epicardio), así como en algunas células en el interior del miocardio.

3.5.2 miR-200b está presente mayoritariamente en una subpoblación de células del epicardio y su progenie.

Para identificar las poblaciones celulares derivadas del epicardio que expresan *miR-200b* hemos utilizado 2 líneas diferentes de ratones reportero: Wt1Cre-eYFP, G2GATA4Cre-YFP y suministradas por el grupo del Dr. Pérez-Pomares de la Universidad de Málaga (en colaboración). La línea Wt1Cre-eYFP nos permite identificar a células epicárdicas de origen en el proepicardio, así como trazar sus células derivadas del epicardio (Zhou et al., 2012). La línea G2GATA4-YFP nos permite trazar las células derivadas del epicardio que contribuyen a la formación de la vasculatura coronaria (células endoteliales y perivasculares)(Cano et al., 2016). Los embriones de estadios entre E12.5 y E15.5 procedentes de estas líneas de ratones transgénicos (cedidos por el Dr. Pérez-Pomares) han sido procesados para hibridación LNA-situ utilizando la sonda *hsa-miR-200b-3p*; *miRCURY LNA™* (Exiqon).

Las LNA-in situ para miR-200b en embriones Wt1Cre-eYFP positivos en estadio E13.5 (Figura 3.8) muestran que, mayoritariamente, las células que expresan el miR-200b, tanto en la superficie del epicardio como el espacio subepicárdico e interior de miocardio, corresponden a células YFP+ positivas. Estos resultados demuestran que el miR-200b está presente principalmente en células WT1 positivas en el corazón en

desarrollo, indicando que este miRNA se expresa en una subpoblación de células epicárdicas (EPDCs) en el epicardio así como en células derivadas del epicardio (EPDCs) que invaden el espacio subepicardio y el miocardio a estas etapas del desarrollo embrionario.

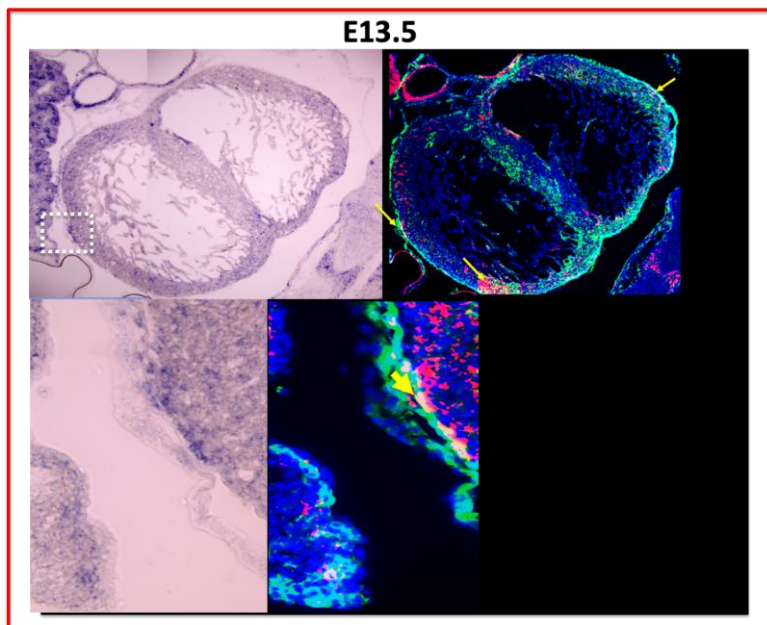


Figura 3.8: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazones de embriones Wt1Cre-eYFP a E13.5. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo. Flechas indican co-localización YFP y miR-200b.

Así mismo, para analizar más en profundidad la expresión del miR-200b en EPDCs, realizamos un aislamiento de las células YFP positivas e YFP negativas mediante FACs en corazones de embriones WT1-YFP+ de estadio E13.5. El análisis por RT-PCR de la expresión del miR-200b en las células aisladas por FACs demuestra que la expresión de este miRNA es más de 4 veces superior en las células YFP positivas que en las células YFP negativas (Figura 3.9). Estos resultados corroboran que el miR-200b se encuentra expresado mayoritariamente en las células EPDCs en el corazón embrionario.

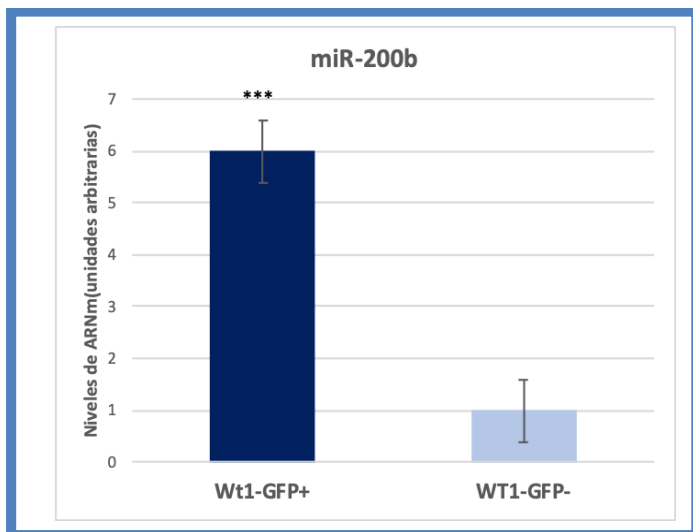


Figura 3.9: RT-PCR para el miR-200b en células extraídas mediante FACs de embriones Wt1Cre-eYFP a E13.5. Análisis estadístico *T-Student*. Significativo $p < 0,05$.

La línea de ratones transgénicos G2-Gata4Cre-eYFP identifica específicamente a una subpoblación de progenitores de endotelio coronario que proceden del *septum transversum*/proepicardio y que invaden el miocardio a partir del estadio E12.5 para formar la mayor parte del endotelio de las arteriolas coronarias intramiocárdicas (Cano et al., 2015). Los experimentos de LNA in situ en embriones G2-Gata4Cre-eYFP positivos en estadio E13.5 (Figura 3.10) muestran que, mayoritariamente, las células que expresan el miR-200b, tanto en la superficie del epicardio como el espacio subepicárdico e interior de miocardio, corresponden a células YFP+ positivas. Estos resultados demuestran que el miR-200b está presente principalmente en células epicárdicas procedentes del *septum transversum* en el corazón en desarrollo, indicando que este miRNA se expresa en una subpoblación de células epicárdicas (EPDCS) progenitoras del endotelio de los vasos coronarios que invaden el espacio subepicardio y el miocardio para formar endotelio coronario.

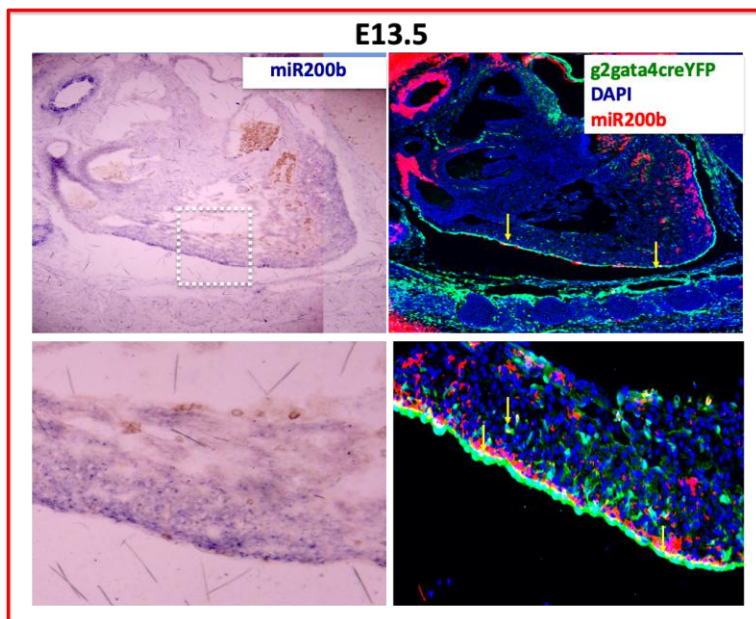


Figura 3.10: Hibridación *LNA-in situ* para el miR-200b en cortes de criostato de corazones de embriones G2Gata41Cre-eYFP a E13.5. AD: atrio derecho. AI: atrio izquierdo. VD: ventrículo derecho. VI: Ventrículo izquierdo. Flechas indican co-localización YFP y miR-200b.

Así mismo, para analizar más en profundidad la expresión del miR-200b en EPDCs, realizamos un aislamiento de las células YFP positivas e YFP negativas mediante FACS en corazones de embriones G2Gata4-YFP+ de estadio E13.5. El análisis por RT-PCR de la expresión del miR-200b en las células aisladas por FACS demuestra que la expresión de este miRNA es más de 5 veces superior en las células YPF positivas que en las

células YFP negativas (Figura 3.11). Estos resultados corroboran que el miR-200b se encuentra expresado en una subpoblación de células EPDCs procedentes del *septum transversum* en el corazón embrionario.

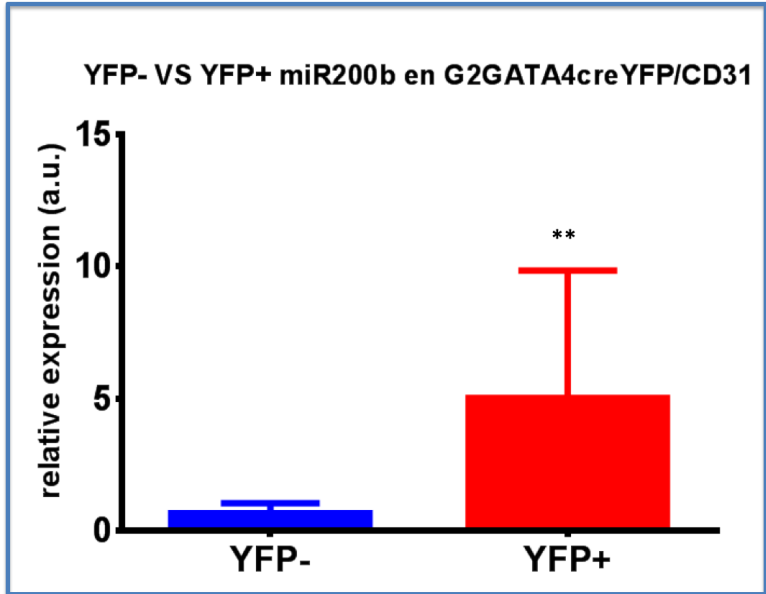


Figura 3.11: RT-PCR para el miR-200b en células extraídas mediante FACS de embriones G2Gata4Cre-eYFP a E13.5.

En conjunto, estos resultados claramente demuestran que el miR-200b se expresa principalmente en subpoblaciones de células epicárdicas que provienen del proepicardio así como en poblaciones de progenitores epicárdicos que proceden del *septum transversum* y que ingresan en el espacio subepicárdico

y miocardio entre los estadios E123.5 y E15.5. Estos hallazgos indican que este miRNA podría estar jugando un papel o en los procesos de EMT de las EPDCs o en su movimiento a través del miocardio.

3.5.3 El miR-200b juega un papel en la movilidad de las células epicárdicas.

Tal y como indican los resultados obtenidos en el apartado anterior, el miR-200b está presente en una subpoblación de células del epicardio y de sus células derivadas (EPDCs) que ingresan en el miocardio entre los estadios E12.5 y E13.5. Así, para dilucidar si este miRNA puede estar jugando un papel en los procesos de EMT y los movimientos de migración de las EPDCs a través del miocardio se realizaron experimentos de pérdida y ganancia de función del miR-200b en cultivos primarios de células epicárdicas obtenidos a partir de explantes de ventrículos en estadio E13.5.

En primer lugar, para verificar que los cultivos celulares obtenidos a partir de explantes de ventrículos estaban enriquecidos en células procedentes del epicardio, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con el marcador WT1 a las 24 horas de cultivo de explante y después de retirar los ventrículos. Tal y como se observa en la Figura 3.12, aproximadamente el 90% de las células son WT1 positivas, lo que

indica que los cultivos primarios están altamente enriquecidos en células de epicardio indiferenciadas.

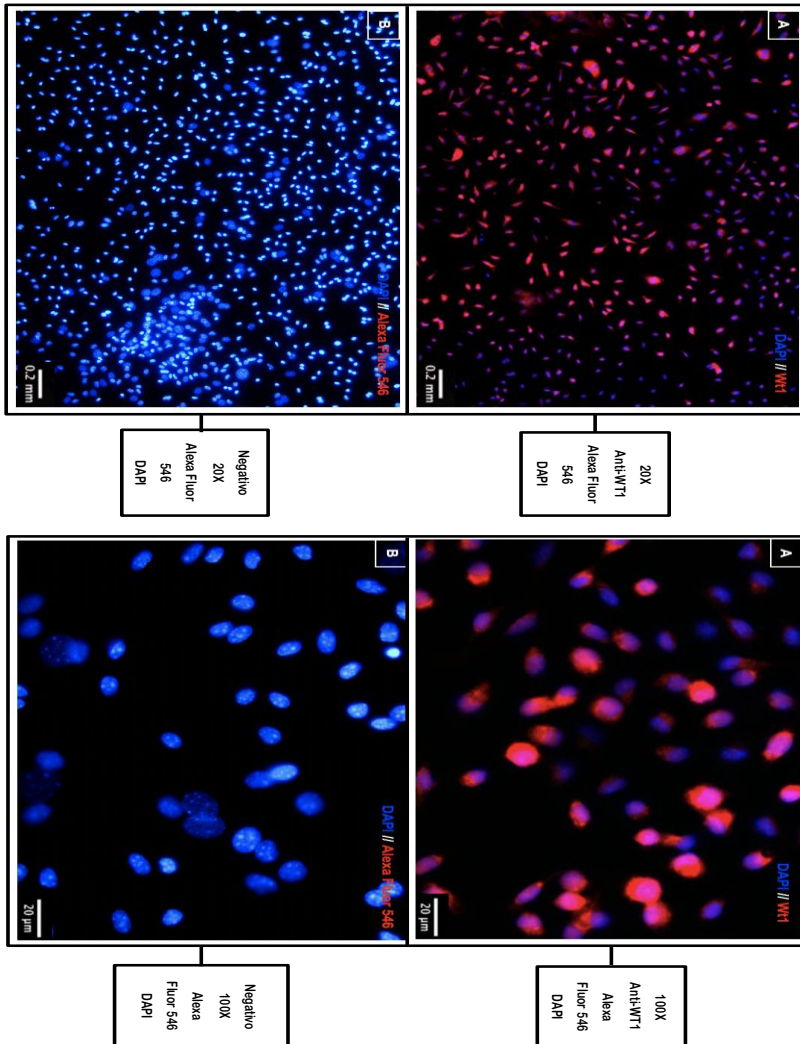


Figura 3.12: Inmunocitoquímica para WT1 en cultivos de células de epicardio obtenidos de explantes de ventrículos de embriones de ratón en estado E13.5.

Así, estos cultivos primarios de células epicárdicas se utilizaron para realizar ensayos *in vitro* de pérdida y ganancia de función de miR-200b mediante transfección con lipofectamina del premiR-200b para los experimentos de ganancia de función, y con el anti-miR200b para los experimentos de pérdida de función.

La sobreexpresión e inhibición del miR-200b en los cultivos de células epicárdicas transfectadas con premiR-200b y antimiR200b respectivamente fue corroborada en cada caso mediante RT-PCR cuantitativa. Como se observa en la Figura 3.13 los niveles de expresión para el miR-200b las células transfectadas con pre-mir200b son muy superiores con respecto a los niveles en células control transfectadas solo con lipofectamina. Así mismo, los niveles de expresión de miR-200b en las células transfectadas con el anti-miR-200b son significativamente inferiores en relación a las células control. Estos resultados corroboran la pérdida y ganancia de función de miR-200b en nuestro sistema *in vitro*.

Expresión de miR-200b en células transfectadas

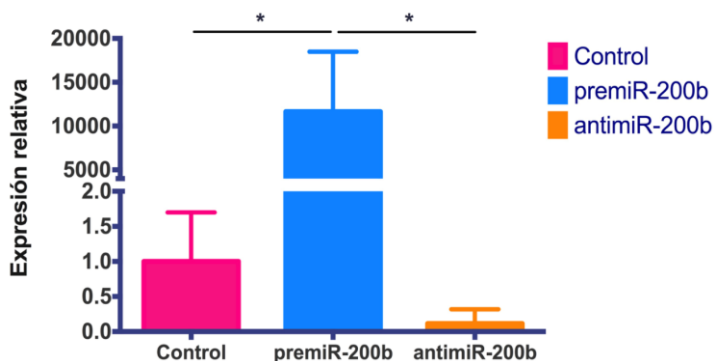


Figura 3.13: RT-PCR para miR-200b en células epicárdicas control y transfectadas con premiR y anti-miR-200b.

Es bien conocido que, una vez que se establece el epicardio, las células epicárdicas comenzarán directamente a participar en la formación de la composición celular del miocardio. Así, un subconjunto de las células epicárdicas se someterá a un proceso conocido como transición epitelial a mesenquimal (EMT) (Essafi *et al.*, 2011). Ha sido previamente establecido que la expresión de N-cadherina en las células que llevan a cabo la EMT es esencial para la formación de los llamados “contactos de inhibición de la locomoción” (CIL), un proceso que permite el movimiento celular entre células dentro de un tejido y que juega un papel fundamental en la invasión de células cancerígenas y en la migración celular durante el desarrollo embrionario (von Gise *et al.*, 2011). Así, para evaluar si

el miR-200b puede modular la adquisición de un fenotipo migratorio en las EPDCs, los niveles de N-cadherina se cuantificaron mediante RT-PCR en los cultivos primarios de células epicárdicas transfectadas con pre-miR-200b y anti-miR-200b (Figura 3.14).

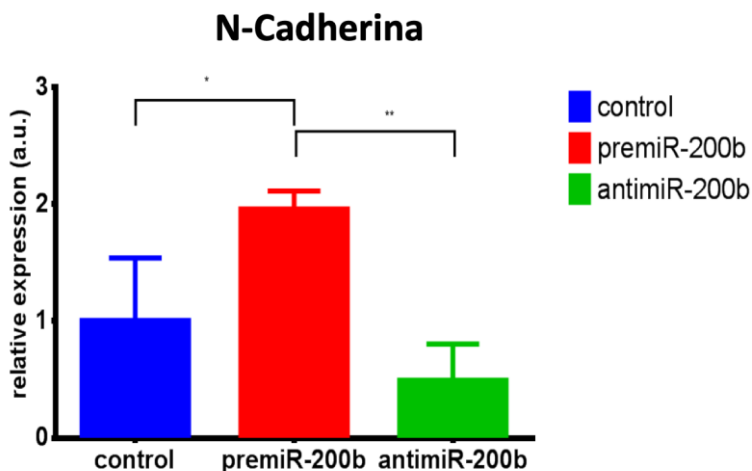


Figura 3.14: RT-PCR para N-cadherina en células epicárdicas control y transfectadas con premiR y anti-miR-200b.

Los resultados obtenidos por RT-PCR indican que la expresión de N-Cadherina se encuentra incrementada al doble en los cultivos de células epicárdicas transfectadas con premiR-200b con respecto a las células control (Figura 3.14). Así mismo, los niveles de expresión de N-cadherina, aunque no significativamente, muestran una tendencia a disminuir en las

células transfectadas con el anti-miR-200b (Figura 3.14). Estos resultados indican que el miR-200b juega un papel regulando los niveles de expresión de N-cadherina en células epicárdicas.

Basados en estos resultados, nos planteamos investigar el posible efecto del miR-200b en la locomoción y/o movimiento de las células del epicardio. Para ello, los cultivos primarios de células epicárdicas fueron transfectadas con premiR-200b y anti-miR-200b, teñidas con Dil y monitorizadas a evaluación de su movimiento mediante *Confocal Live Cell Microscopy* durante 48h. En los videos obtenidos (Figura 3.15) se observó que las células transfectadas con el premiR-200b mostraban mayor motilidad que las células control; mientras que las células transfectadas con el anti-miR-200b parecían tener una motilidad disminuida con respecto al control (Figura 3.15).

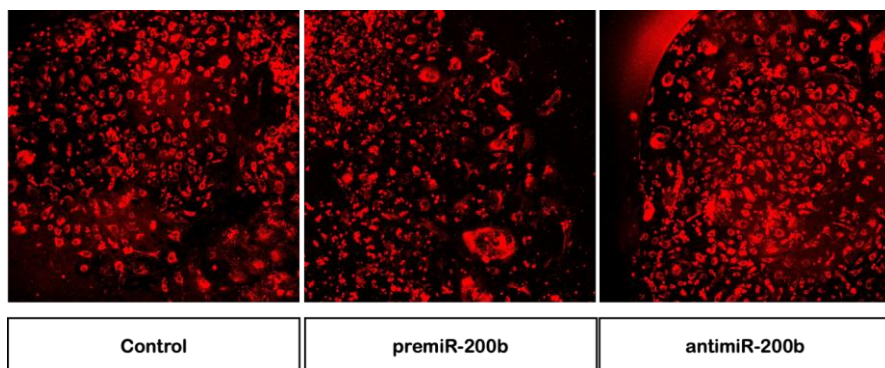


Figura 3.15: Videos en células epicárdicas control y transfectadas con premiR y anti-miR-200b y teñidas con Dil.

Para verificar estos resultados se realizó una cuantificación de los movimientos celulares evaluando el número de células que mostraban motilidad (Figura 3.16), así como cuantificando la distancia recorrida en nm de los movimientos de las células (Figura 3.17) (migración celular).

Tal y como se observa en la Figura 3.16, el número de células con motilidad es significativamente superior en las células transfectadas con el premiR-200b con respecto a las células control. Sin embargo, el número de células con motilidad se encontraba disminuido en las células transfectadas con antimiR-200b (Figura 3.16), indicando que el miR-200b incrementa la motilidad celular en células del epicardio.

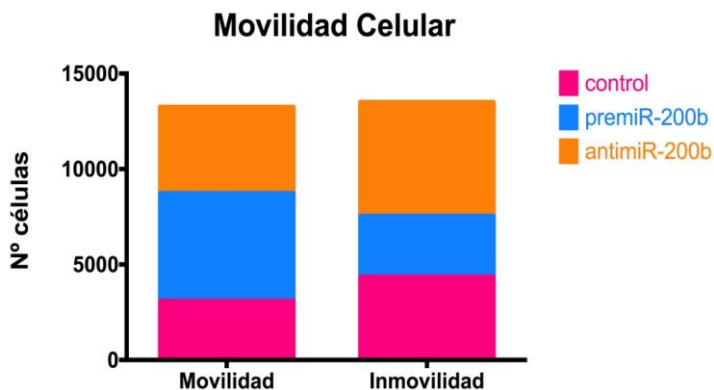


Figura 3.16: Cuantificación del número de células que muestran motilidad.

Así mismo, la cuantificación de la distancia recorrida por las células, demuestra que la distancia recorrida es significativamente superior en las células transfectadas con el pre-miR-200b que en las células control y las transfectadas con el anti-miR-200b (Figura 3.17).

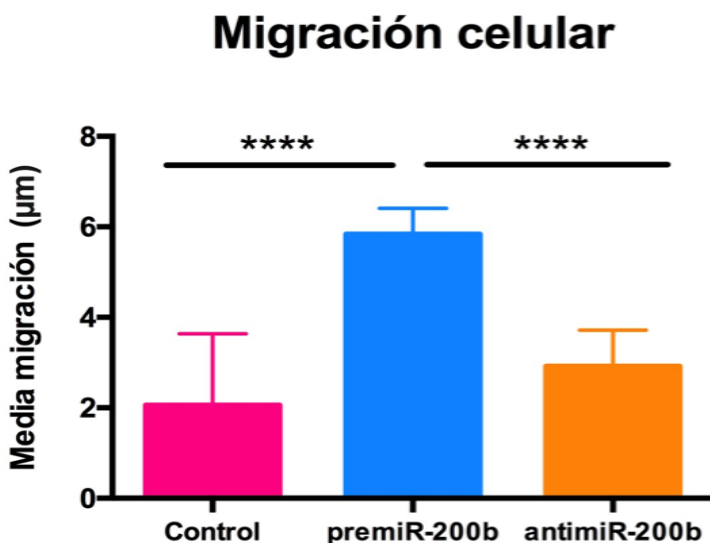


Figura 3.17: Cuantificación de la distancia recorrida por las células en los cultivos de células epicárdicas transfectados con pre miR-200b y anti-miR-200b respectivamente.

Por último, para profundizar en el análisis del efecto del miR-200b en los movimientos celulares de los cultivos de células epicárdicas, se evaluaron los diferentes patrones de movimiento que desplegaban las células tratadas con anti-miR200b y premiR-200b (Figura 3.18). Como se puede observar en la Figura 3.18, las

células transfectadas con el premiR-200b despliegan mayor variedad de patrones de movimientos sobre la superficie de cultivo que las células control.

Movimientos descritos por las células con capacidad de migración

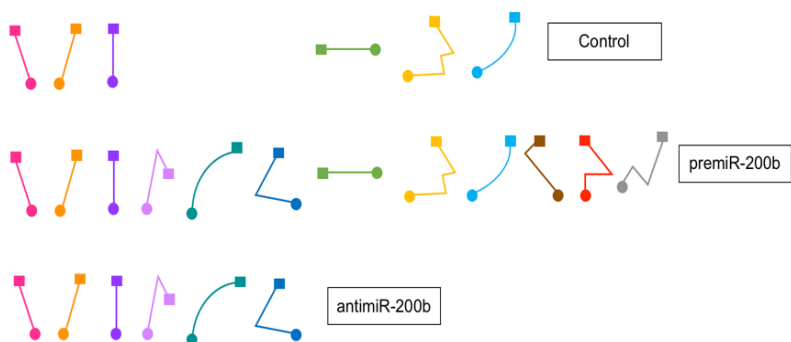


Figura 3.18: Evaluación de los patrones de movimiento en los cultivos de células epicárdicas transfectados con pre miR-200b y anti-miR-200b respectivamente.

En conjunto, estos resultados claramente demuestran que el miR-200b juega un papel fundamental en la regulación del movimiento de las células del epicardio.

3.6 Discusión

Las cardiopatías congénitas son las malformaciones humanas más comunes. Las alteraciones en el desarrollo cardíaco pueden conducir a una variedad de enfermedades congénitas. La capa

de epicardio de células epiteliales que cubre la superficie del miocardio se ha convertido en un tejido fisiológicamente relevante en el desarrollo cardíaco. Uno de los mecanismos importantes del desarrollo en el corazón es la transformación epicárdica a mesenquimal (EMT) (Vincent *et al.*, 2010). El epicardio se somete a EMT para formar células progenitoras derivadas del epicardio (EPDC) que contribuyen al desarrollo y la maduración de muchos tipos de células cardíacas, incluyendo pericitos, músculo liso vascular y células endoteliales que son críticas para la formación de vasos coronarios cardíacos, así como fibroblastos intersticiales; que juegan papeles importantes en la arquitectura cardíaca, también pueden ser fuente de miocitos cardíacos (He *et al.*, 2004). Por lo tanto, la identificación de los factores que regula la EMT en el epicardio es esencial para comprender la etiología de las enfermedades cardíacas.

Los microRNA (miRNA) representan una clase de ARN pequeños (19–25 nucleótidos) no codificantes muy conservadores evolutivamente que modulan la expresión génica inhibiendo la traducción de mRNA o su estabilidad y por lo tanto regula diversos procesos fisiológicos (Bernstein *et al.*, 2003; Kim, 2005). En vertebrados, se han identificado cientos de miRNAs con patrones de expresión diferencial que van desde ubicuos hasta altamente específicas de tejido.

Los microRNAs pueden actuar individualmente o en grupos para regular una amplia gama de procesos de desarrollo embrionario. Un método poderoso para investigar la función de miRNA en embriones y tejidos murinos es inactivar genéticamente *Dicer*, una endorribonucleasa que escinde pre-miRNA para generar dúplex de miRNA de 22 nucleótidos de longitud (Bernstein *et al.*, 2003). Estos dúplex normalmente se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por RNA multiproteína asociado a miRNA. Finalmente, una cadena del miRNA es preferentemente retenido en este complejo y se convierte en el miRNA maduro, mientras que el filamento opuesto / pasajero se elimina del complejo. El miRNA maduro se une al complementario en las secuencias de 3'-UTR de los mRNA target y modula su expresión, ya sea por silenciamiento traduccional, o escisión de ARNm, dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y su target (Carmell *et al.*, 2004; Alvarez-Garcia *et al.*, 2005).

En los últimos 20 años, se han investigado las funciones de los miRNA ampliamente durante el desarrollo embrionario y en diversas enfermedades (Harfe, 2005; Zhao *et al.*, 2007). La pérdida de la función de *Dicer* en ratones conduce a embriones letalidad tempranas en E7.5, lo que sugiere que los miRNAs son esenciales durante desarrollo embrionario temprano (Bernstein *et al.*, 2003). Así, la eliminación de *Dicer* en células progenitoras cardíacas utilizando la línea de ratones Nkx2.5Cre conduce a

letalidad embrionario en E12.5 debido a edema pericárdico y pobre desarrollo ventricular (Zhao *et al.*, 2007). En otro estudio, utilizando una línea Nkx2.5 diferente se demostró que *Dicer* es importante para la muerte celular programada durante la morfogénesis del tracto de salida cardiaco (Saxena *et al.*, 2010). Además, para comprender el papel de los miRNAs en la remodelación cardiaca, *Dicer* fue eliminado en los cardiomiocitos postnatales utilizando la Cre-recombinasa inducible por tamoxifeno (MHC-MerCreMer) (Da Costa Martins *et al.*, 2008). La eliminación de *Dicer* en los cardiomiocitos de ratones de 3 semanas resultó en muerte súbita dentro de 1ª semana debido a la función cardíaca deteriorada. Los corazones mutantes mostraron remodelación ventricular leve, dilatación auricular dramática, hipertrofia de miocitos, desorganización de miofibras, fibrosis ventricular y regulación positiva de transcripciones de genes fetales (Da Costa Martins *et al.*, 2008). Más específicamente, se ha analizado el posible papel de los miRNAs en el desarrollo del epicardio deleccionando *Dicer* utilizando ratones transgénicos Gata5-Cre. Estos mutantes mueren inmediatamente después del nacimiento y exhiben problemas cardíacos graves ligados a anomalías en la EMT del epicardio y formación de las coronarias; subrayando la importancia del papel de los miRNAs en el epicardio (Singh *et al.*, 2011). En este estudio, un análisis de la expresión de miRNAs en explantes de epicardio tratados con FGF2 para estimular la EMT

evidenció un incremento de la familia de los miR-200 en los explantes tratados sugiriendo un papel de estos miRNAs en el epicardio (Singh, et al., 2011). En nuestro estudio, nosotros demostramos que el miR-200b se expresa en una ventana de tiempo muy restringida durante el desarrollo cardíaco (E12.5-E15.5), coincidiendo con los procesos de EMT en el epicardio durante el desarrollo. Además, nuestro análisis mediante hibridación in situ en ratones de las líneas WT1-YFP y G2Gata4-YFP claramente muestran que el miR-200b se expresa en subpoblaciones de células epicárdicas que provienen del proepicardio así como en poblaciones de progenitores epicárdicos que proceden del *septum transversum* ingresando en el espacio subepicárdico y miocardio entre los estadios E123.5 y E15.5. Así, estos resultados indican que el miR-200b puede estar jugando un importante papel en la EMT y/o migración celular que realizan las células epicárdicas durante este periodo del desarrollo, subrayando la posible contribución del miR-200b en los procesos que conducen a la contribución de las células epicárdicas a la formación del corazón.

La EMT comienza cuando las células epicárdicas pierden características epiteliales como su polaridad ápico-basal y sus contactos célula-célula y reducen la expresión de las proteínas de adhesión transmembrana E-cadherina y zónula occludens-1 (ZO-1). Posteriormente, las células epicárdicas adquieren

características de células mesenquimales; con una morfología en forma de huso y regulan al alza la expresión de fibronectina, N-cadherina y metaloproteasas de matriz (MMP). Esto dota a los EPDC de la capacidad de migrar y poblar el espacio subepicárdico: una capa amorfa rica en matriz que está presente entre el epicardio y el miocardio. Desde el subepicardio, los EPDCs migran hacia el intersticio miocárdico, donde pueden diferenciarse en diferentes tipos de células y contribuir al desarrollo y la maduración del miocardio (von Gise *et al.*, 2011). En este contexto, se ha demostrado que un proceso descrito como “contacto por inhibición de la locomoción” (CIL) dirige el movimiento de una célula en el interior de un tejido (Carmona-Fontaine *et al.*, 2008). Más recientemente, ha sido puesto de manifiesto que las células de la cresta neural durante el desarrollo adquieren CIL al mismo tiempo que activan su programa epitelial-mesenquimatoso (EMT) y comienzan a migrar (Scarpa *et al.*, 2015). Al comparar las células NC premigratorias y migratorias, estos autores mostraron que el cambio de expresión de E- a N-cadherina durante EMT es esencial para CIL; demostrando que antes de EMT, la E-cadherina inhibe la polaridad celular dependiente del contacto a través de p120 y Rac1. Además, cultivando NC en micropatrones, fotoactivando diferentes formas de Rac y midiendo las fuerzas de tracción durante CIL, concluyeron que el interruptor de cadherina conduce a la ruptura de la unión célula-célula al

generar mayores fuerzas resultantes de la repolarización celular (Scarpa *et al.*, 2015). En nuestros resultados obtenidos en cultivos de células epicárdicas observamos que la sobreexpresión de miR-200b conduce a un incremento en la expresión de N-cadherina, sugiriendo que este miRNA puede estar potenciando el “interruptor” del cambio de expresión de las cadherinas, potenciando así los movimientos de las células del epicardio. Experimentos adicionales nos ayudaran a dilucidar si la modulación del miR-200b de la expresión de la N-cadherina se debe a un efecto directo o indirecto. Aunque análisis mediante *targetscan* no predice elementos de unión para miR-200b en la porción 3'UTR del mRNA de la N-cadherina, sugiriendo un posible efecto indirecto.

Por otro lado, en los últimos años se han aportado evidencias de la implicación de diversos factores en los procesos de la EMT en el epicardio. En este sentido, se ha evidenciado que la hormona angiogénica, procinética-2 y su receptor PKR1 tienen un papel en el epicardio durante el desarrollo corazón y en el corazón adulto (Arora *et al.*, 2016). Así, La ablación genética de PKR1 en el epicardio conduce a una letalidad parcial embrionaria y postnatal con desarrollo anormal del corazón. Los defectos cardíacos del desarrollo se manifiestan en la etapa adulta como miocardiopatía isquémica con disfunción sistólica. Estos autores mostraron que PKR1 regula la EMT en las células progenitoras

derivadas del epicardio (EPDC). Este evento afecta al menos tres pasos consecuentes durante el desarrollo del corazón: 1.- Proliferación de EPDCs y cardiomiocitos implicada en el engrosamiento de la pared de la cámara ventricular compacta externa, 2.-ritmicidad, y 3.-formación de circulación coronaria. En EPDC embrionarios aislados, la sobreexpresión o activación de PKR1 altera la morfología celular y los marcadores EMT mediante la activación de la señalización de Akt. La falta de señal PKR1 en el epicardio conduce a un desarrollo cardíaco defectuoso y subyace al origen de la cardiopatía congénita en ratones adultos (Arora *et al.*, 2016). Así mismo, el papel del citoesqueleto en los movimientos que llevan a cabo las EPDCs se está poniendo de manifiesto. En concreto, recientemente se ha demostrado que la proteína del citoesqueleto miosina no-muscular IIB (NMIIB) se requiere para la formación del epicardio y sus funciones mediando la proliferación en el miocardio y el desarrollo de vasos coronarios (Ma, *et al.*, 2017). La ablación de NMIIB en las células epicárdicas resulta en la interrupción de la integridad epicárdica con una pérdida de E-cadherina en las uniones célula-célula y un desprendimiento focal del epicardio desde el miocardio. *Knockout* de NMIIB y el tratamiento con blebbistatina de los explantes epicárdicos demuestran un deterioro en la maduración de las células mesenquimales generadas durante la EMT del epicardio. Esto se manifiesta por una invasión deteriorada en geles de colágeno de las células

mesenquimales derivadas del epicardio y la reorganización de la estructura del citoesqueleto. Aunque hay una marcada disminución en la expresión de genes mesenquimales, no hay cambio en Snail (también conocido como Snai1) o expresión de E-cadherina. Estudios de epicardio específico Los ratones noqueados con NMIIB confirman la importancia de NMIIB para integridad epicárdica y funciones epicárdicas en la proliferación de miocitos y formación de vasos coronarios durante el corazón en desarrollo (Ma, *et al.*, 2017). Por tanto, estos hallazgos proporcionan un mecanismo que vincula formación epicárdica y función epicárdica a la actividad de la Proteína motora citoplasmática NMIIB. Nuestros resultados en los experimentos de ganancia y pérdida de función de miR-200b en cultivos primarios de células de epicardio demuestran que el miR-200b favorece la motilidad de las células de epicardio incrementando y diversificando los patrones de motilidad de estas células. Estos hallazgos sugieren que este miRNA podría estar de alguna forma modificando la citoarquitectura celular para imprimir cambios fenotípicos que favorezcan el movimiento de las células epicárdicas. Ya que estudios previos indican que la familia del miR-200 induce la actividad de las integrinas favoreciendo la migración celular en células cancerígenas (Virtakoivu *et al.*, 2012); estudios adicionales serán necesarios para confirmar el papel del miR-200b en las zonas de adhesión celular y CIL en el contexto del epicardio.

3.7 Conclusiones

1.- El miR-200b se expresa en una subpoblación de células epicárdicas y EPDCs entre los estadios E12.5-E15.5 en el corazón en desarrollo.

2.- Los experimentos de ganancia y pérdida de función de miR-200b en cultivos primarios de células de epicardio demuestran que el miR-200b regula la motilidad celular.

3.8 Bibliografía

1. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005.
2. Arora H, Boulberdaa M, Qureshi R, Bitirim V, Gasser A, Messaddeq N, et al. Prokineticin receptor-1 signaling promotes Epicardial to Mesenchymal Transition during heart development. *Sci Rep*. 2016.
3. Babiarz JE, Ravon M, Sridhar S, Ravindran P, Swanson B, Bitter H, et al. Determination of the human cardiomyocyte mRNA and miRNA differentiation network by fine-scale profiling. *Stem Cells Dev*. 2012.

4. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. *Dicer* is essential for mouse development. Nat Genet. 2003.
5. Cano E, Carmona R, Ruiz-Villalba A, Rojas A, Chau YY, Wagner KD, et al. Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio-venous connections. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016.
6. Cano E, Carmona R, Velecela V, Martínez-Estrada O, Muñoz-Chápuli R. The proepicardium keeps a potential for glomerular marker expression which supports its evolutionary origin from the pronephros. Evol Dev. 2015.
7. Carmell MA, Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. Nature Structural and Molecular Biology. 2004.
8. Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, et al. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. Nature. 2008.

9. Da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, Van Oort RJ, Pinto YM, *et al.* Conditional *Dicer* gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008.
10. Dueñas A, Aranega AE, Franco D. More than just a simple cardiac envelope. cellular contributions of the epicardium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017.
11. Essafi A, Webb A, Berry RL, Slight J, Burn SF, Spraggon L, *et al.* A Wt1-Controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell*. 2011.
12. Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2005.
13. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2004.
14. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005.

15. Ladak SS, Roebuck E, Powell J, Fisher AJ, Ward C, Ali S. 2019. The Role of miR-200b-3p in Modulating TGF- β 1-induced Injury in Human Bronchial Epithelial Cells. Transplantation.
16. Li Y, Liu X, Lin X, Zhao M, Xiao Y, Liu C, Liang Z, Lin Z, Yi R, Tang Z, Liu J, Li X, Jiang Q, Li L, Xie Y, Liu Z, Fang W. 2019. Chemical compound cinobufotalin potently induces FOXO1-stimulated cisplatin sensitivity by antagonizing its binding partner MYH9. Signal Transduct Target Ther.
17. Lozano-Velasco E, Chinchilla A, Martínez-Fernández S, Hernández-Torres F, Navarro F, Lyons GE, et al. Pitx2c modulates cardiac-specific transcription factors networks in differentiating cardiomyocytes from murine embryonic stem cells. Cells Tissues Organs. 2011.
18. Ma X, Sung DC, Yang Y, Wakabayashi Y, Adelstein RS. Nonmuscle myosin IIB regulates epicardial integrity and epicardium-derived mesenchymal cell maturation. J Cell Sci. 2017.
19. Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. Dysregulation and

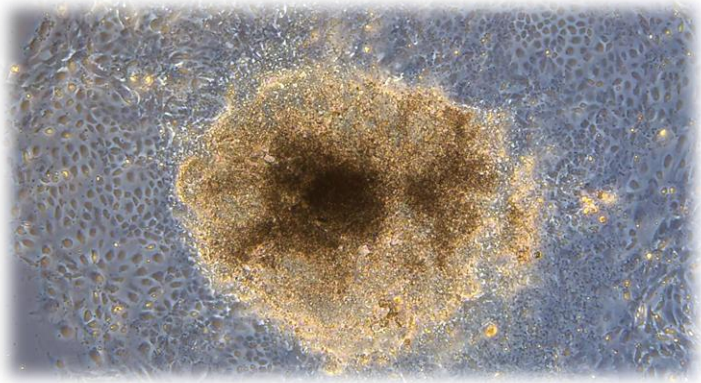
- cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*. 2011.
20. Ranković B, Zidar N, Žlajpah M, Boštjančič E. 2019. Epithelial-Mesenchymal Transition-Related MicroRNAs and Their Target Genes in Colorectal Cancerogenesis
 21. Saxena A, Tabin CJ. miRNA-processing enzyme *Dicer* is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010.
 22. Scarpa E, Szabó A, Bibonne A, Theveneau E, Parsons M, Mayor R. Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Dev Cell*. 2015.
 23. Sengbusch JK, He W, Pinco KA, Yang JT. Dual functions of $\alpha 4\beta 1$ integrin in epicardial development: Initial migration and long-term attachment. *J Cell Biol*. 2002.
 24. Singh MK, Lu MM, Massera D, Epstein JA. MicroRNA-processing enzyme *Dicer* is required in epicardium for coronary vasculature development. *J Biol Chem*. 2011.
 25. Smits AM, Riley PR. Epicardium-derived heart repair. *Journal of Developmental Biology*. 2014.

26. Soung YH, Chung H, Yan C, Ju J, Chung J. Arrestin Domain Containing 3 Reverses Epithelial to Mesenchymal Transition and Chemo-Resistance of TNBC Cells by Up-Regulating Expression of miR-200b. *Cells*. 2019.
27. Vacchi-Suzzi C, Hahne F, Scheubel P, Marcellin M, Dubost V, Westphal M, et al. Heart Structure-Specific Transcriptomic Atlas Reveals Conserved microRNA-mRNA Interactions. *PLoS One*. 2013.
28. Vincent SD, Buckingham ME. How to make a heart. The origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol*. 2010.
29. Virtakoivu R, Pellinen T, Rantala JK, Perälä M, Ivaska J. Distinct roles of AKT isoforms in regulating β 1-integrin activity, migration, and invasion in prostate cancer. *Mol Biol Cell*. 2012.
30. von Gise A, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol*. 2011.

31. Winter EM, Grauss RW, Hogers B, Van Tuyn J, Van Der Geest R, Lie-Venema H, *et al.* Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation*. 2007.
32. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, *et al.* Dysregulation of Cardiogenesis, Cardiac Conduction, and Cell Cycle in Mice Lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007.
33. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*. 2007.
34. Zhou B, Honor LB, Ma Q, Oh JH, Lin RZ, Melero-Martin JM, *et al.* Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2012.

**miR-27b and miR-23b Modulate
Cardiomyocyte Differentiation from
Mouse Embryonic Stem Cells.**

**José Manuel Vilches, Antonio Pulido,
Francisco Hernández-Torres, Diego Franco
and Amelia Aránega**



miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

J. Cardiovasc. Dev. Dis. **2014**, *1*, 41–51; doi:10.3390/jcdd1010041

OPEN ACCESS

Journal of
Cardiovascular
Development and Disease
ISSN 2308-3425
www.mdpi.com/journal/jcdd

Communication

miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

José Manuel Vilches, Antonio Pulido, Francisco Hernández-Torres, Diego Franco and Amelia Aránega *

Cardiovascular Development Group, Department of Experimental Biology, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain; E-Mails: chemavilches84@hotmail.com (J.M.V.); ampulido@ujaen.es (A.P.); fraheto@ujaen.es (F.H.-T.); dfranco@ujaen.es (D.F.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: aaranega@ujaen.es; Tel.: +34-953-212-763; Fax: +34-953-211-875.

Received: 1 February 2014; in revised form: 21 March 2014 / Accepted: 24 March 2014 /

Published: 31 March 2014

Abstract: Diverse types of stem cells represent a potentially attractive source of cardiac cells for the treatment of cardiovascular diseases. However, most of the functional benefits reported for stem cell have been modest and mainly due to paracrine effects rather than differentiation into cardiomyocytes of the applied cells. Therefore, new tools need to be developed in order to improve the efficiency of stem cell differentiation towards specific cardiovascular lineages. Here we show that microRNAs that display early differential expression during ventricular maturation, such as miR-27b, inhibits cardiac differentiation from mouse embryonic stem cells whereas miRNAs that display late differential expression, such as miR-23b, regulates the beating phenotype during *in vitro* cardiac differentiation from Embryonic Stem Cells (ESCs). This study could have an impact on regenerative medicine since we showed that miR-27b and miR-23b overexpression differentially modify the ESC cell fate towards the cardiac lineage.

Keywords: miR-27b; miR-23b; embryonic stem cells

1. Introduction

Heart development takes place through a complex series of steps, including the induction of cardiac mesoderm, formation of the cardiovascular progenitor cells and the commitment of cells to the cardiovascular lineage. Each step is precisely regulated at various levels, including transcriptional, posttranscriptional and posttranslational mechanisms [1].

microRNAs (miRNAs) have been implicated as critical regulators in cardiovascular development and pathological conditions at posttranscriptional level. The essential role of miRNA in early heart development was first revealed by a knockout study of Dicer, a miRNA-processing enzyme. The early lethality in Dicer mutant indicated the crucial role of miRNAs in early heart development [2]. Moreover, conditional Dicer deletion in the adult mouse heart causes various cardiac defects and postnatal lethality [3].

Additional studies led to the discovery of functional miRNAs such as miR-1, miR-15, miR-133, miR-138, miR-218 in regulating different step of vertebrate cardiogenesis [4–8]. Therefore, miRNAs now constitute an important component of the regulatory circuits that govern heart development and this knowledge has revolutionized our understanding of the diverse roles of non-protein-coding RNA in cardiac biology. However, with the human and mouse genome encoding over 4000 miRNAs, only a handful of which have been studied in the heart, much remains to be learned about this new class of regulatory RNA.

Recently we have reported a comprehensive profile of microRNA expression during cardiac maturation [9]. This analysis showed that only a relatively small set of microRNAs display increased expression levels, whereas none display decreased expression levels, supporting the notion that increasing microRNA expression levels provides a means to block and/or inhibit certain transcriptional programs over time. Here we show that microRNAs that display early differential expression profiles during cardiac maturation, such as miR-27b, inhibits cardiac differentiation from mouse embryonic stem cells whereas miRNAs that display late differential expression profiles, such as miR-23b, regulates the beating phenotype during *in vitro* cardiac differentiation from ESCs. These data support the notion that increasing expression levels of microRNAs in discrete temporal developmental windows during *in vitro* cardiac differentiation progressively modulate particular signaling pathways, which can alter the cardiogenic lineage differentiation.

2. Material and Methods

2.1. ESC Culture and microRNA Transfection Assays

R1-ESC line, derived from the 129 S1/SvImJ strain, was kindly provided by Andras Nagy (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada). R1-ESCs were cultured and differentiated as previously described [10]. We designated day 0 as when embryonic bodies (EBs), obtained from hanging drops, were plated. In general, we identified contracting regions within the EBs between 3–4 days after plating (10–11 total days).

microRNA transfection assays were performed when EBs were plated (day 0) as previously described [10]. Pre-miR-27b and pre-miR-23b and negative controls (a scrambled oligonucleotide, scrambled-pre-miR) were obtained from Ambion (Life Technologies). In order to maintain miRNA

miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

over-expression levels during EB culture, miRNA-transfections were repeatedly carried out every two days of culturing, as the EBs-differentiation medium was changed. EBs or dissected beating areas respectively were collected at 7 days of transfection.

2.2. RNA Isolation, Reverse Transcriptase Reaction and Quantitative Real Time PCR

Because spontaneously contracting CMs constitute only a small fraction of EBs, parts of EBs containing beating areas were dissected under a binocular microscope. EBs as well as dissected specimens were used to perform reverse transcriptase reactions (RT). Total RNA isolation, RT reactions and quantitative real time PCR was performed as previously described [10]. Specific primers for each gene analyzed, annealing temperature and amplicon size are shown in the Table 1.

Table 1. Gene-specific primers, annealing temperatures, and amplicon sizes for quantitative Real-Time PCR.

Primers	Sequence	Annealing Temperature	Amplicon size
<i>Wnt3a</i>	Sense: 5'-TTCTGCAGGAACACGTGGA-3'	60 °C	179 bp
	Antisense: 5'-AGATAGCAGCTGATCCCTCTG-3'		
<i>Brachyury</i>	Sense: 5'-CGACCACAAAGATGTAATGGAG-3'	59.5 °C	120 bp
	Antisense: 5'-AACTGAGGGTGGGAGCTG-3'		
<i>Kcnk3</i>	Sense: 5'-TGTGCACCTTCACCTACCTG-3'	59.7 °C	203 bp
	Antisense: 5'-GGTGATGGCGAAGTAGAAGG-3'		
<i>Kcnh1</i>	Sense: 5'-ACGCCCTTCAGAAAGTGCTA-3'	62 °C	182 bp
	Antisense: 5'-GTGGTCAGGAGGCAGGATAA-3'		
<i>c-Troponin T</i>	Sense: 5'-TTCGACCTGCAGGAAAAGTT-3'	64 °C	133bp
	Antisense: 5'-GCACAGCTTTGACGAGAACA-3'		
<i>Hcn4</i>	Sense: 5'-CAGCGTCAGAGCGGATACTT-3'	60 °C	158bp
	Antisense: 5'-TGTGGAGGAGGATGGAGTTC-3'		
<i>Cx40</i>	Sense: 5'-CAGAGCCTGAAGAAGCCAAC-3'	60 °C	178bp
	Antisense: 5'-ATGCGGAAAATGAACAGGAC-3'		
<i>Cx43</i>	Sense: 5'-GAGAGCCCGAACTCTCCTTT-3'	60 °C	158bp
	Antisense: 5'-TGGAGTAGGCTTGGACCTTG-3'		
<i>miR 27b</i>	5'-UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC-3'	60 °C	21 bp
<i>miR 23b</i>	5'-AUCACAUGCCAGGGAUUAAC-3'	60 °C	21 bp

3. Results

3.1. miR-27b Inhibits *In Vitro* Cardiac Differentiation by Modulating Wnt-Beta Catenin Canonical Pathway

Our previous microarray analyses of the microRNA expression profile during mouse cardiac chamber formation at three different developmental stages (E12.5, E15.5, and E18.5) revealed that only a cluster, representing the 11% of the analyzed miRNAs, display increasing expression levels during this developmental window [9]. To further explore the role of this cluster of miRNAs on cardiomyocyte differentiation we have used the *in vitro* system to cardiomyocyte differentiation from murine embryonic stem cells. We decided to analyze first the effects of those microRNAs that display early differential expression profiles, such as miR-27b. For this purpose, embryos bodies formed from mouse embryonic stem cell R1 cell line were transfected when plated with pre-miR-27b and cultured for 7 days on differentiating medium. Cardiac phenotype was analyzed at this step. Isolated beating areas and embryos bodies were collected for RT-PCR analyses. Surprisingly we observed that miR-27b-transfected EBs fail to form beating areas and the expression of cardiac markers such as c-Troponin T was clearly diminished, indicating that cardiac differentiation was inhibited in the EBs overexpressing miR-27b (Figure 1A–C, Supplementary Material Figures 1 and 2).

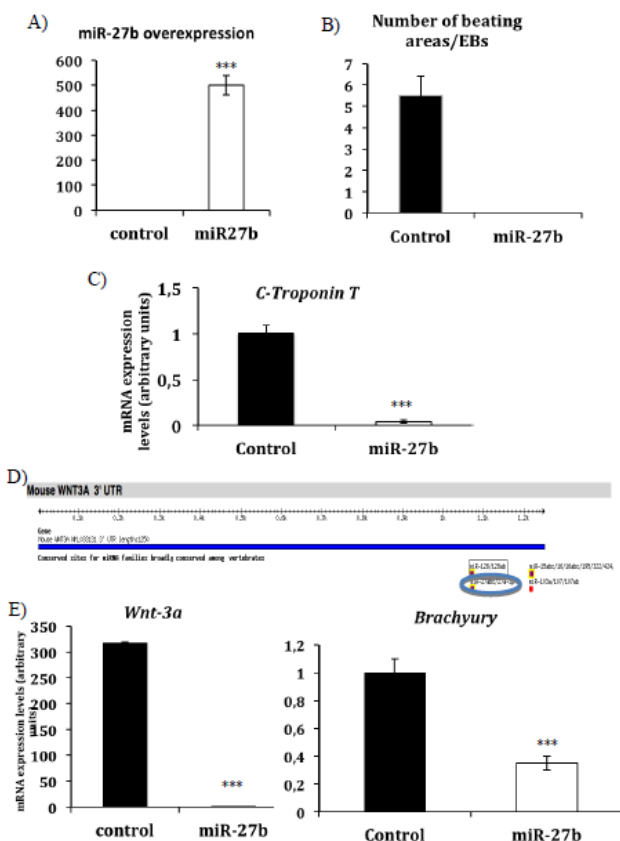
We have previously demonstrated that miR-27b regulates *Mef2c* in differentiated myogenic cells [9]. However, *Mef2* transcription factor family members are dispensable for cardiac lineage specification and determination [11]. Therefore, we have searched for novel miR27 targets, which might mediate early cardiac specification. Using bioinformatics analyses (Targetscan software) we identify *Wnt3a* as a miR-27b predicted target (Figure 1C). RT-PCR analyses showed that *Wnt3a* is clearly down regulated on EBs-overexpressing miR-27b (Figure 1D) indicating that this effective activator of the Wnt canonical pathway is regulated by miR27b in our system. Given that in murine ES cells, the early inhibition of the canonical *Wnt3a* pathway blocks the expression of mesoderm specific marker genes such as *Brachyury* [12], we have looked for *Brachyury* expression in our system. As showed in Figure 1D, the expression levels of *Brachyury* was clearly decreased on EBs-overexpressing miR-27b indicating that the loss of mesoderm induction mediated by *Brachyury* may underlay the inhibition of cardiac differentiation in this system. These results point out a role of miR-27b regulating mesoderm specification and as a consequence cardiac differentiation from cultured EBs.

3.2. miR-23b Regulates the Beating Phenotype During *In Vitro* Cardiac Differentiation from ESCs

Next, we tested the effects on *in vitro* cardiomyocyte differentiation of the microRNAs that display late differential expression profiles during cardiac maturation, such as miR-23b. In contrast to miR-27b, EBs overexpressing miR-23b normally develop beating areas in a similar ratio as to control EBs, indicating that miR-23b overexpression does not alter beating areas formation (Figure 2A). However the size of beating areas from EBs overexpressing miR-23b was significantly larger than the size of control beating areas (Figure 2B,C) whereas no changes in the expression levels for terminally differentiated genes such as c-troponin T were detected (Figure 2D). Moreover, we found that the number of beats per minute was significantly higher in beating areas-overexpressing miR-23b (Figure 3A, Supplementary Material Figures 2 and 3), suggesting that miR-23b overexpression instead to increase cardiac differentiation, might be modifying the beating activity of cardiomyocytes derived from ESCs.

miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

Figure 1. (A) Overexpression of miR-27b in embryonic bodies (EBs) derived from murine Embryonic Stem Cells (ESCs) analyzed by RT-PCR. (B) EBs-overexpressing miR-27b fail to form beating areas (n = 22). (C) *c-Troponin T* expression profiles on EBs overexpressing miR-27b. (D) Schematic representation of the putative microRNA binding sites in *Wnt3a* 3'-UTR region as revealed by TargetScan algorithm (www.targetscan.org). (E) *Wnt3a* and *Brachyury* expression profiles on EBs overexpressing miR-27b.

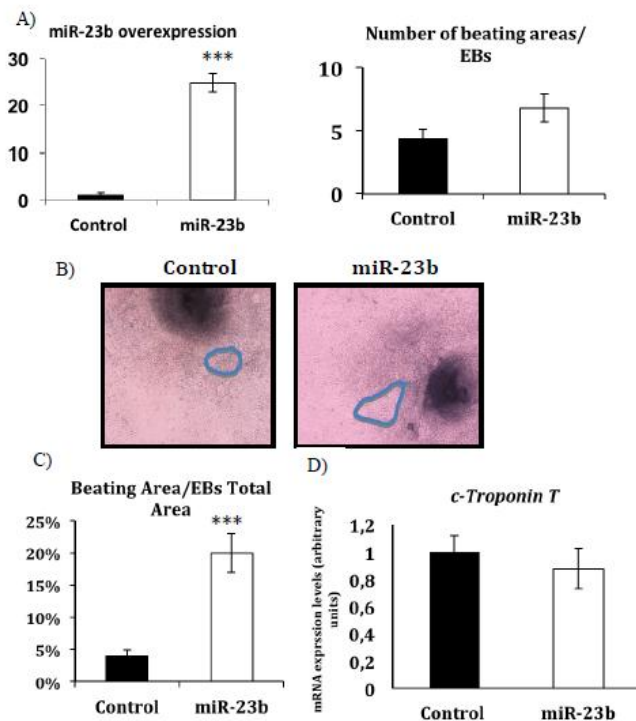


miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2014, 1

46

Figure 2. (A) Overexpression of miR-23b in EBs derived from murine ESCs analyzed by RT-PCR and number of beating areas in EBs overexpressing miR-27b respect to control. (B) Representative image showing the size of beating areas in EBs overexpressing miR-23b respect to control. (C) Percentage of the size of beating areas respect to total area of EBs (n = 20). (D) *c-Troponin T* expression profiles on EBs overexpressing miR-27b.

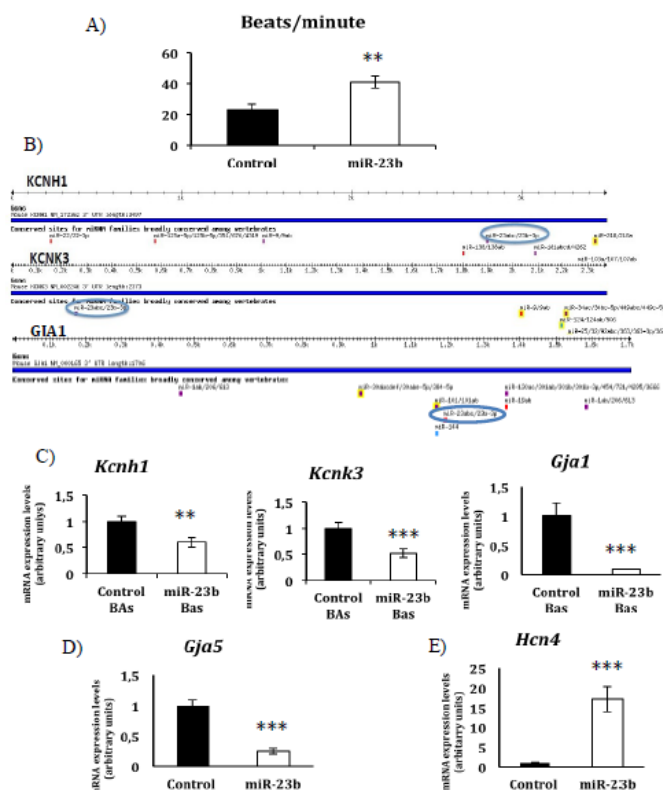


miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2014, 1

47

Figure 3. (A) Quantification of the number of beats per minute in beating areas from EBs overexpressing miR-23b (n = 15) in comparison with beating areas derived from EBs control (n = 13). (B) Schematic representation of the putative microRNA binding sites in *Hcnh1* and *Kcnk3* 3'-UTR regions as revealed by TargetScan algorithm (www.targetscan.org). (C) *Hcnh1*, *Kcnk3* and *Gja1* expression profiles on EBs overexpressing miR-27b. (D) *Gja5* expression profile on EBs overexpressing miR-27b. (E) *Hcn4* expression profile on EBs overexpressing miR-27b.



Interestingly, using bioinformatics algorithms as previously mentioned, we identified *Kcnh1*, *Kcnk3* and *Gjal* as predicted targets for miR-23b (Figure 3B). *Kcnh1* and *Kcnk3*, encode different potassium channels, which distinctly modify the action potential of excitable cells [13,14] and *Gjal* encodes for connexin 43 (Cx43), one of the fast conductance gap junctions more extensively distributed in the myocardium [15]. RT-PCR analysis for *Kcnh1*, *Kcnk3* and *Gjal* revealed that *Kcnh1*, *Kcnk3* and more significantly *Gjal* were down-regulated in beating areas overexpressing miR-23b (Figure 3C). Additionally, connexin 40 (Cx40, *Gja5*); which together with Cx43 is abundantly expressed in the myocardium and the conduction system but sparsely expressed in the sinoatrial and atrio-ventricular nodes [15], was found to be also down regulated (Figure 3D). However, an up-regulation for the pacemaker specific marker *Hcn4* was detected in beating areas overexpressing miR-23b (Figure 3E). Taken together, these findings reveal that miR-23b plays a role in modulating the electrophysiological features of differentiating cardiomyocytes from embryonic stem cells.

4. Discussion

Since the functional benefits reported for stem cell have been modest and mainly due to paracrine effects rather than differentiation of the applied cells into cardiomyocytes [16]; new tools are necessary in order to improve stem cell differentiation towards specific cardiovascular lineages. In the last decade microRNAs have been found to play important roles in the regulation of multiple biologic functions, including the control of stem cell and tissue differentiation [16]. Here, we report the role of miR-27b and miR-23b in cardiomyogenesis using an overexpression strategy in murine embryonic stem cells.

Early in development cardiac progenitors cells are specified in the mesodermal germ layer and many studies have shown that the formation of mesoderm is dependent on canonical Wnt signaling. In fact, loss of Wnt3a function is accompanied by the absence of mesoderm-specific marker genes [12,17]. Here we have shown that miR-27b regulates cardiac differentiation from murine embryonic stem cells by modulating Wnt canonical pathway leading to down-regulation of mesoderm-specific genes such as *Brachyury*. These finding reveal previous unknown functions of miR-27b on early cardiac specification.

Cardiomyocyte maturation from embryonic stem cells requires the acquisition of specific electrophysiological properties that lead to the formation of specific cardiac phenotype such as atrial, nodal or ventricular cardiomyocytes [18] and it has been previously reported that miRNAs such as miR-1 and miR-133 can post-transcriptionally regulate the electrophysiological characteristics on cardiomyocytes [19]. Here we report that miR-23b overexpression modify the beating during *in vitro* cardiac differentiation from ESCs. We have shown that miR-23b overexpression down-regulates the expression of its putative targets *Kcnh1*, *Kcnk3* and *Gjal*. The *Kcnh1* gene encodes a voltage-gated potassium channel highly expressed in neurons and is involved in tumor cell proliferation [20]; however, its physiological on the heart remain largely unclear. *Kcnk3* encodes for a member of the two-pore-domain potassium channel family, the TASK-1 channels which has been considered to have a role in determining the action potential duration [14]. *Gjal* (Cx43) and *Gja5* (Cx40) down-regulation together with *Hcn4* up-regulation has been recently reported to be crucial for activation of the pacemaker gene program, and suppression of the working myocardial gene program in EBs [21]. Besides *Gjal* down-regulation we have found that the expression levels for *Gja5* were lower and the

miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2014, 1

49

expression levels for *Hcn4* higher in beating areas overexpressing miR-23b suggesting that miR-23b overexpression leads to a more defined pacemaker phenotype. Therefore, our findings point out a role of miR-23b defining the electrophysiological characteristics of cardiomyocytes derived from ESCs.

5. Conclusions

In conclusion, this study could have a relevant impact in regenerative medicine since we showed that miR-27b and miR-23b overexpression modify the cell fate through cardiac lineage from ESCs. Additional experiments and further analyses could lead us to purpose these miRNAs as excellent tools to obtain specific cardiac cell types from ESCs.

Acknowledgments

This work was partially supported by grants BFU2012-38111 (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España), CTS-1614, P08-CTS-03878, BIO-302 (Junta de Andalucía) and AFM2012-16074 (AFM).

Author Contributions

Jose Manel Vilches: Collection and/or assembly of data; Antonio Pulido: Collection and/or assembly of data; Francisco Hernández-Torres: Collection and/or assembly of data; Diego Franco: Data analysis and interpretation; Manuscript writing; Amelia Aránega: Conception and design; Data analysis and interpretation, Financial support, Manuscript writing.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Srivastava, D. Making or breaking the heart: From lineage determination to morphogenesis. *Cell* **2006**, *126*, 1037–1048.
2. Bernstein, E.; Kim, S.Y.; Carmell, M.A.; Murchison, E.P.; Alcorn, H.; Li, M.Z.; Mills, A.A.; Elledge, S.J.; Anderson, K.V.; Hammon, G.J. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **2003**, *35*, 215–217.
3. da Costa Martins, P.A.; Bourajjaj, M.; Gladka, M.; Kortland, M.; van Oort, R.J.; Pinto, Y.M.; Molkenkin, J.D.; De Windt, L.J. Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* **2008**, *118*, 1567–1576.
4. Zhao, Y.; Ransom, J.F.; Li, A.; Vedantham, V.; von Drehle, M.; Muth, A.N.; Tsuchihashi, T.; McManus, M.T.; Schwartz, R.J.; Srivastava, D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1–2. *Cell* **2007**, *129*, 303–317.
5. Liu, N.; Bezprozvannaya, S.; Williams, A.H.; Qi, X.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 3242–3254.

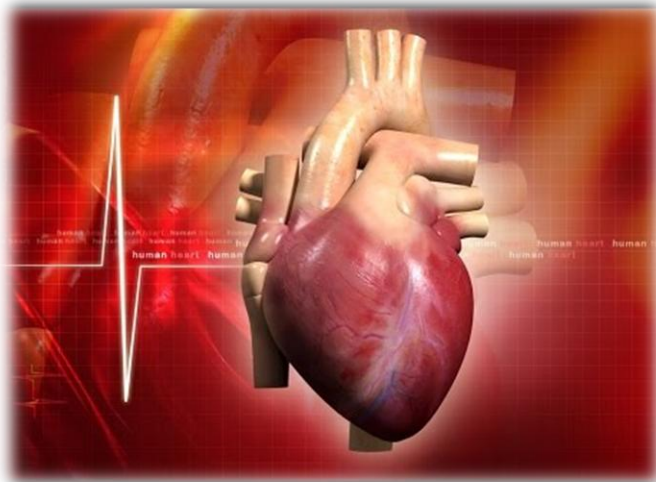
6. Wilson, K.D.; Hu, S.; Venkatasubrahmanyam, S.; Fu, J.D.; Sun, N.; Abilez, O.J.; Baugh, J.J.; Jia, F.; Ghosh, Z.; Li, R.A.; Butte, A.J.; Wu, J.C. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: Role for miR-499. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2010**, *3*, 426–435.
7. Cordes, K.R.; Sheehy, N.T.; White, M.P.; Berry, E.C.; Morton, S.U.; Muth, A.N.; Lee, T.H.; Miano, J.M.; Ivey, K.N.; Srivastava, D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **2009**, *460*, 705–710.
8. Ivey, K.N.; Muth, A.; Arnold, J.; King, F.W.; Yeh, R.F.; Fish, J.E.; Hsiao, E.C.; Schwartz, R.J.; Conklin, B.R.; Bernstein, H.S.; Srivastava, D. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2008**, *6*, 219–229.
9. Chinchilla, A.; Lozano, E.; Daimi, H.; Esteban, F.J.; Crist, C.; Aranaga, A.E.; Franco, D. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: A role for miR-27 modulating MeF2c expression. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *89*, 98–108.
10. Lozano, E.; Chinchilla, A.; Martínez, S.; Hernández, F.; Navarro, F.; Lyons, G.E.; Franco, D.; Aranaga, A.E. Pitx2c modulates cardiac-specific transcription factors networks in differentiating cardiomyocytes from murine embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* **2011**, *194*, 349–362.
11. Black, B.L.; Olson, E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 167–196.
12. Lindsley, R.C.; Gill, J.G.; Kyba, M.; Murphy, T.L.; Murphy, K.M. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* **2006**, *133*, 3787–3796.
13. Stengel, R.; Rivera-Milla, E.; Sahoo, N.; Ebert, C.; Bollig, F.; Heinemann, S.H.; Schönherr, R.; Englert, C. Kcnh1 voltage-gated potassium channels are essential for early zebrafish development. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 35565–35575.
14. Putzke, C.; Wemhöner, K.; Sachse, F.B.; Rinné, S.; Schlichthörl, G.; Li, X.T.; Jaé, L.; Eckhardt, I.; Wischmeyer, E.; Wulf, H.; Preisig-Müller, R.; Daut, J.; Decher, N. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *75*, 59–68.
15. Boyett, M.R.; Honjo, H.; Kodama, I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *47*, 658–687.
16. Porrello, E.R. microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clin. Sci.* **2013**, *125*, 151–166.
17. Huelsken, J.; Vogel, R.; Brinkmann, V.; Erdmann, B.; Birchmeier, C.; Birchmeier, W. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 567–578.
18. van den Heuvel, N.H.; van Veen, T.A.; Lim, B.; Jonsson, M.K. Lessons from the heart: Mirroring electrophysiological characteristics during cardiac development to *in vitro* differentiation of stem cell derived cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *67*, 12–25.
19. Belevych, A.E.; Sansom, S.E.; Terentyeva, R.; Ho, H.T.; Nishijima, Y.; Martin, M.M.; Jindal, H.K.; Rochira, J.A.; Kunitomo, Y.; Abdellatif, M.; Carnes, C.A.; Elton, T.S.; Györke, S.; Terentyev, D. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. *PLoS ONE* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0028324.

20. Spitzner, M.; Ousingsawat, J.; Scheidt, K.; Kunzelmann, K.; Schreiber, R. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J.* **2007**, *21*, 35–44.
21. Hashem, S.I.; Lam, M.L.; Mihardja, S.S.; White, S.M.; Lee, R.J.; Claycomb, W.C. Shox2 regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies. *Stem Cells Dev.* **2013**, *22*, 2915–2926.

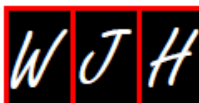
© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial Fibrillation.

José Manuel Vilches, Diego Franco and
Amelia Aránega.



Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.



World Journal of
Hypertension

Submit a Manuscript: <http://www.wjnet.com/wjnet>
Help Desk: <http://www.wjnet.com/wjnet/helpdesk.aspx>
DOI: 10.5494/wjh.v5.i1.6

World J Hypertens 2015; February 23; 5(1): 6-13
ISSN 2220-3268 (online)
© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

MINIREVIEWS

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation

José Manuel Vilches, Diego Franco, Amelia E Aránega

José Manuel Vilches, Diego Franco, Amelia E Aránega, Cardiac and Skeletal Myogenesis Group, Department of Experimental Biology, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain
Author contributions: All the authors equally contributed to this work.

Supported by Grants BFU2012-38111 (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España), Nos. CTS-1614, P08-CTS-03878, BIO-302 (Junta de Andalucía) and AFM2012-16074 (AFM).

Conflict-of-interest: The authors declare that they have no competing interests.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Amelia E Aránega, PhD, Cardiac and Skeletal Myogenesis Group, Department of Experimental Biology, University of Jaén, C.U. Las Lagunillas B3-362, 23071 Jaén, Spain. aranega@uji.es

Telephone: +34-953-2112763

Fax: +34-953-211875

Received: October 7, 2014

Peer-review started: October 8, 2014

First decision: November 1, 2014

Revised: November 12, 2014

Accepted: December 3, 2014

Article in press:

Published online: February 23, 2015

coding mRNAs of around 22 nucleotides in length, have recently emerged as one of the key players in the gene-expression regulatory networks. The potential roles of miRNAs in controlling AF have recently been investigated. Several recent studies have provided promising results for a better understanding of the molecular mechanisms of AF. In this review, we summarize the mechanism of miRNAs as regulators of ion-channel gene expression and their role in causing AF through electrical remodelling.

Key words: Atrial fibrillation; microRNA; Ion channels; Electrical remodelling

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia in clinical practice associated with pronounced mortality and morbidity. MicroRNAs (miRNAs), which are approximately 22 nucleotide long RNA regulators of gene expression, have become a major focus of research in molecular biology. miRNAs have emerged as key post-transcriptional regulators of gene expression therefore, it is important to comment on the roles of these small non-protein-coding miRNAs in the cardiovascular system and their involvement in AF. In this review, we summarize the mechanism of miRNAs as regulators of ion-channels genes and their role in electrical remodelling caused by AF.

Vilches JM, Franco D, Aránega AE. Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation. *World J Hypertens* 2015; 5(1): 6-13. Available from: URL: <http://www.wjnet.com/2220-3268/full/v5/i1/6.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.5494/wjh.v5.i1.6>

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is the most commonly encountered clinical arrhythmia associated with pronounced mortality and morbidity, which are related to palpitations, fainting, congestive heart failure, and stroke. Prolonged episodes of AF promote AF persistence mainly due to electrical remodelling that alters ion-channel expression and/or function. MicroRNAs (miRNAs), a new class of non-

INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

Vlček JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

arrhythmia in clinical practice, with high prevalence in the geriatric population¹⁴. AF is a condition in which heart-rhythm control is displaced from the normal sinus node pacemaker by rapid activity in different areas of the atria, resulting in rapid and irregular atrial activity. This pathology is often underestimated because it is usually asymptomatic and rarely life-threatening. However, it can induce palpitations, fainting, congestive heart failure, and stroke due to electrical disturbance, as well as thromboembolism, all of which are associated with high morbidity and mortality¹⁵. Therefore, a better understanding of the mechanisms of and molecular basis for AF may uncover safer, more effective therapeutic targets and new treatment methods¹⁶.

AF progresses as three different clinical forms, which have been previously well described. Initially, AF occurs in a paroxysmal form characterized by episodes of the arrhythmia that terminate spontaneously. Persistent AF is defined by episodes that are sustained longer than 7 d and require termination by pharmacological or direct-current electric cardioversion. In permanent AF the normal heart rhythm cannot be converted to sinus rhythm. It is believed that AF development from paroxysmal to persistent and permanent forms occurs through the influence of atrial remodelling caused by the arrhythmia itself and/or the progression of underlying heart disease¹⁷. Therefore, the molecular and electrical remodelling of ion channels determining the potential duration has been proposed as a major mechanism in chronic atrial fibrillation. Prolonged episodes of AF alter atrial properties ("atrial remodelling"), promoting AF persistence. Electrical remodelling alters ion-channel expression and/or function, increasing the likelihood of ectopic firing or re-entry, thereby promoting AF initiation and/or recurrence. Ion-channel remodelling shortens the atrial effective refractory period (ERP), favouring re-entrant arrhythmias, mainly due to the shortening of atrial action potential duration (APD)^{18,19}. ERP reduction promotes the conduction block and wave break underlying fibrillatory conduction. APD shortening may lead to AF-related atrial contractile dysfunction^{20,21}. The balance between inward currents that depolarize and outward currents that repolarize cardiac myocytes determines APD, and thus ERP. Thus, deregulation of ion expression as a molecular mechanism for AF has been considered quite interesting by many researchers. In addition to electrical remodelling it has been shown that structural alterations and fibrosis are implicated in AF generation and perpetuation^{22,23}.

Recently microRNA (miRNA) research has evolved rapidly, therefore it is important to comment on the roles of these non-coding short RNA molecules in the cardiovascular system and their involvement in AF. Primarily, miRNAs suppress protein synthesis by inhibiting the translation of protein from mRNA or by promoting the degradation of mRNA, thereby silencing gene expression on the post-transcriptional level. Notably, many recent reports have demonstrated that miRNAs regulate several properties of cardiac physiology and excitability,

including automaticity, Ca²⁺ handling, conduction, and repolarization²⁴. Several miRNAs have been shown to have a role in the triggering or prolonging AF, while other miRNAs target several genes considered to have the potential to regulate AF. Available results show the potential role of miRNAs involved in AF.

In this review, we summarize the mechanism of miRNAs as regulators of ion-channel genes and their role in electrical remodelling caused by AF.

ROLE OF MIRNAS IN CARDIAC DISEASES, REMODELLING, AND HOMEOSTASIS

MiRNAs are endogenous, conserved, single-stranded, small (c. 22 nucleotides in length), noncoding RNAs that repress gene expression at the post-transcriptional level by targeting mRNA^{25,26}. A single miRNA can regulate multiple targets, therefore, modulating the expression of one miRNA often results in the modulation of an entire gene network. Genes coding for miRNAs, such as the protein-coding genes, are located in chromosomes as an integral part of the genome; however, these genes may appear more genomically diverse and dynamic. Based on the genomic organization of miRNA genes, miRNAs can be grouped into two classes: (1) intergenic miRNAs, when the miRNA-coding genes are located in genomic regions distinct from known transcription units and are found between protein-coding genes; and/or (2) intragenic miRNAs, if the miRNA-coding genes are located within annotated genes either of protein-coding genes or of long noncoding RNAs as their host genes and they are transcribed by using the host regulatory elements. Curiously, some miRNAs are transcribed from multiple copies of their genes whereas many other miRNAs appear in clusters on a single polycistronic transcript.

Two converging pathways have been demonstrated for the biogenesis of miRNAs: the canonical pathway and the noncanonical pathway²⁷. The canonical pathway is Drosha-dependent and is usually used to generate intergenic miRNAs and intronic miRNAs. The first step of this pathway, transcription of miRNAs genes yields transcripts, termed primary miRNA transcripts (pri-miRNAs) with a characteristic hairpin morphology, comprising a loop and an imperfectly paired stem incorporating the mature miRNA sequence on one of the strands, operated mainly by RNA polymerase II. Subsequently, these pri-miRNAs are processed by the Class 2 RNase enzyme Drosha together with Pasha protein to become precursor miRNAs (pre-miRNAs), which are then transported to the cytoplasm through the Ran-GTP-dependent nuclear pore exportin-5, where they are processed by Dicer (another RNase III enzyme) to generate the final ~22 nucleotide product of mature miRNAs. The mature miRNAs are then loaded into the miRNA-associated multi-protein RNA-induced silencing complex (RISC) that includes the Argonaute



Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

Vlches JM *et al.* miRNAs and ion-channel remodelling

Proteins (mature miRNAs). A perfect base-pairing of the miRNA (within miRISC complex) motif, mainly in the 3'-untranslated region termed the "seed sequence", a critical site for miRNA action^[20], is required for effective repression of translation of the protein. Also, some miRNAs are involved in gene silencing through mRNA degradation. Alternatively, Drosha-independent and either Dicer-dependent or

Dicer-independent noncanonical pathways are used to generate MiRNAs, small nucleolar miRNAs and short hairpin miRNAs transfer miRNAs. It is important to highlight that some properties of the miRNAs, such as their ability to influence whole cellular processes instead of single genes, the easy manipulation of miRNA activity *in vivo* using miRNA inhibitors, and the high intracellular stability of miRNAs, make them a promising therapeutic target^[21].

To date, over a thousand miRNAs have been identified and they have been reported to participate in many fundamental biological processes, including cell proliferation, growth, differentiation, apoptosis, and tissue remodelling. The essential role of miRNA in early heart development was first revealed by a Dicer knockout. The early lethality of Dicer mutants, along with the complete depletion of mature miRNAs, indicated the crucial role of miRNAs in early heart development^[22]. Additionally, Dicer activity is also required for normal functioning of the mature heart, as adult mice lacking Dicer in the myocardium suffer from high incidence of sudden death, cardiac hypertrophy, and reactivation of the foetal cardiac-gene programme^[23]. These data demonstrate that miRNAs play an important role during normal heart development, cardiac remodelling, and homeostasis. Dysregulated miRNAs have been shown to be related to the pathology of many cardiovascular diseases, including arrhythmia, hypertrophy, and heart failure, gaining a critical position as potential therapeutic targets for cardiac diseases. For instance, multiple miRNAs, such as *miR-1*, *miR-133*, *miR-208*, *miR-195*, *miR-21*, and *miR-186*, have been identified to participate in cardiac hypertrophy and can independently determine this pathological process. Importantly, *miR-1*, *miR-133*, *miR-21*, *miR-29*, *miR-199a*, and *miR-320* have also been reported to be involved in myocardial infarction^[24]. Among them, *miR-1* and *miR-133* are considered muscle-specific miRNAs and they represent the most abundant miRNAs expressed in the heart^[25].

Interestingly, recent studies have highlighted circulating miRNAs as biomarkers for the AF^[26]. Moreover, several miRNAs such as *miR-24*, *miR-29b* and *miR133* have been shown to be involved in myocardial fibrosis^[26,27] and open new perspectives to analyse the role of miRNAs in the structural alterations and fibrosis involved in AF generation and perpetuation.

Finally, a few miRNAs have been reported to regulate cardiac excitability through targeting genes encoding ion channels^[27-30]. Here we focus on miRNAs which target different ion channels that play key roles in the electrical remodelling of AF.

ION-CHANNEL DYSFUNCTION IN ATRIAL FIBRILLATION

It has been previously shown that the factors responsible for onset of AF include triggers that induce arrhythmic. Triggers include not only sympathetic or parasympathetic stimulation, bradycardia, atrial premature beats or tachycardia, accessory AV pathways, and acute atrial stretch, but also ectopic foci occurring in "sleeves" of atrial tissue within the pulmonary veins or vena caval junctions as well^[31].

After the onset of AF, prolonged episodes alter atrial properties ("atrial remodelling") promoting AF persistence. AF-associated remodelling events within the atria include electrical remodelling and, secondarily, structural remodelling and autonomic-nervous-system changes. AF-related electrical remodelling can result from altered expression and/or function of cardiac ion channels, leading to the development of functional re-entry substrates and finally contributing to persistent AF. Therefore, electrical remodelling shortens the atrial ERP and APD, and reduces its physiological rate of adaptation as a result of ion-channel remodelling and abnormal Ca^{2+} handling (Figure 1).

The inward sodium current (I_{Na}), which is encoded by the voltage-gated cardiac sodium channel *SCN5A*, initiates the cardiac action potential and this I_{Na} is involved in repolarization and refractoriness. It bears highlight that rapid cardiac rates can significantly reduce I_{Na} density and conduction velocity, triggering AF (Figure 1)^[32]. In addition, mutations in *SCN5A* are related to diseases caused by abnormalities in cardiac conduction, including AF. In this context, Darbar *et al.*^[33] tested the hypothesis that vulnerability to AF is associated with variation in *SCN5A*, the gene encoding the cardiac sodium channel. They found novel as well as rare variants in nearly 6% of the population, including alleles that segregate with AF in other family members, supporting the hypothesis that *SCN5A* is an important AF-susceptibility gene.

It has been well documented that increased K^{+} currents or decreased Ca^{2+} currents shorten APD, promoting re-entrant AF. Because Ca^{2+} enters atrial cells during AP depolarization, the high atrial rate in AF increase Ca^{2+} loading, which leads to activation of auto-protective mechanisms to reduce chronic Ca^{2+} overload. Therefore, in patients with chronic AF, mRNA transcription of the auxiliary L-type Ca^{2+} channel subunits are significantly diminished reducing the inward Ca^{2+} currents, maintaining the AP plateau, shortening the AP duration, and finally contributing to re-entry^[34]. Moreover, alterations in Ca^{2+} handling promote diastolic Ca^{2+} release by increasing open probability of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels (RyR2), this in turn promoting delayed afterdepolarizations (DADs) and ectopic activity (Figure 1)^[35].

Additionally, AF-related shortening of APD can also result from an increase in K^{+} channel gene products and/or activity. The inward rectified K^{+} current (I_{K1}) and I_{KCa} are also altered in AF and both AF-related up-regulation and enhancement of the constitutive form of I_{KCa} promote the persistence of AF by reducing

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

Vilches JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

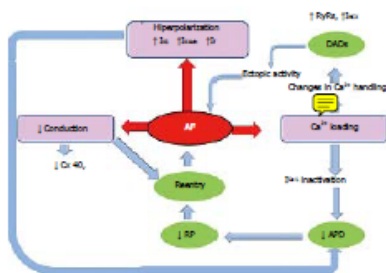


Figure 1 Mechanisms of atrial fibrillation. Cytosolic overloading of Ca^{2+} occurs by a rapid atrial rate. As a result, this acts as a mechanism of cell protection via the inactivation of L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}), which in turn reduces the action potential duration (APD) and this consequently shortens the refractory period (RP). This overloading of Ca^{2+} also contributes to an abnormal function of ryanodine receptor channels (I_{RyR}) and intensifies the inward Na^{+} - Ca^{2+} -exchange current (I_{NaCa}), leading to delayed afterdepolarizations (DADs) and ectopic activity. In addition, AF produces hyperpolarization due to increased I_{K1} , which increases the inward rectifier current (I_{K1}) and acetylcholine-regulated K^{+} current ($I_{K,ACh}$). This also reduces APD and promotes conduction by decreasing of connexin-40 (Cx40).

APD (Figure 1)²⁸. *KCNK3*, which encodes the small conductance calcium-activated potassium channel 3 (SK3), is a new locus strongly associated with AF²⁹. The role of SK channels remains unclear, but it is believed that they contribute to the repolarization of cardiac action^{30,31}. A recent study showed SK3 to be strongly down-regulated in permanent AF, which contributed to AF persistence and susceptibility by abbreviating APD³².

Similarly, it has been well established that chronic AF in humans reduces the transient outward potassium currents (I_{to}) by transcriptional down-regulation of the $Kv4.3$ potassium channel³³. The ultrarapid delayed rectifier K^{+} channel (I_{Kur}) also plays a major part since it has been shown that the amplitude of I_{Kur} is significantly reduced and the current density is lower in patients with AF³⁴. More recently it has been demonstrated in human that chronic AF modifications in transcriptional and posttranscriptional mechanisms of HCK channels occur and are associated with a slight yet significant gain-of-function of the hyperpolarization activated "funny" current (I_f), which may contribute to enhanced atrial ectopy³⁵.

The slow delayed rectifier potassium channel (I_{Kr}), made up of a pore-forming subunit encoded by *KCNQ1*, has also been implicated in AF. Thus, several mutations in *KCNQ1* have been described in AF patients^{36,37}, some of which are associated with I_{Kr} block and APD³⁸. The potassium channel voltage-gated subfamily member 2 (*KCNH2*) is an ion-channel gene that encodes an inwardly rectifying potassium channel (I_{K1}), and a genetic variation in the *KCNH2* gene reportedly predisposes Chinese Han individuals to the risk of acquired AF³⁹. In addition, lower expression levels of the ATP-sensitive potassium channel (*Kir6.2*), the acetylcholine-dependent potassium channel (*Kir3.4*) and the ultra-rapid delayed rectifier potassium channel (*Kv1.5*) in patients with AF have also been described^{40,41}. However, the underlying mechanisms leading to these changes remain unclear.

Finally, although relatively little is known about gap-junction remodelling in the atria, changes in ion channels

involved in cardiac conduction have also been reported in relation to AF. Atrial gap junctions are composed of two different subunit proteins, i.e., Connexin40 (Cx40) and Connexin43 (Cx43). In the goat, Cx40 expression decreases and the protein becomes more heterogeneously distributed after long periods of fast pacing, contributing to the onset and self-perpetuation of re-entry pathways and AP⁴². Moreover, pacing can induce atrial tachyarrhythmias or fibrillation in Cx40-null mice⁴³. These results are consistent with the extensive clinical evidence pointing to disturbances in connexin-40 as a basis for genetic AF predisposition. Importantly, a very recent report has shown a clear reduction in Cx40 but not Cx43 expression (both mRNA and protein) in atrial appendage tissues from patients with lone AF with no Cx40 coding-region mutations identified⁴⁴.

In summary, despite that many studies have pointed out the relevance of the AF-related electrical remodelling, our understanding of the underlying molecular mechanisms leading to and perpetuating ion-channel remodelling during AF is very limited. Better knowledge and deeper insights into the molecular mechanisms underlying AF may help to identify new and selective drug targets for improved AF treatment.

MICRORNAS AND ELECTRICAL REMODELLING IN AF

As mentioned above, electrical remodelling is a maladaptive process that can trigger and prolong AF. Recently, multiple research groups have uncovered an important role of several miRNAs in regulating cardiac excitability and arrhythmogenesis by targeting specific ion channels, which might have an important impact on AF onset and/or persistence^{45,46}.

Microarray analyses in a canine model of AF showed that *miR-223*, *miR-328*, and *miR-454* were significantly up-regulated, whereas *miR-101*, *miR-329*, and *miR-499* were down-regulated^{47,48}. Among these, *miR-328* was the most significantly up-regulated and forced expression of *miR-328*

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

Vlaches JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

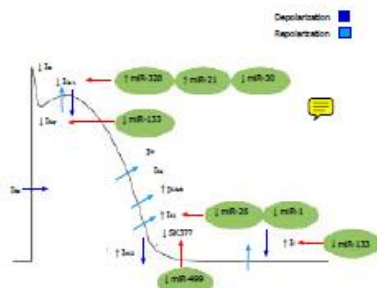


Figure 2 Mechanisms of electrical remodeling in atrial fibrillation regulated by microRNAs. The inward sodium current (I_{Na}), inward rectifier K^+ current (I_{K1}), transient outward potassium current (I_{To}), inactivation of L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}), ultrarapid delayed rectifier K^+ current (I_{Kr}), slow delayed rectifier potassium current (I_{Ks}), Acetylcholine-activated inward-rectifying potassium channel (I_{h}), inward Na^+ - Ca^{2+} -exchange current (I_{NaCa}), small conductance calcium-activated potassium channel 2 (I_{KATP2}), F-type current.

through adenovirus infection in canine atrium as well as a transgenic approach in mice recapitulated the phenotypes of AF. Enhanced AF vulnerability by diminished L-type Ca^{2+} current, led to a shortened atrial action potential. Normalization of *miR-328* levels with antagomiR reversed the conditions, and genetic knockdown of endogenous *miR-328* dampened AF vulnerability, highlighting the importance of *miR-328* as a potential therapeutic target for AF²⁸.

Other miRNAs such as *miR-21* can also act as regulators of L-type Ca^{2+} channel. Barana *et al.*²⁹ showed that *miR-21* was expressed in human myocytes with chronic AF. They demonstrated that this disease increases the expression of *miR-21*, which decreases I_{CaL} . Down-regulation of I_{CaL} by *miR-21*, suggests that this miR could have an important function in AF through electrical remodeling (Figure 2).

On the other hand, *miR-26* has been demonstrated to target *KCNJ2*, the gene encoding the main component of the inward rectifier potassium-channel current I_{K1} (KIR 2.1). As stated above, the I_{K1} is an important regulator of reentrant-spiral dynamics and a major component of AF-related electrical remodeling. Recently, Luo *et al.*³⁰ has found that *miR-26* was down-regulated in AF patients accompanied by I_{K1} /KIR2.1 protein up-regulation. Moreover, by gain and loss-of-function experiments in mice, these authors demonstrated that *miR-26* controls the expression of *KCNJ2* and thereby promotes AF.

In addition, it has also been shown that expression levels of *miR-1* (a muscle specific miRNA) are greatly reduced in the atrial tissue of AF patients. Yang *et al.*³¹ showed that the elimination of *miR-1* by an antisense inhibitor in infarcted rat hearts relieved arrhythmogenesis, whereas *miR-1* overexpression slowed conduction and depolarized the cytoplasmic membrane by post-transcriptionally repressing *KCNJ2* and *GJA1* (which encodes connexin 43). More recently it has been documented that increased I_{K1} currents in left atrial cardiomyocytes of AF patients are associated with greater Kir2.1 expression and lower levels of *miR-1*,

reinforcing the notion of a role for *miR-1* in regulating atrial remodeling in AF³². However, no significant changes in *Cx43* mRNA and protein expression nor in *Cx43* localization were found in those cardiomyocytes, suggesting that *miR-1* may differentially regulate subunits such as Kir2.1 and *Cx43* in different cell subtypes³³. Moreover, a very recent miR array analysis in humans has revealed that *miR-1* is greater in the left atrium than in the right one, underscoring the notion that AF pathophysiology may affect the two atria differently³⁴ (Figure 2).

The possibility that another muscle-specific miRNA such as *miR-133* plays a role in AF has also been proposed, since down-regulation of *miR-133* favours atrial remodeling by depression of *KCNH2/10* and *KCNH1/10*. However, there is no direct evidence on how *miR-133* affects I_{Kr} or I_{Ks} current³⁵. In this way, Luo *et al.*³⁶ found that *miR-1* and *miR-133* act to restrict overexpression of *KCNH2* and *KCNH4* (encoding for important components of I_{Kr} currents), and down-regulation of *miR-1/miR-133* acts partially causing the anomalous re-expression of *KCNH2* and *KCNH4* in cardiac hypertrophy. Yet it remains unclear whether *miR-1* and *miR-133* affect HCN channels in the context of AF³⁷. Notwithstanding, *miR-133* together with *miR-30* were found to be down-regulated in a canine model of AF, reinforcing the potential role of *miR-133* in AF³⁸ (Figure 2).

Together with *miR-1* and *miR-133*, *miR-208a* is also a muscle-specific miRNA, which is encoded within an intron of the α -cardiac muscle myosin heavy-chain gene (*Myh6*). Although no direct evidence for the involvement of *miR-208a* in atrial electrical remodeling have been reported, *miR-208a* transgenic gain of function in mice lead to arrhythmias. In addition, *Cx40* expression was increased in those transgenic mice, indicating that *miR-208a* could modulate electrical conduction in the heart³⁹ (Figure 2).

Finally, in a recently reported finding, a potential role of *miR-499* in AF-related electrical remodeling has been proposed. Atrial *miR-499* is significantly upregulated in AF, (Figure 2), leading to down-regulation of the small-

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

conductance SK3, possibly contributing to the electrical remodeling in AF¹⁶.

MicroRNA (miRNA) research has highlighted the roles of miRNAs in the cardiovascular system and their involvement in AF. Further studies on miRNA and AF will provide new insights into the mechanisms underlying that disorder and may offer new strategies for the treatment of AF.

CONCLUDING REMARKS AND CLINICAL PERSPECTIVES

Electrical remodelling secondary to the onset of atrial fibrillation dramatically contributes to the recurrence of AF, eventually leading to persistent AF. Many recent studies demonstrate that miRNAs are becoming one of the most fascinating regulatory molecules, due to their critical roles in fine-tuning of physiological processes and their deregulation in several disorders, including AF. The functional significance of miRNAs as direct or indirect post-transcriptional regulators of ion channels involved in electrical remodelling strongly suggests that these miRNAs may serve as potential biomarkers or promising drug targets in the treatment and management of AF, though considerable work remains to be done. Further studies making use of existing AF models, miRNA expression signatures and miRNA target gene prediction should provide information finally applicable to clinical practice.

REFERENCES

- Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 1988; 62: 294-9N [PMID: 900895 DOI: 10.1016/S0002-9149(88)00283-9]
- Nattel S, Hainaut M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 2335-2345 [PMID: 24613319 DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.058]
- Pajkoti A. Progression of atrial fibrillation from paroxysmal to persistent. *Circ* 2014; 78: 1058-1060 [PMID: 2462169 DOI: 10.1177/0885066614024094]
- Oh S, Kim KB, Ahn H, Cho HJ, Choi YS. Remodeling of ion channel expression in patients with chronic atrial fibrillation and mitral valvular heart disease. *Korean J Intern Med* 2010; 25: 377-385 [PMID: 21179275 DOI: 10.3904/kjim.2010.25.4.377]
- Kaumann AJ, Lynham JA, Brown AM. Comparison of the duration of S-HT4 receptors, beta 1- and beta 2-adrenoceptors in human atrium: functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1996; 353: 592-595 [PMID: 8748355 DOI: 10.1007/BF00169181]
- Bosch RF, Zeng X, Grammer BJ, Popovic K, Meneis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 127-131 [PMID: 10635396 DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00178-9]
- Grammer BJ, Bosch RF, Kuhlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12: 626-633 [PMID: 11066775 DOI: 10.1111/j.1540-4781.2001.00024.x]
- Albeniz E, Alencastre J, Moreno J, Vaidyanathan R, Talachian A, Kalish J, Aronow A, Villacastin JP, Torrealba EG, Sanchez A, Ponce-Snyder R, Jalife J, Benfield O. Activation of inward rectifier potassium channels accelerates atrial fibrillation in

Vilches JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

- human evidence for a reentrant mechanism. *Circulation* 2006; 114: 2434-2442 [PMID: 17101853 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.630735]
- Debaere D, Friedrich A, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, Kraut M, Ravens U. The G-protein-gated potassium current (K_{GA}) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2006; 112: 3007-3016 [PMID: 16530682 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.553532]
- Brandt MC, Preisbe L, Böhle T, Stöckamp M, Bruckmann DJ. The ultrarapid and the transient outward (K_v) current in human atrial fibrillation. Their possible role in postoperative atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1865-1876 [PMID: 11031312 DOI: 10.1006/jmcc.2000.1221]
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubbinsfield T, Haines JL, George AL, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2006; 117: 1927-1935 [PMID: 16578609 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.759565]
- Kallergis EM, Manios EG, Karoupiakos EM, Mavroukas HE, Arfanakis DA, Melanidis NH, Lathouras CE, Chrysosavakis G, Vardas PE. Extracellular matrix alterations in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation: histological assessment of collagen type-I turnover. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 211-215 [PMID: 16617070 DOI: 10.1016/j.jacc.2006.03.045]
- Pajkoti A, Cheng XW, Isden Y, Shimano M, Yoshida N, Inoue A, Yamamoto T, Takashita K, Kyo S, Taguchi N, Shi GP, Katsuya M, Okumura K, Murohara T. Mechanisms with clinical implications for atrial fibrillation-associated remodeling: cathepsin K expression, regulation, and therapeutic target and biomarker. *J Am Heart Assoc* 2013; 2: e00030 [PMID: 24049095 DOI: 10.1161/JAHA.113.000303]
- Luo X, Zhang H, Xiao J, Wang Z. Regulation of human cardiac ion channel genes by microRNA: theoretical perspective and pathophysiological implications. *Cell Physiol Biochem* 2010; 25: 571-586 [PMID: 20511702 DOI: 10.1159/000313076]
- Xu J, Zhao J, Bran G, Xiao C, Cheng Y, Xiao J. Circulating microRNAs reveal biomarkers for cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 865-875 [PMID: 22159481 DOI: 10.1007/s00094-011-0840-3]
- Kumarawamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res* 2013; 113: 676-689 [PMID: 23907171 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302226]
- Havens MA, Rutch AA, Druell DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 4626-4640 [PMID: 22710064 DOI: 10.1093/nar/gkr524]
- Han J, Lee Y, Yoon KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016-3027 [PMID: 15574580 DOI: 10.1016/j.gdev.2004.04.011]
- Han J, Lee Y, Yoon KH, Nam JW, Hoo L, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901 [PMID: 16751099 DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.043]
- Kwekkeboom RF, Lei Z, Dorvendans PA, Musters RJ, Sluiter JP. Targeted delivery of miRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and challenges. *Crit Rev (Lond)* 2014; 127: 351-365 [PMID: 24690366 DOI: 10.1042/C20140005]
- Winkler BJ, Molkenin JD. Calcium-calcitriol signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1178-1179 [PMID: 15389666 DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.121]
- da Costa Martins PA, Bourjain M, Gladka M, Kortland M, van Oort RJ, Pinto YM, Molkenin JD, De Windt LJ. Conditional diet growth deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation* 2008; 118: 1567-1576 [PMID: 18807798 DOI: 10.1161/circulationaha.108.769964]
- Wang Z. MicroRNAs and Cardiovascular Disease. *Benthon*



Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

Vilches JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

- Science Publishers, 2010
- 24 Gomes da Silva AM, Soltner VN. miRNAs as biomarkers of atrial fibrillation. *Biomarkers* 2014; 19: 631-636 [PMID: 25171770 DOI: 10.1333/bm.1304703.2014.00401]
- 25 Wang J, Huang W, Xu R, Niu Y, Cao X, Meng L, Xu X, Hu S, Zhang Z. MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 2150-2160 [PMID: 2228084 DOI: 10.1111/j.1502-4525.2012.05233.x]
- 26 Piccinini AM, Medvedev IS. Elucidating the interplay between the extracellular matrix and microRNAs. *Int J Exp Pathol* 2014; 95: 158-160 [PMID: 2461702 DOI: 10.1111/imp.12059]
- 27 Wang Z, Yang B. MicroRNA Expression Detection Methods. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer, 2010 [DOI: 10.1007/978-3-642-04928-6]
- 28 Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol* 2009; 5: 419-429 [DOI: 10.1038/nrcardio.2009.36]
- 29 Latronico MV, Condorelli G. RNA silencing: small RNA-mediated posttranscriptional regulation of mRNA and the implications for heart electrophysiology. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009; 20: 230-237 [PMID: 19057333 DOI: 10.1111/j.1540-4545.2008.01397.x]
- 30 Wang Z. miRNA in the regulation of ion channel/transporter expression. *Comp Physiol* 2013; 3: 599-603 [PMID: 2572034 DOI: 10.1007/s00442-013-1000-2]
- 31 Maass AH, Van Gelder IC. Atrial myxomatization therapy: a new concept for treatment of heart failure with preserved ejection fraction and prevention of atrial fibrillation? *Eur J Heart Fail* 2012; 14: 227-229 [PMID: 22535974 DOI: 10.1093/eurjhf/hfr14]
- 32 Gao P, Bosch RF, Bou-Aboud E, Nattel S. Tachycardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1995; 85: 1048-1052 [PMID: 8400896 DOI: 10.1161/01.RES.85.6.1048]
- 33 Van Wagoner DR, Pond AL, Larmorgese M, Roessig SH, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1996; 85: 428-436 [PMID: 10479072 DOI: 10.1161/01.RES.85.4.428]
- 34 Geisler M, Halaszovich CR, Fritsch U, Böhlen P, Ravera U, Devereux D, Luckhoff A, Schotten J. Pharmacological evidence for altered serine kinase regulation of I (Ca_v1) in patients with chronic atrial fibrillation. *Neurosci Biomed Res* 2005; 375: 385-392 [PMID: 17595553 DOI: 10.1007/s00207-005-0174-6]
- 35 Volgt N, Devereux D. Ion Channel Remodelling in Atrial Fibrillation. *European Cardiology* 2011; 7: 97-103 [DOI: 10.1542/ehc.2011.7.2.97]
- 36 Ellinger PT, Lorenz KL, Glaser NL, Pfeiffer A, Alonso A, Chung MK, Ström MF, de Bakker PI, Mueller M, Lubitz SA, Fox E, Durrer D, Smith NL, Smith JD, Schwaiblmair F, Soliman EZ, Roe KM, Van Wagoner DR, Beckmann BM, van Noord C, Wang K, Zhai GB, Rottler JL, Plazek SL, Stenback G, Smith AV, Lauerer U, Harris TR, Makino S, Nishi M, Mian DJ, Perez S, Bakir T, Köttgen A, Moebius S, Newton-Chell C, Li M, Möhlerkamp S, Wang TJ, Kao WH, Vasan RS, Nöthen MM, MacRae CA, Stricker SH, Hofman A, Uitterlinden AG, Levy D, Boerwinkle E, Matipala A, Topol EJ, Chakravarti A, Gudnason V, Psaty BM, Roden DM, Meitinger T, Wichmann HE, Witteman JC, Bernard J, Arking DE, Benjamin EJ, Heckbert SR, Kähle S. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet* 2010; 42: 340-344 [PMID: 2072547 DOI: 10.1038/ng.307]
- 37 Tabei D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Niu L, Vazquez AE, Young JN, Glatzer KA, Chatterjeevinnat N. Differential expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2714-H2723 [PMID: 16265520 DOI: 10.1152/ajpheart.0054.2005]
- 38 Li N, Timofeyev V, Tabei D, Xu D, Lu L, Zhang Q, Zhang Z, Singapurwala A, Albert TR, Rajagopal AV, Bond CT, Perissinaki M, Adelman J, Chatterjeevinnat N. Ablation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* 2009; 587: 1087-1100 [PMID: 19190460 DOI: 10.1111/jphysiol.2008.56778]
- 39 Liang TY, Wang XL, Chai Q, Luo TW, Kowalek CM, Park SJ, Daly RC, Grossen KJ, Jin J, Wu LQ, Shen WF, Shen WC, Chu VM, Lee HC. Regulation of the SK3 channel by microRNA-496-potential role in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2013; 10: 1003-1009 [PMID: 23496625 DOI: 10.1016/j.hrthm.2013.03.005]
- 40 Stilloano F, Leonardo G, Giusti G, Del Lungo M, Coppini R, Spinelli V, Sartori L, Poggiani C, Maggelli A, Corbelli E. Chronic atrial fibrillation alters the functional properties of If in the human atrium. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013; 24: 1397-1400 [PMID: 23869794 DOI: 10.1111/jpc.12212]
- 41 Chu HM, Feng MJ, Li YG, Zhang YX, Ma JP, He B, Yu YB, Liu J, Chen XM. Polymorphisms but not mutations of the KCNQ1 gene are associated with lone atrial fibrillation in the Chinese Han population. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013: 375484 [PMID: 23710137 DOI: 10.1155/2013/375484]
- 42 Ki CS, Jung CL, Kim HJ, Baik KH, Park SJ, Oh YK, Kim KS, Noh SJ, Yoon JS, Kim JH, Cho H. A KCNQ1 mutation causes age-dependent bradycardia and persistent atrial fibrillation. *Pfaffers Arch* 2014; 446: 529-540 [PMID: 23989646 DOI: 10.1007/s00434-013-1337-6]
- 43 Hanson JC, Khariche S, El Hachri A, Stett J, Law P, Zhang H. In silico investigation of a KCNQ1 mutation associated with familial atrial fibrillation. *J Electrocardiol* 2014; 45: 158-165 [PMID: 24411289 DOI: 10.1016/j.jelectcard.2013.12.004]
- 44 Wang QZ, Wang XF, Chen XD, Yu JF, Wang J, Sun J, Lu SB, Shen MY, Lu M, Li YG, Jin L. Genetic polymorphism of KCNQ2 confers predisposition of acquired atrial fibrillation in Chinese. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2009; 20: 1159-1162 [PMID: 19400382 DOI: 10.1111/j.1540-4545.2009.01494.x]
- 45 Kowoor P, Wickman K, Maguire CT, Pu W, Gehrmann J, Brelvi C, Clapham DE. Evaluation of the role of I(KCa2) in atrial fibrillation using a mouse knockout model. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 2138-2143 [PMID: 11419900 DOI: 10.1016/S0735-1097(01)00304-3]
- 46 van der Velden HM, Auzema J, Rook MB, Hellmolen AJ, van Veen TA, Allessie MA, Jongmans PJ. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* 2000; 48: 478-486 [PMID: 10972438 DOI: 10.1016/S0008-6360(00)00028-2]
- 47 Raguez S, Brondel C, Vaidya D, Morley CE, Jalili J. Altered right atrial excitation and propagation in clemastrol knockout mice. *Circulation* 2008; 118: 248-255 [PMID: 18280977 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.507555]
- 48 Girnathous Z, Bilczko P, Bonasus A, Wittenberg-Greenecker G, Scharrer M, Moritz A, Bakkenes A, Gostia A, Nattel S, Hohlmeier SH, Ehrlich J. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009; 6: 182-189 [PMID: 19959133 DOI: 10.1016/j.hrthm.2009.08.018]
- 49 Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang R, Zhang Y, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L, Song W, Xu C, Wang Z, Yang B. MicroRNA-208 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* 2010; 122: 2378-2387 [PMID: 2059446 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.199907]
- 50 Hauxwe M, Reissig L, Holet AG, Larsen AP, Grubb S, Haugseth S, Swendsen JH, Olsson SP, Schmitt N, Calow K. A novel KCND3 gain-of-function mutation associated with early-onset of persistent lone atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2013; 98: 488-495 [PMID: 23400780 DOI: 10.1093/cvr/cvt028]
- 51 Barana A, Malvarosa M, Dola-Gallini P, Pires-Hernandez M, Amorós L, Núñez M, Sacristán S, Pedraza A, Pintos A, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delgado R, Caballero R. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014; 7: 861-868 [PMID: 25307449 DOI: 10.1161/CEP.110.109907]



Wiley | www.wileyonlinelibrary.com

12

February 25, 2015 | Volume 5 | Issue 1 |

Contribution of miRNAs to ion-channel remodelling in atrial fibrillation.

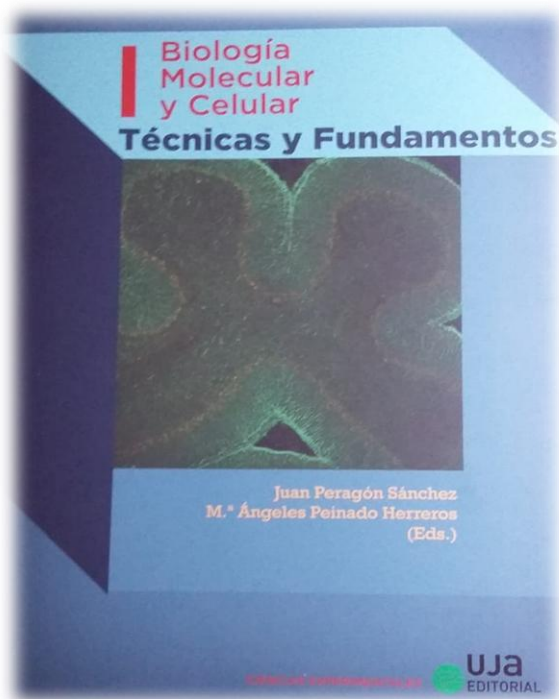
Vlcek JM et al. miRNAs and ion-channel remodelling

- 10.1161/CIRCRES.114.001700]
52. Luo X, Pan Z, Shen H, Xiao J, Sun X, Wang N, Lin H, Xiao L, Maguy A, Qi XY, Li Y, Gao X, Deng D, Zhang Y, Bai Y, Ai J, Sun L, Lu H, Luo XY, Wang Z, Lu Y, Yang B, Nattel S. MicroRNA-26 governs proarrhythmic inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2013; 123: 1559-1561 [PMID: 2384360] DOI: 10.1172/JCI62145]
53. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007; 13: 486-491 [PMID: 1743374] DOI: 10.1038/nm1569]
54. Sagerwald KH, Johnson AB, Rogers O, Heydel M, Winkler U, Weibbe A. Comparison of left versus right atrial myocardium in patients with sinus rhythm or atrial fibrillation - an assessment of mitochondrial function and microRNA expression. *J Physiol Rep* 2014; 2 [PMID: 2516873] DOI: 10.14814/phy.21224]
55. Wang Z, Ferranti B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier outward current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1540-1515 [DOI: DOI: 10.1093/cvr/28.10.1540]
56. Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKo-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions. *J Cell Physiol* 2007; 212: 358-367 [PMID: 1744060] DOI: 10.1002/jcp.21053]
57. Luo X, Lin H, Pan Z, Xiao J, Zhang Y, Lu Y, Yang B, Wang Z. Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem* 2008; 283: 20048-20052 [PMID: 1849806] DOI: 10.1074/jbc.M801082003]
58. Li H, Li S, Yu B, Liu S. Expression of miR-133 and miR-30 in chronic atrial fibrillation in canines. *Mol Med Rep* 2012; 5: 1457-1460 [PMID: 22407060] DOI: 10.3892/mmr.2012.851]
59. Gallis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tsubouchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gurev R, Shrivastava J, Willis MS, Selzman CH, Wang GZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2772-2786 [PMID: 1972667] DOI: 10.1172/JCI38154]

P-Reviewer: Chung XW, Liu C, Salles GF S-Editor: Tian YL
L-Editor: A E-Editor: Wu HL



Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.



Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular

Diego Franco, Estefanía Lozano-Velasco, Francisco Hernández-Torres, Fernando Bonet, Ángel Dueñas, José Manuel Viches, Carlos García-Pachila, Mohamad Alzein, Almudena Expósito, Houria Dami, Jorge N. Domínguez, Amelia E. Aránega

Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén

dfranco@ujaen.es

Resumen

El desarrollo del corazón es un proceso complejo durante el cual el primordio cardíaco pasa de ser un tubo lineal simétrico a generar un órgano tetracameral con vasos de entrada y de salida independientes. Durante las últimas décadas se ha progresado enormemente en el conocimiento de las bases moleculares que gobiernan el desarrollo cardiovascular. La expresión de factores de crecimiento de la familia Bmps y Fgf es esencial para determinar el linaje cardiogénico, activando así a factores de transcripción tales como Gata4, Mef2c, Srf y Nkx2.5, que promueven el desarrollo miogénico y a distintos miembros de la familia T-box que promueven la especificación cameral. Durante los últimos años, la identificación de un grupo de ARNs no codificantes, tales como los microRNAs, que muestran perfiles de expresión tejido-específico, ha demostrado que estos desempeñan un papel funcional esencial en múltiples procesos biológicos, incluida la cardiogénesis. En nuestro laboratorio hemos analizado con detalle el papel funcional de distintos microRNAs durante la cardiogénesis y hemos constatado que múltiples microRNAs incrementan su expresión durante la maduración ventricular. A nivel funcional hemos demostrado que miR-27 regula la expresión de Mef2c y que miR-130 ejerce un

93

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR. VOLUMEN I. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

papel esencial en la diferenciación cardiomiogénica, mientras que otros microRNAs, como miR-23 y miR-199, modulan tanto el ritmo de la contracción durante la diferenciación muscular como la valvulogénesis. En este capítulo abordamos el papel funcional de distintos microRNAs durante la cardiogénesis.

Palabras clave: ARNnc, microRNAs, cardiogénesis, cardiopatías arritmogénicas

Summary

Cardiac development is a complex process by which the cardiac anlage progresses from an symmetric linear heart tube into a tetraaxial organ with independent inlet and outlet connections. Over the last decades, our understanding on the molecular mechanisms driving cardiac development has greatly increased. Growth factor expression such as Bmp2 and Fgf3 are essential to determine the cardiogenic cell lineage, activating the onset of transcription factor such as Nkx2.5, Srf, Mef2c and Gata4, which are critical to promote myogenic differentiation and distinct T-box family members that promote chamber-specific determination. Over the last years, identification of non coding RNAs, such as microRNAs, together with their tissue-specific expression profiles have unraveled a novel essential functional role for these non coding RNAs in multiple morphogenetic processes, including cardiogenesis. In our laboratory we have analyzed the functional role of distinct microRNAs during heart development. We have identified a large number of microRNAs differentially expressed during ventricular maturation. We have functionally demonstrated that miR-27 regulates Mef2c expression while miR-130 is pivotal for cardiomyogenic differentiation. Other microRNAs, such as miR-23 and miR-199 are essential to regulate cardiomyocyte contraction and also play pivotal roles in cardiac valve development. In this chapter, we will elaborate on the functional role of distinct microRNAs during cardiac development.

Keywords: mRNA, microRNAs, cardiogenesis, arrhythmogenic cardiopathies

Introducción

El desarrollo del corazón es un proceso morfogenético complejo en el cual intervienen distintos linajes celulares (Franco *et al.*, 1997; Moorman y Christoffels, 2003; de Castro *et al.*, 2003). El inicio de la formación del corazón se configura

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

con la formación de dos campos cardiogénicos poco después del inicio de la gastrulación, ambos lados de la línea media embrionaria (Kelly *et al.*, 2001). Estos campos cardiogénicos bilaterales experimentan un proceso de migración anterior y se fusionan en la línea media embrionaria generando un tubo cardíaco lineal primitivo (Schoenwolf y García-Martínez, 1995; López-Sánchez *et al.*, 2002, 2009; López-Sánchez & García-Martínez, 2011). Este tubo cardíaco está formado por dos capas, una capa interna de endotelio, el endocardio y una capa externa de miocardio. Poco después de la formación del tubo lineal, el primario cardíaco sufre invariablemente una torsión hacia la derecha, movimiento que origina el asa cardíaca (López-Sánchez *et al.*, 2009; López-Sánchez y García-Martínez, 2011). Posteriormente, y como consecuencia del plegamiento y rotación antero-posterior del embrión en formación, las porciones más caudales del corazón sufren un movimiento anterior, situando así las futuras cámaras ventriculares en el plano ventral y las futuras cámaras auriculares en el plano dorsal. En este momento del desarrollo se pueden distinguir cinco regiones en el corazón embrionario: seno venoso, aurículas embrionarias, canal atrioventricular, ventrículo embrionario y tracto de salida (Christoffels *et al.*, 2000). Es importante destacar que la formación de las distintas estructuras cardíacas embrionarias es consecuencia de la determinación de dos subpoblaciones cardiogénicas distintas (Meilhac *et al.*, 2003); el campo cardíaco primario, que da lugar principalmente al ventrículo embrionario, particularmente al ventrículo izquierdo, y el campo cardíaco secundario, que origina el ventrículo derecho y tracto de salida en la porción anterior, y el canal atrioventricular y las aurículas embrionarias en la porción posterior (Kelly *et al.*, 2001; Kelly y Buckingham, 2002; Kelly *et al.*, 2012; 2014; Watanabe *et al.*, 2012). La región del seno venoso parece desarrollarse a partir de una tercera subpoblación cardiogénica, posterior al campo cardíaco secundario (Christoffels *et al.*, 2006; Mommersteeg *et al.*, 2006, 2010).

El corazón embrionario muestra la formación de nuevas estructuras durante este periodo. En primer lugar, a nivel del tracto de salida, del canal atrioventricular y en menor medida del tracto de entrada, el endocardio y el miocardio sufren una separación por la deposición de una abundante matriz extracelular, generando los denominados cojines endocárdicos (Eisenberg y Markwald, 1994; Sugi *et al.*, 2003, 2004), los cuales actúan temporalmente como válvulas de regulación del flujo cardíaco (De Jong *et al.*, 1992). En estos cojines endocárdicos, el endocardio experimenta un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT), auspiciado por señalización proveniente del miocardio embrionario, colonizando así la matriz extracelular subyacente (Boyer *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2005; Mercado-Pimentel y Runyan, 2007). Este proceso es esencial para la

progresiva formación de las válvulas cardíacas. A su vez, el miocardio es tapizado externamente por una nueva capa cardíaca, el epicardio, que se origina a partir del proepicardio (PE) (Pérez-Pomares *et al.*, 1997, 1998, 2002, 2008, Guadix *et al.*, 2011). El epicardio embrionario experimenta igualmente un proceso de transición epitelio-mesénquima, originando las células derivadas del epicardio (EPDCs) que migran a través de miocardio embrionario para generar el fibroesqueleto cardíaco, así como distintos componentes de la vasculatura coronaria (Pérez-Pomares *et al.*, 1997, 1998, 2002ab, 2009, Ruiz-Villalba *et al.*, 2012).

Seguidamente, el corazón embrionario empieza a experimentar procesos de separación para permitir, de esta forma, configurar el músculo cardíaco con dos circuitos sanguíneos separados, uno sistémico y otro venoso (Franco *et al.*, 1997; 2000). La separación de las cámaras auriculares se produce mediante la formación de un sistema de dos tabiques interatriales de composición esencialmente muscular (Webb *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002, 2003; Briggs *et al.*, 2012, 2013; Burns *et al.*, 2016), mientras que la separación de los ventrículos se produce como consecuencia el crecimiento del septo interventricular (Moorman *et al.*, 2003, 2004), de naturaleza esencialmente izquierda (Franco *et al.*, 2006), que finalmente cierra en la porción más craneal con la formación del septo interventricular membranoso. La separación del canal atrioventricular se produce por la fusión de los cojines endocárdios, al igual que en el tracto de salida. No obstante, es importante resaltar que células derivadas de la cresta neural contribuyen a la correcta separación del tracto de salida (Coxway *et al.*, 1997ab, 2000; Creazzo *et al.*, 1998), si bien no contribuyen a la separación del canal atrioventricular.

Una vez determinados los principales elementos morfológicos del corazón, es necesario también configurar un sistema que permita la correcta coordinación en la contracción de las cámaras ventriculares y auriculares; este es el denominado sistema de conducción cardíaco (Christoffels y Moorman, 2001). El sistema de conducción cardíaco está formado por dos núcleos, sinusal y atrioventricular, respectivamente, y un entramado de ramas de conducción rápida (Franco y Icardo, 2001; Moorman *et al.*, 1993, 2003; Sotnikov *et al.*, 2010, 2011). Aunque el origen y la formación del núcleo sinusal ha sido parcialmente descrito (Miquelot *et al.*, 2010), el origen del núcleo atrioventricular, del fascículo común y de las ramas derecha e izquierda continúa sin estar esclarecido más allá de conocer que tienen un linaje común con el miocardio de trabajo (Miquelot *et al.*, 2010).

En las últimas dos décadas nuestro conocimiento de los procesos moleculares que gobiernan la formación del corazón ha avanzado extraordinariamente. La especificación del mesodermo se inicia con la expresión de factores de transcripción tipo T box (Brachyury) (Herrmann, 1992; Herrmann y Kispert, 1994;

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

Showell *et al.*, 2004) y del mesodermo anterior con la activación de *Mesp1* y *Mesp2* (Kitajima *et al.*, 2000; Sagu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2008; Bondue *et al.*, 2008, 2010). A nivel cardiogénico, el mesodermo cardiogénico es inducido por el endodermo primitivo con la expresión de *Bmp2* y *Fgf8* (Andres *et al.*, 1998; Schlange *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 2004; Gharipade *et al.*, 2006; Lopez-Sanchez *et al.*, 2015a) bloqueando su dominio con la expresión de señalizador *Wnt* en el ectodermo primitivo (Marvin *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2017). Este juego entre activadores y represores configura la región cardiogénica, que se caracteriza por la expresión temprana de factores de transcripción como *Nkx2.5* (Ljongs *et al.*, 1995; Harvey, 1996; Harvey *et al.*, 2002). Durante la configuración tubo cardíaco inicial se inicia la expresión de distintos miembros de la familia *Gata* (*Gata4*, *Gata5* y *Gata6*) y *Mef2* (*Mef2abcd*) (Goswami *et al.*, 1994; Lavertre *et al.*, 1994; Charon y Nemer, 1999; MacNeill *et al.*, 2000). Es importante resaltar que, ya desde este mismo momento, el corazón muestra un perfil molecular derecha-izquierda diferencial, dada la expresión del factor de transcripción *Pitx2* exclusivamente en la porción izquierda de las crestas cardíacas y el posterior tubo cardíaco inicial (Campione *et al.*, 1999, 2001, 2002; Franco y Campione, 2003; Franco *et al.*, 2014).

La especificación del campo cardíaco secundario se caracteriza por la expresión de *Islet-1* (Sun *et al.*, 2006; Khattar *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2015), y es a partir de este momento cuando un alto número de factores de transcripción de la familia *T-box* experimentan una expresión diferencial en distintas porciones del corazón embrionario, imprimiendo así una determinación celular diferencial (Hoogaars *et al.*, 2007). Concretamente, *Tbx1* se expresa en el tracto de entrada (Mesbah *et al.*, 2012; Rama *et al.*, 2014); *Tbx2* y *Tbx3* se expresan en regiones prospectivas del sistema de conducción ventricular (Aamhaugen *et al.*, 2009, 2010, 2011a; Verhoven *et al.*, 2011; Christoffels *et al.*, 2004; Hoogaars *et al.*, 2004, 2007a; Bakker *et al.*, 2008, 2010; Singh *et al.*, 2012); *Tbx5*, en parte de sistema de conducción ventricular y los derivados del campo cardíaco primario (Plageman y Yutzey, 2004; Hatcher *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2003; Liberatore *et al.*, 2000; Hiroi *et al.*, 2001); *Tbx18*, en el epicardio embrionario y el seno venoso (Christoffels *et al.*, 2009; Narden *et al.*, 2012), y *Tbx20*, en todo el miocardio embrionario (Stennard *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2011; Greulich *et al.*, 2016).

Durante el desarrollo de las válvulas cardíacas, distintos componentes moleculares han sido identificados igualmente. Las señales determinantes del miocardio del canal atrioventricular y tracto de salida se producen mediante las vías de señalización *Tlg-beta* y *Bmp* (Wang *et al.*, 2005; Mercado-Pimentel y Runyan, 2007; Conway *et al.*, 2011; Kruithof *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015). El endocardio

valvular presenta expresión de distintos receptores Tg β Bmp que promueven la expresión de factores de transcripción Snail/Slug (Xu *et al.*, 2015), iniciando un programa de señalización para la pérdida de la integridad epitelial (caderinas) y la adquisición de características mesenquimales (vimentina) (Grego-Bessa *et al.*, 2004; Conway *et al.*, 2011; Kruithof *et al.*, 2012).

El desarrollo del PE/epicardio embrionario y sus derivados cardiovasculares ha sido estudiado con profusión en los últimos años. Distintos factores de transcripción como Wt1, Tbc21/Pod1 y Tbx18 han sido identificados como marcadores del epicardio (Haening y Kispert, 2004; Zeng *et al.*, 2011). Además, Wt1 y Tbc21/Pod1 constituyen elementos esenciales en la transición epitelio-mesénquima y en la regulación de la diferenciación del epicardio embrionario en los distintos linajes cardiovasculares (Carmona *et al.*, 2010; Braitsch *et al.*, 2012; Greulich *et al.*, 2012; Tskeitchi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). En este contexto, el papel de PDGF α y FGF es también crucial (Mellgren *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; van den Akker *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

Durante muchos años el dogma en la regulación de la expresión génica convenía que a partir del molde de ADN genómico se transcribían unos ARN mensajeros como unos intermediarios de la información genética que permitía posteriormente traducirla y generar así proteínas estructurales/funcionales. En los últimos años este paradigma ha sido parcialmente modificado en base al descubrimiento de los ARNs no codificantes (Carninci *et al.*, 2005; Harnow *et al.*, 2012). La secuenciación del genoma completo humano demostró que la cantidad de genes codificantes no era significativamente mayor que el de otras especies bastante alejadas filogenéticamente y que además solo constituía el 5% del genoma completo. Por tanto, la mayoría del genoma se consideró como "genoma basura". A principio de la década de los 90 se descubrió que distintos ARNs que no codificaban proteínas sí podían actuar como elementos funcionales regulando la expresión de otras proteínas. El análisis de la expresión génica con nuevas técnicas de secuenciación masiva ha demostrado que un alto grado de ese "genoma basura" se transcribe, pero no se traduce, identificando así un papel relevante para los ARNs no codificantes. La diversidad y variabilidad funcional de estos ARNs no codificantes es muy amplia. En la actualidad, los ARNs no codificantes se clasifican en dos grandes subgrupos, esencialmente en base al tamaño de los mismos: ARN no codificantes pequeños (<200 nt) y ARNs no codificantes largos (>200 nt) (Schonrock *et al.*, 2012). La diversidad y variabilidad funcional de estos ARNs no codificantes es muy amplia. Dentro de los ARN no codificantes pequeños (<200 nt), los microRNAs constituyen a día de hoy el grupo más numeroso y mejor estudiado, mientras que en los ARNs no codificantes largos (>200 nt) se corresponde con los lincRNAs (long intergenic non coding RNAs).

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

Los microRNAs son ARN no codificantes con un tamaño de 18-24 nt (Bartel, 2004, 2009). Los microRNAs se transcriben a partir de precursores de 120-200 nt que forman un bucle palindrómico mediante la ARN polimerasa II. La mayoría presentan una caperuza 5' y están poliadenilados en su extremo 3'. La biogénesis de los microRNAs es un proceso altamente estudiado, durante el cual, la exonucleasa Dicer juega un papel primordial tanto en la maduración de los microRNAs como en su incorporación al complejo RISC (Bartel, 2004, 2009). Los microRNAs son moléculas altamente conservadas durante la evolución que ejercen su papel funcional mediante el reconocimiento de secuencias homólogas complementarias del ARN mensajero, originando la degradación de este y/o la inhibición de la traducción de dicho ARN mensajero a proteína. En la actualidad se han identificado más de 1500 microRNAs distintos en humano y su expresión es tejido-específica.

Papel funcional de los microRNAs en la especificación y determinación cardiogénica

La diferenciación del mesodermo precardiogénico está influenciada por la señalización del endodermo anterior mediante *Brp2* y *Egfr8* (Andree *et al.*, 1998) (Figura 1). La señalización de estos factores de crecimiento induce, por tanto, la expresión de los primeros marcadores cardiogénicos, como son los factores de transcripción *Nkx2.5* y *Gata4*. Sin embargo, el control espacio-



Figura 1. Esquema representativo del papel funcional de distintos microRNAs en la inducción del mesodermo cardiogénico. En este contexto se ha descrito un mecanismo de interacción entre distintos factores de crecimiento esenciales en la inducción de mesodermo cardiogénico, como *Brp2* y *Egfr8*, y distintos microRNAs tales como *miR-130* y *miR-133*.

temporal de la inducción cardiogénica no está completamente definido. El papel funcional de distintos microRNAs durante la diferenciación miogénica, en particular de miR-99a/let7c (Coppola *et al.*, 2014) y miR-124 (Cai *et al.*, 2012), ha sido estudiada en distintos contextos celulares (Quarocelli *et al.*, 2011; Hosada *et al.*, 2011). En nuestro laboratorio, el análisis de la expresión de distintos microRNAs durante el desarrollo cardiovascular temprano (Chinchilla *et al.*, 2011) ha identificado a miR-130 como un microRNA que se expresa en el mesodermo precardiogénico, así como en el endodermo anterior, mostrando un perfil de expresión similar a Fgf8 y Bmp2 (Lopez-Sanchez *et al.*, 2015ab). Estudios de ganancia y pérdida de función de miR-130 en embriones tempranos del desarrollo cardiovascular del pollo han demostrado que miR-130 modula la expresión de Fgf8, Nkx2.5 y Gata4. Asimismo, Bmp2 regula la expresión de miR-130 y Fgf8. Además, la sobreexpresión de miR-130 modula a su vez la expresión de un microRNA específicamente cardíaco, miR-133 (Lopez-Sanchez *et al.*, 2015ab). Todos estos datos demuestran un papel esencial de miR-130 como regulador del mecanismo de señalización Bmp2/Fgf8 que determina la inducción cardiogénica del mesodermo.

El papel de los microRNAs durante la especificación cardiogénica ha sido estudiado también usando modelos de diferenciación *in vitro* a partir de células embrionarias pluripotentes de ratón (Brü-Rosário *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013) o humanas (Lu *et al.*, 2013; Izarra *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2011; Sluijter *et al.*, 2010), respectivamente, y recientemente también usando células pluripotentes inducidas (iPS) (Kuppusamy *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio, usando células embrionarias pluripotentes de ratón hemos evidenciado que la sobreexpresión de miR-27b inhibe la especificación cardiomiogénica. El número de áreas contráctiles es básicamente inexistente y la expresión de marcadores de cardiomiocitos terminal está severamente reducida. Por otro lado, la sobreexpresión de miR-25 inhibe sustancialmente la expresión de determinantes mesodérmicos como Brachyury (T) y cardiomiogénicos como Wnt5a (Vilches *et al.*, 2014).

También hemos observado que la sobreexpresión de miR-23 permite la especificación de los precursores cardiomiogénicos, sin modificar la diferenciación terminal, aunque afectando a las características contráctiles de dicho cardiomiocitos. En concreto, la sobreexpresión de miR-23 modula la expresión de distintos canales de potasio, cationes, así como distintos canales intercelulares de tipo conexinas (Vilches *et al.*, 2014). En conjunto, estos datos demuestran el papel esencial de los microRNAs en procesos tan complejos como la especificación cardiomiogénica (Vilches *et al.*, 2014). En este contexto, la identificación de microRNAs con capacidad funcional para modular la diferenciación celular en distintos linajes

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

cardiovasculares permitirá en un futuro postular su posible uso terapéutico. En particular, la búsqueda de microRNAs que permita incrementar el linaje cardiomiogénico, bloqueando la diferenciación hacia fibroblastos y/o miofibroblastos, pero permitiendo un aporte vasculogénico, sería ideal para el tratamiento de enfermedades cardiovascular, tan relevantes como el infarto de miocardio.

Expresión diferencial de microRNAs en la maduración ventricular

Durante el desarrollo cardíaco, distintos factores de transcripción juegan un papel esencial en la determinación y maduración de las cámaras cardíacas. Distintos estudios han demostrado la expresión diferencial de microRNAs durante la cardiogénesis (Wilson *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013), así como en distintos contextos fisiopatológicos (Roberts *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2014; Rowell *et al.*, 2014; Chiang *et al.*, 2015; Bulent Vatan *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016). En nuestro laboratorio analizamos los perfiles de expresión de microRNAs mediante *microarray* durante la maduración ventricular (Chinchilla *et al.*, 2011). Aproximadamente 700 microRNAs fueron analizados en tres estadios de desarrollo ventricular en ratón. Los análisis comparativos demostraron un conjunto reducido de microRNAs que mostraban incremento en su expresión diferencial a lo largo de la maduración cardíaca, mientras que no se identificaron microRNAs cuyo perfil global fuese en decremento. Dado que el papel funcional de los microRNAs es esencialmente un regulador negativo, se podría interpretar que los microRNAs juegan un papel esencial paraodo la función de los factores de transcripción cardiogénicos (Chinchilla *et al.*, 2011). En este contexto, identificamos miR-27b como un regulador directo del factor de transcripción Mef2c. Además, hemos comprobado que la modulación de un mismo microRNA, p. ej. miR-27b, sobre el mismo gen diana (p. ej. Mef2c) es dependiente de contexto celular (Lozano-Velasco *et al.*, 2015).

El análisis comparativo de los perfiles de expresión de microRNAs durante la maduración ventricular ha sido comparado con otras dos condiciones cardiovasculares, la especificación cardiogénica a partir de células pluripotentes inducidas y el proceso de senescencia cardíaca. Este tipo de meta-análisis nos ha permitido identificar que la mayor parte de los microRNAs diferencialmente expresados durante la maduración ventricular también lo hacen, y de la misma forma, durante la cardiogénesis inducida *in vitro*, pero difieren con aquellos altamente representados en condiciones de envejecimiento cardíaco (Bout *et al.*, 2013; 2015; Franco *et al.*, 2016).

Papel señalizador de los microRNAs en la valvulogénesis cardíaca y en la diferenciación del epicardio

La transición epitelio-mesénquima (EMT) constituye uno de los procesos esenciales para la formación de las válvulas cardíacas. Distintos factores de crecimiento, tales como Tgf- β y Bmp, juegan un papel crítico. Distintos estudios han analizado el papel funcional de los microRNAs durante la valvulogénesis, tanto de ratón (Lagerstedt *et al.*, 2011) como en pez zebra (Banjo *et al.*, 2013; Kolpa *et al.*, 2013), poniendo de manifiesto el papel esencial de miR-23 y miR21, respectivamente (Figura 2). Igualmente, distintos estudios han analizado el perfil diferencial de microRNAs en distintos contextos patológicos valvulares (Xiao *et al.*, 2011; Cooley *et al.*, 2012). En nuestro laboratorio queremos saber el papel que los microRNAs puede desempeñar durante la valvulogénesis. Para ello realizamos un análisis de la expresión diferencial de microRNAs en las cámaras auriculares y ventriculares, en comparación con la expresión en el canal atrioventricular en distintos estadios del desarrollo (Booet *et al.*, 2015). Este análisis nos permitió identificar un número discreto de microRNAs expresados diferencialmente en el canal atrioventricular. Nuestro análisis se centró en discernir el papel funcional de estos microRNAs en el EMT. La sobre-expresión de miR-199, miR-23b y miR-15 inhibió el EMT, pero no la sobre-expresión de otros microRNAs tales como miR-130 y miR-200. El análisis mediante



Figura 2. Diagrama representativo del papel funcional de distintos microRNA en la especificación del linaje cardiogenético, la vasculogénesis y la diferenciación del epitelio. En este contexto, el papel funcional de miR-25 ha sido descrito tanto reduciendo la expresión de distintos genes durante la diferenciación cardiomiogénica como en el bloqueo de la transición epitelio-mesénquima durante el desarrollo cardiovascular. De modo similar, el papel funcional de miR-27 también ha sido descrito en ambos procesos morfológicos.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

hibridación *in situ* demostró que miR-23b se localiza preferencialmente en los cojines endocárdicos del canal aurioventricular. Además, la sobre-expresión de miR-23 y miR-199 regulaba diferencialmente las vías de señalización Snail/Slug de inicio del EMT, así como marcadores de epitelio y mesénquima (Boet et al., 2015). Para ver cuáles podrían ser los genes diana involucrados en este proceso, realizamos un estudio de todos los posibles genes diana compartidos entre las tres microRNAs que inhiben EMT y que hubiese evidencias bibliográficas de su expresión cardiovascular o su papel funcional en EMT en otros procesos biológicos relevantes. De este modo identificamos 14 genes diana, todos los cuales se expresan en el AVC y además están modulados por estos microRNAs. Adicionalmente identificamos a qué nivel de la vía de señalización que regula el EMT valvular se sitúan estos genes diana, acotando de este modo los mecanismos de acción de cada microRNA en el proceso de EMT. Estos datos muestran el papel regulador de distintos microRNAs en EMT, proceso que tiene una alta relevancia biológica en otros contextos como el cáncer, y por ello suponen nuevas vías para el desarrollo de dianas terapéuticas (Boet et al., 2015).

MicroRNAs en cardiopatías arritmogénicas

La expresión diferencial de microRNAs no solo acontece durante el desarrollo embrionario, sino que también ocurre en distintos procesos patológicos (Roberts et al., 2012; Feng et al., 2014; Rowell et al., 2014; Chiang et al., 2015; Bulent Vatan et al., 2016; Chen et al., 2016; Xiao et al., 2011; Cooley et al., 2012). En nuestro laboratorio hemos analizado el perfil de expresión de microRNAs en distintas patologías cardíacas arritmogénicas y hemos indagado en su papel funcional. En particular, hemos analizado la expresión de microRNAs en modelos experimentales de fibrilación auricular. Es importante resaltar que la fibrilación auricular es la patología arritmogénica más frecuente en la población humana, con una incidencia del 2%, que llega a ser del 10% en pacientes mayores de 80 años (Staerk et al., 2017; Dilaveris et al., 2017). Estudios recientes de GWAS han determinado qué SNPs en la región cromosómica 4q25 están altamente asociadas con la presencia de AF, sugiriendo que el PITX2, el gen más cercano, es el agente causativo (Gudbjartsson et al., 2007).

La falta de función de Pitx2 en ratones modificados genéticamente conlleva alteraciones estructurales y moleculares que son más proclives al desarrollo de AF (Franco et al., 2011, 2012). Los análisis moleculares sugieren distintas vías de señalización aguas debajo de Pitx2, por un lado modulado la expresión de Shox2/Hcn4 (Wang et al., 2010), canales iónicos (Kirchoff et al. 2011; Chinch-

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR. VOLUMEN I. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

lla *et al.*, 2011), Wnt8/Wnt11 (Lozano-Velasco *et al.*, 2016), así como distintos microRNAs (Wang *et al.*, 2010; Chinchilla *et al.*, 2011; Lozano-Velasco *et al.*, 2016). Nuestros resultado, implican a *Pitx2* en la regulación de múltiples microRNAs, tales como miR-1, miR-133, miR-29 y miR-200, que tienen un impacto directo en la regulación de distintos canales iónicos cardíacos como *Scn5a*, *Kcnc2*, *Kcnc12* y *Cacophony* (Chinchilla *et al.*, 2011; Lozano-Velasco *et al.*, 2016).

Las diferencias de expresión en microRNAs afectan incluso a los primeros momentos de la fibrilación auricular (Terrado *et al.*, 2015). La inducción de FA conlleva una alteración específica del perfil de expresión de microRNAs, incrementando la expresión de miR-21, que a su vez es capaz de disminuir la expresión de *Pitx2* (Terrado *et al.*, 2015) (Figura 3). Estos datos por tanto sugieren un mecanismo molecular por el cual los primeros episodios de FA comprometen que los siguientes episodios sean más frecuentes y severos.

Dado que estas alteraciones en la expresión de estos microRNAs pueden afectar no solo a factores de transcripción determinantes de cardiopacías arritmogénicas, sino también directamente a los canales iónicos responsables de la configuración del potencial de acción cardíaco, en nuestro laboratorio hemos determinado el papel funcional de distintos microRNAs en la regulación posttranscripcional del principal canal de sodio cardíaco, *Scn5a*. Análisis de sobreexpresión y falta de función de miR-200 y miR-219 ha permitido determinar la temporalidad y dosisdependencia de la modulación del canal de sodio *Scn5a*, disminuyendo e incrementando, respectivamente. Además hemos determinado que la modificación de tan solo dos nucleótidos en la secuencia semilla de reconocimiento de este mi-

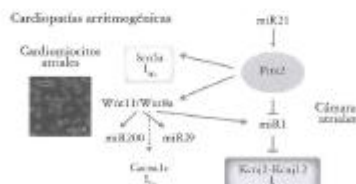


Figura 3. Esquema representativo del papel funcional de distintos microRNAs en procesos fisiopatológicos como las arritmias cardíacas. La regulación génica crea el factor de transcripción *Pitx2* y la expresión de distintos microRNAs ha sido ampliamente descrita en el contexto de la fibrilación auricular, conllevando a la modulación de la expresión de múltiples canales iónicos presentes en la regulación de la configuración del potencial de acción cardíaco.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

croRNA afecta de forma diferencial la modulación de *Scn5a* tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos datos demuestran el potencial terapéutico de estos microRNAs para modular la expresión y función del canal de sodio en cardiopatías arritmogénicas en las cuales existe una deficiencia en la función de dicho canal, como son el síndrome de Brugada y el síndrome QT largo (Daami et al., 2015).

Conclusiones y perspectivas

Durante muchos años hemos aceptado que el genoma (ADN) contiene la información genética, y que dicha información genética es leída temporalmente mediante la generación de ARN mensajeros, los cuales traducen esa información en proteínas que ejercen las distintas funciones celulares necesarias para su desarrollo y división. La secuenciación completa del genoma, en múltiples especies, incluida la especie humana, nos ha dejado un panorama no menos curioso, pues la información codificante para proteínas no alcanza más allá del 5-10% del total del genoma. Además existen pocas diferencias cuantitativas en el número de genes codificantes entre especies aparentemente bastante distantes. La identificación de genes no codificantes abre una nueva línea de complejidad en el conocimiento de la regulación génica y de las distintas funciones celulares. En estos últimos años hemos asistido a la identificación de un elevado número de microRNAs cuyas funciones celulares son esenciales para básicamente todas y cada una de los procesos celulares. Como estamos vislumbrando recientemente, además de desempeñar un papel morfogenético esencial, los microRNAs también actúan como moléculas señalizadoras encapsuladas dentro de exosomas intercelulares. Ello hace que los microRNAs se constituyan hoy día como posibles dianas terapéuticas, como biomarcadores patológicos y como moléculas señalizadoras, abriendo así un amplio espectro de posibilidades en biomedicina.

Si bien nuestro conocimiento sobre los microRNAs ha emergido con rotundidad en los últimos años, no es menos cierto que solo conocemos la punta del iceberg en relación con las funciones de los ARN no codificantes. Los RNAs codificantes de larga cadena (lncRNAs), con una similitud estructural a los ARN mensajeros, pero que no codifican para proteínas, tienen capacidades multifuncionales (epigenética, transcripción, post-transcripcional, transducción). Además, en muchos de los casos, falta conservación evolutiva. Todo ello nos augura nuevos tiempos, aun mucho más complejos en el entendimiento de los procesos celulares y moleculares que rigen el desarrollo embrionario, la homeostasis celular y los procesos fisiopatológicos. En los próximos años asistiremos a una nueva revolución en nuestro conocimiento de los procesos moleculares que gobiernan la expresión génica y, por ende, el funcionamiento celular y tisular.

105

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR. VOLUMEN I. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

Tabla de abreviaturas

Abrev.	Factor morfogenético proteico	Factor morfogenético ribonucleico
EgF	Fibroblast growth factor	Factor de crecimiento fibroblástico
FF	Prospicardium	Prospercardia
EPOC	Episcardial dorsal outfold	Celulas derivadas del epicardio
IFE	Isolated pluripotent endocardial cells	Celulas pluripotentes inducidas
EMT	Epithelial to mesenchymal transition	Transición epitelio-mesénquima
lncRNA	Long non coding RNA	ARN no codificante largo
lincRNA	Long intergenic non coding RNA	ARN intergénico no codificante largo

Bibliografía

- Aanhaanen, W. T., Bronkens, B. J., Semtsov, A., Winkler, V., de Gier-de Vries, C., van Ginneken, A. C., Moorman, A. F., Caron, B., y Christoffels, V. M. (2011): "Defective Tbx2-dependent patterning of the atrioventricular canal myocardium causes accessory pathway formation in mice". *J Clin Invest*, 121, 554-564.
- Aanhaanen, W. T., Brons, J. E., Domínguez, J. N., Rana, M. S., Norden, J., Aitak, R., Winkler, V., de Gier-de Vries, C., Brown, N. A., Kispert, A., Moorman, A. F., y Christoffels, V. M. (2009): "The Tbx2+ primary myocardium of the atrioventricular canal forms the atrioventricular node and the base of the left ventricle". *Circ Res*, 104, 1267-1274.
- Aanhaanen, W. T., Mommerseuig, M. T., Norden, J., Winkler, V., de Gier-de Vries, C., Anderson, R. H., Kispert, A., Moorman, A. F., y Christoffels, V. M. (2010): "Developmental origin, growth, and three-dimensional architecture of the atrioventricular conduction axis of the mouse heart". *Circ Res*, 107, 728-736.
- Aanhaanen, W. T., Moorman, A. F., y Christoffels, V. M. (2011): "Origin and development of the atrioventricular myocardial lineage: insight into the development of accessory pathways". *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91, 565-577.
- Ahmed, R. P., Haider, H. K., Buccini, S., Li, L., Jiang, S., y Ashraf, M. (2011): "Reprogramming of skeletal myoblasts for induction of pluripotency for tumor-free cardiomyogenesis in the infarcted heart". *Circ Res*, 109, 60-70.
- Anderson, R. H., Brown, N. A., y Webb, S. (2002): "Development and structure of the atrial septum". *Heart*, 88, 104-110.
- Anderson, R. H., Webb, S., Brown, N. A., Lattem, W., y Moorman, A. (2003): "Development of the heart: (2) Separation of the atria and ventricles". *Heart*, 89, 949-958.

- André, B., Duprez, D., Vurbusch, B., Arnold, H. H., y Beaud, T. (1998): "BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos". *Mech Dev*, 70, 119-131.
- Bakker, M. L., Beisk, G. J., Boukens, B. J., Verkerk, A. O., van den Boogaard, M., den Haan, A. D., Hoogaars, W. M., Buijsse, H. P., de Bakker, J. M., Seppen, J., Tan, H. L., Moorman, A. F., y Hoon, P. A., y Christoffels, V. M. (2012): "T-box transcription factor TBX3 reprograms mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells". *Cardiovas Res*, 94, 439-449.
- Bakker, M. L., Boukens, B. J., Mommering, M. T., Brera, J. E., Walder, V., Moorman, A. F., y Christoffels, V. M. (2008): "Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system". *Circ Res*, 102, 1340-1349.
- Bakker, M. L., Moorman, A. F., y Christoffels, V. M. (2010): "The atrioventricular node: origin, development, and genetic program". *Trends Cardiovasc Med*, 20, 164-171.
- Banjo, T., Grajcarek, J., Yoshino, D., Otsu, H., Miyasaka, K. Y., Kida, Y. S., Urki, Y., Nagayama, K., Kawakami, K., Misumoto, T., Sato, M., y Ogura, T. (2013): "Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21". *Nat Commun*, 4, 1978.
- Bartel, D. P. (2004): "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function". *Cell*, 116, 281-297.
- Bartel, D. P. (2009): "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *Cell*, 136, 215-233.
- Bondue, A., y Blumstein, C. (2010): "Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment". *Circ Res*, 107, 1414-1427.
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulsson, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., y Blumstein, C. (2008): "Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification". *Cell Stem Cell*, 3, 69-84.
- Bonet, E., Duñas, Á., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Ariéga, A. E., y Franco, D. (2015): "MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation". *Dev Dyn*, 244, 1259-1275.
- Bonet, E., Hernández-Torres, E., Esteban, E. J., Ariéga, A., y Franco, D. (2013): "Comparative Analysis of MicroRNA Microarrays during Cardiogenesis: Functional Perspectives". *Microarrays (Basel)*, 2, 81-96.
- Boyer, A. S., Ayerinskas, I. L., Vincent, E. B., McKinney, L. A., Weeks, D. L., y Runyan, R. B. (1999): "TGFBeta2 and TGFBeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart". *Dev Biol*, 208, 330-343.
- Bratsch, C. M., Combs, M. D., Quaglin, S. E., y Yotsey, K. E. (2012): "Pod1/Trf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart". *Dev Biol*, 368, 345-357.

- Breis-Rodríguez, L., Marsada, A., Pinheiro, A. I., Gardner, R., Lopes, T., Amaral, A., y Cima-Carvalho, M. (2013). "Expression profile of microRNAs regulating proliferation and differentiation in mouse adult cardiac stem cells". *PLoS One*, 8, e63041.
- Briggs, L. E., Karkaria, J., y Wessels, A. (2012). "The pathogenesis of atrial and atrioventricular septal defects with special emphasis on the role of the dorsal mesenchymal protrusion". *Differentiation*, 84, 117-130.
- Briggs, L. E., Phelps, A. L., Brown, E., Karkaria, J., Anderson, R. H., van den Hoff, M. J., y Wessels, A. (2013). "Expression of the BMP receptor Alk3 in the second heart field is essential for development of the dorsal mesenchymal protrusion and atrioventricular septation". *Circ Res*, 112, 1420-1432.
- Bulent Yaman, M., Kalyoncu Yigit, A., Akdemir, B., Tarik Agac, M., Akif Cakar, M., Aksoy, M., Tadi, E., Kilic, H., Gunduz, H., Guzel, D., y Karacan, K. (2016). "Altered Plasma MicroRNA Expression in Patients with Mitral Chordae Tendineae Rupture". *J Heart Valve Dis*, 25, 580-588.
- Burns, T., Yang, Y., Hiriart, E., y Weisels, A. (2016). "The Dorsal Mesenchymal Protrusion and the Pathogenesis of Atrioventricular Septal Defects". *J Cardiovasc Dev Dis*, 3, pii: 29.
- Cai, B., Li, J., Wang, J., Luo, X., Ai, J., Liu, Y., Wang, N., Liang, H., Zhang, M., Chen, N., Wang, G., Xing, S., Zhou, X., Yang, B., Wang, X., y Lu, Y. (2012). "microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling". *Stem Cells*, 30, 1746-1755.
- Cai, X., Nomura-Kitabayashi, A., Cai, W., Yan, J., Christoffels, V. M., y Cai, C. L. (2011). "Myocardial Tbx20 regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via Bmp2". *Dev Biol*, 360, 381-390.
- Campione, M., Acosta, L., Martínez, S., Icardo, J. M., Aránega, A., y Franco, D. (2002). "Pitx2 and cardiac development: a molecular link between left/right signaling and congenital heart disease". *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 67, 89-95.
- Campione, M., Ros, M. A., Icardo, J. M., Piedra, E., Christoffels, V. M., Schweickert, A., Blum, M., Franco, D., y Moonman, A. E. (2001). "Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the *iv/iv* mice". *Dev Biol*, 231, 252-264.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deisler, K., van Bebbes, E., Lowe, L. A., Nowotzsch, S., Viebahn, C., Halfter, P., Kuehn, M. R., y Blum, M. (1999). "The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping". *Development*, 126, 1225-1234.
- Cao, X., Wang, J., Wang, Z., Du, J., Yuan, X., Huang, W., Meng, J., Gu, H., Nie, Y., Ji, B., Hu, S., y Zheng, Z. (2013). "MicroRNA profiling during rat ventricular maturation: A role for miR-29a in regulating cardiomyocyte cell cycle re-entry". *FEBS Lett*, 587, 1548-1555.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

- Carmona, R., Guadix, J. A., Cano, E., Ruiz-Villalba, A., Portillo-Sánchez, V., Pérez-Pomares, J.M., y Muñoz-Chápuli, R. (2010): "The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development". *J Cell Mol Med*, 14, 2066-2072.
- Garnieri, P., Kasukawa, T., Karyama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Hajic, V.B., Brenner, S. E., Bocalov, S., Forrest, A. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., Aidinis, V., Allen, J. E., Ambesi-Impiomato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R. N., Bailey, T. L., Barnal, M., Baxter, L., Beisel, K. W., Bernano, T., Bono, H., Chalk, A. M., Chiu, K. P., Chaudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D. R., Crowe, M. L., Dalla, B., Dalrymple, B. P., de Bono, B., Della Gatta, G., di Bernardo, D., Down, T., Engstrom, P., Fagioli, M., Fialkner, G., Fletcher, C. F., Fukushima, T., Furuno, M., Potaki, S., Gariboldi, M., Georgii-Hemming, P., Gingeras, T. R., Gujibori, T., Green, R. E., Gustincich, S., Harbers, M., Hayashi, Y., Hensch, T. K., Hirokawa, N., Hill, D., Huminiecki, L., Iacono, M., Ikeno, K., Iwama, A., Ishikawa, T., Jakt, M., Kanapin, A., Karth, M., Kawasaki, Y., Kelson, J., V., Laneu, L. P., Lazarevic, D., Lipovich, L., Liu, J., Liuni, S., McWilliam, S., Madan Babu, M., Mader, M., Marchionni, L., Matsuda, H., Matsuzawa, S., Miki, H., Mignone, F., Miyake, S., Morris, K., Mottagui-Talbot, S., Mulder, N., Nakano, N., Nakaguchi, H., Ng, P., Nilsson, R., Nishiguchi, S., Nishikawa, S., Nori, F., Ohara, O., Okazaki, Y., Oikarinen, V., Pang, K. C., Pavan, W. J., Pavesi, G., Pesole, G., Petrosky, N., Piazza, S., Reed, J., Reid, J. E., Ring, B. Z., Ringwald, M., Rost, B., Ruus, Y., Salzberg, S.L., Sandelin, A., Schneider, C., Schönbach, C., Sekiguchi, K., Sempke, C. A., Seno, S., Sessa, L., Sheng, Y., Shibata, Y., Shimada, H., Shimada, K., Silva, D., Sinclair, B., Sperling, S., Stupka, E., Sugiura, K., Sultana, R., Takenaka, Y., Taki, K., Tammoja, K., Tan, S. L., Tang, S., Taylor, M. S., Tegner, J., Teichmann, S. A., Ueda, H. R., van Nimwegen, E., Verardo, R., Wei, C. L., Yagi, K., Yamanishi, H., Zabarovsky, E., Zhu, S., Zimmer, A., Hide, W., Bult, C., Grimmond, S. M., Teasdale, R. D., Liu, E. T., Brusic, V., Quackenbush, J., Wahlestedt, C., Mattick, J. S., Hume, D. A., Kai, C., Suzuki, D., Tomaru, Y., Fukuda, S., Kanamori-Karayama, M., Suzuki, M., Aoki, J., Asakawa, T., Iida, J., Imamura, K., Itoh, M., Kato, T., Kawaji, H., Kawagashira, N., Kawashima, T., Kojima, M., Kondo, S., Konno, H., Nakano, K., Ninomiya, N., Nishio, T., Okada, M., Plesky, C., Shibata, K., Shimizu, T., Suzuki, S., Tagami, M., Waki, K., Watanabe, A., Okamura-Oho, Y., Suzuki, H., Kawai, J., Hayashizaki, Y.; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group) (2005): "The transcriptional landscape of the mammalian genome". *Science*, 309, 1539-1563.
- Charron, E., y Nemer, M. (1999): "GATA transcription factors and cardiac development". *Semin Cell Dev Biol*, 10, 85-91.

- Chen, Y. T., Wang, J., Wei, A. S., Yong, Q. W., Tay, E. L., Woo, C. C., Sorokin, V., Richards, A. M., y Ling, L. H. (2016): "Differential MicroRNA Expression Profile in Myxomatous Mitral Valve Prolapse and Fibroelastic Deficiency Valves". *Int J Mol Sci*, 17, pii: E755.
- Chiang, D. Y., Zhang, M., Voigt, N., Alsina, K. M., Jakob, H., Martin, J. E., Dobrev, D., Wilmshus, X. H., y Li, N. (2015): "Identification of microRNA-mRNA dysregulations in paroxysmal atrial fibrillation". *Int J Cardiol*, 184, 190-197.
- Chinchilla, A., Daimi, H., Luazo-Velasco, E., Dominguez, J. N., Caballero, R., Del-pón, E., Tamarit, J., Cinca, J., Hove-Madsen, L., Araneaga, A. E., y Franco, D. (2011): "PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis". *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 269-279.
- Chinchilla, A., Lozano, E., Daimi, H., Esteban, F. J., Crist, C., Araneaga, A. E., y Franco, D. (2011): "MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression". *Cardiovasc Res*, 89, 98-108.
- Christoffels, V. M., Griekamp, T., Norden, J., Mommersteeg, M. T., Rudar, C., y Kispert, A. (2009): "Tbx18 and the fate of epicardial progenitors". *Nature*, 458, ES-9.
- Christoffels, V. M., Halbes, P. E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., Bao, Z. Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R. P., y Moorman, A. F. (2008): "Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart". *Dev Biol*, 223, 266-278.
- Christoffels, V. M., Hoogaars, W. M., Tazari, A., Cleut, D. E., Moorman, A. F., y Campione, M. (2004): "T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers". *Dev Dyn*, 229, 763-770.
- Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trowe, M. O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. E., y Kispert, A. (2006): "Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18". *Circ Res*, 98, 1555-1563.
- Conway, S. J., Bundy, J., Chen, J., Dickman E., Rogers, R., y Will, B. M. (2000): "Decreased neural crest stem cell expansion is responsible for the conotruncal heart defects within the splenic (Sp2H)/Pax3 mouse mutant". *Cardiovasc Res*, 47, 314-328.
- Conway, S. J., Doetschman, T., y Azhar, M. (2011): "The inter-relationship of perinatal, TGF beta, and BMP in heart valve development and valvular heart diseases". *Scientific World Journal*, 11, 1509-1524.
- Conway, S. J., Guch, R. E., Hatcher, C. J., Leatherbury, L., Zolotouchnikov, V. V., Brisco, M. A., Copp, A. J., Kirby, M. L., y Creazzo, T. L. (1997): "Neural crest is involved in development of abnormal myocardial function". *J Mol Cell Cardiol*, 29, 2675-2685.
- Conway, S. J., Henderson, D. J., y Copp, A. J. (1997): "Pax3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: evidence from the splenic (Sp2H) mutant". *Development*, 124, 505-514.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

- Cooley, N., Cowley, M. J., Lin, R. C., Marasco, S., Wong, C., Kaye, D. M., Dart, A. M., y Woodcock, E. A. (2012). "Influence of atrial fibrillation on microRNA expression profiles in left and right atria from patients with valvular heart disease". *Physiol Genomics*, 44, 211-219.
- Coppola, A., Romito, A., Boer, C., Gehrig, C., Gagnebin, M., Fulconeri, E., Izzo, A., Aluicci, L., Bonfi, S., Amonarakis, S. E., Minichietti, G., y Cobellis, G. (2014). "Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications". *Stem Cell Res*, 12, 323-337.
- Ciruzzo, T. L., Gudi, R. E., Leatherbury, L., Conway, S. J., y Kirby, M. L. (1998). "Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development". *Annu Rev Physiol*, 60, 267-286.
- Duimi, H., Lozano-Velasco, E., Haj Khelil, A., Chibani, J. E., Barasa, A., Amorós, I., González de la Fuente, M., Caballero, R., Aratega, A., y Franco, D. (2015). "Regulation of SCN5A by microRNAs: miR-219 modulates SCN5A transcript expression and the effects of flecainide intoxication in mice". *Heart Rhythm*, 12, 1333-1342.
- de Castro, M. P., Acosta, L., Domínguez, J. N., Acínega, A., y Franco, D. (2003). "Molecular diversity of the developing and adult myocardium: implications for tissue targeting". *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 3, 227-239.
- de Jong, F., Opthoff, T., Wilde, A. A., Jansz, M. J., Charles, R., Lamers, W. H., y Moorman, A. E. (1992). "Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts". *Circ Res*, 71, 240-250.
- Dilaveris, P. E., y Kennedy, H. L. (2017). "Silent atrial fibrillation: epidemiology, diagnosis, and clinical impact". *Clin Cardiol*, Mar 8.
- Eisenberg, L. M., y Markwald, R. R. (1995). "Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis". *Circ Res*, 77, 1-6.
- Feng, H. J., Ouyang, W., Liu, J. H., Sun, Y. G., Hu, R., Huang, L. H., Xian, J. L., Jing, C. F., y Zhou, M. J. (2014). "Global microRNA profiles and signaling pathways in the development of cardiac hypertrophy". *Braz J Med Biol Res*, 47, 361-368.
- Franco, D., Bonet, E., Hernández-Torres, F., Lozano-Velasco, E., Escoban, F. J., y Aratega, A. E. (2016). "Analysis of microRNA Microarrays in Cardiogenesis". *Mol Biol*, 1375, 207-221.
- Franco, D., Campione, M., Kelly, R., Zammitt, P. S., Buckingham, M., Lamers, W. H., y Moorman, A. E. (2000). "Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart". *Circ Res*, 87, 984-991.
- Franco, D., y Campione, M. (2003). "The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases". *Trends Cardiovasc Med*, 13, 157-163.

- Franco, D., Chinchilla, A., y Arévalo, A.E. (2012): "Transgenic insights linking *pitx2* and atrial arrhythmias". *Front Physiol*, 3, 205.
- Franco, D., Chinchilla, A., Daimi, H., Domínguez, J. N., y Arévalo, A. (2011): "Modulation of conductive elements by *Pitx2* and their impact on atrial arrhythmogenesis". *Cardiovasc Res*, 91, 223-231.
- Franco, D., Christoffels, V. M., y Campione, M. (2014): "Homeobox transcription factor *Pitx2*: The rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis". *Trends Cardiovasc Med*, 24, 23-31.
- Franco, D., y Izard, J. M. (2001): "Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts". *Cardiovasc Res*, 49, 417-429.
- Franco, D., Kelly, R., Lamers, W. H., Buckingham, M., y Moonman, A. E. (1997): "Regionalized transcriptional domains of myosin light chain 3f transgenes in the embryonic mouse heart: morphogenetic implications". *Dev Biol*, 188, 17-33.
- Franco, D., Meilhac, S. M., Christoffels, V. M., Kispert, A., Buckingham, M., y Kelly, R. G. (2006): "Left and right ventricular contributions to the formation of the interventricular septum in the mouse heart". *Dev Biol*, 294, 366-375.
- Ghatpande, S., Brand, T., Zile, M., y Evans, T. (2006): "Bmp2 and Gata6 function additively to rescue heart tube development in the absence of retinoic acid". *Dev Dyn*, 235, 2030-2039.
- Goswami, S., Qadri, P., Ghatpande, S., Carleton, S., Deshpande, A. K., Baig, M., y Siddiqui, M. A. (1994): "Differential expression of the myocyte enhancer factor 2 family of transcription factors in development: the cardiac factor BBF-1 is an early marker for cardiogenesis". *Mol Cell Biol*, 14, 5130-5138.
- Grego-Bessa, J., Díez, J., Timmerman, L., y de la Pompa, J. L. (2004): "Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw". *Cell Cycle*, 3, 718-721.
- Greulich, F., Fatin, H. F., Schuster-Gossler, K., y Kispert, A. (2012): "Tbx18 function in epicardial development". *Cardiovasc Res*, 95, 476-483.
- Greulich, F., Rudat, C., Farin, H. E., Christoffels, V. M., y Kispert, A. (2016): "Lack of Genetic Interaction between Tbx18 and Tbx20 in Mouse Epicardial Development". *PLoS One*, 11, e0156787.
- Guadix, J. A., Ruiz-Villalba, A., Lertice, L., Velasco, V., Muñoz-Chápuli, R., Hastie, N. D., Pérez-Pomares, J. M., y Martínez-Estrada, O. M. (2011): "Wnt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of *Raldh2*". *Development*, 138, 1093-1097.
- Gudbjartsson, D. F., Arnar, D. O., Helgadóttir, A., Gretarsdóttir, S., Holm, H., Sigurdsson, A., Jonsdóttir, A., Baker, A., Thorgeirsdóttir, G., Kristjánsson, K., Pálsson, A., Blondal, T., Sulem, P., Backman, V. M., Hardarson, G. A., Palsdóttir, E.,

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

- Helgason, A., Sigurjonsdottir, R., Sverrisson, J. T., Kostulas, K., Ng, M. C., Baum, L., So, W. Y., Wong, K. S., Chan, J. C., Furie, K. L., Greenberg, S. M., Sale, M., Kelly, P., MacRae, C. A., Smith, E. E., Rosand, J., Hillert, J., Ma, R. C., Ellinor, P. T., Thorgeirsson, G., Gulcher, J. R., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., y Stefansson, K. (2007): "Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25". *Nature*, 448, 353-357.
- Haenig, B., y Kispert, A. (2004): "Analysis of TBX18 expression in thick embryos". *Dev Genes Evol*, 214, 407-411.
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, E., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignelli, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., Steward, C., Harte, R., Lin, M., Hovav, C., Tanzer, A., Derrien, T., Chazot, J., Walters, N., Balasubramanian, S., Pei, B., Tress, M., Rodriguez, J. M., Ezkurdi, L., van Baren, J., Brent, M., Haussler, D., Kellis, M., Valencia, A., Reymond, A., Genstein, M., Guigó, R., y Hubbard, T. J. (2012): "GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project". *Genome Res*, 22, 1760-1774.
- Harvey, R. P., Lai, D., Elliott, D., Biben, C., Solloway, M., Prall, O., Scemard, E., Schindeler, A., Groves, N., Lavulo, L., Hyun, C., Yeoh, T., Costa, M., Furtado, M., y Kisk, E. (2002): "Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease". *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 67, 107-114.
- Harvey, R. P. (1996): "NK-2 homeobox genes and heart development". *Dev Biol*, 178, 203-216.
- Hatcher, C. J., Diman, N. Y., Kim, M. S., Pennisi, D., Song, Y., Gokhale, M. M., Makiwala, T., y Besson, C. T. (2004): "A role for Tbx3 in prepericardial cell migration during cardiogenesis". *Physiol Genomics*, 18, 129-140.
- Herrmann, B. G., y Kispert, A. (1994): "The T genes in embryogenesis". *Trends Genet*, 10, 280-286.
- Herrmann, B. G. (1992): "Action of the Brachyury gene in mouse embryogenesis". *Ciba Found Symp*, 165, 78-86.
- Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., y Komuro, I. (2001): "Tbx3 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation". *Nat Genet*, 28, 276-280.
- Hoogaars, W. M., Barnett, P., Moorman, A. E., Christoffels, V. M. (2007): "T-box factors determine cardiac design". *Cell Mol Life Sci*, 64, 646-660.
- Hoogaars, W. M., Engel, A., Bruns, J. R., Verkerk, A. O., de Lange, E. J., Wong, L. Y., Bakker, M. L., Clout, D. E., Wakker, V., Barnett, P., Ravensloot, J. H., Moorman, A. E., Verheijck, E. E., y Christoffels, V. M. (2007): "Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria". *Genes Dev*, 21, 1098-1112.

- Hongnan, W. M., Tessari, A., Moorman, A. F., de Boer, P. A., Hagooet, J., Soufan, A. T., Campione, M., y Christoffels, V. M. (2004): "The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart". *Cardiovasc Res*, 62, 489-499.
- Hosoda, T., Zheng, H., Cabral-da-Silva, M., Sanada, E., Ide-Juma, N., Ogórek, B., Ferreira-Martins, J., Arraño, C., D'Amazio, D., del Monte, P., Urbancsek, K., D'Alessandro, D. A., Michler, R. B., Anversa, P., Rosa, M., Kajstura, J., y Leri, A. (2011): "Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a microRNA mechanism". *Circulation*, 125, 1287-1296.
- Hu, D. L., Liu, Y. Q., Chen, F. K., Sheng, Y. H., Yang, R., Kong, X. Q., Cao, K. J., Zhang, J. S., y Qian, L. M. (2011): "Differential expression of microRNAs in cardiac myocytes compared to undifferentiated F19 cells". *Int J Mol Med*, 28, 59-64.
- Huang, F., Tang, L., Pang, Z. F., Hu, X. Q., Pan, J. Y., y Zhou, S. H. (2013): "miR-1-mediated induction of cardiogenesis in mesenchymal stem cells via downregulation of Hes-1". *Biochem Biophys Res Commun*, 436, 216-226.
- Ibarra, A., Muroso, I., Cebón, S., Carreiro, C., Fondevila, D., Martín-Caballero, J., Blanca, V., Valiente, I., Díez-Juan, A., y Bernad, A. (2017): "miRNA-1 and miRNA-133a are involved in early commitment of pluripotent stem cells and demonstrate antagonistic roles in the regulation of cardiac differentiation". *J Tissue Eng Regen Med*, 11, 787-799.
- Kang, J., Gu, Y., Li, P., Johnson, B. L., Sisco, H. M., y Thomas, P. S. (2008): "PDGF-A as an epicardial mitogen during heart development". *Dev Dyn*, 237, 692-701.
- Kawai, T., Takahashi, T., Esaki, M., Ushikoshi, H., Nagano, S., Fujiwara, H., y Kozai, K. (2004): "Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2". *Circ J*, 68, 691-702.
- Kelly, R. G., Brown, N. A., y Buckingham, M. E. (2001): "The arterial pole of the mouse heart forms from Egr1-expressing cells in pharyngeal mesoderm". *Dev Cell*, 1, 435-440.
- Kelly, R. G., Buckingham, M. E., y Moorman, A. F. (2014): "Heart fields and cardiac morphogenesis". *Cold Spring Harbor Perspect Med*, 4, pii: a015750.
- Kelly, R. G., y Buckingham, M. E. (2002): "The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart". *Trends Genet*, 18, 210-216.
- Kelly, R. G. (2012): "The second heart field". *Curr Top Dev Biol*, 100, 53-65.
- Khataf, P., Friedrich, F. W., Bonne, G., Carrier, L., Eichenbagen, T., Evans, S. M., Schwartz, K., Fitzman, M. Y., y Vilguzin, J. T. (2011): "Distinction between two populations of islet-1-positive cells in hearts of different murine strains". *Stem Cells Dev*, 20, 1043-1052.
- Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., Werns, K. M., Huang, Y., Rubin, N., Shimada, H., Hardin, R. L., Chao, M. Y., Tian, T. L., Starnes, V. A., y Lian, C. L. (2010): "PDGF

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

- signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17206-17210.
- Kinajima, S., Takagi, A., Inoue, T., y Saga, Y. (2000): "Mex1 and Mex2 are essential for the development of cardiac mesoderm". *Development*, 127, 5115-5126.
- Kolpa, H. J., Peal, D. S., Lynch, S. N., Giokas, A. C., Ghatak, S., Mitra, S., Norris, B. A., Macne, C. A., Markwald, R. R., Ellins, P., Bischoff, J., y Milan, D. J. (2013): "miR-21 represses Pcd4 during cardiac valvulogenesis". *Development*, 140, 2172-2180.
- Kruithof, B. P., Duim, S. N., Moerkamp, A. T., y Goumans, M. J. (2012): "TGF β and BMP signaling in cardiac cushion formation: lessons from mice and chicken". *Differentiation*, 84, 89-102.
- Kruithof, B. P., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Pérez-Pomares, J. M., Weisse, F., Wessels, A., Moerman, A. E., y van den Hoff, M. J. (2006): "BMP and TGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage". *Dev Biol*, 299, 507-522.
- Kuppusamy, K. T., Sperber, H., y Rudolph-Baer, H. (2013): "MicroRNA regulation and role in stem cell maintenance, cardiac differentiation and hypertrophy". *Curr Mol Med*, 13, 757-764.
- Lagendijk, A. K., Goumans, M. J., Burkhard, S. B., y Bakkers, J. (2011): "MicroRNA-25 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production". *Circ Res*, 109, 649-657.
- Lavie, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Foellmer, R. E., Burch, J. B., y Evans, T. (1994): "GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut". *J Biol Chem*, 269, 23177-23184.
- Lee, H. C., Lo, H. C., Lo, D. M., Su, M. Y., Hu, J. R., Wu, C. C., Chang, S. N., Dai, M. S., Tsai, C. T., y Tsai, H. J. (2015): "Amiloride Induces Overexpression of Similar to Versican b to Repress the EGFR/Cdk5/Smad Signaling Axis during Cardiac Valve Formation of Zebrafish Embryos". *PLoS One*, 10, e0144731.
- Liang, X., Zhang, Q., Cattaneo, P., Zhuang, S., Gong, X., Spenn, N. J., Jiang, C., Gao, X., Zhao, X., Zheng, X., Bu, L., Wang, G., Chen, H. S., Zhuang, T., Yan, J., Geis, P., Luo, L., Banerjee, I., Chen, Y., Glass, C. K., Zamboni, A. C., Chen, J., Sun, Y., y Evans, S. M. (2013): "Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function". *J Clin Invest*, 123, 3256-3268.
- Libé, C. M., Searcy-Schrick, R. D., y Yutsey, K. E. (2000): "Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development". *Dev Biol*, 225, 169-180.
- Liu, L., Cui, L., Zhou, W., Dufort, D., Zhang, X., Cai, C. L., Bu, L., Yang, L., Martin, J., Kemler, R., Rosenfeld, M. G., Chen, J., y Evans, S. M. (2007): "Beta-catenin directly regulates *Id1* expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9313-9318.

- Lopez-Sanchez, C., Climent, V., Schoenwolf, G. C., Alvarez, I. S., y Garcia-Martinez, V. (2002): "Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors". *Cell Tissue Res*, 309, 237-249.
- Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., Garcia-Lopez, V., Aranea, A., y Garcia-Martinez, V. (2015): "Reciprocal repression between Fgf8 and miR-133 regulates cardiac induction through Bmp2 signaling". *Data Brief*, 5, 59-64.
- Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., Garcia-Lopez, V., Aranea, A., y Garcia-Martinez, V. (2015): "Negative Fgf8-Bmp2 feed-back is regulated by miR-130 during early cardiac specification". *Dev Biol*, 406, 63-73.
- López-Sánchez, C., y García-Martínez, V. (2011): "Molecular determinants of cardiac specification". *Cardiovasc Res*, 91, 185-195.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Mas, N., Gallan, C. M., y Garcia-Martinez, V. (2009): "Movement and commitment of primitive streak precardiac cells during cardiogenesis". *Int J Dev Biol*, 53, 1445-1455.
- Lozano-Velasco, E., Chinchilla, A., Martínez-Fernández, S., Hernández-Torres, F., Navarro, F., Lyons, G. E., Franco, D., y Aranea, A. E. (2011): "Plex2c modulates cardiac-specific transcription factors networks in differentiating cardiomyocytes from murine embryonic stem cells". *Cells Tissues Organs*, 194, 349-362.
- Lozano-Velasco, E., Galiano-Torres, J., Jodar-García, A., Aranea, A. E., y Franco, D. (2015): "miR-27 and miR-25 Distinctly Regulate Muscle-Enriched Transcription Factors in Cardiac and Skeletal Myocytes". *Biomol Res Int*, 2015, 391306.
- Lu, T. Y., Lin, B., Li, Y., Arora, A., Han, L., Cai, C., Corsonello, C., Sheng, Y., Benos, P. V., y Yang, L. (2013): "Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and PGF signaling pathways". *J Mol Cell Cardiol*, 63, 146-154.
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L., y Harvey, R. P. (1995): "Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene Nkx2-5". *Genes Dev*, 9, 1654-1666.
- MacNeill, C., French, R., Evans, T., Westek, A., y Burch, J. B. (2000): "Modular regulation of cGATA-3 gene expression in the developing heart and gut". *Dev Biol*, 217, 62-76.
- Mandal, A., Holowiecki, A., Song, Y. C., y Waxman, J. S. (2017): "Wnt signaling balances specification of the cardiac and pharyngeal muscle fields". *Mech Dev*, 143, 32-41.
- Marvin, M. J., Di Rocco, G., Cardiner, A., Bush, S. M., y Lassar, A. B. (2001): "Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm". *Genes Dev*, 15, 316-327.
- Meilhac, S. M., Kelly, R. G., Rocancourt, D., Eloy-Trinquet, S., Nicolas, J. E., y Buckingham, M. E. (2003): "A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals

- two phases of clonal growth in the developing mouse heart". *Development*, 130, 3877-3889.
- Mölgren, A. M., Smith, C. L., Olsen, G. S., Eskicelik, B., Zhou, B., Kazi, M. N., Ruiz, F. R., Pu, W. T., y Talbot, M. D. (2008). "Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations". *Circ Res*, 103, 1393-1401.
- Mercado-Pimentel, M. E., Hubbard, A. D., y Runyan, R. B. (2007). "Endoglin and Alk5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation". *Dev Biol*, 304, 420-432.
- Mercado-Pimentel, M. E., y Runyan, R. B. (2007). "Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart". *Cell Tissue Res*, 185, 146-156.
- Mesbah, K., Rana, M. S., Francis, A., van Duijnenbode, K., Papadimitou, V. E., Moorman, A. E., Kelly, R. G., y Christoffels, V. M. (2012). "Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis". *Hum Mol Genet*, 21, 1217-1229.
- Miquelot, L., Mura-Rascon, N., Beyer, S., Dupays, L., Meilhac, S. M., Buckingham, M. E., Franco, D., y Kelly, R. G. (2013). "Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system". *Circ Res*, 107, 153-161.
- Mommenteg, M. T., Domínguez, J. N., Wisse, C., Norden, J., de Gier-de Vries, C., Burch, J. B., Kispert, A., Brown, N. A., Moorman, A. E., y Christoffels, V. M. (2010). "The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development". *Cardiovasc Res*, 87, 92-101.
- Mommenteg, M. T., Soufan, A. T., de Lange, F. J., van den Hoff, M. J., Anderson, R. H., Christoffels, V. M., y Moorman, A. E. (2006). "Two distinct pools of mesenchyme contribute to the development of the atrial septum". *Circ Res*, 99, 351-353.
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N. A., Lamers, W., y Anderson, R. H. (2003). "Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks". *Heart*, 89, 806-814.
- Moorman, A. E., y Christoffels, V. M. (2003). "Development of the cardiac conduction system: a matter of chamber development". *Neurosci Found Symp*, 250, 25-34.
- Moorman, A. E., de Jong, F., Deryn, M. M., y Lamers, W. H. (1998). "Development of the cardiac conduction system". *Circ Res*, 82, 629-644.
- Moorman, A. E., y Christoffels, V. M. (2003). "Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution". *Physiol Rev*, 83, 1223-1267.
- Moorman, A. E., Soufan, A. T., Hagour, J., de Boer, P. A., y Christoffels, V. M. (2004). "Development of the building plan of the heart". *Ann NY Acad Sci*, 1015, 171-181.

- Norden, J., Grieskamp, T., Christoffels, V. M., Moorman, A. E., y Kispert, A. (2012): "Partial absence of pleuroparietal membranes in *Tbx18*- and *Wnt1*-deficient mice". *PLoS One*, 7, e35100.
- Pérez-Pomares, J. M., Carmona, R., González-Iriarte, M., Arenas, G., Westels, A., y Muñoz-Chápuli, R. (2002): "Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos". *Int J Dev Biol*, 46, 1005-1013.
- Pérez-Pomares, J. M., González-Rosa, J. M., y Muñoz-Chápuli, R. (2009): "Building the vertebrate heart - an evolutionary approach to cardiac development". *Int J Dev Biol*, 53, 1427-1443.
- Pérez-Pomares, J. M., Macías, D., García-Garrido, L., y Muñoz-Chápuli, R. (1997): "Contribution of the primitive esocardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos". *Dev Dyn*, 210, 96-105.
- Pérez-Pomares, J. M., Macías, D., García-Garrido, L., y Muñoz-Chápuli, R. (1998): "The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo; an immunohistochemical and quail-chick chimera study". *Dev Biol*, 200, 57-68.
- Pérez-Pomares, J. M., Phelps, A., Secmerova, M., Carmona, R., González-Iriarte, M., Muñoz-Chápuli, R., y Westels, A. (2002): "Experimental studies on the spatiotemporal expression of *WNT1* and *RAIDH2* in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs)". *Dev Biol*, 247, 307-326.
- Person, A. D., Klewer, S. E., y Runyan, R. B. (2005): "Cell biology of cardiac cushion development". *Int Rev Cytol*, 243, 287-335.
- Plagemán, T. E. Jr., y Yutzey, K. E. (2004): "Differential expression and function of *Tbx5* and *Tbx20* in cardiac development". *J Biol Chem*, 279, 19026-19034.
- Quattrocchi, M., Palazzolo, G., Agnolin, I., Martino, S., Bouché, M., Anastasia, L., y Sampaoli, M. (2011): "Synthetic sulfonil-hydrazones-1 positively regulates cardiomyogenic microRNA expression and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells". *J Cell Biochem*, 112, 2006-2014.
- Rana, M. S., Théveniau-Rissy, M., De Bono, C., Meshah, K., Franco, A., Rammah, M., Domínguez, J. N., Roux, M., Lefebvre, B., Anderson, R. H., Mobun, T., Zafran, S., Christoffels, V. M., y Kelly, R. G. (2014): "Tbx1 coordinates addition of posterior second heart field progenitor cells to the arterial and venous poles of the heart". *Circ Res*, 115, 790-799.
- Roberts, T. C., Blomberg, K. E., McGorey, G., Andaloussi, S. E., Godfrey, C., Betts, C., Coursindel, T., Gair, M. J., Elvard Smith, C. L., y Wood, M. J. (2012): "Expression Analysis in Multiple Muscle Groups and Serum Reveals Complexity in the MicroRNA Transcriptome of the mdx Mouse with Implications for Therapy". *Mol Ther Nucleic Acids*, 1, e39.

- Rowell, J., Koitabashi, N., Kass, D. A., y Barth, A. S. (2014): "Dynamic gene expression patterns in animal models of early and late heart failure reveal biphasic-bidirectional transcriptional activation of signaling pathways". *Physiol Genomics*, 46, 779-787.
- Ruiz-Villalba, A., y Pérez-Pomares, J. M. (2012): "The expanding role of the epicardium and epicardial-derived cells in cardiac development and disease". *Curr Opin Pediatr*, 24, 569-576.
- Saga, Y., Kitajima, S., y Miyagawa-Tomita, S. (2000): "Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development". *Trends Cardiovasc Med*, 10, 345-352.
- Schlange, T., André, B., Arnold, H. H., y Brand, T. (2000): "BMP2 is required for early heart development during a distinct time period". *Mol Dev*, 91, 259-270.
- Schoenwolf, G. C., y García-Martínez, V. (1995): "Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos". *Cell Mol Biol Res*, 41, 235-240.
- Schenrock, N., Harvey, B. P., y Mattick, J. S. (2012): "Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology". *Circ Res*, 111, 1349-1362.
- Shurwell, C., Binder, O., y Conlon, E. L. (2004): "T-box genes in early embryogenesis". *Dev Dyn*, 229, 201-218.
- Singh, M. K., Christoffels, V. M., Diaz, J. M., Trowe, M. O., Perry, M., Schuster-Gasser, K., Bürger, A., Ericson, J., y Kispert, A. (2005): "Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2". *Development*, 132, 2697-2707.
- Singh, R., Hongaars, W. M., Barnett, P., Griekamp, T., Rana, M. S., Buermans, H., Farin, H. E., Perry, M., Heallen, T., Martin, J. F., Moorman, A. E., 't Horn, P. A., Kispert, A., y Christoffels, V. M. (2012): "Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation". *Cell Mol Life Sci*, 69, 1377-1389.
- Sizem, A., Anderson, R. H., Christoffels, V. M., y Moorman, A. E. (2010): "Three-dimensional and molecular analysis of the venous pole of the developing human heart". *Circulation*, 122, 798-807.
- Sizem, A., Devalla, H. D., Anderson, R. H., Possir, R., Christoffels, V. M., y Moorman, A. E. (2011): "Molecular analysis of patterning of conduction tissues in the developing human heart". *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 4, 532-542.
- Sluijter, J. P., van Mil, A., van Vlier, R., Metz, C. H., Liu, J., Doevendans, P. A., y Gourmans, M. J. (2010): "MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 859-868.
- Snare, B. S., O'Neil, J. L., Chinnaiyapudi, M. B., Wirig, E. E., Phelps, A. L., Kalbala, S. W., y Westels, A. (2007): "Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development". *Circ Res*, 101, 971-974.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo y la patología cardiovascular.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR. VOLUMEN I. TÉCNICAS Y FUNDAMENTOS

- Staerk, L., Sheer, J. A., Ko, D., Benjamin, E. J., y Helm, R. H. (2017): "Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes". *Circ Res*, 120, 1501-1517.
- Stennard, F. A., Costa, M. W., Elliott, D. A., Rankin, S., Haas, S. J., Lai, D., McDonald, L. P., Niederreiter, K., Dolle, P., Bruneau, B. G., Zorn, A. M., y Harvey, R. P. (2003): "Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart". *Dev Biol*, 262, 206-224.
- Sugi, Y., Ito, N., Szabenyi, G., Myers, K., Fallon, J. E., Mikawa, T., y Maderwald, R. B. (2003): "Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation". *Dev Biol*, 258, 252-263.
- Sugi, Y., Yamamura, H., Okagawa, H., y Maderwald, R. B. (2004): "Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice". *Dev Biol*, 269, 505-518.
- Sun, M., Yan, X., Bian, Y., Caggiano, A. O., y Morgan, J. P. (2011): "Improving murine embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes with neuregulin-1: differential expression of microRNA". *Am J Physiol Cell Physiol*, 301, C21-30.
- Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C. L., Chen, J., y Evans, S. M. (2007): "Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells". *Dev Biol*, 304, 286-296.
- Takeichi, M., Nimura, K., Mori, M., Nakagami, H., y Kaneda, Y. (2013): "The transcription factors Tbx18 and Wt1 control the epicardial epithelial-mesenchymal transition through bi-directional regulation of Slug in murine primary epicardial cells". *PLoS One*, 8, e57829.
- Takeuchi, J. K., Ohgi, M., Koshida-Takeuchi, K., Shiratori, H., Sakaki, I., Ogura, K., Saijoh, Y., y Ogura, T. (2003): "Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis". *Development*, 130, 5953-5964.
- Torres, M., Franco, D., Lozano-Velasco, E., Hernández-Torres, F., Calviño, R., Aldama, G., Centeno, A., Castro-Beiras, A., y Mikhailov, A. (2015): "A MicroRNA-Transcription Factor Blueprint for Early Atrial Arrhythmogenic Remodeling". *Bioess Rev Int*, 2015, 263151.
- Van den Akker, N. M., Winkel, L. C., Nisaciglu, M. H., Maas, S., Wise, J. J., Armulik, A., Poelmann, R. E., Lie-Venema, H., Bersoltz, C., y Gittenberger-de Groot, A. C. (2008): "PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation". *Dev Dyn*, 237, 494-503.
- Verhoeven, M. C., Haase, C., Christoffels, V. R., Weidinger, G., y Bakkers J. (2011): "Wnt signaling regulates atrioventricular canal formation upstream of BMP and Tbx2". *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91, 435-440.

Papel funcional de ARN no codificantes en el desarrollo...
D. Franco et al.

- Vilches, J. M., Pulido, A., Hernández-Torres, F., Franco, D., y Arriaga, A. (2014): "miR-27b and miR-23b Modulate Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells". *J. Cardiovasc. Dev. Dis.*, 1, 41-51.
- Wang, J., Scudonogri, S., Dudas, M., Thonias, P., Nagy, A., Schneider, M. D., Epstein, J. A., y Kautmann, V. (2005): "Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart". *Dev Biol.*, 286, 299-310.
- Wang, J., Klysik, E., Sood, S., Johnson, R. L., Wehrens, X. H., y Martin, J. E. (2010): "Prrx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 9753-9758.
- Watanabe, Y., Zaffran, S., Kuroiwa, A., Higuchi, H., Ogura, T., Harvey, R. P., Kelly, R. G., y Buckingham, M. (2012): "Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by Tbx1, Nkx2-5, and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 18273-18280.
- Webb, S., Kamari, M., Anderson, R. H., Richardson, M. K., Brown, N. A. (2001): "Development of the human pulmonary vein and its incorporation in the morphologically left atrium". *Circulation*, 103, 632-642.
- Wilson, K. D., Hu, S., Venkatasubramanian, S., Fu, J. D., Sun, N., Abilez, O. J., Baugh, J. J., Jia, F., Ghosh, Z., Li, R. A., Burt, A. J., y Wu, J. C. (2010): "Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499". *Circ Cardiovasc Genet*, 3, 426-435.
- Wong, S. S., Rietner, C., Ramachandran, S., Arangui, J., Pitt, C., Chandra, P., Ling, Y. B., Yabur, O., y Bernstein, H. S. (2012): "miR-125b promotes early germ layer specification through Lin28/let-7d and preferential differentiation of mesoderm in human embryonic stem cells". *PLoS One*, 7, e36121.
- Wu, S. M. (2008): "Mesp1 at the heart of mesoderm lineage specification". *Cell Stem Cell*, 3, 1-2.
- Wu, S. P., Dong, X. B., Regan, J. N., Su, C., y Majesky, M. W. (2013): "Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels". *Dev Biol.*, 383, 307-320.
- Xiao, J., Liang, D., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, H., Liu, Y., Li, L., Liang, X., Sun, Y., y Chen, Y. H. (2011): "MicroRNA expression signature in atrial fibrillation with mitral stenosis". *Physiol Genomics*, 43, 655-664.
- Xu, X., Tao, X., Tian, B., Sanchez, E., Zeisberg, M., y Zeisberg, E. M. (2013): "Snail is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1a (HIF1a) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells". *J Biol Chem*, 288, 16653-16664.
- Zeng, B., Ren, X. F., Cao, F., Zhou, X. Y., y Zhang, J. (2011): "Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart". *J Biomol Sci*, 26, 18-27.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y más importante, tengo que dedicar este trabajo y agradecérselo a mi familia, sobre todo a mis padres, ya que gracias a su apoyo, cariño y comprensión, he podido llegar a culminar esta tesis doctoral. A mis hermanos Pedro y Pilar, a Encarni y Ramón y, especialmente, a mi pequeño sobrino Aaron que, aunque él aún no lo sepa, desde que vino a este mundo, la vida me resulta más bonita y me la alegra con sus monerías y sus risas, espero que algún día se sienta tan orgulloso de su tito Josema como yo lo estoy de él.

Han pasado por mi vida a lo largo de estos años de doctorado muchas personas que me han hecho ver la vida de diferentes formas, algunas para bien y otras para no tan bien, pero si algo tengo claro es que de todo se aprende. Estos años de trabajo en el laboratorio no sólo me han servido para poder realizar mi tesis doctoral, sino que también he aprendido muchas cosas que me sirven y me servirán en el día a día; a cómo afrontar mis errores, a seguir luchando por lo que se quiere, a ver la vida de otro modo... a intentar ser más feliz.

Agradecer a la Doctora Amelia Aránega, directora de esta tesis doctoral, su apoyo, sabiduría y paciencia conmigo. Todo este trabajo tampoco hubiera sido posible sin ella, desde que me propuso empezar mi investigación en su grupo supe que me embarcaría en una aventura de la que sin duda no me arrepentiría, y así ha sido. Muchas gracias Amelia.

Al Doctor Jorge Domínguez, Jorge, mi co-director, que, aparte de su confianza, su comprensión, su tiempo y su dedicación, me ha ofrecido su experiencia y conocimiento para pegar el último empujón a esta etapa que acaba. Gracias también por mostrarme la salida en las ocasiones en las que no veía claro la dirección que tomar para seguir con esto. Siempre tendréis en mí un alumno agradecido y espero haber estado a la altura de vuestras perspectivas.

Siempre, en cada etapa en la vida de uno, algunas personas dejan huella, yo, más que eso, también he logrado amistad. No podría escribir una página de agradecimientos sin mencionar a mi compañero, colega y gran amigo Dani. Son innumerables las anécdotas en nuestra época de doctorado. Anécdotas que nos han unido como amigos, hemos pasado malos ratos en el laboratorio, pero por supuesto que muchísimos buenos y espero que así siga siendo. Tu sempiterno buen humor a pesar de los palos que suele dar la vida a veces, es un modelo a seguir.

Ángel, otro gran amigo que vino a mi vida durante estos años. Cómo no echarte de menos cuando decidiste irte a la otra punta del mundo a probar suerte. Nos quedamos solos sin tus regañinas, sin tu carácter gruñón pero afable y sin tus carcajadas tan sonoras.

Cómo no recordar con nostalgia los buenos momentos que pasamos los tres.

Gracias también a Estefanía que nos enseñó con paciencia y buen hacer, gran parte de los experimentos en nuestra investigación y que además nos brindó con su amistad. Una compañera y amiga admirable como científica y como persona.

También tengo que nombrar a Rocío, esa gaditana alegre y jacarandosa que entraba en nuestro laboratorio con su sonrisa y su gracia a alegrarnos la jornada y a contagiarnos con su buen humor.

Fueron tiempos raros allá cuando empecé en el grupo CVR (*cardiovascular research*) con mi trabajo de fin de máster. Era el novato y aún no me manejaba nada bien en las técnicas de laboratorio. Por allí había muchos buenos científicos y buenas personas a la vez. Algunos ya tomaron otros caminos y partieron, pero siempre se les recuerda y se les desea lo mejor. Gracias a Antonio y Maribel, nuestros antiguos técnicos que me enseñaron el trabajo en el

laboratorio, a coger buenos hábitos, a familiarizarme con todo... a empezar mi investigación.

Gracias a Fernando, por enseñarme tanto y por tu buen rollo. A Paquito, no me extraña que tus alumnos te quieran tanto. Tu compañía siempre agradable y tu buen hacer como investigador son claves en ti. Fue una suerte trabajar codo con codo contigo.

También agradecer por supuesto y dedicar este trabajo al Doctor Diego Franco por todo lo que me ha enseñado y ayudado y por confiar en mí como investigador y por ser una gran persona en el trato con los demás.

Como ya he dicho antes, empecé sin apenas saber nada, y la ayuda de mis compañeros antes nombrados me fue muy valiosa. Con el tiempo se incorporaron nuevos compañeros a los que intenté ayudar y enseñar lo mejor que pude. Compañeros a los que guardo un gran cariño y a los que sigo teniendo presentes y a los que también dedico mi tesis.

Almudena, al principio fue como nuestra “peque” pero pronto se supo adaptar y a aprender. Trabajadora, constante y tenaz.

Carlos, qué decir de Carlos, un torbellino en el laboratorio pero currante como él solo. Un buen fichaje, gracioso, extrovertido y buena gente.

María del Mar, Eme para nosotros. Mi querida Eme, la humildad y la gracia hechas persona. Todo lo que pienso de ti ya lo sabes, podría escribir párrafos pero me alargaría mucho. Pero sí te digo que también fuiste una gran ayuda y apoyo moral en el laboratorio. Siempre hace falta gente como tú.

Piedi, otro gran fichaje, gracias por ayudarme en los últimos experimentos y por aprender tan rápido y ser tan cuidadosa y tan perfeccionista con todo. Y perdona por esos “susto-bromas” con los que te atormentaba de vez en cuando para echarnos unas risas.

A Simón, por seguir mis experimentos y toma de datos mientras yo ya no podía estar en el laboratorio en los últimos meses por temas laborales. Mereces una mención especial tú también.

También tengo que mencionar a Lara como compañera, sigue trabajando ya que el talento ya lo tienes. Sin duda llegarás lejos.

Y por último, la que espero que sea la próxima en el grupo en ser doctora. Feli, aprovecha este último tirón y pronto tendrás tu recompensa. Espero que te siga yendo todo muy bien.

Agradecimientos.

Gracias a todos y cada uno de los que habéis estado presentes, tal vez me olvide de mucha gente pero espero que disculpen mi mala memoria y se den por agradecidos.

Quiero también dedicar mi tesis a los que han sido y son mis amigos de toda la vida, no pondré los nombres porque me extendería muchísimo por suerte, pero sí mencionar a mis amigos de mi peña de Canena, mi pueblo. Mis *Gatitos de la Rábida* con los que hice el máster, en especial a una gatita que me estará viendo desde su estrella.

Mis amigos de Granada y Almería de mi época de estudiante.

Y a mis familiares.

A todos ellos GRACIAS por vuestro interés en cómo iba mi tesis, en vuestros “ánimo que al final lo conseguirás” y por vuestro apoyo.

MUCHAS GRACIAS.