

Universidad de Extremadura
Departamento de Anatomía,
Biología Celular y Zoología

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE LA COOPERACIÓN FGF/BMP EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN EL PROCESO DE CARDIOGÉNESIS

Memoria presentada por

Carlos Manuel Gañán Serrano

para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Extremadura

Badajoz, 2012

Badajoz a 12 de Junio de 2.012

Los Profesores Carmen López Sánchez y Virginio García Martínez,
del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología,

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada:

**“Papel de la cooperación FGF/BMP en las vías de señalización
que regulan el proceso de cardiogénesis”**

realizada por D. Carlos Manuel Gañán Serrano

INFORMAMOS

Que reúne las características idóneas para ser defendida ante el Tribunal que la
Universidad de Extremadura designe a tal efecto.



Dra. Carmen López Sánchez



Dr. Virginio García Martínez

Carlos Manuel Gañán Serrano ha sido beneficiario de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador de la Junta de Extremadura (PRE06134).

Esta investigación ha sido financiada por ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad, co-financiadas por FEDER (BFU2007-66350-BFI) y de la Consejería de Empleo, Empresa e Innovación (Dirección General de Modernización e Innovación Tecnológica) de la Junta de Extremadura, cofinanciadas por FSE y FEDER (3PR07A005, GR10067).



AGRADECIMIENTOS

Primero al profesor Ignacio Santiago Álvarez por acordarse de un estudiante de Biología recién licenciado para una ocupación a la que no hubiese aspirado de otra manera. La cual me ha permitido descubrir el mundo de la investigación biomédica de primera mano durante prácticamente 5 años de la mano de profesionales de primera línea.

En el desarrollo de este trabajo primero de todo tengo que destacar el apoyo durante la parte más ardua del trabajo de Carmen en la que pude extraer no sólo conocimientos valiosos, sino valores como la disciplina y el trabajo. Así como la tutela y orientación del primer y último responsable de todo el trabajo, Virginio.

A los Dres. Juan Hurlé, Diego Franco y Catalina Hernández, por su generosa ayuda cediendo varios de los factores moleculares utilizados en los experimentos realizados.

En todo este tiempo rodeado de botes, tubos, soluciones también me ha permitido conocer gente que más allá del aspecto científico y de desarrollo del trabajo. Primero aquellos con los que he compartido más horas, empezando por los compañeros venidos de tierras lusas, Ana y sobre todo Ricardo, con los cuales he compartido más horas en laboratorio y fuera de él (la que llaman la "*otra ciencia*"). Tampoco se puede olvidar a los venidos de Madrid Óscar y Quique y a Marga a la que deseo suerte "*con el corazón*".

Paloma, Marisabel y las "*niñas de prácticas*" merecen mi reconocimiento por su colaboración, por el apoyo y entusiasmo.

Tampoco puedo olvidar al resto de miembros del área de Anatomía en especial Maribel, Vicente y Gloria por su cercanía y consejos en el tiempo que estuve allí.

Por último y no menos importante no se puedo olvidar a mis padres y sobre todo a mi hermano Álvaro que me han acompañado en los buenos momentos y en los malos han sabido estar siempre ahí.

RESUMEN

Recientemente ha cobrado una gran relevancia el interés por conocer y entender los reguladores moleculares responsables del desarrollo del corazón. En la presente Tesis Doctoral analizamos los determinantes moleculares de la especificación cardiaca de las células programadas para formar el corazón. Nosotros analizamos las células precardiacas desde su localización inicial a nivel de la línea primitiva, y posterior migración hacia mesodermo precardiaco y constitución del tubo cardiaco, sus características moleculares, el patrón de expresión de genes específicos y los factores implicados en la inducción o represión de la especificación cardiaca.

Para ello, hemos planteado una serie de estudios experimentales, utilizando como modelo el embrión de pollo. Actuando sobre embriones en cultivo, hemos llevado a cabo experimentos de ganancia de función, utilizando diferentes factores, entre ellos *Fgf8*, *Bmp2* y miR-130, mediante técnicas de electroporación y aplicación de esferas acrílicas sobre las células precardiacas, desde fases muy iniciales del desarrollo. Simultáneamente, hemos llevado a cabo experimentos de pérdida de función mediante *Fgf8* siRNA; SU5402, bloqueante de la señal FGF; nogina, inhibidor de *Bmp*; y anti-miR-130.

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de *Fgf8* conduce a una disminución de la expresión de los factores de transcripción *Nkx-2.5*, el primer marcador de diferenciación cardíaca, y *Gata4*. Además, disminuye la expresión de *Bmp2*. Los experimentos de sobreexpresión de *Bmp2* conducen a un incremento de expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*, así como a una disminución de la expresión de *Fgf8* y de la señal *Erk1/2* a nivel de los tubos endocárdicos. Estos datos son concordantes con nuestros resultados obtenidos mediante los experimentos de pérdida de función, que establecen efectos opuestos a los referidos.

Adicionalmente, hemos analizado el papel de miR-130, un microRNA que se une a secuencias específicas en el 3'UTR del gen diana *Erk1/2 (Mapk1)*. Observamos que la expresión de *miR-130* se localiza en el mesodermo precardiaco y su correspondiente endodermo adyacente del campo cardiaco primario. Nuestros experimentos de sobreexpresión de miR-130 ponen de manifiesto que suprime la expresión de *Fgf8* a nivel de los tubos endocárdicos, e induce la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*; además, controla la expresión de *miR-133*, también específico de áreas precardiacas; y lo más relevante, induce un incremento de la expresión de *Bmp2*, un factor que mantiene una íntima relación con otros aquí analizados, dentro de la vía de las catecolaminas, poniendo de manifiesto un papel activo de estos factores en el proceso de diferenciación cardíaca.

En conjunto, nuestros resultados sugieren un proceso de *feed-back* negativo entre *Bmp2* y *Fgf8*, regulado a través de miR130 y mediado por la señal de *Erk1/2*, lo que constituye un elemento crucial que participa en el patrón preciso del desarrollo temprano del corazón.

Palabras clave: cardiogenesis, Fgf, Bmp, microRNAs, electroporación

ABSTRACT

Over the last few years, the challenge to understand those molecular determinants responsible for heart development has taken on special relevance. In the present Doctoral Thesis, we analyze the molecular determinants of cardiac specification of cells programmed to form the heart. With this perspective, we examine the prospective cardiogenic cells, from their initial location, at primitive streak level, and their migration to precardiac mesoderm and primitive cardiac tube formation, their molecular characteristics, specific gene expression patterns, and those inductive and repressive factors involved in cardiac specification.

We use chick embryo in culture as a model to design groups of experiments based in gain- and loss-of-function. We perform gain-of-function experiments through electroporation and acrylic beads application on the prospective cardiogenic cells from the initial gastrulation by using Fgf8, Bmp2 and miR-130. Simultaneously, we perform loss-of-function experiments by means of Fgf8 siRNA; SU5402, blocker of FGF signal; noggin, which antagonizes Bmp activity; and anti-miR-130.

Our results show that over-expression of Fgf8 lead to a decrease in the transcription factor Nkx-2.5 expression, the earliest marker of cardiac differentiation, and Gata4. Moreover, Fgf8 over-expression decreases Bmp2. Our experiments based on Bmp2 over-expression resulted in an increased Nkx-2.5 and Gata4 expressions, as well as suppression of Fgf8 expression and reduction of Erk1/2 staining, at endocardial tube level. These data agree with the results we obtained by means of loss-of-function experiments, that show the opposite effects.

Additionally, we analyze the role of miR-130, a microRNA that binds to specific sequences in the 3'UTR of target gene Erk1/2 (Mapk1). We observe that miR-130 expresses at precardiac mesoderm and underlying endoderm levels of the primary cardiac field. Our results show that over-expression of miR-130 suppresses Fgf8 expression at both primitive endocardial tube levels, and induces Nkx-2.5 and Gata4 expressions. Furthermore, it regulates miR-133 expression, specifically expressed in precardiac areas. The most relevant data, over-expression of miR-130 increase Bmp2 expression, a molecular factor which maintains a close relationship with other factors here analyzed, such as catecholamines pathways, which reveals an active role of these factors in the process of cardiac differentiation.

All those data support the establishment of a negative feed-back between Bmp2 and Fgf8 mediated by miR-130 expression and Erk1/2 signal, constituting a crucial element in the precise patterning and early development of the heart.

Keywords: cardiogenesis, Fgf, Bmp, microRNAs, electroporation

ÍNDICE

Introducción	11
Objetivos	14
Estado actual del tema:	16
Diferenciación y morfogénesis cardiaca	17
Regulación génica del desarrollo cardiaco:	21
Genes determinantes del proceso de cardiogénesis	22
Genes relacionados con el proceso de morfogénesis cardiaca	24
Papel de los microRNAs en el desarrollo del corazón	27
Material y Métodos:	30
I. Diseños experimentales:	31
A. Experimentos de ganancia de función	31
B. Experimentos de pérdida de función	31
II. Técnicas de estudio en embriones completos:	32
1.- Electroporación <i>in vitro</i>	32
2.- Aplicación de esferas acrílicas	33
3.- Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	34
4.- Técnica inmunohistoquímica IMH)	34
5.- Técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM)	35
III. Apéndice	36
A. Procedimientos desarrollados	36
B. Número de embriones experimentales. Tablas I y II	40
C. Preparación de placas de cultivo	41
D. Elaboración de Soluciones	41
Resultados:	45
I.- Análisis del papel de Fgf8 en el desarrollo cardiaco	46
II.- Análisis del papel de Bmp2 en el desarrollo cardiaco	49
III.- Análisis del papel del <i>miR-130</i> en el desarrollo cardiaco	52
IV.- Regulación de <i>miR-133</i> por Bmp2 y <i>miR-130</i>	57
Discusión	60
Conclusiones	68
Bibliografía	71

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los factores que determinan el desarrollo del sistema cardiovascular sigue, hoy día, siendo uno de los más importantes retos que la biología del desarrollo tiene planteados. En los estadios iniciales del desarrollo embrionario, el sistema circulatorio es la primera unidad funcional en constituirse, siendo el corazón el primer órgano que comienza a funcionar, para poder suministrar los requerimientos nutricionales y de oxígeno, que no pueden ser satisfechos por difusión, cuando el embrión comienza a ser más complejo.

En embriones de aves las células que van a formar el corazón han sido identificadas a nivel del epiblasto y de la línea primitiva, justo caudales al organizador o nódulo de Hensen (Selleck y Stern, 1991; García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995; López-Sánchez et al., 2001). Numerosos estudios previos han mostrado que las células precordíacas de la línea primitiva se invaginan para formar el mesodermo precordíaco en la región rostral, a ambos lados del embrión, constituyendo junto con su endodermo adyacente el campo cardíaco primario (zona precordíaca o regiones formadoras de corazón; Rawles, 1943; Rosenquist y DeHaan, 1966; Stalsberg y DeHaan, 1969; García-Martínez y Schoenwolf, 1993; García-Martínez et al., 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995; Ehrman y Yutzey, 1999; Harvey, 2002; Brand, 2003, Lawson y Schoenwolf 2003; Martinsen 2005; Lopez-Sanchez et al., 2009). Posteriormente, las células del mesodermo precordíaco, localizadas a nivel de la hoja esplacnopleura del mesodermo lateral, se diferencian y se organizan para constituir ambos tubos endocárdicos primitivos (DeHaan, 1965; Rosenquist, 1970; González-Sánchez y Bader, 1990, Peng et al., 1990; Linask y Lash, 1993; Eisenberg y Bader, 1995, 1996; Sugi y Markwald, 1996; Buckingham et al., 2005; Martinsen 2005; Hutson et al., 2010), que se fusionan en la línea media para formar el lineal tubo cardíaco primitivo (Hurlé y Ojeda, 1977; Manasek et al., 1986; Haunstetter e Izumo, 1998; Manner, 2000; Martinsen 2005; Buckingham et al., 2005; Abu-Issa y Kirby 2008; Cui, et al., 2009), con un extremo caudal, venoso, atrial, y un extremo craneal, arterial, ventricular. Un proceso morfogénético complejo determina que tenga lugar en el tubo una incurvación, dando lugar a la formación del asa cardíaca, determinando que su polo venoso llegue a ocupar una posición más rostral, justo dorsal al polo arterial. En estos estadios, otros grupos celulares procedentes del mesodermo faríngeo, de relevancia aún no bien determinada, contribuyen a la formación de diferentes zonas del corazón embrionario, fundamentalmente en el polo arterial, constituyendo el campo cardíaco secundario (Mjaatvedt et al., 2001; Kelly et al., 2001; Waldo et al., 2001; Abu-Issa, 2004; Dyer y Kirby, 2009; Rochais, et al., 2009). De modo concomitante a la formación del asa cardíaca tiene lugar un proceso de segmentación (atrio-ventricular) y de tabicación para constituir las cuatro cámaras que caracterizan al corazón adulto (García-Martínez y Hurlé 1986; Hurlé et la., 1986; Manner, 2000).

A pesar del amplio número de estudios centrados en el análisis de los factores que determinan el desarrollo cardíaco, existen aún numerosos aspectos oscuros e incluso controvertidos. En los últimos años ha cobrado especial relevancia el interés por conocer los mecanismos moleculares que regularían el proceso de cardiogénesis y morfogénesis cardíaca (Brand et al., 2002; Zaffran y Frasch, 2002; Brand, 2003; Dunwoodie, 2007; Kirby, 2007; Miazga y McLaughlin 2009; Lopez-Sanchez y Garcia-Martinez, 2011). El conocimiento de los genes que

se expresan específicamente a nivel del corazón, así como los factores que regulan su expresión, constituyen hoy día el aspecto más relevante, no sólo por su implicación en el desarrollo, sino también por su potencial repercusión en el establecimiento de estrategias terapéuticas y medicina regenerativa.

Hoy día es asumido que la primera manifestación del proceso de diferenciación hacia miocardiocito vendría determinada por la expresión del factor de transcripción *Nkx-2.5* (*tinman*) a nivel de las células del mesodermo precardiaco del campo cardíaco primario (Schultheiss et al., 1995). La expresión de *Nkx-2.5* estaría regulada por proteínas secretadas a nivel del endodermo adyacente, fundamentalmente *Bmp2* (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000) y *Fgf8* (Alsan y Schultheiss, 2002). Estos datos han sido obtenidos a partir de estudios experimentales en embrión de pollo, en los que se ha puesto de manifiesto que la administración de BMP2 tiene capacidad de inducir la expresión de *Nkx-2.5*, pero sólo cuando se aplica en una localización medial al campo cardíaco primario. Por otro lado, la administración experimental de FGF8 ha mostrado ser capaz de inducir la expresión de *Nkx-2.5*, pero en este caso sólo cuando se aplica lateral al campo cardíaco primario, mostrando además la capacidad dosis-dependiente de BMP2 para inducir la expresión de *Fgf8* (Alsan y Schultheiss, 2002).

Recientemente, como responsables del proceso de cardiogénesis, se ha implicado a los microRNAs, pequeñas secuencias de RNA de 20-26 nucleótidos, como posibles factores reguladores centrales de la expresión de genes durante el desarrollo embrionario (He y Hannon, 2004, Zhao y Srivastava, 2007; Espinoza-Lewis y Wang, 2012). Del mismo modo, variaciones en sus niveles estarían asociadas con diferentes patologías cardíacas en humanos (Cordes et al., 2010; Chen y Wang, 2012; Osman 2012; Papageorgiou et al., 2012; Wang y Yang, 2012). Estos microRNAs están conservados y actúan a nivel post-transcripcional para el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis del organismo (Zhao y Srivastava, 2007), y muchos microRNAs son expresados en numerosos tejidos específicos incluyendo el corazón (Darnell et al., 2006; Cordes et al., 2010; Chinchilla et al., 2011; Malizia y Wang, 2011; Espinoza-Lewis y Wang, 2012).

En un intento de aportar nuevos datos sobre los factores de transcripción y moléculas que determinan el proceso de inducción y diferenciación cardíaca, en la presente Tesis Doctoral, hemos realizado un estudio en embriones de aves, basado en experimentos de ganancia y pérdida de función, al objeto de analizar su papel regulador y modulador en las vías de señalización que regulan el desarrollo cardíaco.

OBJETIVOS

En la Presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes Objetivos:

- 1.- Analizar el papel de Fgf8 en el proceso de inducción cardíaca.
- 2.- Determinar el papel de Bmp2 en los mecanismos de especificación cardíaca.
- 3.- Caracterizar el papel modulador de miR-130 en las vías de señalización cardíaca.
- 4.- Caracterización del papel de otros factores que pudieran actuar en combinación con los anteriores.
- 5.- Establecer criterios de una cooperación entre los diferentes factores moleculares, como base de los mecanismos responsables de la inducción y mantenimiento de la diferenciación cardíaca.

ESTADO ACTUAL DEL TEMA

En los estadios iniciales del desarrollo embrionario, el sistema circulatorio es la primera unidad funcional en constituirse, siendo el corazón el primer órgano que comienza a funcionar, para poder suministrar los requerimientos nutricionales y de oxígeno, que no pueden ser satisfechos por difusión, cuando el embrión comienza a ser más complejo. Se desarrolla inicialmente como una estructura tubular sencilla, hasta constituir un órgano maduro, tetracameral, con un alto grado de complejidad.

Diferenciación y morfogénesis cardíaca

En el desarrollo cardíaco se distinguen dos aspectos fundamentales: el proceso de cardiogénesis, que incluye aquellos mecanismos que promueven la diferenciación y especificación de las células precardiacas, y el proceso de morfogénesis cardíaca, que incluiría los procesos de distribución organizada de las células, para conseguir una completa morfología y formación del corazón adulto (García-Martínez et al., 1993, 1997; López-Sánchez et al., 2001, 2004, 2005).

El modelo de estudio para los primeros estadios de gastrulación en el desarrollo humano y mamíferos es el embrión de ave y reptil fundamentalmente, debido al aspecto similar a nivel morfológico y a la facilidad en la manipulación de estos embriones *in vivo*.

Desde el punto de vista experimental, se ha puesto de manifiesto en embriones de aves que las células precardiacas son identificables, incluso antes de la gastrulación (Figura 1), a nivel de la mitad rostral del ectodermo (*epiblasto*), laterales a la línea primitiva e inmediatamente caudales al nódulo de Hensen (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995; López-Sánchez et al., 2001; Lawson y Schoenwolf, 2003). Al comienzo de la fase de gastrulación, las células precardiacas se dirigen hacia la línea media del embrión (Rawles, 1943; Hatada y Stern, 1994; Tam et al., 1997), se invaginan a través de zonas determinadas de la línea primitiva, situadas justo caudalmente al nódulo de Hensen (Selleck y Stern, 1991; García-Martínez y Schoenwolf, 1993; López-Sánchez et al., 2001), y migran rostrolateralmente en distribución bilateral, a ambos lados del nódulo de Hensen, hasta situarse a nivel de la placa mesodérmica, constituyendo las áreas de mesodermo precardiaco, que junto con su endodermo adyacente determinan la zona precardiaca, regiones formadoras de corazón o campo cardíaco primario (Rawles, 1943; Rosenquist y DeHaan, 1966; Stalsberg y DeHaan, 1969; García-Martínez y Schoenwolf, 1993; García-Martínez et al., 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995; Tam et al., 1997; Ehrman y Yutzey, 1999; Harvey, 2002; Brand, 2003; Cui et al., 2009), que van a contribuir a la formación del endocardio y del miocardio (Peng et al., 1990; Linask y Lash, 1993; Eisenberg y Bader, 1995).

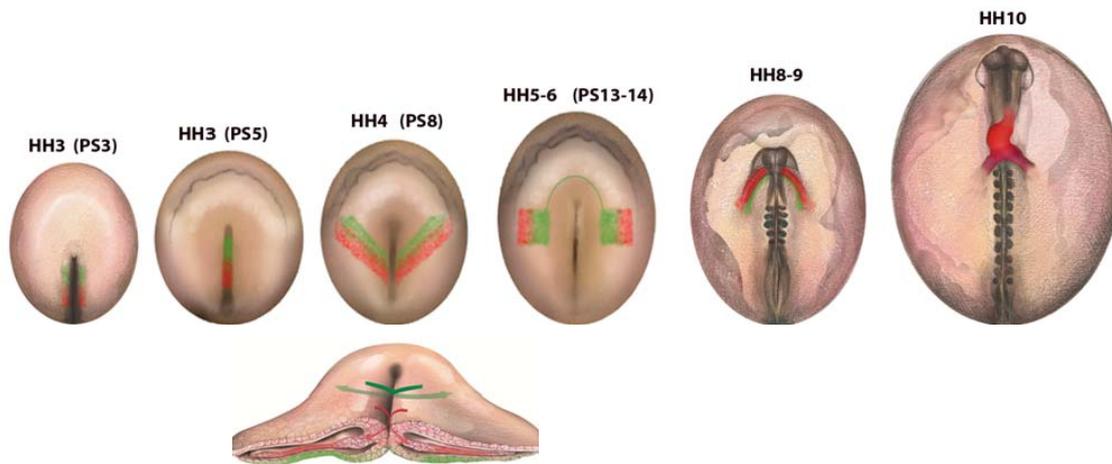


Figura 1.- Esquema de un embrión de pollo en fase de gastrulación mostrando en color rojo la localización de las células precardiacas, desde la línea primitiva hasta su posterior localización a nivel del tubo cardíaco primitivo. En verde están representadas las células que formarán el endodermo adyacente al mesodermo precardiaco.

Se ha determinado que más de la mitad rostral de la línea primitiva en esta fase del desarrollo contiene células precardiacas (Figura 2), con excepción del extremo más rostral de ésta, el nódulo de Hensen, el cual contribuye esencialmente a la formación de la notocorda, del mesénquima de la cabeza y al endodermo del intestino anterior (Schoenwolf et al., 1992; García-Martínez y Schoenwolf, 1992; Garcia-Martínez et al., 1993, 1997; López-Sánchez et al., 2002; Lawson y Schoenwolf, 2003). El mesodermo precardiaco establece una estrecha relación con el endodermo anterior, que ha sido implicado en el proceso de diferenciación del corazón embrionario (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Martinsen, 2005; Lopez-Sanchez et al., 2009). El mesodermo precardiaco posee carácter bipotencial en su línea de diferenciación, lo que significa que dará origen a células endocárdicas y miocárdicas (Rosenquist, 1970; Peng et al., 1990; Linask y Lash, 1993; Eisenberg y Bader, 1995, 1996; Sugi y Markwald, 1996; Buckingham et al, 2005; Martinsen, 2005; Hutson et al., 2010).

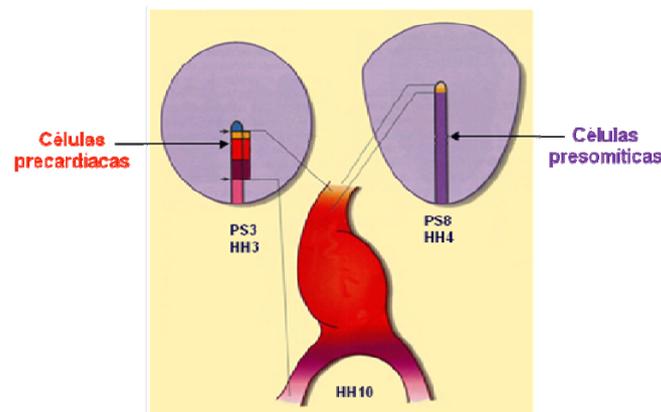


Figura 2.- Esquema de un embrión en fase de gastrulación mostrando la localización de las células precardiacas a nivel del epiblasto y la línea primitiva y su posterior localización a nivel del tubo cardíaco primitivo.

Inicialmente, el mesodermo se constituye por una capa simple de células, pero, a medida que avanza el desarrollo, el mesodermo lateral comienza a separarse en dos capas, la capa de mesodermo esplácnico y la capa de mesodermo somático, con las células precardiacas contenidas dentro de la capa de mesodermo esplácnico (DeHaan, 1965; González-Sánchez y Bader, 1990). Posteriormente, la distribución de las células precardiacas adquiere una característica forma de media luna (Cui et al., 2009), constituyéndose las crestas o áreas cardíacas; que sufren un proceso de diferenciación que dará lugar a la formación de una estructura par, los tubos endocárdicos primitivos (Sugi y Lough, 1994; Sugi y Markwald, 1996; Buckingham et al, 2005; Martinsen, 2005; Hutson et al., 2010).

Debido al cierre de la placa neural y también a la elongación de las vesículas encefálicas, el sistema nervioso central crece y se expande sobre la región cardiogénica central y la futura cavidad pericárdica. De forma concomitante a este crecimiento del sistema nervioso y a la flexión cefalocaudal del embrión, los tubos endocárdicos son desplazados hacia la región rostral para posteriormente aproximarse y fusionarse en la línea media del embrión (Manasek et al., 1986; Haunstetter e Izumo, 1998; Manner, 2000; Abu-Issa y Kirby, 2008). La fusión comienza en el extremo cefálico de los tubos (Figuras 1 y 3) y se extiende en dirección caudal, de tal modo que se forma un tubo cardíaco único, denominado tubo cardíaco primitivo (Hurlé y Ojeda, 1977; Haunstetter e Izumo, 1998; Cui et al., 2009), con capacidad contráctil, y estructuralmente constituido por un tapiz endotelial interno, el endocardio, por la pared muscular o miocardio, y por el epicardio, que recubre el exterior del tubo. El miocardio está formado por elementos contráctiles que se orientan de forma aparentemente aleatoria y circunferencial (Itasaki et al., 1989; Shiraishi et al., 1992). La parte interna del miocardio secreta matriz extracelular, la gelatina cardíaca, que se acumula separando al miocardio del endocardio (Kitten et al., 1987; Manasek, 1970, 1975, 1976). El epicardio se diferencia a partir de las células mesoteliales del mesodermo esplácnico. Estas células migran desde el mesocardio dorsal, a nivel del seno venoso desde donde avanzan hasta cubrir por completo el miocardio (Muñoz-Chápuli et al., 2002; Van Wijk et al., 2009).

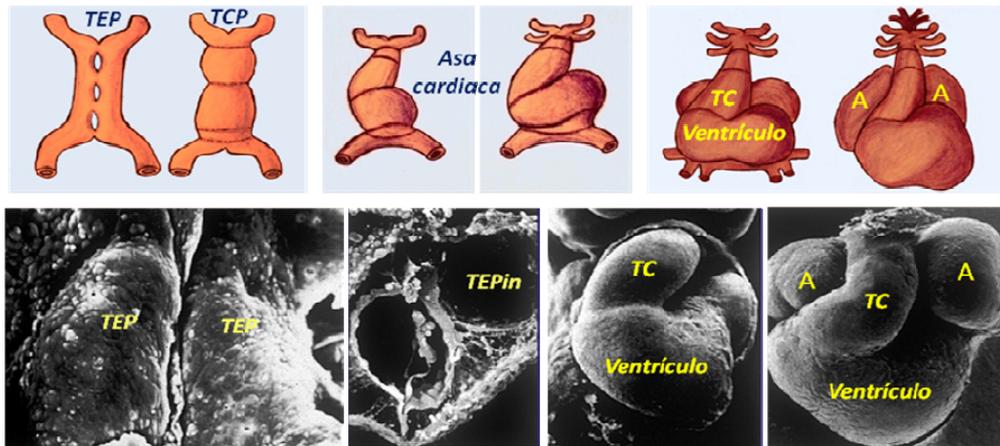


Figura 3.- En la línea superior un esquema de la fusión de los tubos endocárdicos primitivos y la formación del asa cardíaca, con la posterior segmentación del corazón. TEP: tubos endocárdicos primitivos. TCP: tubo cardíaco primitivo. TC. Tronco-cono. A: Atrio. En la línea inferior una secuencia de imágenes de microscopía electrónica de barrido de las fases señaladas en el esquema.

El tubo cardíaco primitivo conecta en la parte craneal con la aorta ventral y en la zona caudal con las venas vitelinas. La superficie ventral del corazón está libre en la cavidad pericárdica, y suspendida en el líquido pericárdico. Dorsalmente, el corazón está unido a la pared del tubo digestivo por el mesocardio dorsal (Waldo et al., 2001; Abu-Issa et al., 2004; Martinsen, 2005; Abu-Issa y Kirby, 2008). En el curso del desarrollo sufrirá un proceso de incurvación hacia la derecha y un giro ventrocaudal (DeHaan, 1965; Fishman y Chien, 1997; Levin et al., 1997) que dará lugar a la formación de una estructura denominada asa cardíaca, inicialmente con forma de “C” (Figuras 1 y 3) y al progresar el plegamiento del cuerpo embrionario, el mesocardio dorsal se interrumpe en la región media del corazón, liberándose más del cuerpo embrionario, adquiriendo posteriormente forma de “S” (Manasek et al., 1972, 1986; Taber et al., 1995). Este desplazamiento del tubo cardíaco primitivo constituye una de las primeras señales de asimetría izquierda-derecha en el embrión (Olson y Srivastava, 1996; Fishman y Chien, 1997; Lin y Taber, 1994; Taber et al., 1995; Zamir et al., 2003; Voronov et al., 2004; Nerurkar et al., 2006; Ramasubramanian et al., 2006).

El plano corporal de los vertebrados exhibe simetría bilateral, mientras que los órganos internos se encuentran localizados asimétricamente en relación con los lados, izquierdo y derecho, de la línea media. El corazón es el primer órgano que presenta una asimetría izquierda-derecha, ya que gira hacia la derecha inicialmente durante la embriogénesis. Las anomalías en la disposición de los órganos internos a menudo están asociadas a malformaciones cardíacas congénitas. La mayor parte de los casos de lateralidad incorrecta dan lugar a disfunciones cardíacas severas debidas a la inversión del asa cardíaca (Ruiz-Lozano et al., 2001).

Simultáneamente a la formación del asa cardíaca se produce la segmentación o regionalización del corazón embrionario (Figura 3). De tal forma que se constituyen y diferencian las distintas partes del corazón: seno venoso en el polo caudal, atrio o aurícula y ventrículo primitivos, y *bulbus cordis*, región tronco-conal, o polo arterial, en el extremo cefálico (Kramer, 1942). La primera manifestación morfológica del proceso de regionalización (Manner, 2000) consiste en un aumento del grosor del tubo cardíaco a nivel de los 2/3 más rostrales, identificándose una región más gruesa ventricular; inmediatamente craneal se localiza el tracto de salida. Posteriormente se completa el giro a la derecha y muestra el primer esbozo del sector atrial. Además del tracto de salida y el sector atrial y ventricular, se observa un surco interventricular que lo divide en dos sectores. De modo concomitante a la aparición del tracto de salida en el polo arterial, formación del ventrículo primitivo y aurícula primitiva, se constituye el seno venoso, expansiones que aparecen caudales al sector atrial (Moorman y Christoffels, 2003). A nivel de la aurícula primitiva se producirán expansiones laterales. La aurícula izquierda crece antes, lo que provoca el desplazamiento del seno venoso. A nivel ventricular también se produce una expansión diferenciada de los dos ventrículos, izquierdo y derecho, que acentúa el surco interventricular.

La septación o tabicación consiste en un proceso basado en la formación del septum atrial y septum ventricular, necesarios para la separación de la doble circulación del corazón, así como la formación del aparato valvular, que se localizará en la región atrioventricular y tracto de salida cardíaco. Comienza con el crecimiento en grosor del miocardio (hasta entonces era una sola capa), formando estructuras trabeculares que invaden la luz ventricular. El primer paso consiste en la aparición de la barra media, localizada en el centro de la cavidad cardíaca, en sentido dorso-ventral, separando parcialmente el sector atrial del sector ventricular, y permitiendo la comunicación entre ambos a través de los canales atrioventriculares, izquierdo y derecho, donde se desarrollará el aparato valvular atrioventricular, mitral y tricuspídeo (García-Martínez y Hurle, 1986, 1988; García-Martínez et al., 1987, 1990, 1991; Kirby, 2007).

Regulación génica del desarrollo cardíaco

En los últimos años ha sido evidente el avance en el conocimiento de los factores que determinan y controlan el desarrollo del corazón (Brand et al., 2002; Zaffran y Frasch, 2002; Brand, 2003; Kirby, 2007; López-Sánchez y García-Martínez, 2011). Dentro de estos factores, la expresión de diferentes genes durante el desarrollo ha sido una de las principales vías de conocimiento, a nivel molecular, para la comprensión de los complejos acontecimientos que caracterizan los procesos de cardiogénesis y morfogénesis cardíaca. Los mecanismos moleculares que actúan en el desarrollo están basados fundamentalmente en dos aspectos: a) en la regulación génica por factores de transcripción, que son genes que controlan la expresión

de otros genes, y b) mediante morfógenos y señales intercelulares, mecanismo basado en la comunicación de las células a través de un receptor de la superficie celular y por la molécula (ligando) que se une al mismo, permitiendo así a los receptores transmitir sus señales a procesos intracelulares.

Genes determinantes del proceso de cardiogénesis

Uno de los aspectos más relevantes en el proceso de cardiogénesis consiste pues en la migración de las células precardiacas de la línea primitiva hacia sus dos laterales localizaciones para constituir el mesodermo precardiaco. Recientemente ha sido propuesto (Münsterberg y Yue, 2008) que la expresión de *Wnt3a* a nivel de la línea primitiva actuaría como una señal quimio-repelente para guiar el movimiento de las células precardiacas desde la línea primitiva hacia su migración lateral. El seguimiento de estas células ha sido bien analizado en embriones de ratón, utilizando como marcador el análisis de la expresión de *Mesp1* (Saga et al., 1999; Kitajima et al., 2000; Klaus et al., 2007; Costello et al., 2011).

En nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto que el nódulo de Hensen tiene capacidad de inducir la expresión de marcadores específicos de corazón cuando es trasplantado a regiones precardiacas y no-precardiacas (Lopez-Sanchez et al., 2002; 2009). Estos datos apoyan la hipótesis de que el nódulo de Hensen podría constituir un factor regulador en la especificación cardíaca (Martinsen, 2005; Cui et al., 2009), probablemente mediante la producción de los factores de crecimiento *Fgf8* y *Bmp2*, que se están expresando en estas fases del desarrollo a nivel del nódulo de Hensen.

La primera manifestación de la diferenciación de células del mesodermo esplácnico hacia la formación de células cardíacas viene determinada por la expresión del factor de transcripción *Nkx-2.5*, y se ha propuesto que sea como consecuencia de la inducción de miembros de las familias *Fgf* y *Bmp*, que se expresan en el endodermo adyacente al mesodermo precardiaco (Figura 4), comprometiendo a las células de estas áreas en la vía de diferenciación de células cardíacas (Schultheiss et al., 1995; 1997). Por lo tanto, en respuesta a estos mecanismos de inducción por parte de *Fgf* y *Bmp* desde el endodermo, las células del mesodermo precardiaco expresan genes para diversos grupos de factores de transcripción: *Nkx-2.5*, *Mef2* y *GATA4*, de gran importancia en el proceso de cardiogénesis (Brand, 2003; Lopez-Sanchez et al. 2009; Lopez-Sanchez y Garcia-Martinez, 2011).

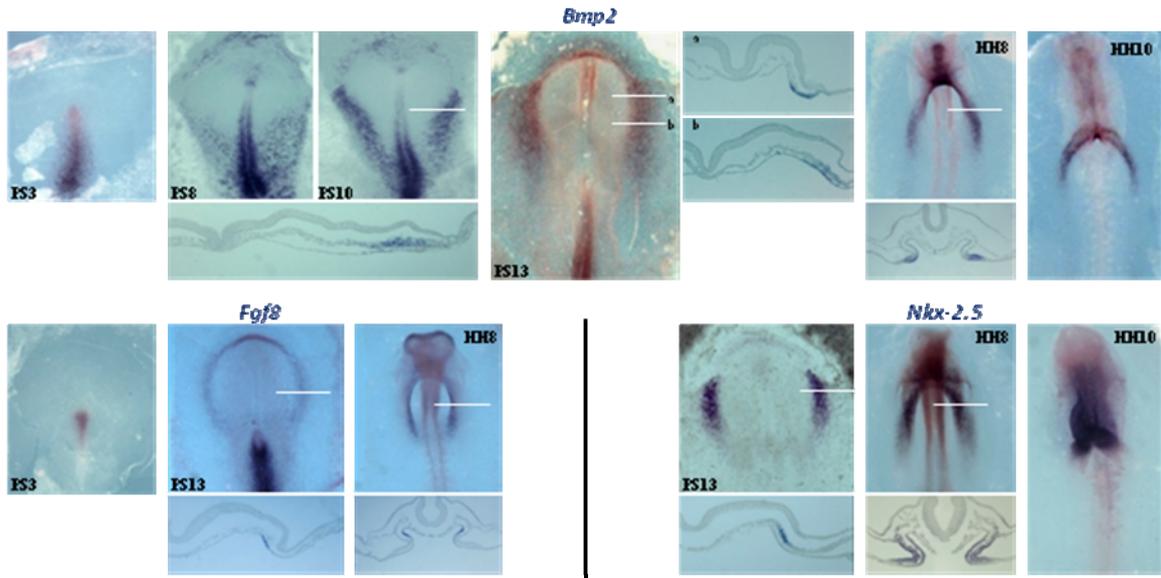


Figura 4.- Hibridación *in situ* en embriones completos con *Bmp2*, *Fgf8* y *Nkx-2.5* en relación con el proceso de inducción cardiaca en diferentes estadios del desarrollo inicial. Las líneas blancas indican el nivel de la sección fotografiada.

Estos datos vienen apoyados por una serie de experimentos que ponen de manifiesto que la aplicación de BMP2 medial al campo cardiaco primario induce la expresión de *Nkx-2.5*, así como la expresión de *Fgf8* (Alsan y Schultheiss, 2002), *GATA4* (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998), *GATA5* y *GATA6* (Schlange et al., 2000), *Hex* (Zhang et al., 2004), *Smad6* (Yamada et al., 1999), *Tbx2* y *Tbx3* (Yamada et al., 2000), todos ellos relacionados con la cardiogénesis. Además, la incubación de mesodermo precardiaco con nogina, un antagonista de las señales de Bmp (Zimmerman et al., 1996; Yamada et al., 1999), inhibe la expresión de genes específicos de la diferenciación cardiaca (*Nkx-2.5*, *GATA4*, *Mef2a*, *eHand* y *Vmhc1*) y la miogénesis cardiaca (Schlange et al., 2000).

Como moléculas señalizadoras responsables del proceso de inducción en la diferenciación cardiaca han sido también propuestos diferentes miembros de la familia Fgf. Así, la aplicación de FGF8 lateral al campo cardiaco primario (Alsan y Schultheiss, 2002) induce la expresión de *Nkx-2.5* y *Mef2c*, pero no la inducción de *Bmp2* ni *GATA4*, cuya expresión es característica de las células precardiacas de la línea primitiva (Andrée et al., 1998; Jiang et al., 1998; Chapman et al., 2007). Además, en nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto que FGF2 y FGF4 son capaces de inducir la expresión de *Nkx-2.5* y *Nkx-2.8* en células no precardiacas (Lopez-Sanchez et al., 2002). Se ha puesto de manifiesto también que a nivel del mesodermo lateral caudal, y por ello, zona no precardiaca, la aplicación de una combinación de BMP2-FGF4, pero ninguno de ellos de forma independiente, es capaz de inducir la expresión de *Nkx-2.5* (Lough et al., 1996; Barron et al., 2000). Otros miembros de la familia Fgf, que no se expresan a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva, también han demostrado jugar un papel activo en la inducción experimental en estudios *in vitro* con células mesodérmicas

precardiacas (Zhu et al., 1996). Así, la administración de FGF1, FGF2 o FGF4 induce la formación de vesículas que contienen una o varias capas celulares con capacidad contráctil sincronizada. Todos estos datos ponen de manifiesto que el proceso de cardiogénesis estaría iniciado y regulado por una compleja interrelación entre vías de señalización Bmp/Fgf.

Así como un grupo de moléculas están implicadas en el proceso de inducción, se ha propuesto que otros factores estarían inhibiendo la diferenciación cardíaca, para así establecer la regulación de la cardiogénesis. *Wnt11*, cuya expresión puede ser observada en el campo cardíaco primario (Eisenberg et al., 1997; Eisenberg y Eisenberg, 1999; Hardy et al., 2008), tiene capacidad de inducir miogénesis a partir de células no precardiacas (Pandur et al., 2002; Brand, 2003; Brand, 2010), mientras que otros miembros de la misma familia (*Wnt3a* y *Wnt8c*), que se expresan a nivel del mesodermo lateral posterior, zona no precardiaca, actuarían inhibiendo la diferenciación cardíaca (Marvin et al., 2001).

Un análisis detallado de la expresión de genes a nivel del campo cardíaco primario, pone de manifiesto la relevancia y complejidad del mecanismo de inducción del proceso de cardiogénesis (Lopez-Sanchez y Garcia-Martinez, 2011). Hay un primer grupo de genes que inicialmente (PS11-13; HH5) se expresa únicamente a nivel del mesodermo precardiaco del campo cardíaco primario (*Nkx-2.5*, *GATA4*, *Myocardyn*, *dHand*, *Usmaar*, *Tbx5*, *Tbx20*, *Pitx2*, *Aldh1A2/Raldh2*, *Pax3* y *Wnt11*). Un segundo grupo de genes que se expresa únicamente a nivel del endodermo del campo cardíaco primario, inmediatamente adyacente al mesodermo precardiaco (*Fgf8*, *Hex*, *Bmp5*, *Nkx-2.8*, *Has2*, *Tbx2*, *Tbx3*, y *Fgfr1*). Y un tercer grupo que englobaría a los que se expresan de forma simultánea en ambas capas del campo cardíaco primario, mesodermo precardiaco y endodermo adyacente (*Bmp2*, *Gata-5*, *Gata-6*, *Cripto*, *Smad6*, *EphB3*, *Mkp3*, *Ezrin*, *Cerberus*, *EphrinB1*, *Islet2*, *Fgfr2*, y *Fgfr4*). Todo ello revela que este proceso requiere la activación de una cascada de señales que cronológicamente y sincronizadamente inicien y regulen las fases de la diferenciación de las células destinadas a la formación del corazón embrionario.

Genes relacionados con el proceso de morfogénesis cardíaca

Una de las fases fundamentales de la morfogénesis cardíaca viene definida por la incurvación del tubo cardíaco primitivo, para dar lugar a la formación del asa cardíaca, constituyendo la primera estructura asimétrica que aparece en el embrión. La base molecular inicial de esta diferencia izquierda-derecha vendría definida por la expresión de genes de asimetría controlados por *Pitx2* (Piedra et al., 1998; Campione et al., 2001; Piedra y Ros, 2002), y de los factores de transcripción cardíacos *Nkx-2.5*, *Mef2*, *eHand* y *dHand*. La primera indicación molecular del desarrollo asimétrico del tubo cardíaco es la expresión de *eHand* a nivel del lado izquierdo del tubo cardíaco, mientras que *dHand* se expresa principalmente en el primordio del ventrículo derecho, tal como se ha puesto de manifiesto en animales de

experimentación (pollo y ratón), y la eliminación experimental de estos genes origina un bloqueo de la formación del asa (Thomas et al., 1998; Franco et al., 2002).

Pitx2 muestra una expresión asimétrica durante la embriogénesis de los vertebrados, siendo uno de los genes críticos en la regulación de la lateralidad (Linask et al., 2002). Su expresión asimétrica se detecta por primera vez restringida a los tejidos mesodérmicos del lado izquierdo del embrión (Figura 5), incluyendo la parte izquierda del mesodermo lateral, el lado izquierdo del mesodermo precardiaco y la mitad izquierda del epicardio del tubo cardiaco primitivo. A medida que avanza el desarrollo, se observa que *Pitx2* se expresa a nivel del mesocardio dorsal, de la parte izquierda del miocardio del primitivo tubo cardiaco, la parte izquierda del asa cardiaca y el tracto de salida (Dong et al., 2006).

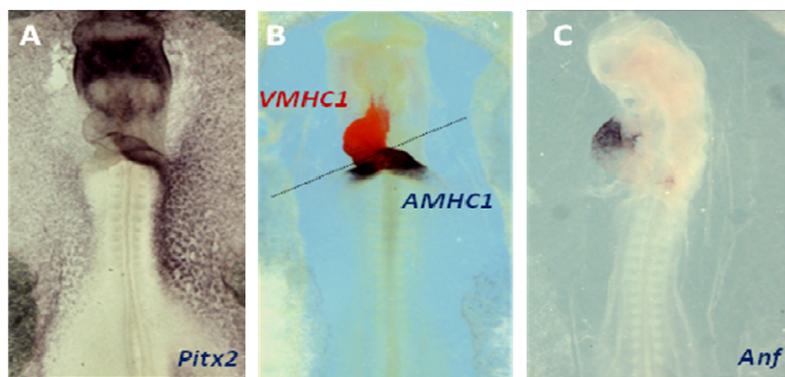


Figura 5.- A: Hibridación *in situ* en un embrión de estadio HH11 mostrando el patrón asimétrico de la expresión de *Pitx2*. B: Doble hibridación *in situ* en un embrión HH11 mostrando la expresión de *Vmhc1* en el segmento ventricular y *Amhc1* en el segmento atrial. C: Expresión de *Anf* en el segmento ventricular en estadio HH13.

En el embrión de pollo, la ruta de control molecular de la asimetría izquierda-derecha ha sido previamente definida (Levin et al., 1997; Levin, 2005). La ruta comienza con la expresión asimétrica del gen *ActivinβB* en el lado derecho del nódulo de Hensen, lo que induce la expresión asimétrica en el mismo lado de *cActR1α*, que determina la expresión de *Shh* (*Sonic hedgehog*) en el lado izquierdo del nódulo de Hensen. *Shh* induce la expresión asimétrica de *Nodal*, que controla directamente la asimetría morfológica de los órganos originados a partir del mesodermo (Levin et al., 1997; Sampath et al., 1997; Ruiz-Lozano et al., 2001). En los mamíferos no hay una expresión asimétrica del gen *Nodal* en el nódulo, sin embargo, su expresión es asimétrica en la hoja lateral izquierda del mesodermo (Ruiz-Lozano et al., 2001).

Experimentalmente (Kirby, 2007) el análisis del proceso de segmentación revela que, en mamíferos (embriones de ratón) el gen inicial responsable de la segmentación y diferenciación hacia aurícula es el *MLC-1a* y *MLC-2b* (*myosin light chain*). No obstante, la mayor parte de genes identificados en la segmentación se han estudiado experimentalmente en embriones de aves, y el estudio detallado de la participación de estos genes pone también de

manifiesto la necesidad de una coordinación precisa y jerarquizada para el establecimiento de los diferentes segmentos del tubo cardiaco. *Vmhc1* se expresa a nivel del miocardio a lo largo de todo el tubo cardiaco primitivo, pero posteriormente su expresión se restringe al sector anterior o rostral (Figura 5), determinando el segmento ventricular del asa cardiaca (Bisaha y Bader, 1991). Sin embargo, el segmento posterior comienza a expresar *Amhc1* (Figura 5), determinando el segmento atrial del asa cardiaca (Yutzey et al., 1994). Estos datos ponen de manifiesto que diferentes isoformas de miosina estarían caracterizando y diferenciando ambos segmentos cardiaco.

En embriones de aves, diferentes modelos experimentales han puesto de manifiesto que *Irx4*, cuya expresión está restringida exclusivamente al segmento ventricular, sería el factor controlador del proceso de segmentación (Bruneau et al., 2000). *Irx4*, dependiente de *Nkx-2.5* y *dHand*, regularía la expresión específica de las isoformas de miosina activando la expresión de *Vmhc1* y suprimiendo la expresión de *Amhc1* en el segmento ventricular (Bao et al., 1999; Bruneau et al., 2000).

En embriones de ratón, diferentes modelos experimentales han puesto de manifiesto que los factores de transcripción *Hand1* y *Hand2* son también co-expresados inicialmente en el tubo cardiaco primitivo, pero posteriormente quedan restringidos al segmento ventricular (Srivastava et al., 1995; Thomas et al., 1998; Srivastava, 1999). Además, los factores de transcripción, *Hey1* y *Hey2*, han sido identificados y posiblemente implicados en el establecimiento del proceso de segmentación, al ser expresados específicamente en las células progenitoras atriales y ventriculares respectivamente (Leimeister et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Algunos otros factores expresados en el sector atrial, α -MyHC (*myosin heavy chain*) *MLC-2a* (*myosin light chain*), y en el sector ventricular, β -MyHC (*myosin heavy chain*) y *MLC-2v* (*myosin light chain*), podrían también jugar un papel activo en el proceso de segmentación (Lyons et al., 1990).

Diferentes modelos experimentales, en pollo y ratón, han puesto de manifiesto que el gen *Anf* (*atrial natriuretic factor*) se expresa en el miocardio (Figura 5), inicialmente a lo largo del tubo cardiaco primitivo, y posteriormente su expresión queda restringida al segmento ventricular (Houweling et al., 2002). Además, *GATA4* y *Tbx5* se expresan en el segmento atrial del tubo cardiaco primitivo (Molkentin et al., 1997; Jiang et al., 1998; Yamada et al., 2000). Se ha propuesto que la expresión de *Anf* estaría regulada por una cooperación *GATA4/Tbx5*, ambos expresados desde fases muy precoces de la cardiogénesis (Bruneau et al., 2001; Plageman y Yutzey, 2004). Sin embargo, *Tbx20*, cuya expresión es inducida por *Bmp2*, bloquearía la expresión de *Anf* y de *Tbx5* (Plageman y Yutzey, 2004). También ha sido analizada la posible relación entre la expresión de *GATA4* y el efecto del ácido retinoico (Dersch y Zile, 1993; Kostetskii et al., 1999), regulado por la expresión de *Raldh2*, que se expresa específicamente en la región atrial (Niederreither et al., 1999), implicando la actividad del ácido retinoico en el establecimiento de la segmentación o regionalización ántero-posterior del tubo cardiaco.

En la fase de formación de la barra media y establecimiento de los canales atrio-ventriculares juega un papel fundamental el proceso de transformación epitelio-mesénquima. Debido a un proceso de inducción del miocardio subyacente, determinadas células del endocardio pierden su carácter epitelial y se transforman en células del mesénquima, que migran hacia la gelatina cardiaca, fundamentalmente a nivel de la región aurículo-ventricular y en el tracto de salida. La característica molecular que define este proceso es que las células del endocardio que sufren la transformación a mesénquima expresan el gen *Msx-1*, siendo concomitante con la disminución de la producción de la molécula de adhesión celular N-CAM. La inducción de la invasión de la gelatina cardiaca por parte de las células endoteliales aurículo-ventriculares está regulada por la actividad de *TGFβ1* y *TGFβ3* (*transforming growth factors*, factores de crecimiento transformantes). Además, durante la transformación epitelio-mesénquima se expresa el factor de transcripción *Sox9*, el cual regula la expresión de *ErbB3* (*epidermal growth factor Egf receptor*), requerido para la adecuada diferenciación y proliferación celular de los cojinetes endocárdicos (Akiyama et al., 2004). Estos acontecimientos moleculares y celulares también son la base de la formación temprana de las válvulas cardiacas.

En el proceso de septación auricular y ventricular cobra especial relevancia la expresión del factor de transcripción *TBX5*, aunque también ha sido implicado en la formación del asa cardiaca. *TBX5* se expresa desde fases muy iniciales, a nivel del mesodermo precardiaco y en el tubo cardiaco primitivo, además, durante la especificación de las cámaras adquiere una distribución progresiva con alta expresión a nivel de la aurícula y baja expresión en el ventrículo izquierdo, extendiéndose posteriormente hacia el tabique interauricular. Por otro lado, *TBX20* se expresa en ambas aurículas y en las válvulas aurículo-ventriculares (Bruneau et al., 1999).

Papel de los microRNAs en el desarrollo del corazón

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias cortas de moléculas de RNA, de 20-24 nucleótidos, que actúan como reguladores postranscripcionales de la expresión de genes, y su principal función post-transcripcional se produce por medio de la interacción con la región 3' UTR (*untranslated region*) de los mRNA diana específicos (He y Hannon, 2004; Zhao y Srivastava, 2007; Espinoza-Lewis y Wang, 2012). Actuarían inhibiendo la traslación del mRNA y síntesis de la proteína, o degradando el mRNA. Los miRNAs se pueden encontrar en exones o intrones de transcritos no codificantes, y en los intrones y los 3' UTRs de transcritos que codifican proteínas. También pueden solaparse con un exón o con un intrón, según el patrón de *splicing* alternativo (Zhao y Srivastava, 2007). En las especies *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, algunos de los miRNAs situados en las regiones intrónicas sobrepasan el procesamiento de la enzima nuclear *Drosha* y entran en la vía de la biogénesis de miRNAs como premiRNAs (Ruby et al., 2007). En muchos casos, los miRNAs se encuentran agrupados cerca de otros miRNAs, están corregulados transcripcionalmente y comparten funciones reguladoras cooperativas (Cordes et al., 2010).

Recientemente, la identificación de microRNAs que se expresan específicamente en diferentes células cardíacas ha conducido al descubrimiento de importantes papeles reguladores durante la diferenciación de los cardiomiocitos y proliferación celular, hasta tal punto que ha llegado a proponerse para ellos el término de miomiRs (Malizia y Wang, 2011). En embriones de pollo y de ratón, la expresión de *miR-1*, *miR-126* (Figura 6), *miR-27* y *miR-133* ha sido descrita durante el desarrollo cardíaco (Darnell et al., 2006; Fish et al., 2008; Cordes et al., 2010; Chinchilla et al., 2009, 2011).

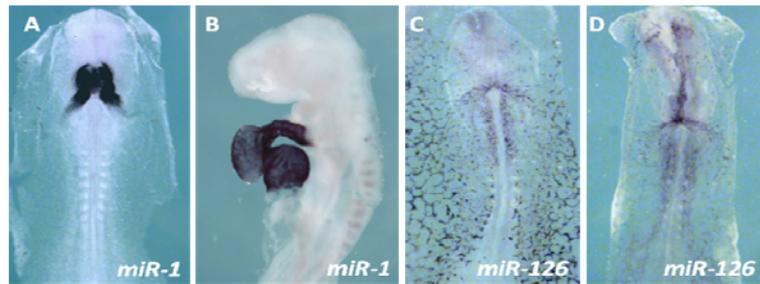


Figura 6.- Patrón de expresión de *miR-1* (A: HH10, B: HH15) y *miR-126* (C: HH9, D: HH11) analizado mediante hibridación in situ en embriones completos.

Además, la organización, regulación y función de *miR-1* y *miR-133* ha sido analizada en ratón; habiéndose puesto de manifiesto el papel regulador de *Mef2* y *Srf* (*Serum response factor*) sobre estos pequeños RNAs (Zhao et al., 2005; Zhang et al., 2011). Estudios experimentales recientes muestran que la sobre-expresión de *miR-1* ó *miR-133* reduce la expresión de *Nkx-2.5* durante la diferenciación de las células troncales embrionarias de ratón (Tomohide et al., 2009).

En ratones transgénicos que sobreexpresan *miR-1*, se ha puesto de manifiesto su capacidad de inducir la división de las células progenitoras cardíacas a través de la inhibición del factor de transcripción cardíaco *Hand2*. La desregulación de *Hand2* provoca una disminución de la expansión de los cardiomiocitos ventriculares, resultando en un fenotipo con las paredes ventriculares más delgadas producido por una inhibición temprana de la proliferación y diferenciación de los cardiomiocitos (Zhao et al., 2005).

Especial referencia merece la participación del *miR-208*, el cual regula la expresión de genes α -*MyHC* (van Rooij y Olson, 2007) y β -*MyHC* (Callis et al., 2009). Tanto *miR-208* como α -*MyHC* a su vez están controlados por elementos reguladores en común, *Gata4* y *Mef2* (Callis et al., 2008), mientras que el *miR-133* regularía la expresión de *Mef2* (Xiao et al., 2007; Schlesinger et al., 2011). También ha sido analizada la regulación de *Mef2c* a través de *miR-27*, que presenta un patrón similar expresándose durante el desarrollo del miocardio (Chinchilla et al., 2011).

También ha sido descrita en embriones de pollo la expresión de *miR-126* en el mesodermo precardiaco, siendo posteriormente observada (Figura 6) en el endocardio del tubo cardiaco primitivo y el endotelio vascular (Darnell et al., 2006). Su papel ha sido analizado en el proceso de angiogénesis/vasculogénesis (Fish et al., 2008).

Todos estos datos ponen de manifiesto que los microRNAs pueden ser tan importantes como los factores de transcripción en el control de la expresión de los genes cardiacos. Sin embargo, a pesar de los recientes avances en el descubrimiento de los miRNAs, el papel de los mismos en procesos de desarrollo está aún en fases emergentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Diseños experimentales

En la presenta Tesis Doctoral hemos realizado una serie de experimentos en función de los objetivos planteados, utilizando como animal de experimentación embriones de pollo (*Gallus gallus*), en cultivo, en estadios PS3-PS13 (López-Sánchez et al., 2005), HH3 – HH5 (Hamburger y Hamilton, 1951).

Se obtuvieron huevos fecundados y se incubaron artificialmente a 38°C, en incubadora humidificada, hasta que los embriones alcanzaban el estadio necesario para la realización de los experimentos. Posteriormente, los embriones se sometieron a crecimiento en cultivo, siguiendo la técnica de EC (*early chick*) (Chapman et al., 2001): Los huevos se rociaban con etanol al 70% y se abrían por su parte roma procediendo a la extracción de la mayor cantidad de albúmina posible, pasando la yema a una placa de petri. Se retiraban los restos de albúmina con un papel secante, manteniendo el blastodermo hacia arriba y centrándolo en un fragmento de papel de filtro cortado en forma de trébol de cuatro hojas. Posteriormente se procedía a cortar la membrana vitelina en torno al papel de filtro, orientando el embrión por su lado ventral (endodermo) y se transfería a una placa de cultivo agar–albúmina.

Hemos realizado dos grupos de procedimientos experimentales:

A.- Experimentos de “ganancia” de función: sobre las células precardiacas (Garcia-Martinez y Schoenwolf, 1993; Lopez-Sanchez et al., 2002) hemos llevado a cabo, mediante técnicas de electroporación y/o mediante la aplicación de esferas acrílicas de heparina, la sobreexpresión de *Fgf8*, *Bmp2*, *miR130*.

B.- Experimentos de “pérdida” de función: sobre las células precardiacas, hemos procedido a la electroporación de *Fgf8* siRNA, anti-miR130, y a la aplicación de esferas acrílicas impregnadas en SU5402 (bloqueante químico de la señal de FGF por específica unión a FGFR1; Eblaghie et al., 2003; Echevarría et al., 2005; Lunn et al., 2007) y nogina (bloquea la señal de Bmp, Zimmerman et al., 1996).

Tras un periodo de incubación determinado, embriones controles y experimentales fueron analizados mediante técnicas de hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión.

II. Técnicas de estudio en embriones completos

1.- Electroporación *in vitro*.

La electroporación es una técnica que conlleva la aplicación de pulsos eléctricos de corta duración sobre las células, provocando rotura física, dieléctrica y reversible, de la bicapa lipídica que conforma las membranas celulares, formándose poros temporales que permiten el paso del DNA como resultado de la carga negativa de éste. La transferencia génica es inmediata dentro de las células embrionarias, lo que permite tener una rápida expresión de los genes. Se hace uso de un electroporador de pulsos cuadrados de muy corta duración, para evitar la muerte de las células.

Se realizó la electroporación en embriones en cultivo (empleando una modificación de la técnica previamente descrita por Colas y Schoenwolf (2003), en estadio PS3-PS5 a nivel de la región precardiaca de la línea primitiva (Garcia-Martinez y Schoenwolf, 1993; Lopez-Sanchez et al., 2002). Cada embrión, orientado por su lado ventral (endodermo), era transferido a una placa de Petri que contiene un electrodo de tungsteno que actuará como cátodo (CUY701P2E, Nepagene), cuyo extremo (2mm longitud, 100µm de diámetro) se situaba justo por debajo de la línea primitiva. A continuación, se procedía a la microinyección del plásmido o solución de oligonucleótidos de DNA, mediante el uso de un microinyector Inject+Matic (INJECT+MATIC, Geneva), justo en la región seleccionada de la línea primitiva. Inmediatamente tras la inyección del DNA procedimos a la colocación del electrodo de platino sobre el área inyectada, que actúa como ánodo, con forma de L, con un extremo de 2mm de longitud y 300µm de diámetro (CUY613P2, Nepagene). Aplicamos un tren de cinco pulsos eléctricos cuadrados (40 mseg de duración, a 5V con intervalos de 999 mseg) mediante el uso de un electroporador de pulsos cuadrados TSSS20 Ovodyne (Intracel).

Para los experimentos de “ganancia” de función procedimos a:

- coelectroporar los vectores de expresión pCS2-MT que contienen la región codificante completa para Fgf-8 (pCS2-Fgf-8) (amablemente cedido por T. Schimmang) con el vector de expresión pCAGs que contiene el inserto de la EGFP; como control se utilizó el plásmido con el pCAGs-EGFP;
- electroporación del vector de expresión pCAGs-IRES-GFP que contiene la región codificante completa para el gen de BMP-2 (pCAGs-Bmp2-IRES-GFP) (amablemente cedido por D. Franco); como control se utilizó el plásmido con el pCAGGS-IRES-GFP;
- electroporación de premiR-130 (precursor de microRNA 130; Ambion) junto con el marcador fluorescente diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; Vybrant); como control utilizamos la electroporación de CFDA.

Para los experimentos de “pérdida” de función procedimos a:

- co-electroporación del *interference pSilencer-Fgf8* (amablemente cedido por M.A. Ros) con el vector de expresión pCAGs que contiene el inserto de la EGFP; como control se utilizó el plásmido con el pCAGs-EGFP;
- electroporación de anti premiR-130 (Ambion) junto con el marcador fluorescente diacetato de carboxifluoresceína (CFDA); como control utilizamos la electroporación de CFDA;

Los embriones eran transferidos a una placa de cultivo e incubados a 38°C. Para detectar la localización y la extensión de la electroporación (Figura 7) los embriones eran observados periódicamente mediante microscopía de fluorescencia con un filtro estimulador azul que detecta la fluorescencia verde emitida por la GFP o el CFDA (Nikon digital SIGHT DS-U1).

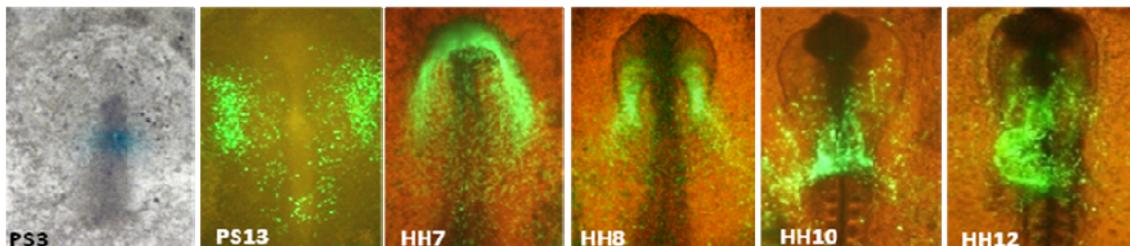


Figura 7.- Electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con pCAGs-EGFP y seguimiento hasta la formación del asa cardíaca.

2.- Aplicación de esferas acrílicas.

La aplicación de esferas acrílicas tiene como objetivo administrar los diferentes factores reguladores utilizados. Las esferas fueron colocadas (Figura 8) en estadio PS11-PS13, a nivel de las áreas correspondientes al mesodermo precardiaco (Garcia-Martinez y Schoenwolf, 1993; Lopez-Sanchez et al., 2002, 2009).

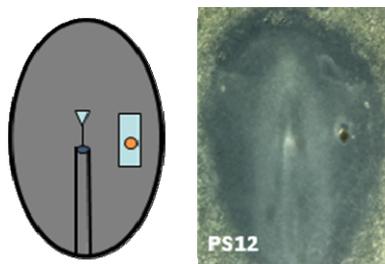


Figura 8.- Esquema de la localización del campo cardíaco primario (rectangular) y la posición de la aplicación de la esfera cargada con el componente deseado para el experimento. La micrografía muestra la esfera en el embrión en cultivo.

Las esferas seleccionadas, con un diámetro de 150-200µm, eran previamente incubadas con el factor seleccionado durante dos horas. Con ayuda de unas pinzas se traslada la esfera a la posición seleccionada en el embrión en cultivo para su colocación entre el mesodermo y el

endodermo del embrión, practicando para ello un pequeño bolsillo en la capa de endodermo con una aguja de cactus.

Los factores FGF8 y BMP2 (R&D Systems), así como SU5402 (Calbiochem) y nogina (R&D Systems), fueron administrados mediante la utilización de esta técnica. Adicionalmente, un grupo de embriones fue sometido a la administración de ácido retinóico (Sigma).

Las esferas acrílicas empleadas en estos procedimientos correspondían con esferas de heparina (Sigma), excepto en el caso de la administración de SU5402 y ácido retinoico, que correspondieron con esferas de resina de intercambio iónico AG1-X2 (BioRad). Experimentos control fueron llevados a cabo con esferas de heparina cargadas con PBS, o esferas de resina cargadas con DMSO.

Tras cada procedimiento experimental, transcurridas de 6 a 36 horas de incubación a 38°C, los embriones eran fijados durante toda la noche a 4°C en paraformaldehído (PFA 4%) en PBS y deshidratados en soluciones crecientes de metanol en PBT (ISH) y conservados a -20°C. Para su posterior análisis, los embriones eran rehidratados en concentraciones decrecientes de metanol/PBT (ISH) (1x 10 min), hasta PBT (ISH) (2x10 min).

3. Hibridación *in situ* (ISH).

Embriones controles y experimentales fueron sometidos a técnicas de hibridación *in situ* (ISH) con sondas monocatenarias de RNA de embrión de pollo marcadas con digoxigenina en su fragmento *UTP* (Chapman et al., 2002) correspondientes para los genes: *Nkx2.5*, *Bmp2*, *Fgf8*, *GATA4*, *Tbx5*, *Amhc1*, *Vmhc1*.

Un grupo de embriones fue sometido a doble ISH, con sondas monocatenarias de RNA de embrión de pollo *Bmp2-Fgf8* y *Amhc1-Vmhc1*, marcadas en su fragmento *UTP* con digoxigenina y fluoresceína respectivamente en cada caso.

Un grupo de embriones controles y experimentales fueron sometidos a técnicas de ISH utilizando sondas de LNA (*locked nucleic acids*) marcadas con digoxigenina en ambos extremos 3' y 5' (Darnell et al., 2000), para determinar la expresión de miR-130 y miR-133 (hsa-miR103a, gga-miR133a; Exiqon).

4.- Técnica inmunohistoquímica (IMH).

Embriones controles y experimentales fueron sometidos a técnica inmunohistoquímica (Lopez-Sanchez et al., 2004) con los siguientes anticuerpos primarios: *policlonal rabbit anti-GFP serum (green fluorescent protein)* (Molecular Probes), *policlonal rabbit phospho-P44/42 MAPK (mitogen-activated protein kinase) (ERK1/2)* (Cell Signaling), utilizando como anticuerpo secundario el *anti-rabbit IgG-HRP* (Upstate).

5. Técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Un grupo de embriones experimentales fue seleccionado para realizar estudios de microscopía electrónica de transmisión en el tejido inducido alrededor de la esfera, y analizar sus características ultraestructurales. Corazones de embriones en estadio HH11 fueron utilizados como controles. Las imágenes fueron obtenidas mediante la utilización del microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM10-10.

III. Apéndice

A. Procedimientos desarrollados

1. Electroporación.

Para su inyección, los plásmidos (pCS2-Fgf-8, pCAGs-EGFP, pCAGs-Bmp2-IRES-GFP, pCAGGS-IRES-GFP, y *pSilencer-Fgf8*) se prepararon en una solución de trabajo de concentración final 1,5 µg/µl, conteniendo un volumen 1/10 de sucrosa (Sigma) al 60% y un volumen 1/10 de *fast green* FCF (Sigma) al 0,5% (Voiculescu et al., 2008).

Para la inyección del premiR130 y anti premiR-130 se preparó una solución final de trabajo de 0,5mM, conteniendo CFDA 2,5mM y un volumen 1/10 de *fast green* FCF al 0,5%.

2. Aplicación de esferas acrílicas.

Los factores se administraron a la siguiente concentración:

- FGF8: proteína recombinante humanas: 50 ng/µl en PBS (Alsan and Schultheiss, 2002).
- BMP2 proteína recombinante humanas: 5 ng/µl en PBS (Alsan and Schultheiss, 2002).
- SU5402: 5 µg/µl en DMSO (Montero et al., 2001).
- Nogina: 1 µg/µl en PBS (Piedra y Ros, 2002).

3. Hibridación in situ (ISH) con sonda de RNA.

- Fase de prehibridación:

Embriones para hibridación in situ para sonda de RNA se trataron con 3 pases en solución detergente para permeabilización durante 20-60min en función del estadio. A continuación se refijaban en PFA 4% (20-60min), y se realizaban lavados 3x5min en PBT (ISH), seguido de un lavado de 10 min en solución de hibridación, permaneciendo posteriormente 12h a 65°C en la solución de hibridación.

- Hibridación con sonda de RNA:

Tras la fase de prehibridación, se reemplazó la solución de hibridación por una nueva solución que contenía 1µg/ml de sonda de RNA marcada con digoxigenina (y con fluoresceína en el caso de la doble ISH). La hibridación se realizó a 60-65°C durante 12h, ajustando la temperatura según la sonda utilizada.

- Lavados tras la hibridación:

Se realizaron dos lavados de 30min a la temperatura de hibridación en solución X con el fin de eliminar el RNA no hibridado.

- Tratamiento de los embriones para la incubación con el anticuerpo:

Se realizaron lavados de 2x10min y 1x30min en solución MABT a temperatura ambiente y posteriormente transferidos a una solución de bloqueo (BBR 2%/MABT).

- Incubación con el anticuerpo:

Los embriones fueron incubados durante 12h a 4°C con un anticuerpo monoclonal frente a la digoxigenina (*antidigoxigenin-AP*, Roche), unido a fosfatasa alcalina (Roche) a dilución 1:2000 en solución de bloqueo (BBR 2%/MABT). En el caso de la doble ISH se incubaban simultáneamente con el anti cuerpo anti-fluoresceína marcado con fosfatasa alcalina a dilución 1:1000.

- Lavado del anticuerpo:

Realizado mediante lavados en MABT (5x1h) a temperatura ambiente y un lavado de 12h a 4°C.

- Proceso de revelado:

Se realizaron lavados en solución MABT (2x10 min) y en solución NTMT pH 9,5 (2x10 min), realizando el revelado en solución de NTMT pH 9,5 que contenía NBT (Roche) 4.5µl/ml y BCIP (Roche) 3.75 µl/ml, en oscuridad. En el caso de la doble ISH se realizaban posteriormente lavados 2x10min en solución MABT y 2x10min en solución NTMT pH 8,0 y 2x10min en solución 0,1M Tris pH8.0; la identificación de la sonda marcada con fluoresceína se realizó con una solución de revelado con una pastilla de *Fast Red* (Roche) en 2ml de 0,1M Tris pH8.0.

Una vez finalizada la reacción cromogénica, se procedió a la realización de lavados en solución KTBT (2x10 min), seguido de un lavado en PBS y fijación en 4%PFA.

4. Hibridación in situ con sonda de LNA.

- Fase de prehibridación:

Embriones para hibridación in situ para sonda de LNA se trataron a temperatura ambiente con proteinasa K a concentración de 10 µg/ml en PBS, con un tiempo establecido en función del estadio, para posteriormente realizar la postfijación durante 20 min en PFA 4% con glutaraldeído al 0,2% a temperatura ambiente, seguido de lavados (3x5min en PBT de ISH) y 1x10min en solución de hibridación, permaneciendo posteriormente 12h a 65°C en la solución de hibridación.

- Hibridación con sonda de LNA:

Tras la fase de prehibridación, se reemplazó la solución de hibridación por una nueva solución que contenía sonda de LNA 5nM marcada con digoxigenina. La hibridación se realizó a 52°C (miR130), y a 58°C (miR133) durante 3 a 4 días.

- Lavados tras la hibridación:

A la temperatura de hibridación, se realizaron lavados 3x20 min con una solución 2xSSC con 0,1% CHAPS, seguidos de lavados 3x20 min en solución de 0,2xSSC con 0,1% CHAPS.

- Tratamiento de los embriones para la incubación con el anticuerpo:

Se realizaron lavados en KTBT (2x10min) posteriormente transferidos a una solución de bloqueo: 20% *Sheep Serum* en KTBT durante 2-3horas.

- Incubación con el anticuerpo:

Se realizó administrando anticuerpo antidigoxigenina-AP pretratado (ver apéndice III C), dilución 1:4000 en 20% *Sheep Serum*/KTBT, a 4°C, durante 12h.

- Lavado del anticuerpo:

Realizado mediante lavados en KTBT (5x1h) a temperatura ambiente y un lavado 12h a 4°C.

- Proceso de revelado:

Igual al utilizado en ISH con sonda de RNA (NBT-BCIP/NTMT pH 9.5).

5. Inmunohistoquímica (IMH)

- Lavado y bloqueo:

Los embriones fueron lavados en PBS (2x5 min) y en PBT (IMH) (2x5 min y 3x30 min) y bloqueados durante 1h en PBT+N (*normal goat serum* NGS/PBT 1:20).

- Incubación con el anticuerpo primario:

Se procedió a la incubación con el respectivo anticuerpo primario durante 12 h a 4°C, dilución 1:1000 (policlonal rabbit anti-GFP serum), 1:50 (policlonal rabbit phospho-P44/42 MAPK/ERK1/2).

- Incubación con el anticuerpo secundario:

Se realizaron lavados en PBT (IMH) (3x5 min y 4x30 min) y un bloqueo en PBT+N durante 1h. Se procedió a incubar con el anticuerpo secundario (anti-rabbit IG-HRP) a dilución 1:1000 en solución PBT+N durante 12h a 4°C. Tras la incubación, se realizaron lavados en PBT (IMH) (3x5 min y 4x30 min) y se procedió a revelar en reacción peroxidasa.

- Reacción peroxidasa:

Los embriones se incubaron en solución A que contenía 1ml de DAB (diaminobencidina) (Sigma) (1mg/ml) en 2ml de PBT (IMH) durante 10 min y fueron revelados en solución A que contenía 12 µl de H₂O₂ al 0,33% por cada ml de solución. Se detuvo el proceso de revelado con lavados de PBT (ISH) (2 x 10 min) y fueron fijados en 4% PFA.

Un grupo de embriones sometido a ISH y/o IMH fue seleccionado para su inclusión en parafina. Se procedió a la deshidratación de los embriones en concentraciones crecientes de

EtOH en PBS, mediante pases de 1x2 min (30%, 50%, 70%, 96% EtOH) y 2x5min (100% EtOH). Se efectuaron cambios en isopropanol (2x15 min), en mezcla 1:1 isopropanol/parafina a 58°C (1x15 min) y parafina a 58°C (2x30 min). Por último, se procedió a la inclusión y orientación de los embriones en bloques de parafina para la obtención de secciones transversales seriadas. Los cortes se realizaron a 15µm y se incubaron durante 2 días a 37°C. Posteriormente, se desparafinaron en Xilol (1x10 min y 1x5 min), EtOH 100% (2x2 min), EtOH 96% (2x2 min), EtOH 100% (2x2 min) y Xilol (1x5 min y 1x10 min). Finalmente, se procedía a cubrir los cortes con Eukitt.

6. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Pequeños fragmentos del tejido inducido alrededor de las esferas acrílicas implantadas así como muestras control de pequeños fragmentos de corazones de embriones en estadio HH11, fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión. Las muestras eran fijadas en glutaraldehído al 2,5-3% en buffer de cacodilato sódico (BFCS) durante 2-4 horas. A continuación dos lavados en BFCS. Post-fijación en ácido ósmico al 1% en BFCS durante de 1-2 horas en oscuridad y seguidamente dos lavados en BFCS de 15 minutos. Posteriormente, deshidratación en soluciones crecientes de acetona 1x30 min (30%, 50%, 70%) y un pase de 12 horas en acetona de 70% en acetato de uranilo al 2%. Después un pase de 20 min en acetona al 90% y 3x60 min en acetona al 100%. Seguidamente se realizan pases 2x1h en óxido de propileno. En la fase de inclusión en Araldita se realizan varios cambios: 1x60min en una solución 1/4 de mezcla 1 (MI) y 3/4 de óxido de propileno; 1x60min en 1/2 de MI y 1/2 de óxido de propileno y 1x60min en 3/4 de MI y 1/4 de óxido de propileno. A continuación se mantienen 10-12 horas en M1. Después 1x60min a 37°C en MI, después 1x90min en M2 a 60°C y por último 1x72horas en M2. Tras las 72 horas se preparan los moldes para incluir las muestras en la orientación deseada. Los embriones tratados incluidos en esta mezcla de araldita fueron seccionados en un ultramicrotomo LKB III. Secciones semifinas de 1 µm fueron realizadas para tinciones de control con azul de toluidina. Secciones ultrafinas de 800 Å fueron depositadas en las rejillas para su tinción: se colocan gotas de la primera tinción de contraste, acetato de uranilo, sobre las que se colocan las rejillas 5min, a continuación 3 pases en agua bidestilada y 20 min sobre citrato de plomo. Se someten de nuevo a 3 pases de agua bidestilada (pasando una perla de NaOH sobre el agua en los dos primeros pases), para finalizar dejándolas secar a temperatura ambiente en papel de filtro.

B. Número de embriones experimentales.

Un número de embriones controles fueron sometidos a ISH e IMH para identificar los patrones de expresión.

Tabla I.- Número de embriones sometidos a experimentos de ganancia de función.

Tabla II.- Número de embriones sometidos a experimentos de ganancia de función.

C. Preparación de placas de cultivo.

Placas de cultivo de agar y albúmina (40 placas):

60 ml albúmina de huevo.

0.36 gr. de Bactor-Agar

60 ml de salino 123 mM.

123mM Salino:

NaCl 7.19g

dH₂O 1 l.

Se procederá a autoclavar la solución.

- Se esteriliza todo el material con EtOH 70 % y se seca con toallas de papel.
- Se pulverizan los huevos con EtOH 70 % para su desinfección y se dejan secar.
- Se abren los huevos por su parte roma haciendo uso de pinzas de punta roma y se depositará la albúmina fina en la probeta de 100 ml hasta la cantidad deseada: 60 ml albúmina / 40 placas.
- Se añade la cantidad de albúmina medida a un vaso de precipitados de 250 ml que se cubrirá con papel de aluminio y se pasa al baño a 49°C.
- Se preparan 0.36 g. de Bactor-Agar en 60 ml. de 123mM salino en la otra probeta de 100ml.
- Cuando la albúmina y el agar se equilibren a una temperatura de 49 °C, se mezclan con agitación rápida sin calor hasta que se consigue una solución espumosa.
- Haciendo uso de jeringas o micropipetas de plástico estériles de 2,5 ml., se transfiere el medio preparado a las placas de cultivo, a razón de unos 2.5 ml por placa.
- Cuando el medio ha solidificado, se almacenan las placas en un recipiente de plástico y se conservan en cámara húmeda a 4°C.

D. Elaboración de Soluciones.

PBS:

NaCl 8 g

KCl 0.2 g

Na₂HPO₄ 1.44 g

KH₂PO₄ 0.24 g

dH₂O 1 l

Ajustar a pH 7.4, autoclavar y guardar a 4°C.

4% PFA

Paraformaldehído 4 g

PBS 100ml

Se disuelve en agitación con temperatura. Se filtra y se mantiene a 4°C.

PBT (ISH):

PBS 100 ml

25% Tween-20 1ml

1M Tris-HCl:

Trizma base 24,22g

dH₂O 160ml

Se ajusta el pH. Se enrasa a 200ml y se autoclava.

0.5M EDTA pH 8

EDTA 36.5 g

dH₂O 250 ml

5M NaCl

NaCl 146.1grs

dH₂O 500ml

autoclavar

0,1% DEPC H₂O:

DEPC	1 ml
dH ₂ O	1 l

Mantener 1h a 37°C y autoclavar.

Solución detergente

IGEPAL 20%	25 ml
SDS 10%	50 ml
Ácido desoxicólico 5%	50 ml
1M Tris-HCl pH 8.0	25 ml
0,5M EDTA pH 8.0	1 ml
5M NaCl	15 ml

Enrasar con DEPC H₂O hasta 500ml

20X SSC:

NaCl	175 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	73 g
dH ₂ O	800 ml

Ajustar a pH 5.2 con 1M Ácido cítrico. Enrasar a 1 l y autoclavar.

1M Ácido cítrico:

C ₆ H ₈ O ₇	48.03 g
DEPC H ₂ O	250 ml

Heparina (50mg/ml):

Heparina	50 mg
20X SSC	0,2 ml
dH ₂ O	0,8 ml

Conservar a -20°C.

Solución de hibridación para sonda de RNA:

Formamida	25 ml
20X SSC pH 5.2	12.5 ml
10% SDS	10ml
0.5M EDTA pH 8	0.5 ml
25% Tween-20	0.5 ml
RNA de levadura (20mg/ml)	0,625 ml
Heparina (50mg/ml)	0,1 ml

Enrasar con DEPC dH₂O hasta 50ml calentar a 65°C

Solución de hibridación para sonda de LNA:

Formamida	25 ml
20X SSC pH 4.5	12.5 ml
0.5M EDTA pH 8	0.5 ml
25% Tween-20	0.2 ml
10% CHAPS (C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S)	0.5 ml
RNA de levadura (20mg/ml)	0,25 ml
Heparina (50mg/ml)	0,05 ml

Enrasar con DEPC dH₂O hasta 50ml calentar a 65°C

Solución X:

Formamida	25 ml
20X SSC	5 ml
10% SDS	5 ml
dH ₂ O	15 ml

Solución MABT:

MAB 1x	45.5 ml
25% Tween-20	0.5 ml

MAB 1x:

150 mM NaCl	8.76 g
100mM Ácido Maleico	11.6 g
dH ₂ O	700 ml

Ajustar a pH 7.5 (NaOH), enrasar a 1l y autoclavar.

10% BBR

BBR	10 g
MAB 1x	100 ml

Mantener en baño a 65°C hasta su disolución. Alicuotar y guardar a -20°C.

KTBT

NaCl 5M	12 ml
TrisHCl pH 7,5 1M	20 ml
KCl 1M	4 ml
Tween-20 al 25%	20 ml

Enrasar con dH₂O hasta 400 ml

Tratamiento del anticuerpo para ISH para sonda de LNA

Embryo powder (EP)	3mg
Anticuerpo antidigoxigenina	1µl
KTBT	400 µl
Sheep Serum	100 µl

Desactivar previamente EP a 70°C 30 min. Incubar 1hora anticuerpo en hielo. Centrifugar retirar el sobrenadante y diluir en solución de bloqueo para ISH para sonda de LNA a 1:4000.

Embryo powder

Se produjo primero el homogeneizado de manera manual de embriones de 3 a 5 días en volumen mínimo de PBS. Posteriormente se añade acetona en proporción 4:1 en PBS y se centrifuga y se retira el sobrenadante. Posteriormente se retira el sobrenadante y se deja secar al aire para su conservación a -20°C.

1M MgCl₂

MgCl ₂	40.6 grs
dH ₂ O	200 ml

autoclavar

NTMT pH 9,5 ó pH 8:

1M Tris-HCl pH 9.5 ó Ph 8	5 ml
5M NaCl	1 ml
1M MgCl ₂	2,5 ml
25% Tween-20	500 µl
dH ₂ O	41 ml

PBT (IMH):

PBS	100 ml
BSA (Sigma)	0.2 g
Tritón X-100	100 µl

Buffer de Cacodilato de sodio (BFCS)

Cacodilato de sodio	21,4 g
dH ₂ O	1 l

a 4°C

Glutaraldehído al 3%

Glutaraldehído	12 ml
BFCS	88ml

Ácido ósmico al 1% en BFCS

Tetróxido de osmio	1 g
BFCS	100 ml

Se agita en oscuridad y se congela a -20°C

Acetato de uranilo 2% en acetona al 70%

Acetato de uranilo	1 g
Acetona	35 ml
dH ₂ O	15 ml

Mezcla I (fluka)

Compuesto AM	10 ml
Compuesto B	10 ml
Compuesto D	0,1-0,2 ml

Se agita; 10 min en estufa 37°C y se congela a – 20°C

Mezcla II (fluka)

Compuesto AM	10 ml
Compuesto B	10 ml
Compuesto D	0,1-0,2 ml
Compuesto c	0,4 ml

Se agita; 10 min en estufa a 65°C y se congela a – 20°C

Acetato de uranilo (tinción rejilla)

Acetato de uranilo	3 g
ddH ₂ O	70 ml

Citrato de plomo

Nitrato de plomo	1,33 g
Citrato de sodio	1,76 g
dH ₂ O	30 ml

Agitar y ajustar a pH 12 (NaOH 1N).

RESULTADOS

I. Análisis del papel de *Fgf8* en el desarrollo cardiaco

Es bien conocido que la expresión de *Fgf8* mantiene una íntima relación con las células precardiacas desde la fase de gastrulación (Lopez-Sanchez y Garcia-Martinez, 2011), expresándose inicialmente a nivel de la línea primitiva y posteriormente en el endodermo adyacente al mesodermo precardiaco (Figura 4).

En la presente Tesis Doctoral llevamos a cabo un estudio experimental del papel de *Fgf8* en las vías de señalización que regulan el proceso de cardiogénesis, realizando para ello experimentos de ganancia y pérdida de función.

IA. Experimentos de ganancia de función.

Nuestros resultados obtenidos mediante la electroporación a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran que la sobreexpresión de *Fgf8* reduce la expresión de los tempranos marcadores cardiacos *Nk-2.5* y *GATA4*. De forma significativa, observamos una reducción de la expresión de *Bmp2* (Figura 9).

Nuestros resultados obtenidos mediante la aplicación de esferas acrílicas justo a nivel del campo cardiaco primario, muestran que la administración de FGF8 reduce también la expresión de *Bmp2*, *Nk-2.5* y *GATA4* (Figura 9).

No obstante, al aplicar las esferas acrílicas en posición lateral al campo cardiaco primario, observamos una inducción de *Nk-2.5* alrededor de la esfera (Figura 10), dato éste coincidente con previos autores (Alsan y Schultheiss, 2002).

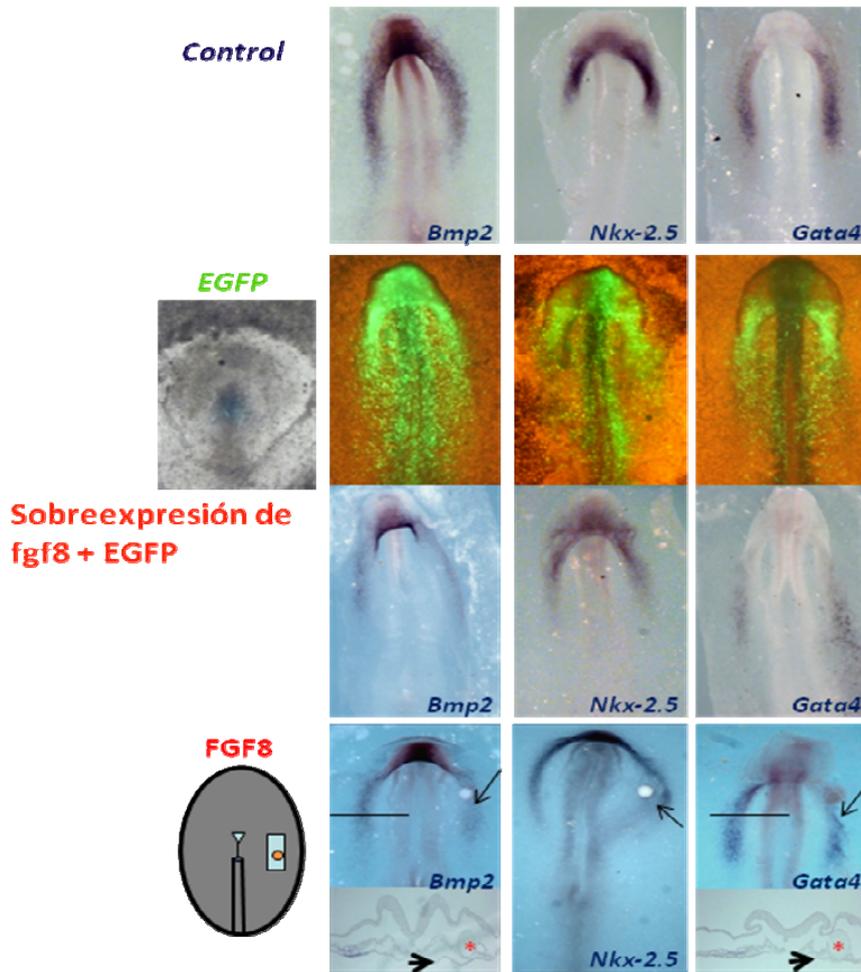


Figura 9.- La línea superior muestra los embriones control tras ISH con *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4*. A continuación se muestra una secuencia de las células precardiacas electroporadas a nivel de la línea primitiva y seguidas hasta su localización en los tubos endocárdicos primitivos. La tercera línea muestra la inhibición de la expresión de *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4* tras la electroporación con *Fgf8*. La línea inferior muestra el efecto inhibitor similar tras la aplicación de esferas (flechas) cargadas con FGF8. Las líneas horizontales señalan el nivel de las secciones (en rojo se indica la posición de la esfera).

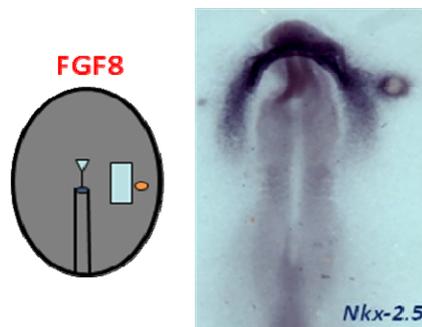


Figura 10.- El esquema muestra la aplicación de la esfera, lateral al campo cardíaco primario. Nótese en la ISH la inducción de *Nkx-2.5* alrededor de la esfera cargada con FGF8.

IB. Experimentos de pérdida de función.

Nuestros resultados obtenidos mediante la aplicación de esferas acrílicas justo a nivel del campo cardiaco primario, muestran que la administración de SU5402 incrementa la expresión de *Bmp2*, así como de *GATA4*; no obstante una modificación significativa de la expresión de *Nkx-2.5* no es observable. De especial relevancia es la observación de una disminución significativa de la expresión de *Fgf8*, así como una disminución de la señal de Erk1/2, analizada mediante IMH (Figura 11).

Adicionalmente, y coincidiendo con los resultados descritos, la electroporación con el *p-silencer Fgf8* ponen de manifiesto la gran similitud de los resultados obtenidos, esto es, un incremento de la expresión de *Bmp2* y de *GATA4*, una disminución significativa de la expresión de *Fgf8* y la señal de Erk1/2, mientras que no son identificables las modificaciones de la expresión de *Nkx-2.5* (Figura 11).

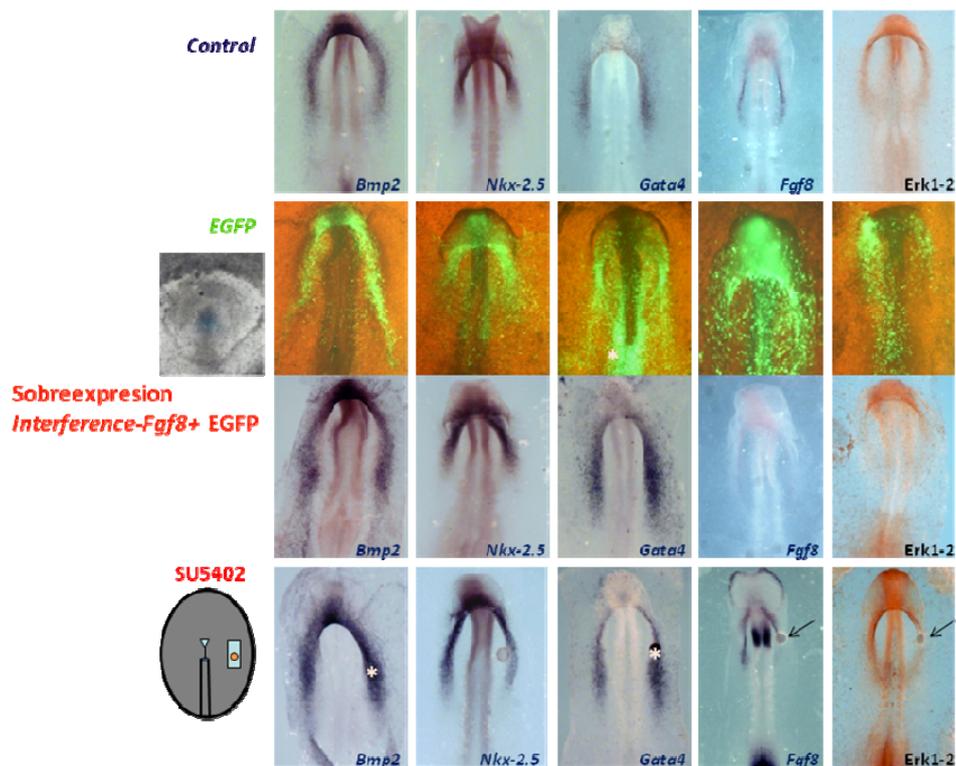


Figura 11.- La línea superior muestra los embriones control tras ISH con *Bmp2*, *Nkx-2.5*, *GATA4* y *Fgf8*, y la señal de Erk1/ mediante IMH. A continuación se muestra una secuencia de las células precárdicas electroporadas con *p-SilencerFgf8* a nivel de la línea primitiva y seguidas hasta su localización en los tubos endocárdicos primitivos. La tercera línea muestra un incremento de la expresión de *Bmp2*, y *GATA4* tras la electroporación con *p-silencer Fgf8*, con una disminución significativa de la expresión de *Fgf8* y la señal de Erk1/2.. La línea inferior muestra el efecto similar tras la aplicación de esferas (flechas) cargadas con SU5402.

II. Análisis del papel de *Bmp2* en el desarrollo cardiaco

Mediante la realización de técnicas de doble ISH (Figura 12), hemos observado que la expresión de *Bmp2* tiene lugar también desde fases muy iniciales de la gastrulación, mostrándose especialmente a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva, para expresarse posteriormente a nivel del mesodermo precardiaco, así como en el endodermo adyacente (Figura 4), en una posición más lateral y caudal a la expresión endodérmica de *Fgf8*. Estos datos sugieren una estrecha relación entre *Fgf8* y *Bmp2*, por lo que diseñamos una serie de experimentos encaminados a analizar de forma detallada el papel de *Bmp2* en las vías de señalización que regulan la cardiogénesis.

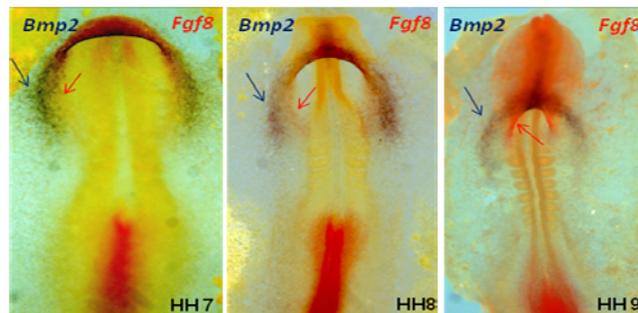


Figura 12.- Doble ISH con *Bmp2* y *Fgf8* en embriones control mostrando la expresión de *Bmp2* (azul) en el mesodermo precardiaco y endodermo adyacente, en una posición lateral y caudal a la expresión endodérmica de *Fgf8* (rojo).

IIA. Experimentos de ganancia de función.

Nuestros resultados obtenidos mediante la electroporación a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran que la sobreexpresión de *Bmp2* incrementa la expresión de los tempranos marcadores cardiacos *Nk-2.5* y *GATA4*. De forma significativa, observamos una reducción de la expresión de *Fgf8*, así como una disminución de la tinción de *Erk1/2* (Figura 13).

Nuestros resultados obtenidos mediante la aplicación de esferas acrílicas justo a nivel del campo cardiaco primario, muestran que la administración de BMP2 incrementa también la expresión de *Nk-2.5* y *GATA4*, y disminuye la expresión de *Fgf8* y la actividad *Erk1/2* (Figura 13).

No obstante, al aplicar las esferas acrílicas en posición medial al campo cardiaco primario, observamos una inducción de *Nk-2.5* y *GATA4* alrededor de la esfera; así como de *Fgf8* (Figura 14), dato éste coincidente con previos autores (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et Al., 199; Alsan y Schultheiss, 2002).

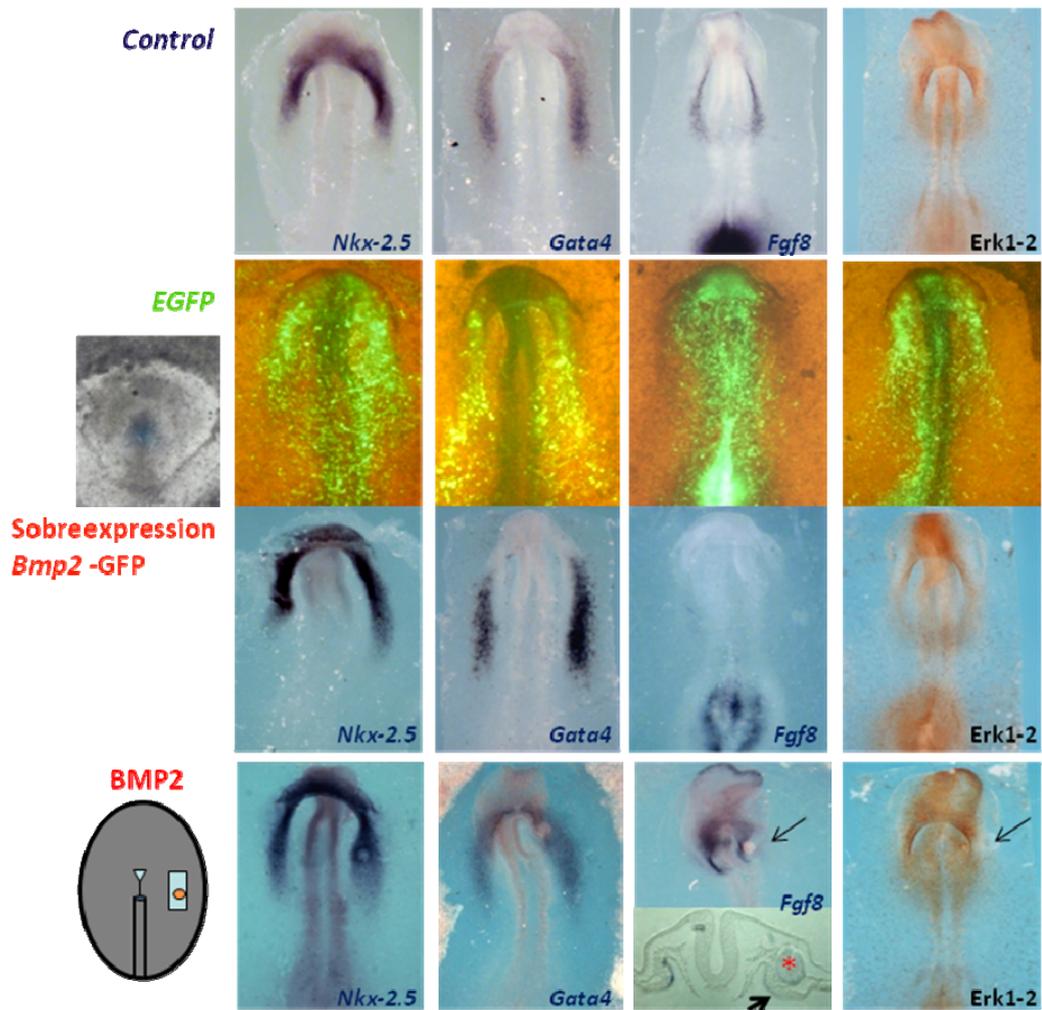


Figura 13.- La línea superior muestra los embriones control tras ISH con *Nkx-2.5*, *GATA4* y *Fgf8*, y la señal de *Erk1/2* mediante IMH. A continuación se muestra una secuencia de las células precardiacas electroporadas con *Bmp2* a nivel de la línea primitiva y seguidas hasta su localización en los tubos endocárdicos primitivos. La tercera línea muestra el incremento de la expresión de *Nkx-2.5* y *GATA4* tras la electroporación con *Bmp2*, y una disminución de la expresión de *Fgf8* y la señal de *Erk1/2*. La línea inferior muestra el efecto similar tras la aplicación de esferas (flechas) cargadas con BMP2.

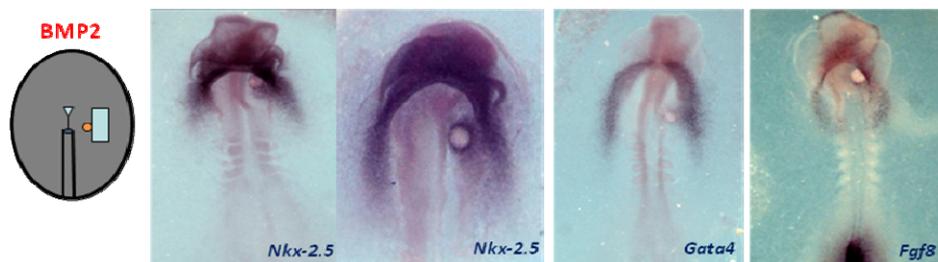


Figura 14.- El esquema muestra la aplicación de la esfera, medial al campo cardiaco primario. Nótese en las imágenes de ISH la inducción de *Nkx-2.5*, *GATA4* y *Fgf8* alrededor de la esfera cargada con BMP2.

II.B. Experimentos de pérdida de función.

Nuestros resultados obtenidos mediante la administración de nogina a nivel del campo cardíaco primario da lugar a una disminución de la expresión de *Bmp2*, así como de *Nkx-2.5* y *GATA4*; pero no de la expresión de *Fgf8* ni de la señal de Erk1/2 (Figura 15).

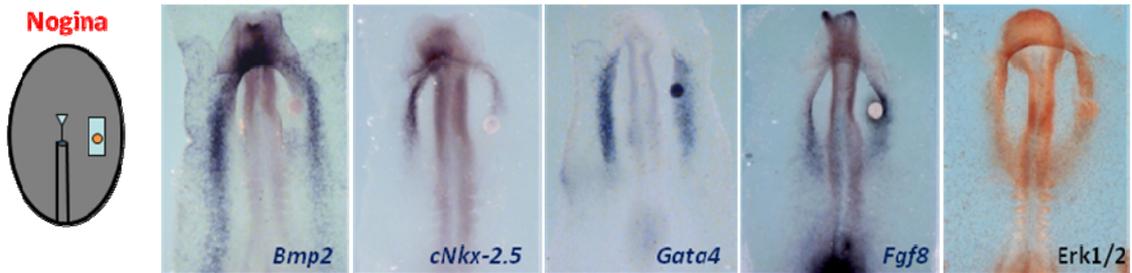


Figura 15.- El esquema muestra la aplicación de la esfera cargada con nogina justo sobre el campo cardíaco primario. Nótese en las imágenes de ISH la disminución de la expresión de *Bmp2*, así como de *Nkx-2.5* y *GATA4*; pero no de la expresión de *Fgf8* ni de la señal de Erk1/2.

III. Análisis del papel del miR-130 en el desarrollo cardiaco

Nuestros resultados de los experimentos previos han revelado que la señal de Erk1/2 disminuye en los experimentos de sobreexpresión de *Bmp2*. Analizando detalladamente el programa *target scan* (Grimson et al., 2007; Friedman et al., 2009), encontramos que miR130 es un microRNA que se une a secuencias específicas en el 3'UTR del gen diana Erk1/2 (Figura 16), lo cual sugiere que podría actuar como regulador post-transcripcional de su expresión. Considerando estos datos, hemos realizado un análisis de la expresión del miR-130 desde la fase de línea primitiva hasta la formación del tubo cardiaco primitivo, así como un estudio de su posible papel en la interacción Fgf/Bmp.

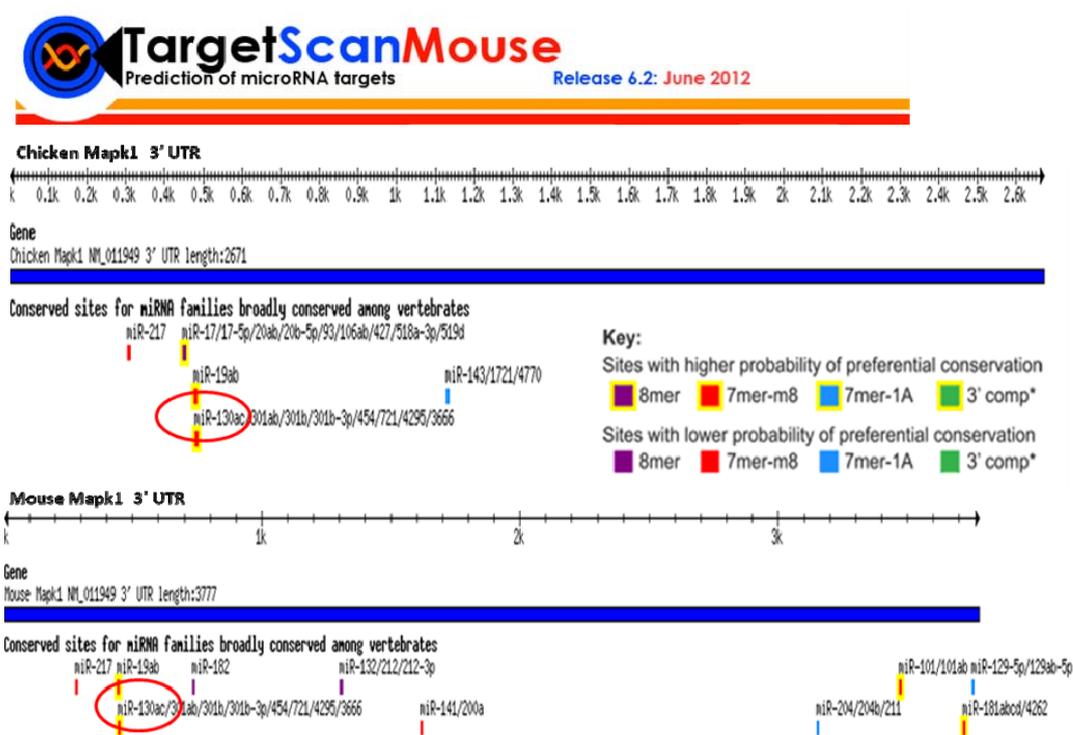


Figura 16.- Muestreo mediante programa bioinformático Target-Scan (<http://www.targetscan.org/>) mostrando que miR130 es un microRNA que se une a secuencias específicas en el 3'UTR del gen diana Erk1/2.

Expresión de miR-130 durante el desarrollo cardiaco.

Tal como queda ilustrado en la Figura 17, la expresión de miR-130 se inicia en estadio PS3 a nivel de la línea primitiva, expandiéndose hacia las áreas laterales del embrión en estadio PS8, de distribución muy amplia, a nivel de las capas de mesodermo y endodermo. A partir del estadio PS13 la expresión viene a ser restringida a nivel de ambos campos cardiacos primarios. Hacia los estados HH7 y HH8 la expresión del miR-130 queda localizada a nivel de ambos tubos endocárdicos primitivos.

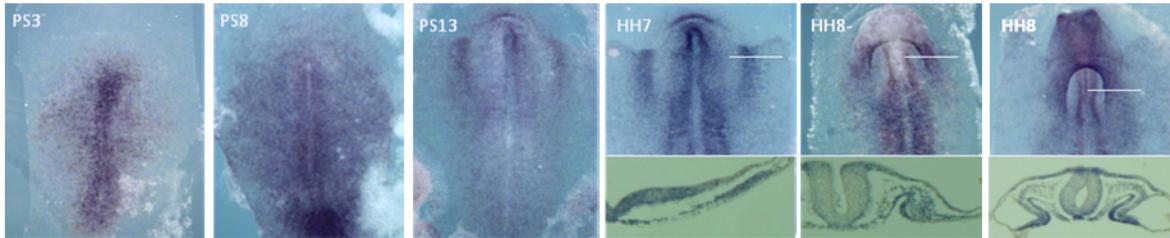


Figura 17.- Secuencia de diferentes estadios de embriones sometidos a ISH con sonda LNA de *miR-130*, mostrando su expresión inicialmente (PS3) a nivel de la línea primitiva, y posteriormente a nivel del mesodermo y endodermo adyacente a nivel del campo cardiaco primario.

Este patrón de expresión del miR-130 es muy concordante con la señal de Erk1/2, que hemos estudiado mediante técnicas de IMH. Tal como puede apreciarse en la Figura 18, las áreas de expresión son muy similares a las áreas de expresión del miR-130.

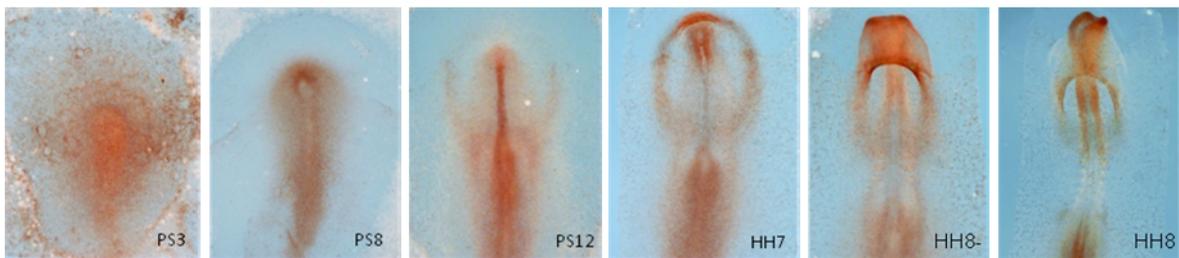


Figura 18.- Secuencia de diferentes estadios de embriones sometidos a IMH con ERK1/2, mostrando señal inicialmente (PS3) a nivel de la línea primitiva, y posteriormente a nivel del mesodermo y endodermo adyacente a nivel del campo cardiaco primario.

Experimentos de ganancia de función del miR-130.

Nuestros resultados obtenidos mediante la electroporación a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran que la sobreexpresión de miR-130 incrementa significativamente la expresión de *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4*, mientras que se observa una evidente inhibición de la expresión de *Fgf8* y de la señal de Erk1/2. (Figura 19).

Experimentos de pérdida de función del miR-130.

Nuestros resultados obtenidos mediante la electroporación a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran que la sobreexpresión de anti-miR-130 suprime significativamente la expresión de *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4*, mientras que se observa una evidente expansión de la expresión de *Fgf8* y de la señal de Erk1/2. (Figura 20).

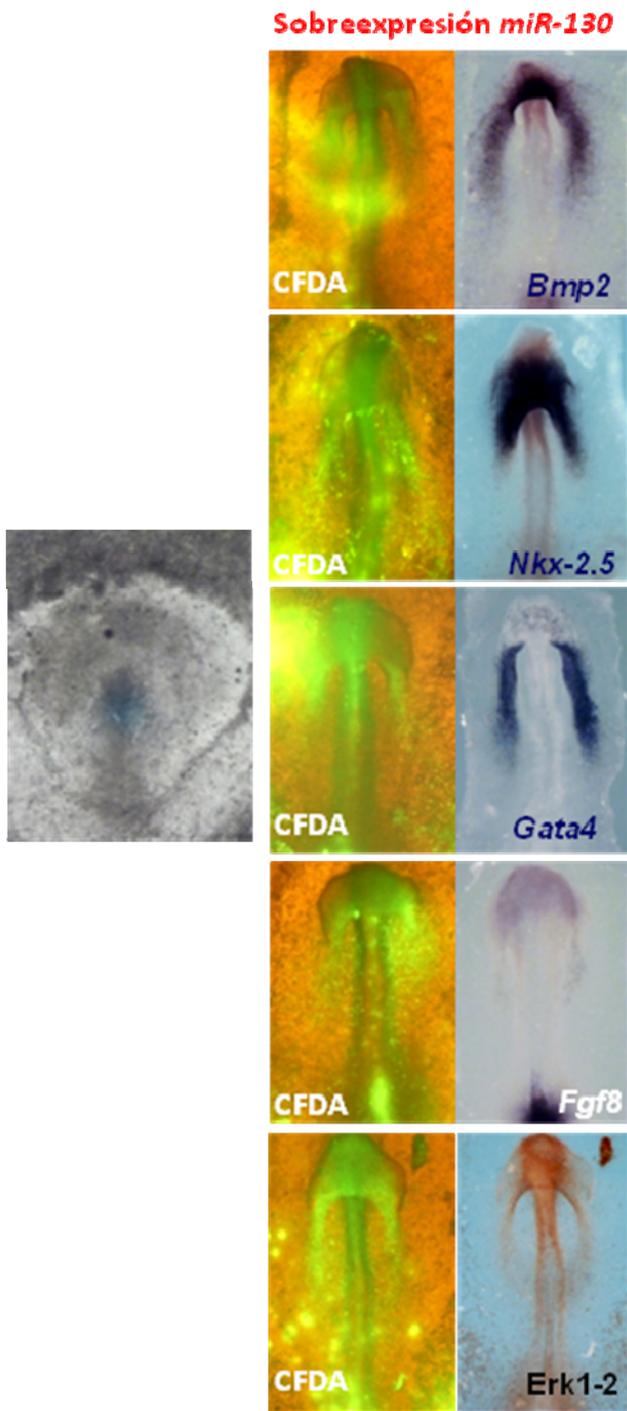


Figura 19.- El panel ilustra el efecto de la electroporación de las células precardiacas con *miR-130* a nivel de la línea primitiva, mostrando el incremento de la expresión de *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4*, y una disminución de la expresión de *Fgf8* y la señal de *Erk1/2*.

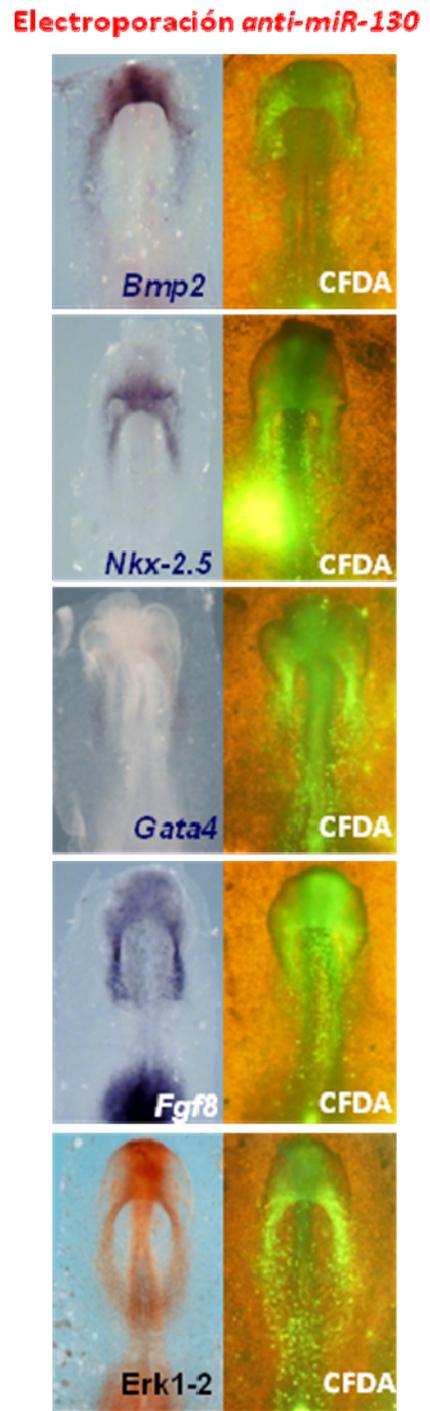


Figura 20.- El panel ilustra el efecto de la electroporación de las células precardiacas con *anti-miR-130* a nivel de la línea primitiva, mostrando la disminución de la expresión de *Bmp2*, *Nkx-2.5* y *GATA4*, y un incremento de la expresión de *Fgf8* y la señal de *Erk1/2*.

Bmp2 regula la expresión del miR-130.

En un intento de establecer una relación más precisa entre el miR-130 y Bmp2, hemos analizado el efecto de la sobreexpresión de *Bmp2* a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva y su repercusión sobre la expresión del *miR-130*, observando un incremento de su expresión a nivel de los tubos endocárdicos. De forma concordante, la aplicación de esferas acrílicas a nivel del campo cardiaco primario, pone de manifiesto que nogina se produce una pérdida de la expresión del *miR-130* en el tubo endocárdico ipsilateral (Figura 21).

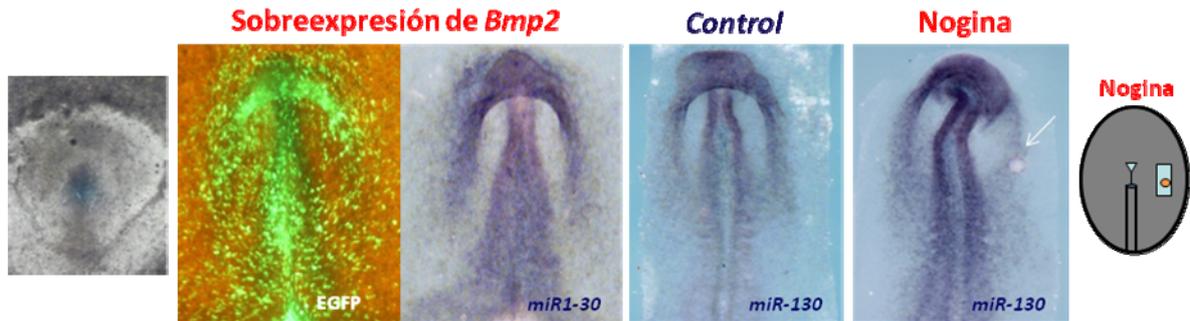


Figura 21- La electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con *Bmp2* conduce a un incremento de la expresión de *miR-130* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, en comparación con los embriones control. El esquema muestra la posición de la esfera cargada con nogina, a nivel del campo cardiaco primario, que origina la disminución de la expresión de miR-130 (flecha).

IV. Regulación de miR-133 por Bmp2 y miR-130

Aunque algunas descripciones en relación con la expresión del *miR-133* han sido previamente aportadas (citas), no se conoce con precisión el patrón de expresión del mismo. En la presente tesis doctoral hemos realizado mediante ISH un análisis amplio y exhaustivo del patrón de expresión del *miR-133* (Figura22), desde la fase de gastrulación hasta la constitución del asa cardiaca. Nuestros resultados muestran que la expresión de *miR-133* mantiene una íntima relación con las células precardiacas y la constitución de las paredes que caracterizan la formación del asa. En la fase de gastrulación, *miR-133* se expresa a lo largo de toda la línea primitiva, para extenderse posteriormente de forma lateral y concentrarse a nivel del campo cardiaco primario a cada lado del embrión, para finalmente quedar restringida su expresión exclusivamente a nivel de los tubos endocárdicos primitivos. Tal y como ha sido referido por previos autores, el *miR-133* muestra una especial especificidad en su expresión a nivel del miocardio del asa cardiaca (Darnell et al., 2006).

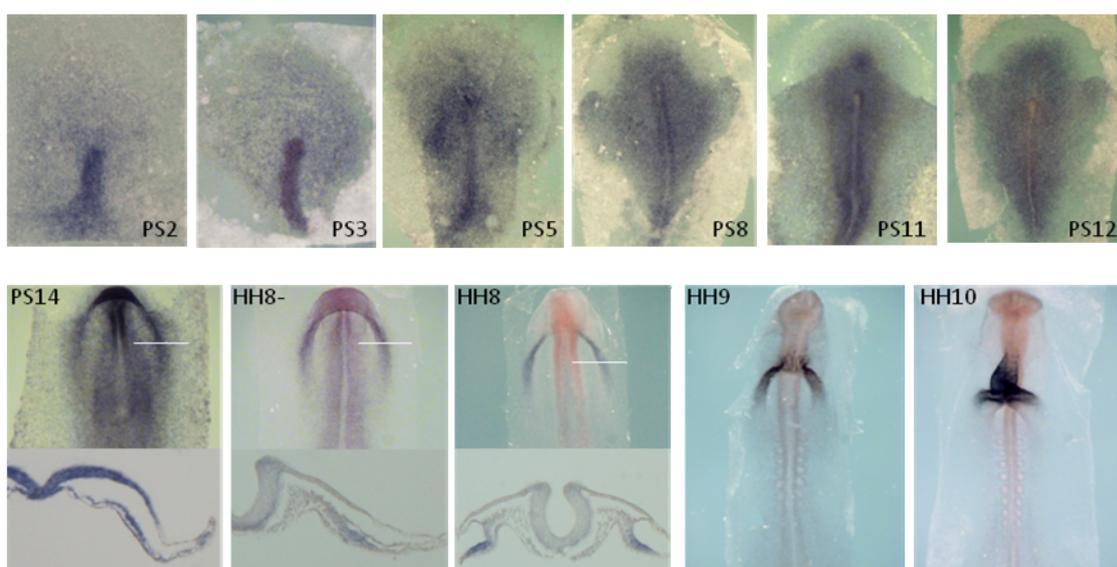


Figura 22- Hibridación *in situ* con LNA del *miR-133* mostrando su expresión inicialmente a nivel de la línea primitiva (PS2-PS12), y posteriormente a nivel del mesodermo precardiaco (PS14), desde su localización en la hoja esplancopleura del mesodermo lateral, hasta la formación de los tubos endocárdicos primitivos, tubo cardiaco y asa cardiaca (HH8-HH10). Las líneas blancas indican el nivel de las secciones ilustradas.

Nuestros resultados de sobreexpresión de *Bmp2* a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran un incremento de la expresión del miR-133 a nivel de los tubos endocárdicos. De forma concordante, la aplicación de esferas acrílicas a nivel del campo cardíaco primario, pone de manifiesto que nogina produce una pérdida de la expresión del miR-133 en el tubo endocárdico ipsilateral (Figura 23).

Adicionalmente, de sobreexpresión de *miR-130* a nivel de las células precardiacas de la línea primitiva muestran un incremento de la expresión del *miR-133* a nivel de los tubos endocárdicos (Figura 24).

De forma concordante, la inhibición de la expresión del miR-130, mediante la electroporación con de anti-*miR-130*, produce una pérdida de la expresión del miR-133 en los tubos endocárdicos (Figura 25).

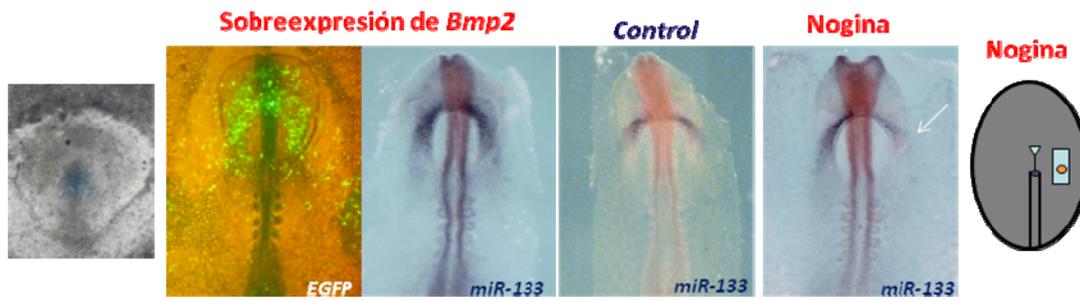


Figura 23- La electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con *Bmp2* conduce a un incremento de la expresión de *miR-133* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, en comparación con los embriones control. El esquema muestra la posición de la esfera cargada con nogina, a nivel del campo cardíaco primario, que origina la disminución de la expresión de *miR-133* (flecha).



Figura 24- La electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con *miR-130* conduce a un incremento de la expresión de *miR-133* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, en comparación con los embriones control.

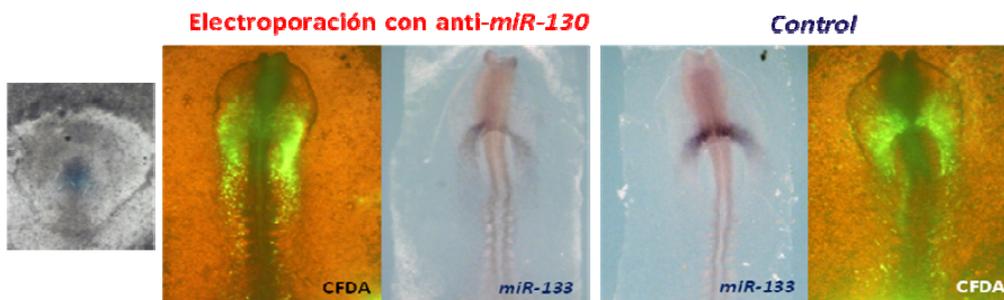


Figura 25- La electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con anti-*miR-130* conduce a una disminución de la expresión de *miR-133* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, en comparación con los embriones control.

DISCUSIÓN

Hoy día es asumido que los determinantes moleculares constituyen uno de los pilares fundamentales de la biología del desarrollo. En todos los órganos, incluido el corazón, el conocimiento de las vías de señalización que regulan la expresión de diferentes genes en las distintas fases de su desarrollo, es clave para la comprensión de los complejos sistemas que controlan los procesos morfogénéticos, así como su posible repercusión en los tejidos de los órganos del adulto, dada su potencial influencia en los procesos de reparación y en la medicina regenerativa.

El corazón constituye uno de los principales órganos en los que se centra la atención y el interés debido a su precoz desarrollo, pues es el primer órgano con capacidad funcional, y es imprescindible para el inicio y mantenimiento del desarrollo de los demás sistemas.

En un intento de aportar nuevos datos sobre los factores moleculares que confeccionan las vías de señalización responsables de la inducción y diferenciación cardiaca, en la presente Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un estudio en embriones de pollo basado en un detallado análisis del papel de los factores de crecimiento *Fgf8* y *Bmp2*, así como otros componentes que desde un punto de vista molecular pueden constituir factores determinantes claves en las vías de señalización para que células indiferenciadas reciban estímulos de inducción cardiaca, lleguen a diferenciarse en miocardiocitos y tengan la capacidad de organizarse morfológicamente en la estructura tridimensional compleja que determina la morfología tetracameral que caracteriza al corazón adulto.

Se ha propuesto como primer marcador de diferenciación cardiaca a nivel del mesodermo, lateral y craneal a ambos lados del embrión, la expresión del factor de transcripción *Nkx-2.5* (Schultheiss et al., 1995; Ehrman y Yutzey, 1999), y que estaría determinado por el efecto inductor de proteínas secretadas a nivel del endodermo adyacente al mesodermo precardiaco (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000; Alsan y Schultheiss, 2002; Brand, 2003; Brade et al, 2006). Previamente ha sido puesto de manifiesto que este endodermo adyacente expresa *Fgf8*, y experimentalmente se ha demostrado que la administración de FGF8 tiene capacidad de inducir la expresión de *Nkx-2.5*, no obstante, estos hallazgos han sido identificados solamente en una localización lateral al campo cardiaco primario. Además, experimentos previos han mostrado que tras retirar el endodermo adyacente, el mesodermo precardiaco pierde su capacidad de expresar *Nkx-2.5*, mientras que esta expresión es rescatada al aplicar FGF8 (Alsan y Schultheiss, 2002).

Nuestros experimentos de sobreexpresión de *Fgf8*, electroporando las células precardiacas de la línea primitiva, analizadas a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, produce una disminución de la expresión de *Nkx-2.5*, así como del factor de transcripción *Gata4*, un marcador específico de diferenciación cardiaca (Laverriere et al., 1994; Jiang et al., 1998). Tras la aparente discrepancia con los resultados previamente aportados por otros autores

(Alsan y Schultheiss, 2002), hemos procedido a la aplicación de esferas acrílicas cargadas con FGF8, justo a nivel del campo cardiaco primario, observando nuevamente la disminución de la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*. Dado que nuestros experimentos, colocando las esferas en una localización lateral al campo cardiaco primario, han resultado, al igual que previos trabajos (Alsan y Schultheiss, 2002), en la inducción de *Nkx-2.5* alrededor de la esfera, cabe plantearse que la aparente discrepancia en los resultados vendría explicada por el hecho de que experimentalmente existe una importante diferencia en el diseño del estudio, ya que en nuestros experimentos actuamos directamente sobre las células precardiacas de la línea primitiva, y sobre las células precardiacas del mesodermo y endodermo del campo cardiaco primario. Ello viene apoyado por el hecho de que en nuestros experimentos las esferas colocadas en posición lateral al campo cardiaco primario, aunque tienen capacidad de inducir *Nkx-2.5*, no muestran evidencias de capacidad de inducción de *Gata4*. Es pues evidente que nuestros experimentos son llevados a cabo sobre específicas células de linaje cardiaco, del propio campo cardiaco primario, y no en áreas periféricas al mismo. Además, otros factores localizados en áreas periféricas al campo cardiaco primario, de la familia de los *Wnt*, estarían también regulando el proceso de inducción cardiaca (Flaherty et al., 2012). Estos datos también sugieren que podría existir la posibilidad de un efecto inductor de *Fgf8* dosis-dependiente, y que un nivel elevado de señal de *Fgf8* tuviese un efecto opuesto, represor de diferenciación, tal como se ha sugerido en trabajos previos realizados sobre modelos diferentes de desarrollo (Hutson et al., 2010; Tirosh-Finkel et al., 2010).

Nuestros resultados obtenidos mediante sobreexpresión de *Fgf8* vienen apoyados por nuestros experimentos de pérdida de función, ya que la electroporación de las células precardiacas de la línea primitiva con el *Fgf8* siRNA, así como la aplicación del bloqueante de señal FGF, SU5402, han mostrado el efecto inverso, dando lugar a un incremento de la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4* a nivel del campo cardiaco primario. Es interesante tener en cuenta que el SU5402 es un inhibidor del receptor FGF (FGFR1), lo cual sugiere que los receptores de FGF a nivel del mesodermo precardiaco estarían jugando un papel relevante en el proceso de cardiogénesis, y merecerían en su caso pues un análisis más exhaustivo de los mismos (Sugi et al., 1995; Zhu et al., 1999; Dell'Era et al., 2003).

Uno de nuestros resultados más relevantes tras la sobreexpresión de *Fgf8* es su capacidad de inhibir la expresión de *Bmp2*, dato que viene apoyado por nuestros experimentos de pérdida de función de *Fgf8*, que originan un incremento de la expresión de *Bmp2* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos. Ha sido previamente demostrado que *Bmp2* se expresa a nivel de ambos componentes del campo cardiaco primario, mesodermo precardiaco y endodermo adyacente (Andrée et al., 1998), y se ha propuesto que *Bmp2* sería un factor determinante del proceso de inducción cardiaca, mediante la actuación de señales que emanan desde el endodermo y tienen su respuesta a nivel del mesodermo precardiaco (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000). Experimentos previos han mostrado que la administración de BMP2, en una región medial al campo cardiaco primario, justo lateral al

nódulo de Hensen, tiene capacidad de inducir la expresión de genes específicos de diferenciación cardíaca, *Nkx-2.5* y *Gata4* (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000; Alsan y Schultheiss, 2002). Sin embargo, esta capacidad inductora de BMP2 no ha podido ser demostrada cuando se administra en localización lateral al campo cardíaco primario (Alsan y Schultheiss, 2002).

Nuestros experimentos de sobreexpresión de *Bmp2*, electroporando las células precardiacas de la línea primitiva, analizadas a nivel de los tubos endocárdicos primitivos, produce un incremento de la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*. Asimismo, la aplicación de esferas acrílicas cargadas con BMP2, justo a nivel del campo cardíaco primario, incrementa las áreas de expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*. Estos datos son coincidentes con trabajos previos de otros autores (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000; Alsan y Schultheiss, 2002), lo cual apoya la participación clave de *Bmp2* como factor inductor del proceso de cardiogénesis. Además, nuestros resultados vienen apoyados por nuestros experimentos de pérdida de función, mediante la aplicación del inhibidor de *Bmp2*, nogina, obteniendo el efecto inverso, dando lugar a una pérdida de expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*, lo cual es coincidente con previos resultados de otros autores (Schultheiss et al., 1997; Andrée et al., 1998; Schlange et al., 2000; Tirosh-Finkel et al., 2010; Hutson et al., 2010).

De modo interesante, nuestros experimentos de sobreexpresión de *Bmp2* ponen de manifiesto una disminución de la expresión de *Fgf8* a nivel de los tubos endocárdicos primitivos. Además, la administración de esferas cargadas con BMP2 inhibe la expresión de *Fgf8*, coincidiendo con resultados de experimentos previos (Alsan y Schultheiss, 2002). Teniendo en cuenta que en nuestros experimentos la sobreexpresión de *Fgf8* conducen a una inhibición de la expresión de *Bmp2*, cabe plantearse que existe ineludiblemente una cooperación *Fgf8/Bmp2* en el proceso de inducción cardíaca. Trabajos previos han mostrado que *Fgf8* y *Bmp2* se expresan ambos en el endodermo adyacente al mesodermo precardiaco, y que actuarían como factores claves emitiendo señales inductoras hacia el mesodermo (Alsan y Schultheiss, 2002; Schlange et al., 2000; Brand, 2003). Sin embargo, nuestros resultados mediante doble ISH con *Fgf8* y *Bmp2* ponen de manifiesto que la expresión de ambos a nivel del endodermo no está solapada, de tal modo que *Fgf8* se expresa en una localización medial respecto de la expresión de *Bmp2*, más lateral, a nivel de la capa endodérmica adyacente.

Todos estos datos en conjunto, la inhibición de *Bmp2* por la sobreexpresión de *Fgf8*, la inhibición de *Fgf8* por la sobreexpresión de *Bmp2*, y el hecho de que *Fgf8* y *Bmp2* tienen áreas de expresión separadas a nivel del endodermo del campo cardíaco primario, sugieren un mecanismo de *feed-back* negativo, quizá dosis-dependiente, mediante el cual una cooperación *Fgf8/Bmp2*, ambos necesarios para la expresión de *Nkx-2.5*, constituirían el mecanismo del inicio de la cardiogénesis. Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que *Fgf8* es capaz de inducir la expresión de *Nkx-2.5*, pero no la expresión de *Gata4*, mientras que *Bmp2* tiene capacidad de inducir a ambos simultáneamente (Figura 37). Posteriormente, cada

uno de estos factores de transcripción regularía una cascada de expresión de genes responsables del mantenimiento de la diferenciación cardiaca (Brand, 2003; Brewer et al., 2005).

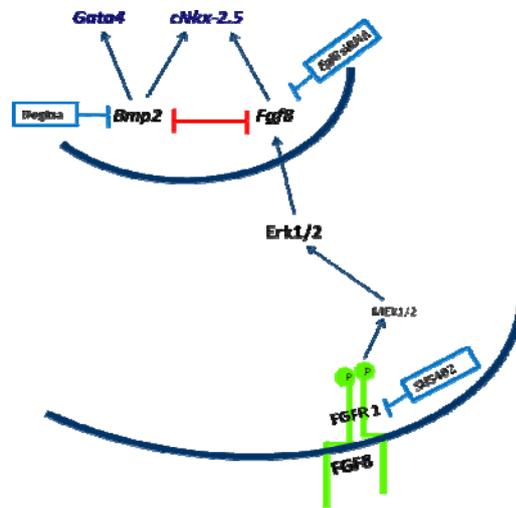


Figura 37- Esquema del modelo propuesto para explicar el *feed-back* negativo BMP2/FGF8 en la regulación del inicio de la cardiogénesis.

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *Bmp2* origina un descenso de la expresión de *Fgf8*, y que la administración de nogina, que inhibe a *Bmp2*, resulta en un incremento de la expresión de *Fgf8*. Estos resultados se acompañan con el dato que hemos obtenido mediante IMH con Erk1/2, de tal modo que cuando desciende la expresión de *Fgf8*, bien por electroporación con *Fgf8* siRNA, o bien mediante la aplicación de esferas de SU5402, disminuye la señal de Erk1/2. Este dato es explicable al encontrarse Erk1/2 en la vía de señalización de Fgf/MAPK (Eblaghie et al., 2003; Corson et al., 2003; Lunn et al., 2007; Aragon y Pujades, 2009), ya que previamente se ha demostrado, en otros modelos, que la inhibición de la expresión de *Fgf8* mediante SU5402 inhibe la señal de Erk1/2, siendo éste necesario para la expresión de *Fgf8* (Echevarria et al., 2005). Estos resultados estarían apoyando un papel activo del Bmp2 sobre la regulación de la señal de Erk1/2, tal como se ha propuesto previamente en otros modelos experimentales (Hutson et al., 2010; Tirosh-Finkel et al., 2010; Stuhlmiller y Garcia-Castro, 2012).

Atendiendo a nuestros resultados, cabe plantearse una acción directa de Bmp2 sobre la expresión de *Fgf8*, o bien, indirecta, a través de la regulación de Erk1/2. En un intento de establecer un mecanismo que justifique si existe una vía alternativa del control de Fgf/MAPK a partir de *Bmp2*, hemos analizado la posible influencia del dato que hemos observado a través del análisis con el programa *Target-Scan* (Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009; Garcia et al.,

2011), mediante el que obtenemos la información de que miR130 es un microRNA que se une a secuencias específicas en el 3'UTR del gen diana Erk1/2. Teniendo en cuenta este dato, y el hecho de que los microRNAs han mostrado jugar un papel relevante en otros modelos de desarrollo (Chen et al., 2006; Chinchilla et al., 2011; Malizia y Wang, 2011; Cao et al., 2012; Sokol, 2012), en la presente Tesis Doctoral hemos analizado el posible papel del miR-130 en el proceso de cardiogénesis.

Nuestros resultados muestran que *miR-130* se expresa a nivel de la línea primitiva, abarcando pues las células precardiacas, y continua expresándose a nivel del mesodermo precardiaco y su endodermo adyacente. Este patrón de expresión es altamente coincidente con la distribución de la señal de Erk1/2 durante estas fases del desarrollo. Estos datos sugieren una estrecha relación entre el patrón observado para *miR-130* y Erk1/2 y el proceso de cardiogénesis.

En un intento de dilucidar hasta qué punto miR-130 está implicado en el proceso de inducción cardíaca, hemos realizado experimentos de ganancia y pérdida de función. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de *miR-130* incrementa los niveles de expresión de los marcadores cardíacos *Nkx-2.5* y *Gata4*, y de forma interesante, un incremento de la expresión de *Bmp2*. Ello se acompaña de una disminución de la expresión de *Fgf8* y de la señal Erk1/2 a nivel de los tubos endocárdicos primitivos.

Nuestros datos están apoyados por el hecho de que nuestros experimentos de inhibición de la expresión de *miR-130*, mediante electroporación del *anti-miR-130*, conducen a una inhibición de *Nkx-2.5* y *Gata4*, acompañada de una inhibición de la expresión de *Bmp2*. De modo significativo observamos un incremento de la expresión de *Fgf8* y de la señal de Erk1/2 a nivel de los tubos endocárdicos primitivos.

Adicionalmente, nuestros experimentos de sobreexpresión de *Bmp2* resultan en un incremento de la expresión de *miR-130*, y de forma concordante, la administración de nogina resulta en una disminución de la expresión de *miR-130*.

Todos estos datos en conjunto sugieren que *Bmp2* regula la expresión de *miR-130*, y éste a su vez controlaría la señal de Erk1/2, posiblemente por interacción con el 3'UTR del específico mRNA reprimiendo su translación y estabilidad, tal como ha sido también sugerido a partir de estudios realizados en otros modelos experimentales (Jarrett et al., 2011). Cabe plantear la hipótesis del establecimiento de una vía que regulase la expresión de *Fgf8* a través de la señal de *Bmp2* por su efecto sobre Erk1/2, mediado por su acción a través de la regulación del miR-130 (Figura 38).

cardiaco. Esta participación podría estar basada en un mecanismo de control del receptor FGFR1 por miR-133, estableciendo una regulación del conjunto de la vía FGF8/MAPK (Figura 39).

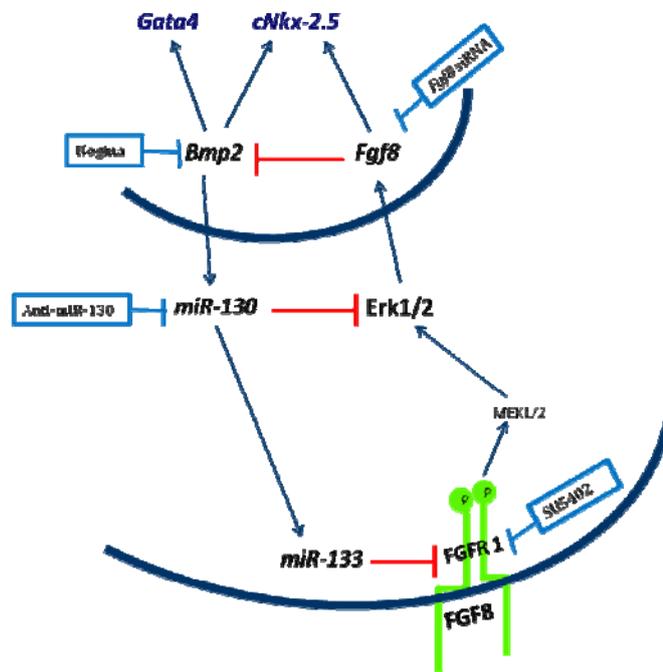


Figura 39- Esquema del modelo propuesto para explicar el *feed-back* negativo BMP2/FGF8 en la regulación del inicio de la cardiogénesis. Participación de miR-133 en la vía Fgf-Erk1/2, regulada por miR-130.

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos realizado un estudio experimental en embriones de aves dirigido a la determinación de los factores moleculares que determinan el desarrollo inicial del corazón. De nuestros resultados se pueden extraer las siguientes Conclusiones:

1.- La sobreexpresión de *Bmp2* a nivel de las células precardiacas incrementa la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*. *Bmp2* constituye el factor inductor del proceso de cardiogénesis.

2.- La sobreexpresión de *Fgf8* a nivel de las células precardiacas disminuye la expresión de los factores de transcripción *Nkx-2.5* y *Gata4*. *Fgf8* actúa como controlador del proceso de inducción de cardiogénesis.

3.- Dado que la sobreexpresión de *Fgf8* inhibe la expresión de *Bmp2* y que la sobreexpresión de *Bmp2* inhibe la expresión de *Fgf8* y la señal de *Erk1/2*, concluimos que el inicio del proceso de especificación cardiaca está regulado por un mecanismo de *feed-back* negativo entre *Fgf8/Bmp2*.

4.- La co-expresión de *miR-130* y *Erk1/2* en íntima relación con la localización de las células precardiacas, desde su posición a nivel de la línea primitiva hasta la formación del tubo cardiaco primitivo, pone de manifiesto su papel clave en la regulación del proceso de inducción cardiaca, lo cual está apoyado por los resultados de los experimentos de ganancia y pérdida de función de *miR-130*.

5.- Nuestros resultados evidencian una participación de *miR-130* en el control de *Fgf8* en la vía de señalización de inducción cardiaca, modulando la actividad *Erk1/2*.

6.- El proceso de inducción cardiaca está regulado por un mecanismo de coordinación entre *Fgf8/Bmp2* responsable de la inducción de la expresión de *Nkx-2.5* y *Gata4*. Un mecanismo de regulación entre *Bmp2* y *miR-130* inhibe a *Erk1/2*, que está regulando la expresión de *Fgf8*. En este proceso, *miR-133* podría actuar como modulador de la vía *Fgf8-Erk1/2*.

7.- En conjunto, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran la compleja base molecular que determina el proceso de inducción y diferenciación cardiaca, basada en una precisa ordenación témporo-espacial de señales y expresión de genes específicos que garantizan el adecuado normal desarrollo morfológico y funcional del corazón embrionario.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Issa, R., Waldo, K. and Kirby, M. L.** (2004). Heart Fields: One, Two Or More? *Dev. Biol.* **272**, 281-285.
- Abu-Issa, R. and Kirby, M. L.** (2008). Patterning of the Heart Field in the Chick. *Dev. Biol.* **319**, 223-233.
- Akiyama, H., Chaboissier, M., Behringer, R. R., Rowitch, D. H., Schedl, A., Epstein, J. A. and de Crombrughe, B.** (2004). Essential Role of Sox9 in the Pathway that Controls Formation of Cardiac Valves and Septa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6502-6507.
- Alsan, B. H. and Schultheiss, T. M.** (2002). Regulation of Avian Cardiogenesis by Fgf8 Signaling. *Development* **129**, 1935-1943.
- Andrée, B., Duprez, D., Vorbusch, B., Arnold, H. and Brand, T.** (1998). BMP-2 Induces Ectopic Expression of Cardiac Lineage Markers and Interferes with Somite Formation in Chicken Embryos. *Mech. Dev.* **70**, 119-131.
- Aragon, F. and Pujades, C.** (2009). FGF Signaling Controls Caudal Hindbrain Specification through Ras-ERK1/2 Pathway. *BMC Dev. Biol.* **9**, 61.
- Bao, Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E. and Cepko, C. L.** (1999). Regulation of Chamber-Specific Gene Expression in the Developing Heart by Irx4. *Science* **283**, 1161-1164.
- Barron, M., Gao, M. and Lough, J.** (2000). Requirement for BMP and FGF Signaling during Cardiogenic Induction in Non-Precardiac Mesoderm is Specific, Transient, and Cooperative. *Developmental Dynamics* **218**, 383-393.
- Bisaha, J. G. and Bader, D.** (1991). Identification and Characterization of a Ventricular-Specific Avian Myosin Heavy Chain, VMHC1: Expression in Differentiating Cardiac and Skeletal Muscle. *Dev. Biol.* **148**, 355-364.
- Brade, T., Männer, J. and Kühl, M.** (2006). The Role of Wnt Signalling in Cardiac Development and Tissue Remodelling in the Mature Heart. *Cardiovascular Research* **72**, 198-209.
- Brand, T., Andree, B. and Schlange, T.** (2002). Molecular Characterization of Early Cardiac Development. *Results Probl. Cell Differ.* **38**, 215-238.
- Brand, T.** (2003). Heart Development: Molecular Insights into Cardiac Specification and Early Morphogenesis. *Dev. Biol.* **258**, 1-19.
- Brewer, A. C., Alexandrovich, A., Mjaatvedt, C. H., Shah, A. M., Patient, R. K. and Pizzey, J. A.** (2005). GATA Factors Lie Upstream of Nkx 2.5 in the Transcriptional Regulatory Cascade that Effects Cardiogenesis. *Stem Cells Dev.* **14**, 425-439.
- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D. A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C. E. et al.** (2001). A Murine Model of Holt-Oram Syndrome Defines Roles of the T-Box Transcription Factor Tbx5 in Cardiogenesis and Disease. *Cell* **106**, 709-721.
- Bruneau, B. G., Bao, Z., Tanaka, M., Schott, J., Izumo, S., Cepko, C. L., Seidman, J. G. and Seidman, C. E.** (2000). Cardiac Expression of the Ventricle-Specific Homeobox Gene Irx4 is Modulated by Nkx2-5 and dHand. *Dev. Biol.* **217**, 266-277.
- Bruneau, B. G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C. J., Seidman, J. G. and Seidman, C. E.** (1999). Chamber-Specific Cardiac Expression of Tbx5 and Heart Defects in Holt-Oram Syndrome. *Dev. Biol.* **211**, 100-108.
- Buck, S. H., Konyn, P. J., Palermo, J., Robbins, J. and Moss, R. L.** (1999). Altered Kinetics of Contraction of Mouse Atrial Myocytes Expressing Ventricular Myosin Regulatory Light Chain. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **276**, H1167-H1171.

- Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S.** (2005). Building the Mammalian Heart from Two Sources of Myocardial Cells. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 826-837.
- Callis, T. E., Deng, Z., Chen, J. F. and Wang, D. Z.** (2008). Muscling through the microRNA World. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**, 131-138.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J. et al.** (2009). MicroRNA-208a is a Regulator of Cardiac Hypertrophy and Conduction in Mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2772-2786.
- Campione, M., Ros, M. A., Icardo, J. M., Piedra, E., Christoffels, V. M., Schweickert, A., Blum, M., Franco, D. and Moorman, A. F. M.** (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.
- Cao, L., Kong, L. P., Yu, Z. B., Han, S. P., Bai, Y. F., Zhu, J., Hu, X., Zhu, C., Zhu, S. and Guo, X. R.** (2012). MicroRNA Expression Profiling of the Developing Mouse Heart. *Int. J. Mol. Med.*
- Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M. L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D. et al.** (2007). MicroRNA-133 Controls Cardiac Hypertrophy. *Nat. Med.* **13**, 613-618.
- Chapman, S. C., Collignon, J., Schoenwolf, G. C. and Lumsden, A.** (2001). Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture using a Filter Paper Carrier. *Dev. Dyn.* **220**, 284-289.
- Chapman, S. C., Matsumoto, K., Cai, Q. and Schoenwolf, G. C.** (2007). Specification of Germ Layer Identity in the Chick Gastrula. *BMC Developmental Biology* **7**,
- Chen, J. and Wang, D. -.** (2012). MicroRNAs in Cardiovascular Development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 949-957.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L. and Wang, D. Z.** (2006). The Role of microRNA-1 and microRNA-133 in Skeletal Muscle Proliferation and Differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228-233.
- Chen, J., Kubalak, S. W., Minamisawa, S., Price, R. L., Becker, K. D., Hickey, R., Ross, J. and Chien, K. R.** (1998). Selective Requirement of Myosin Light Chain 2v in Embryonic Heart Function. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1252-1256.
- Chinchilla, A., Daimi, H., Moreno, N., Aranega, A. and Franco, D.** (2009). Emerging Roles of microRNAs in Cardiovascular Development and Disease. *Trends in Developmental Biology* **4**, 1-18.
- Chinchilla, A., Lozano, E., Daimi, H., Esteban, F. J., Crist, C., Aranega, A. E. and 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., Habets, P. E. M. H., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., Bao, Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R. P. et al.** (2000). Chamber Formation and Morphogenesis in the Developing Mammalian Heart. *Dev. Biol.* **223**, 266-278.
- Colas, J. and Schoenwolf, G. C.** (2003). Assessing the Contributions of Gene Products to the Form-Shaping Events of Neurulation: A Transgenic Approach in Chick. *Genesis* **37**, 64-75.
- Cordes, K. R., Srivastava, D. and Ivey, K. N.** (2010). MicroRNAs in Cardiac Development. *Pediatric cardiology* **31**, 349-359.
- Corson, L. B., Yamanaka, Y., Lai, K. M. and Rossant, J.** (2003). Spatial and Temporal Patterns of ERK Signaling during Mouse Embryogenesis. *Development* **130**, 4527-4537.

- Cui, C., Chevront, T. J., Lansford, R. D., Moreno-Rodriguez, R. A., Schultheiss, T. M. and Rongish, B. J.** (2009). Dynamic Positional Fate Map of the Primary Heart-Forming Region. *Dev. Biol.* **332**, 212-222.
- Darnell, D. K., Garcia-Martinez, V., Lopez-Sanchez, C., Yuan, S. and Schoenwolf, G. C.** (2000). Dynamic Labeling Techniques for Fate Mapping, Testing Cell Commitment, and Following Living Cells in Avian Embryos. *Methods Mol. Biol.* **135**, 305-321.
- Darnell, D. K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J. K., Yatskievych, T. A. and Antin, P. B.** (2006). MicroRNA Expression during Chick Embryo Development. *Developmental Dynamics* **235**, 3156-3165.
- DeHaan, R. L.** (1965). DEVELOPMENT OF PACEMAKER TISSUE IN THE EMBRYONIC HEART. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **127**, 7-18.
- Dell'Era, P., Ronca, R., Coco, L., Nicoli, S., Metra, M. and Presta, M.** (2003). Fibroblast Growth Factor Receptor-1 is Essential for in Vitro Cardiomyocyte Development. *Circulation Research* **93**, 414-420.
- Dersch, H. and Zile, M. H.** (1993). Induction of Normal Cardiovascular Development in the Vitamin A-Deprived Quail Embryo by Natural Retinoids. *Dev. Biol.* **160**, 424-433.
- Dong, D., Chen, C., Huo, R., Wang, N., Li, Z., Tu, Y., Hu, J., Chu, X., Huang, W. and Yang, B.** (2010). Reciprocal Repression between MicroRNA-133 and Calcineurin Regulates Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* **55**, 946-952.
- Dong, F., Sun, X., Liu, W., Ai, D., Klysiak, E., Lu, M. F., Hadley, J., Antoni, L., Chen, L., Baldini, A. et al.** (2006). Pitx2 Promotes Development of Splanchnic Mesoderm-Derived Branchiomeric Muscle. *Development* **133**, 4891-4899.
- Dunwoodie, S. L.** (2007). Combinatorial Signaling in the Heart Orchestrates Cardiac Induction, Lineage Specification and Chamber Formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 54-66.
- Dyer, L. A. and Kirby, M. L.** (2009). The Role of Secondary Heart Field in Cardiac Development. *Dev. Biol.* **336**, 137-144.
- Ebert, S. N. and Taylor, D. G.** (2006). Catecholamines and Development of Cardiac Pacemaking: An Intrinsically Intimate Relationship. *Cardiovascular Research* **72**, 364-374.
- Eblaghie, M. C., Lunn, J. S., Dickinson, R. J., Münsterberg, A. E., Sanz-Ezquerro, J., Farrell, E. R., Mathers, J., Keyse, S. M., Storey, K. and Tickle, C.** (2003). Negative Feedback Regulation of FGF Signaling Levels by Pyst1/MKP3 in Chick Embryos. *Current Biology* **13**, 1009-1018.
- Echevarria, D., Belo, J. A. and Martinez, S.** (2005). Modulation of Fgf8 Activity during Vertebrate Brain Development. *Brain Res. Rev.* **49**, 150-157.
- Ehrman, L. A. and Yutzey, K. E.** (1999). Lack of Regulation in the Heart Forming Region of Avian Embryos. *Dev. Biol.* **207**, 163-175.
- Eisenberg, C. A., Gourdie, R. G. and Eisenberg, L. M.** (1997). Wnt-11 is Expressed in Early Avian Mesoderm and Required for the Differentiation of the Quail Mesoderm Cell Line QCE-6. *Development* **124**, 525-536.
- Eisenberg, C. A. and Bader, D.** (1995). QCE-6: A Clonal Cell Line with Cardiac Myogenic and Endothelial Cell Potentials. *Dev. Biol.* **167**, 469-481.
- Eisenberg, C. A. and Bader, D. M.** (1996). Establishment of the Mesodermal Cell Line QCE-6. *Circulation Research* **78**, 205-216.
- Eisenberg, C. A. and Eisenberg, L. M.** (1999). WNT11 Promotes Cardiac Tissue Formation of Early Mesoderm. *Developmental Dynamics* **216**, 45-58.

- Espinoza-Lewis, R. A. and Wang, D. -** (2012). MicroRNAs in Heart Development. *Current Topics in Developmental Biology* **100**, 279-317.
- Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R., Wythe, J. D., Ivey, K. N., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y. R. and Srivastava, D.** (2008). MiR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Developmental Cell* **15**, 272-284.
- Fishman, M. C. and Chien, K. R.** (1997). Fashioning the Vertebrate Heart: Earliest Embryonic Decisions. *Development* **124**, 2099-2117.
- Flaherty, M. P., Kamerzell, T. J. and Dawn, B.** Chapter 7 - Wnt Signaling and Cardiac Differentiation. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp. 153-174: Academic Press.
- Franco, D., Domínguez, J., de Castro, M. and Araneaga, A.** (2002). Regulation of Myocardial Gene Expression during Heart Development. - *Revista Española de Cardiología* **55**, 167-184.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. and Bartel, D. P.** (2009). Most Mammalian mRNAs are Conserved Targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92-105.
- Garcia, D. M., Baek, D., Shin, C., Bell, G. W., Grimson, A. and Bartel, D. P.** (2011). Weak Seed-Pairing Stability and High Target-Site Abundance Decrease the Proficiency of Lys-6 and Other microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 1139-1146.
- Garcia-Martinez, V., Alvarez, I. S. and Schoenwolf, G. C.** (1993). Locations of the Ectodermal and Nonectodermal Subdivisions of the Epiblast at Stages 3 and 4 of Avian Gastrulation and Neurulation. *Journal of Experimental Zoology* **267**, 431-446.
- Garcia-Martinez, V. and Hurle, J. M.** (1986). - Cell Shape and Cytoskeletal Organization of the Endothelial Cells of the Semilunar Heart Valves in the Developing Chick. *Anatomy and Embryology* **174**, 83-89.
- Garcia-Martinez, V., Colvee, E. and Hurle, J. M.** (1987). Effects of Colchicine Administration on the Endothelial Cells of the Developing Semilunar Heart Valves of the Chick Embryo. *Cell Tissue Res.* **250**, 595-598.
- Garcia-Martinez, V. and Hurle, J. M.** (1988). Effects of Taxol on Endothelial Cells of the Developing Semilunar Heart Valves in the Chick Embryo. *Acta Anat. (Basel)* **133**, 282-288.
- Garcia-Martinez, V., Sanchez-Quintana, D. and Hurle, J. M.** (1990). Histogenesis of the Semilunar Valves: An Immunohistochemical Analysis of Tenascin and Type-I Collagen Distribution in Developing Chick Heart Valves. *Cell and Tissue Research* **259**, 299-304.
- Garcia-Martinez, V., Sanchez-Quintana, D. and Hurle, J. M.** (1991). Histochemical and Ultrastructural Changes in the Extracellular Matrix of the Developing Chick Semilunar Heart Valves. *Acta Anat. (Basel)* **142**, 87-96.
- Garcia-Martinez, V. and Schoenwolf, G. C.** (1992). Positional Control of Mesoderm Movement and Fate during Avian Gastrulation and Neurulation. *Dev. Dyn.* **193**, 249-256.
- Garcia-Martinez, V. and Schoenwolf, G. C.** (1993). Primitive-Streak Origin of the Cardiovascular System in Avian Embryos. *Dev. Biol.* **159**, 706-719.
- Garcia-Martinez, V., Darnell, D. K., Lopez-Sanchez, C., Sosic, D., Olson, E. N. and Schoenwolf, G. C.** (1997). State of Commitment of Prospective Neural Plate and Prospective Mesoderm in Late Gastrula/Early Neurula Stages of Avian Embryos. *Dev. Biol.* **181**, 102-115.
- Gonzalez-Sanchez, A. and Bader, D.** (1990). In Vitro Analysis of Cardiac Progenitor Cell Differentiation. *Dev. Biol.* **139**, 197-209.

- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engle, P., Lim, L. P. and Bartel, D. P.** (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91-105.
- Hamburguer, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *Journal of Morphology* **88**, 49-92.
- Hardy, K. M., Garriock, R. J., Yatskievych, T. A., D'Agostino, S. L., Antin, P. B. and Krieg, P. A.** (2008). Non-Canonical Wnt Signaling through Wnt5a/b and a Novel Wnt11 Gene, Wnt11b, Regulates Cell Migration during Avian Gastrulation. *Dev. Biol.* **320**, 391-401.
- Harvey, R. P.** (2002). Patterning the Vertebrate Heart. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 544-556.
- Hatada, Y. and Stern, C. D.** (1994). A Fate Map of the Epiblast of the Early Chick Embryo. *Development* **120**, 2879-2889.
- Haunstetter, A. and Izumo, S.** (1998). Apoptosis: Basic Mechanism and Implications in Cardiovascular Disease. *Circulation Research* **82**, 1111-1129.
- He, L. and Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522-531.
- Hochgreb, T., Linhares, V. L., Menezes, D. C., Sampaio, A. C., Yan, C. Y. I., Cardoso, W. V., Rosenthal, N. and Xavier-Neto, J.** (2003). A Caudorostral Wave of RALDH2 Conveys Anteroposterior Information to the Cardiac Field. *Development* **130**, 5363-5374.
- Horie, T., Ono, K., Nishi, H., Iwanaga, Y., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Takanabe, R., Hasegawa, K., Kita, T. et al.** (2009). MicroRNA-133 Regulates the Expression of GLUT4 by Targeting KLF15 and is Involved in Metabolic Control in Cardiac Myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **389**, 315-320.
- Houweling, A. C., Somi, S., Van Den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M. and Christoffels, V. M.** (2002). Developmental Pattern of ANF Gene Expression Reveals a Strict Localization of Cardiac Chamber Formation in Chicken. *Anat. Rec.* **266**, 93-102.
- Hurlé, J. M., and Ojeda, J. L.** (1977). Cardiac Jelly Arrangement during the Formation of the Tubular Heart of the Chick Embryo. *Acta Anatomica* **98**, 444.
- Hurle, J. M., Garcia-Martinez, V. and Sanchez-Quintana, D.** (1986). Morphologic Characteristics and Structure of Surface Excrescences (Lambli's Excrescences) in the Normal Aortic Valve. *Am. J. Cardiol.* **58**, 1223-1227.
- Hutson, M. R., Zeng, X. L., Kim, A. J., Antoon, E., Harward, S. and Kirby, M. L.** (2010). Arterial Pole Progenitors Interpret Opposing FGF/BMP Signals to Proliferate Or Differentiate. *Development* **137**, 3001-3011.
- Itasaki, N., Nakamura, H. and Yasuda, M.** (1989). Changes in the Arrangement of Actin Bundles during Heart Looping in the Chick Embryo. *Anatomy and Embryology* **180**, 413-420.
- Jiang, Y., Tarzami, S., Burch, J. B. E. and Evans, T.** (1998). Common Role for each of the cGATA-4/5/6 Genes in the Regulation of Cardiac Morphogenesis. *Dev. Genet.* **22**, 263-277.
- Kamino, K., Hirota, A. and Fujii, S.** (1981). Localization of Pacemaking Activity in Early Embryonic Heart Monitored using Voltage-Sensitive Dye. *Nature* **290**, 595-597.
- Kelly, R. G., Brown, N. A. and Buckingham, M. E.** (2001). The Arterial Pole of the Mouse Heart Forms from Fgf10-Expressing Cells in Pharyngeal Mesoderm. *Developmental Cell* **1**, 435-440.
- Kirby, M. L.** (2007). *Cardiac Development*. New York: Oxford University Press.

- Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.** (2000). MesP1 and MesP2 are Essential for the Development of Cardiac Mesoderm. *Development* **127**, 3215-3226.
- Kitten, G. T., Markwald, R. R. and Bolender, D. L.** (1987). Distribution of Basement Membrane Antigens in Cryopreserved Early Embryonic Hearts. *Anat. Rec.* **217**, 379-390.
- Klaus, A., Saga, Y., Taketo, M. M., Tzahor, E. and Birchmeier, W.** (2007). Distinct Roles of Wnt/ β -Catenin and Bmp Signaling during Early Cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 18531-18536.
- Kostetskii, I., Jiang, Y., Kostetskaia, E., Yuan, S., Evans, T. and Zile, M.** (1999). Retinoid Signaling Required for Normal Heart Development Regulates GATA-4 in a Pathway Distinct from Cardiomyocyte Differentiation. *Dev. Biol.* **206**, 206-218.
- Kramer, T. C.** (1942). The Partitioning of the Truncus and Conus and the Formation of the Membranous Portion of the Interventricular Septum in the Human Heart. *Am. J. Anat.* **71**, 343-370.
- Laverriere, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. and Evans, T.** (1994). GATA-4/5/6, a Subfamily of Three Transcription Factors Transcribed in Developing Heart and Gut. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 23177-23184.
- Lawson, A. and Schoenwolf, G. C.** (2003). Epiblast and Primitive-Streak Origins of the Endoderm in the Gastrulating Chick Embryo. *Development* **130**, 3491-3501.
- Leimeister, C., Externbrink, A., Klamt, B. and Gessler, M.** (1999). Hey Genes: A Novel Subfamily of Hairy- and Enhancer of Split Related Genes Specifically Expressed during Mouse Embryogenesis. *Mech. Dev.* **85**, 173-177.
- Levin, M.** (2005). Left-right Asymmetry in Embryonic Development: A Comprehensive Review. *Mech. Dev.* **122**, 3-25.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D. J., Cooke, J., Kuehn, M. R. and Tabin, C. J.** (1997). Left/Right Patterning Signals and the Independent Regulation of Different Aspects of Situs in the Chick Embryo. *Dev. Biol.* **189**, 57-67.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P.** (2005). Conserved Seed Pairing, often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* **120**, 15-20.
- Liberatore, C. M., Searcy-Schrick, R. D. and Yutzey, K. E.** (2000). Ventricular Expression of *tbx5* Inhibits Normal Heart Chamber Development. *Dev. Biol.* **223**, 169-180.
- Lin, I. and Taber, L. A.** (1994). Mechanical Effects of Looping in the Embryonic Chick Heart. *J. Biomech.* **27**, 311-321.
- Linask, K. K. and Lash, J. W.** (1993). Early Heart Development: Dynamics of Endocardial Cell Sorting Suggests a Common Origin with Cardiomyocytes. *Developmental Dynamics* **196**, 62-69.
- Linask, K. K., Yu, X., Chen, Y. and Han, M.** (2002). Directionality of Heart Looping: Effects of Pitx2c Misexpression on Flectin Asymmetry and Midline Structures. *Dev. Biol.* **246**, 407-417.
- Lopez-Sanchez, C., Climent, V., Schoenwolf, G. C., Alvarez, I. S. and Garcia-Martinez, V.** (2002). Induction of Cardiogenesis by Hensen's Node and Fibroblast Growth Factors. *Cell Tissue Res.* **309**, 237-249.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V. and Schoenwolf, G. C.** (2001). Localization of Cells of the Prospective Neural Plate, Heart and Somites within the Primitive Streak and Epiblast of Avian Embryos at Intermediate Primitive-Streak Stages. *Cells Tissues Organs* **169**, 334-346.
- Lopez-Sanchez, C., Garcia-Masa, N., Gañan, C. M. and Garcia-Martinez, V.** (2009). Movement and Commitment of Primitive Streak Precardiac Cells during Cardiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1445-1455.

- Lopez-Sanchez, C., Puelles, L., Garcia-Martinez, V. and Rodriguez-Gallardo, L.** (2005). Morphological and Molecular Analysis of the Early Developing Chick Requires an Expanded Series of Primitive Streak Stages. *J. Morphol.* **264**, 105-116.
- López-Sánchez, C., Bártulos, Ó., Martínez-Campos, E., Gañán, C., Valenciano, A. I., García-Martínez, V., De Pablo, F. and Hernández-Sánchez, C.** (2010). Tyrosine Hydroxylase is Expressed during Early Heart Development and is Required for Cardiac Chamber Formation. *Cardiovascular Research* **88**, 111-120.
- López-Sánchez, C. and García-Martínez, V.** (2011). Molecular Determinants of Cardiac Specification. *Cardiovascular Research* **91**, 185-195.
- López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Lawson, A., Chapman, S. C. and Schoenwolf, G. C.** (2004). Rapid Triple-Labeling Method Combining in Situ Hybridization and Double Immunocytochemistry. *Developmental Dynamics* **230**, 309-315.
- Lough, J., Barron, M., Brogley, M., Sugi, Y., Bolender, D. L. and Zhu, X.** (1996). Combined BMP-2 and FGF-4, but neither Factor Alone, Induces Cardiogenesis in Non-Precardiac Embryonic Mesoderm. *Dev. Biol.* **178**, 198-202.
- Lyons, G. E., Schiaffino, S., Sassoon, D., Barton, P. and Buckingham, M.** (1990). Developmental Regulation of Myosin Gene Expression in Mouse Cardiac Muscle. *The Journal of Cell Biology* **111**, 2427-2436.
- Malizia, A. P. and Wang, D. -.** (2011). MicroRNAs in Cardiomyocyte Development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **3**, 183-190.
- Malizia, A. P. and Wang, D.** (2011). MicroRNAs in Cardiomyocyte Development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **3**, 183-190.
- Manasek, F. J.** (1976). Heart Development: Interactions Involved in Cardiac Morphogenesis. In *Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development* (ed. G. Poste and G. L. Nicholson), pp. 545-598. New York: North-Holland.
- Manasek, F. J., Icardo, J. M., Nakamura, A. and Sweeny, L.** (1986). Cardiogenesis: Developmental Mechanisms and Embriology. In *The Heart and Cardiovascular System* (ed. H. A. Fozzard), pp. 965-985.
- Manasek, F. J.** (1975). The Extracellular Matrix: A Dynamic Component of the Developing Embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* **10**, 35-102.
- Manasek, F. J.** (1970). Sulfated Extracellular Matrix Production in the Embryonic Heart and Adjacent Tissues. *J. Exp. Zool.* **174**, 415-439.
- Männer, J.** (2000). Cardiac Looping in the Chick Embryo: A Morphological Review with Special Reference to Terminological and Biomechanical Aspects of the Looping Process. *Anat. Rec.* **259**, 248-262.
- Martinsen, B. J.** (2005). Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology. *Developmental Dynamics* **233**, 1217-1237.
- Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. and Lassar, A. B.** (2001). Inhibition of Wnt Activity Induces Heart Formation from Posterior Mesoderm. *Genes & Development* **15**, 316-327.
- Mikawa, T. and Brand, T.** (2010). Epicardial Lineages: Origins and Fates: In *Heart Development and Regeneration* (ed. N. Rosenthal and R. P. Harvey), pp. 325-344: Academic Press.
- Mjaatvedt, C. H., Nakaoka, T., Moreno-Rodriguez, R., Norris, R. A., Kern, M. J., Eisenberg, C. A., Turner, D. and Markwald, R. R.** (2001). The Outflow Tract of the Heart is Recruited from a Novel Heart-Forming Field. *Dev. Biol.* **238**, 97-109.

- Molkentin, J. D., Lin, Q., Duncan, S. A. and Olson, E. N.** (1997). Requirement of the Transcription Factor GATA4 for Heart Tube Formation and Ventral Morphogenesis. *Genes Dev.* **11**, 1061-1072.
- Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A. and Hurler, J. M.** (2001). Role of FGFs in the Control of Programmed Cell Death during Limb Development. *Development* **128**, 2075-2084.
- Moorman, A. F. and Christoffels, V. M.** (2003). Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol. Rev.* **83**, 1223-1267.
- Muñoz-Chápuli, R., Macías, D., González-Iriarte, M., Carmona, R., Atencia, G. and Pérez-Pomares, J. M.** (2002). El Epicardio y Las Células Derivadas Del Epicardio: Múltiples Funciones En El Desarrollo Cardíaco. *Revista española de cardiología* **55**, 1070-1082.
- Munsterberg, A. and Yue, Q.** (2008). Cardiac Progenitor Migration and Specification: The Dual Function of Wnts. *Cell. Adh Migr.* **2**, 74-76.
- Nakagawa, O., Nakagawa, M., Richardson, J. A., Olson, E. N. and Srivastava, D.** (1999). HRT1, HRT2, and HRT3: A New Subclass of bHLH Transcription Factors Marking Specific Cardiac, Somitic, and Pharyngeal Arch Segments. *Dev. Biol.* **216**, 72-84.
- Nerurkar, N. L., Ramasubramanian, A. and Taber, L. A.** (2006). Morphogenetic Adaptation of the Looping Embryonic Heart to Altered Mechanical Loads. *Developmental Dynamics* **235**, 1822-1829.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P. and Chambon, P.** (1999). Embryonic Retinoic Acid Synthesis is Essential for Early Mouse Post-Implantation Development. *Nat. Genet.* **21**, 444-448.
- Olson, E. N. and Srivastava, D.** (1996). Molecular Pathways Controlling Heart Development. *Science* **272**, 671-676.
- Osman, A.** (2012). MicroRNAs in Health and Disease--Basic Science and Clinical Applications. *Clin. Lab.* **58**, 393-402.
- Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L. M. and Kuhl, M.** (2002). Wnt-11 Activation of a Non-Canonical Wnt Signalling Pathway is Required for Cardiogenesis. *Nature* **418**, 636-641.
- Papageorgiou, N., Tousoulis, D., Androulakis, E., Siasos, G., Briasoulis, A., Vogiatzi, G., Kampoli, A. -, Tsiamis, E., Tentolouris, C. and Stefanadis, C.** (2012). The Role of microRNAs in Cardiovascular Disease. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2605-2610.
- Pawloski-Dahm, C. M., Song, G., Kirkpatrick, D. L., Palermo, J., Gulick, J., Dorn, G. W., Robbins, J. and Walsh, R. A.** (1998). Effects of Total Replacement of Atrial Myosin Light Chain-2 with the Ventricular Isoform in Atrial Myocytes of Transgenic Mice. *Circulation* **97**, 1508-1513.
- Peng, I., Dennis, J. E., Rodriguez-Boulant, E. and Fischman, D. A.** (1990). Polarized Release of Enveloped Viruses in the Embryonic Chick Heart: Demonstration of Epithelial Polarity in the Presumptive Myocardium. *Dev. Biol.* **141**, 164-172.
- Piedra, M. E., Icardo, J. M., Albajar, M., Rodriguez-Rey, J. C. and Ros, M. A.** (1998). Pitx2 Participates in the Late Phase of the Pathway Controlling Left-Right Asymmetry. *Cell* **94**, 319-324.
- Piedra, M. E. and Ros, M. A.** (2002). BMP Signaling Positively Regulates Nodal Expression during Left Right Specification in the Chick Embryo. *Development* **129**, 3431-3440.
- Plageman, T. F. and Yutzey, K. E.** (2004). Differential Expression and Function of Tbx5 and Tbx20 in Cardiac Development. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 19026-19034.
- Pollack, G.** (1977). Cardiac Pacemaking: An Obligatory Role of Catecholamines? *Science* **196**, 731-738.
- Ramasubramanian, A., Latacha, K., Benjamin, J., Voronov, D., Ravi, A. and Taber, L.** (2006). Computational Model for Early Cardiac Looping. *Annals of Biomedical Engineering* **34**, 1355-1369.

- Rawles, M. E.** (1943). The Heart-Forming Areas of the Early Chick Blastoderm. *Physiological Zoology* **16**, 22-43.
- Rochais, F., Dandonneau, M., Mesbah, K., Jarry, T., Mattei, M. G. and Kelly, R. G.** (2009). Hes1 is Expressed in the Second Heart Field and is Required for Outflow Tract Development. *PLoS One* **4**, e6267.
- Rosenquist, G. C.** (1970). The Origin and Movement of Prelung Cells in the Chick Embryo as Determined by Radioautographic Mapping. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **24**, 497-509.
- Rosenquist, G. C. and DeHann, R. L.** (1966). Migration of Precardiac Cells in the Chick Embryo: A Autoradiographic Study. *Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol* **38**, 111-121.
- Ruby, J. G., Jan, C. H. and Bartel, D. P.** (2007). Intronic microRNA Precursors that Bypass Drosha Processing. *Nature* **448**, 83-86.
- Ruiz-Lozano, P., Nakamura, T. and Chien, K. R.** (2001). Developmental Genes and Heart Disease. *Rev. Esp. Cardiol.* **54**, 1439-1445.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. i. and Inoue, T.** (1999). MesP1 is Expressed in the Heart Precursor Cells and Required for the Formation of a Single Heart Tube. *Development* **126**, 3437-3447.
- Sampath, K., Cheng, A. M., Frisch, A. and Wright, C. V.** (1997). Functional Differences among Xenopus Nodal-Related Genes in Left-Right Axis Determination. *Development* **124**, 3293-3302.
- Sarasa, M. and Climent, S.** (1991). Cardiac Differentiation Induced by Dopamine in Undifferentiated Cells of Early Chick Embryo. *Dev. Biol.* **148**, 243-248.
- Schlange, T., Andrée, B., Arnold, H. and Brand, T.** (2000). BMP2 is Required for Early Heart Development during a Distinct Time Period. *Mech. Dev.* **91**, 259-270.
- Schlesinger, J., Schueler, M., Grunert, M., Fischer, J. J., Zhang, Q., Krueger, T., Lange, M., Tönjes, M., Dunkel, I. and Sperling, S. R.** (2011). The Cardiac Transcription Network Modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, Histone Modifications, and MicroRNAs. *PLoS Genet* **7**, 1-16.
- Schoenwolf, G. C. and Garcia-Martinez, 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**, 233-240.
- Schoenwolf, G. C., Garcia-Martinez, V. and Dias, M. S.** (1992). Mesoderm Movement and Fate during Avian Gastrulation and Neurulation. *Developmental Dynamics* **193**, 235-248.
- Schultheiss, T. M., Burch, J. B. and Lassar, A. B.** (1997). A Role for Bone Morphogenetic Proteins in the Induction of Cardiac Myogenesis. *Genes & Development* **11**, 451-462.
- Schultheiss, T. M., Xydas, S. and Lassar, A. B.** (1995). Induction of Avian Cardiac Myogenesis by Anterior Endoderm. *Development* **121**, 4203-4214.
- Selleck, M. A. and Stern, C. D.** (1991). Fate Mapping and Cell Lineage Analysis of Hensen's Node in the Chick Embryo. *Development* **112**, 615-626.
- Shiraishi, I., Takamatsu, T., Minamikawa, T. and Fujita, S.** (1992). 3-D Observation of Actin Filaments during Cardiac Myofibrinogenesis in Chick Embryo using a Confocal Laser Scanning Microscope. *Anatomy and Embryology* **185**, 401-408.
- Sokol, N. S.** (2012). Small Temporal RNAs in Animal Development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 368-373.
- Srivastava, D.** (1999). Developmental and Genetic Aspects of Congenital Heart Disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **14**, 263-268.

- Srivastava, D., Cserjesi, P. and Olson, E. N.** (1995). A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science* **270**, 1995-1999.
- Stalsberg, H. and DeHaan, R. L.** (1969). The Precardiac Areas and Formation of the Tubular Heart in the Chick Embryo. *Dev. Biol.* **19**, 128-159.
- Stuhlmiller, T. J. and García-Castro, M. I.** (2012). FGF/MAPK Signaling is Required in the Gastrula Epiblast for Avian Neural Crest Induction. *Development* **139**, 289-300.
- Sugi, Y. and Lough, J.** (1994). Anterior Endoderm is a Specific Effector of Terminal Cardiac Myocyte Differentiation of Cells from the Embryonic Heart Forming Region. *Developmental Dynamics* **200**, 155-162.
- Sugi, Y. and Markwald, R. R.** (1996). Formation and Early Morphogenesis of Endocardial Endothelial Precursor Cells and the Role of Endoderm. *Dev. Biol.* **175**, 66-83.
- Sugi, Y., Sasse, J., Barron, M. and Lough, J.** (1995). Developmental Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (Cek-1; Flg) during Heart Development. *Developmental Dynamics* **202**, 115-125.
- Taber, L. A., Lin, I. -. and Clark, E. B.** (1995). Mechanics of Cardiac Looping. *Developmental Dynamics* **203**, 42-50.
- Takaya, T., Ono, K., Kawamura, T., Takanabe, R., Kaichi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kita, T., Shimatsu, A. and Hasegawa, K.** (2009). MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in Spontaneous Myocardial Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Circ. J.* **73**, 1492-1497.
- Tam, P. P., Parameswaran, M., Kinder, S. J. and Weinberger, R. P.** (1997). The Allocation of Epiblast Cells to the Embryonic Heart and Other Mesodermal Lineages: The Role of Ingression and Tissue Movement during Gastrulation. *Development* **124**, 1631-1642.
- Tanaka, M., Tamura, K. and Ide, H.** (1996). Citral, an Inhibitor of Retinoic Acid Synthesis, Modifies Chick Limb Development. *Dev. Biol.* **175**, 239-247.
- Thomas, T., Kurihara, H., Yamagishi, H., Kurihara, Y., Yazaki, Y., Olson, E. N. and Srivastava, D.** (1998). A Signaling Cascade Involving Endothelin-1, dHAND and msx1 Regulates Development of Neural-Crest-Derived Branchial Arch Mesenchyme. *Development* **125**, 3005-3014.
- Tirosh-Finkel, L., Zeisel, A., Brodt-Ivenshitz, M., Shamai, A., Yao, Z., Seger, R., Domany, E. and Tzahor, E.** (2010). BMP-Mediated Inhibition of FGF Signaling Promotes Cardiomyocyte Differentiation of Anterior Heart Field Progenitors. *Development* **137**, 2989-3000.
- van Wijk, B., van den Berg, G., Abu-Issa, R., Barnett, P., van der Velden, S., Schmidt, M., Ruijter, J. M., Kirby, M. L., Moorman, A. F. M. and van den Hoff, M. J. B.** (2009). Epicardium and Myocardium Separate from a Common Precursor Pool by Crosstalk between Bone Morphogenetic Protein- and Fibroblast Growth Factor- Signaling Pathways. *Circulation Research* **105**, 431-441.
- Villar, A. V., Merino, D., Wenner, M., Llano, M., Cobo, M., Montalvo, C., Garcia, R., Martin-Duran, R., Hurle, J. M., Hurle, M. A. et al.** (2011). Myocardial Gene Expression of microRNA-133a and Myosin Heavy and Light Chains, in Conjunction with Clinical Parameters, Predict Regression of Left Ventricular Hypertrophy After Valve Replacement in Patients with Aortic Stenosis. *Heart* **97**, 1132-1137.
- Voiculescu, O., Papanayotou, C. and Stern, C. D.** (2008). Spatially and Temporally Controlled Electroporation of Early Chick Embryos. *Nat. Protoc.* **3**, 419-426.
- Voronov, D. A., Alford, P. W., Xu, G. and Taber, L. A.** (2004). The Role of Mechanical Forces in Dextral Rotation during Cardiac Looping in the Chick Embryo. *Dev. Biol.* **272**, 339-350.
- Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. A., Hutson, M. R., Platt, D. H. and Kirby, M. L.** (2001). Conotruncal Myocardium Arises from a Secondary Heart Field. *Development* **128**, 3179-3188.

- Wang, J. and Yang, X.** (2012). The Function of miRNA in Cardiac Hypertrophy. *Cell Mol. Life Sci.*
- Whelan, J. T., Hollis, S. E., Cha, D. S., Asch, A. S. and Lee, M.** (2012). Post-Transcriptional Regulation of the Ras-ERK/MAPK Signaling Pathway. *J. Cell. Physiol.* **227**, 1235-1241.
- Xavier-Neto, J., Neville, C. M., Shapiro, M. D., Houghton, L., Wang, G. F., Nikovits, W., Stockdale, F. E. and Rosenthal, N.** (1999). A Retinoic Acid-Inducible Transgenic Marker of Sino-Atrial Development in the Mouse Heart. *Development* **126**, 2677-2687.
- Yamada, M., Revelli, J., Eichele, G., Barron, M. and Schwartz, R. J.** (2000). Expression of Chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 Genes during Early Heart Development: Evidence for BMP2 Induction of Tbx2. *Dev. Biol.* **228**, 95-105.
- Yamada, M., Szendro, P. I., Prokscha, A., Schwartz, R. J. and Eichele, G.** (1999). Evidence for a Role of Smad6 in Chick Cardiac Development. *Dev. Biol.* **215**, 48-61.
- Yutzey, K. E., Rhee, J. T. and Bader, D.** (1994). Expression of the Atrial-Specific Myosin Heavy Chain AMHC1 and the Establishment of Anteroposterior Polarity in the Developing Chicken Heart. *Development* **120**, 871-883.
- Zaffran, S. and Frasch, M.** (2002). Early Signals in Cardiac Development. *Circulation Research* **91**, 457-469.
- Zamir, E., Srinivasan, V., Perucchio, R. and Taber, L.** (2003). Mechanical Asymmetry in the Embryonic Chick Heart during Looping. *Annals of Biomedical Engineering* **31**, 1327-1336.
- Zhang, W., Yatskievych, T. A., Baker, R. K. and Antin, P. B.** (2004). Regulation of Hex Gene Expression and Initial Stages of Avian Hepatogenesis by Bmp and Fgf Signaling. *Dev. Biol.* **268**, 312-326.
- Zhang, X., Azhar, G., Helms, S. A. and Wei, J. Y.** (2011). Regulation of Cardiac microRNAs by Serum Response Factor. *J. Biomed. Sci.* **18**, 15.
- Zhao, Y., Samal, E. and Srivastava, D.** (2005). Serum Response Factor Regulates a Muscle-Specific microRNA that Targets Hand2 during Cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-220.
- Zhao, Y. and Srivastava, D.** (2007). A Developmental View of microRNA Function. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 189-197.
- Zhu, X., Sasse, J. and Lough, J.** (1999). Evidence that FGF Receptor Signaling is Necessary for Endoderm-Regulated Development of Precardiac Mesoderm. *Mech. Ageing Dev.* **108**, 77-85.
- Zhu, X., Sasse, J., McAllister, D. and Lough, J.** (1996). Evidence that Fibroblast Growth Factors 1 and 4 Participate in Regulation of Cardiogenesis. *Developmental Dynamics* **207**, 429-438.
- Zimmerman, L. B., Jesús-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann Organizer Signal Noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. - *Cell* **86**, 599-606.