



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Grado en Biología  
Trabajo Fin de Grado

# **Papel de IncRNAs y microRNAs en el desarrollo cardiovascular**

**Alumno: Pedro José Mira Núñez**

**Julio, 2020**



Universidad de Jaén



Facultad de  
**Ciencias Experimentales**

Grado en Biología  
Trabajo Fin de Grado

# **Papel de IncRNAs y microRNAs en el desarrollo cardiovascular**

Alumno: Pedro José Mira Núñez

Julio, 2020

## RESUMEN

La mayor parte del genoma está compuesto por genes que no se traducen a proteínas pero que sí se transcriben. Estos transcritos componen el llamado grupo de los RNAs no codificantes, los cuales están involucrados y tienen un papel fundamental en la regulación de distintos procesos celulares. Este grupo se subdivide en función de su tamaño y en este estudio nos centramos en los microRNAs (22-24 nucleótidos) y lncRNAs (>200 nucleótidos). En las últimas décadas se ha avanzado mucho en el estudio de estas moléculas y en este trabajo realizamos una revisión de los microRNAs y lncRNAs que están involucrados en el desarrollo cardiovascular. Se está poniendo de manifiesto que estos RNAs tienen un gran poder regulador y regenerador sobre el corazón y si se consigue avanzar en las investigaciones en este campo se podría poner remedio a distintas enfermedades cardiovasculares.

**Palabras clave:** lncRNAs, microRNAs, desarrollo cardiovascular, regeneración cardiovascular, epicardio.

## ABSTRACT

Most of the genome is composed of genes that do not translate into proteins but are transcribed. These transcripts make up the so-called non-coding RNA group, which are involved and have a fundamental role in the regulation of different cellular processes. This group is subdivided according to their size and in this study we focus on microRNAs (22-24 nucleotides) and lncRNAs (>200 nucleotides). In recent decades much progress has been made in the study of these molecules and in this work we are reviewing the microRNAs and lncRNAs that are involved in cardiovascular development. It is already becoming clear that these RNAs have great regulatory and regenerative power on the heart and if progress is made in research in this field it could be possible to cure various cardiovascular diseases.

**Keywords:** lncRNAs, microRNAs, cardiovascular development, cardiovascular regeneration, epicardium.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
1.1 Conceptos generales del desarrollo cardiaco .....	4
1.2 Desarrollo del proepicardio/epicardio .....	10
1.3 Regulación transcripcional del proepicardio/epicardio .....	11
1.4 Papel del epicardio en patologías cardiovasculares.....	13
1.5 Papel del epicardio en regeneración cardiovascular .....	14
1.6 RNAs no codificantes en el desarrollo cardiovascular .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Papel de los microRNAs en el desarrollo cardiovascular .....	17
3.1.1. Funciones de los miRNAs en cardiomiocitos .....	17
3.1.2. Funciones de los miRNAs en las células de la cresta neural cardíaca .....	20
3.1.3. Función de los miRNAs en células endocárdicas .....	22
3.1.4. Función de los miRNAs en células epicárdicas .....	22
3.2 Papel de lncRNAs en el desarrollo cardiovascular .....	24
3.3 Interacción lncRNA-microRNAs en el desarrollo cardiovascular ..	27
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>31</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Conceptos generales del desarrollo cardíaco**

La gastrulación es el proceso mediante el cual se forma la tercera capa embrionaria, el mesodermo. Inicialmente el disco embrionario bilaminar consta de epiblasto e hipoblasto y durante el proceso de gastrulación se configura en un disco trilaminar con tres capas embrionarias, conocidas como endodermo, ectodermo y mesodermo (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; García-Martínez et al. 1997).

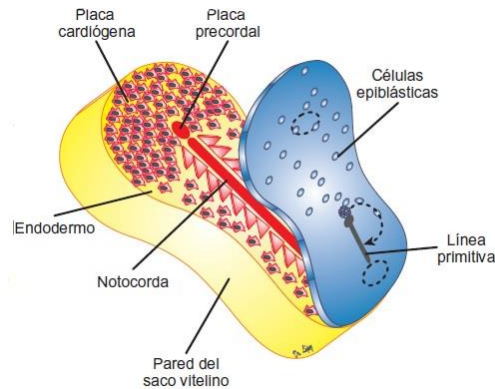
Este proceso consta de una serie de cambios que se producen en el embrión mediante el cual las células del epiblasto proliferan y migran para formar el mesodermo. Estas células crean dos corrientes de migración, una en sentido rostro-caudal y otra en sentido látero-medial, dando lugar a la línea primitiva. La línea primitiva es una estructura longitudinal ubicada a lo largo del eje rostro-caudal del embrión muy dinámica. Es decir, esta línea tiene una composición diferente en cada momento del desarrollo en función de las células que ingresan para la formación del mesodermo constituyéndose el embrión trilaminar (Álvarez et al. 2006).

Por tanto, la línea primitiva consiste en el aspecto morfológico que tienen las células cuando ingresan a través de ella para formar el mesodermo. Tras la separación del mesodermo lateral en dos láminas (mesodermo somático y esplácnico) y la formación de la cavidad celómica, los precursores cardíacos se sitúan en el mesodermo esplácnico, y constituyen el mesodermo cardiogénico de los campos cardíacos bilaterales (Brand, 2003; Kirby, 2007). Experimentalmente se ha conseguido poner de manifiesto en embriones de aves que las células precardiacas son identificables antes de la gastrulación en la mitad rostral del epiblasto, laterales en la línea primitiva e inmediatamente caudales al nódulo de Hensen (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Schoenwolf y García-Martínez, 1995).

El corazón es el primer órgano que comienza a funcionar para proporcionar los requerimientos de oxígeno y nutricionales que no son satisfechos por difusión cuando el embrión crece y empieza a ser más complejo (Kirby, 2007). Inicialmente desarrolla una estructura tubular sencilla que progresivamente va

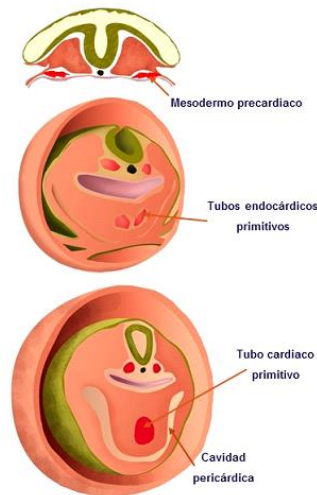
cambiando hasta configurar el órgano maduro (González-Sánchez y Bader, 1990; Harvey, 2002; Brand, 2003).

Al comienzo de la gastrulación, las células precardiacas se dirigen hacia la línea media del embrión. Aquí se invaginan a través de la línea primitiva, situada caudalmente al nódulo de Hensen y migran rostrolateralmente en distribución bilateral a ambos lados del nódulo hasta que se sitúan a nivel de las áreas del mesodermo precárdico que contribuirá a la formación del endocardio y miocardio. El mesodermo precardiaco establece una relación con el endodermo anterior que ha sido implicado en el proceso de diferenciación del corazón embrionario (Stalsberg y DeHaan, 1969; Fishman y Chien, 1997; Franco et al. 2002).



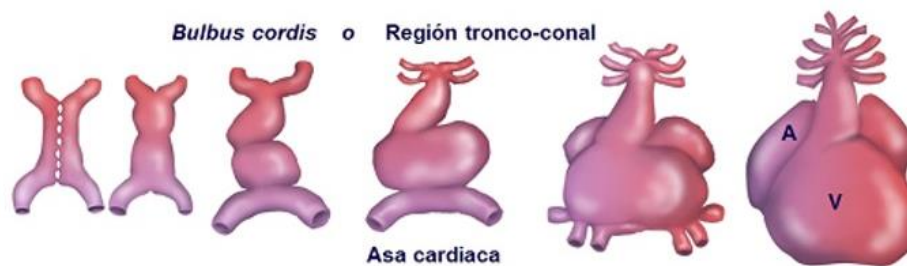
**Figura 1.** Esquema de un embrión durante la gastrulación donde se muestra la formación de la placa cardiogénica. La flecha indica la migración hacia la línea primitiva de las células epiblasticas determinadas a células cardiacas que forman la placa cardiogénica (López, 2012).

El mesodermo precardiaco, que se encuentra aún sin diferenciar, se extiende a lo largo del eje antero-posterior a cada lado del embrión y sufre un proceso de epitelización y diferenciación que da lugar a la formación de estructuras pareadas, los tubos endocárdicos primitivos (Schultheiss et al. 1995).



**Figura 2.** Ilustración de la formación de los tubos endocárdicos primitivos a partir del mesodermo precardiaco. A continuación, se fusionan para constituir el tubo cardíaco primitivo. (Arteaga, 2017).

A consecuencia del cierre de la placa neural y elongación de las vesículas encefálicas el sistema nervioso central crece y se expande sobre la región cardiogénica central. Al mismo tiempo, a consecuencia del cierre se forma la cresta neural que consta de un pequeño grupo de células multipotentes, parte de las cuales, la cresta neural cardíaca, contribuirán al tejido conectivo de las paredes de las arterias cardíacas principales. Debido al crecimiento que se está produciendo en el sistema nervioso y la flexión cefalocaudal del embrión, los tubos endocárdicos son desplazados hacia la región cervical para después alcanzar su ubicación definitiva a nivel torácico. En este paso los tubos se acercan y fusionan en la línea media del embrión. La fusión empieza en el extremo cefálico de los tubos y se extiende en dirección caudal de modo que se forma un tubo único denominado tubo cardíaco primitivo con capacidad contráctil y constituido por el endocardio y miocardio. En el desarrollo el tubo cardíaco primitivo se incurva hacia la derecha y da lugar a la formación del asa cardíaca con forma de C que progresivamente adquiere una forma de S. Este desplazamiento constituye una de las primeras señales de asimetría izquierda-derecha en el embrión. (Manasek et al. 1972; Lin y Taber, 1994; Levin, 1997, 2005; Levin et al. 1997; Männer, 2000; Voronov et al. 2004; Ramasubramanian et al. 2006).

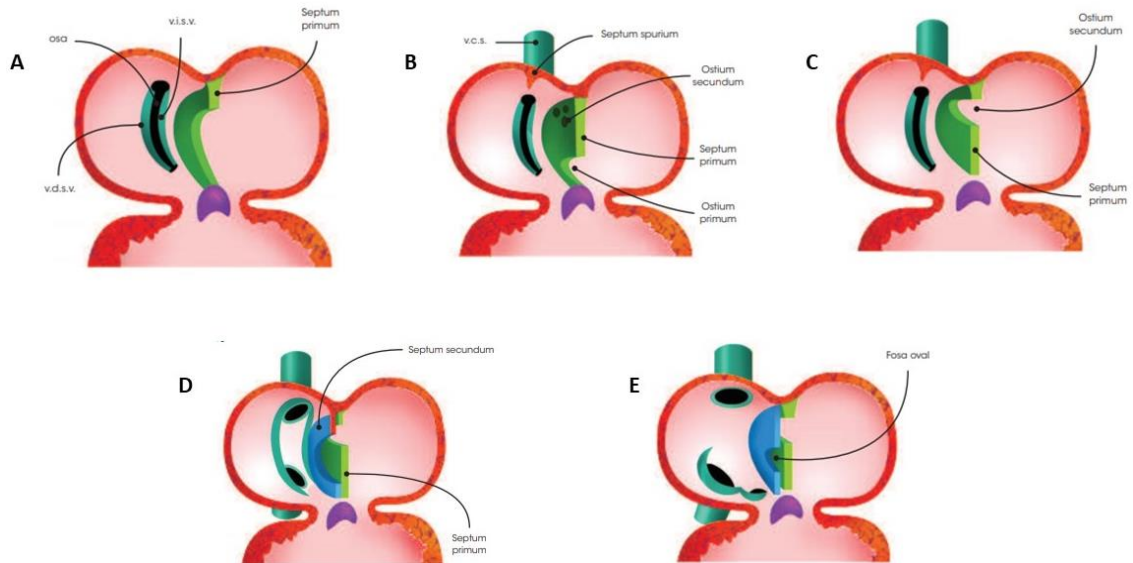


**Figura 3.** Proceso de la formación del corazón tetracameral. Comenzando con la fusión de los tubos endocárdicos primitivos para formar el tubo cardíaco primitivo, el cual se incurva y forma la llamada asa cardíaca que posteriormente se divide en sectores (A: atrial, V: ventricular) (López-Sánchez et al. 2013).

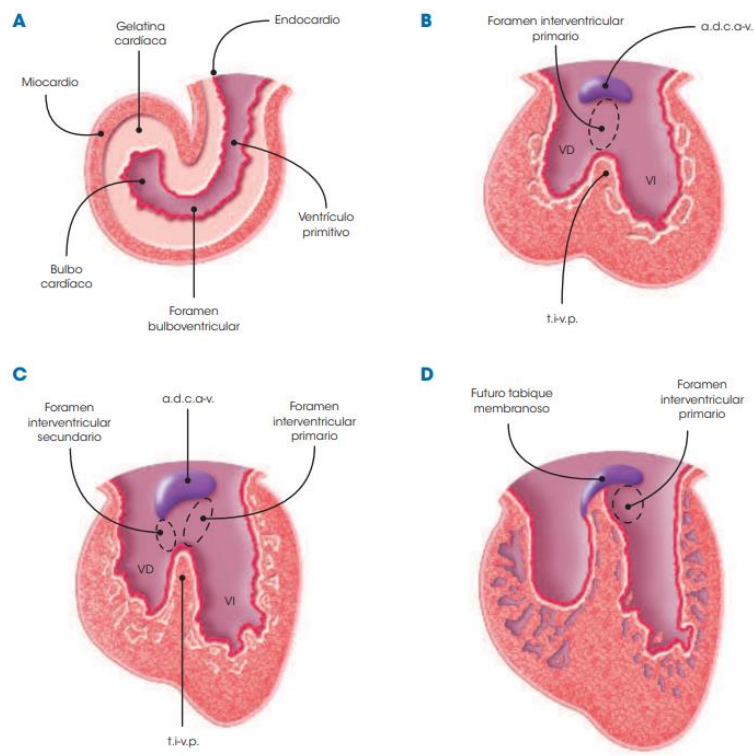
Al mismo momento que se produce el proceso anterior también se produce la segmentación del corazón embrionario (Larry et al. 1995), de tal modo que se constituyen distintas partes del corazón como el seno venoso, la aurícula común, ventrículos primitivos y la región tronco-conal y el polo arterial. La septación o tabicación consiste en un proceso basado en la formación del septo atrial y septo ventricular, necesarios para la separación de la doble circulación del corazón y en la formación de los aparatos valvulares atrioventriculares y tronco-conales (Kramer, 1942; Kirby, 2007).

Dentro del sector atrial se forma el *septum primum* que desciende desde la pared superior de la aurícula y sufre un proceso de perforación configurando así el *ostium primum* que se cerrará parcialmente por el desarrollo del *septum secundum* a su derecha. Esto permite el paso de sangre desde la aurícula derecha a la izquierda a través del foramen oval del *septum secundum* que se cerrará totalmente tras el nacimiento (Moorman y Christoffels, 2003).

El septo o tabique interventricular se forma gracias a dos estructuras, la porción muscular y la membranosa. La porción muscular procede de la capa miocárdica en el ápice del ventrículo primitivo permitiendo la presencia del foramen interventricular que comunica ambos ventrículos (Abad et al. 2006). La porción membranosa es la responsable del cierre del foramen interventricular y se desarrolla a partir de las crestas tronco-conales (Akiyama et al. 2004).



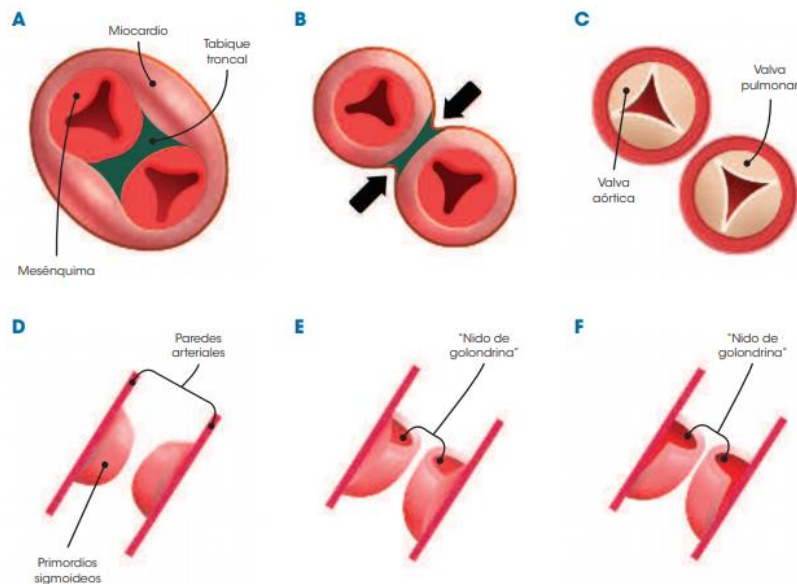
**Figura 4.** Esquema de la tabicación atrial. **A.** Se ilustra aparición del *septum primum*. **B.** muestra en la parte alta del *septum primum* las zonas de muerte celular fisiológica precursoras del *ostium secundum*. **C.** fusión de las almohadillas del canal atrioventricular y el cierre del ostium primum; las perforaciones del ostium secundum han confluido y forman un orificio único. **D.** aparición del *septum secundum*, a la derecha del *septum primum*. **E.** tabique interatrial totalmente formado y la superposición del *septum primum* y del *septum secundum* (Modificado de Arteaga, 2017).



**Figura 5.** Esquema desarrollo de los ventrículos. **A.** La gelatina cardíaca se encuentra uniformemente distribuida entre el endocardio y miocardio, y el bulbo cardíaco y el ventrículo

primitivo están comunicados a través del foramen bulboventricular. **B.** La gelatina se ha adelgazado comenzando el proceso de diverticulización ventricular; el tabique interventricular primitivo está presente y por encima de él está el foramen interventricular primario. **C.** La diverticulización ventricular ha avanzado. La almohadilla dorsal del canal atrioventricular se está remodelando, adelgazándose y curvándose; el espacio que queda entre el tubérculo derecho y la cima del tabique interventricular primitivo se denomina foramen interventricular secundario. **D.** Se fusiona ya el tabique interventricular primitivo con el tubérculo derecho, cerrándose el foramen interventricular secundario. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo; a.d.c.a-v., almohadilla dorsal del canal atrioventricular; t.i-v.p., tabique interventricular primitivo. (Arteaga 2017).

En la división del tracto de salida cardíaca tiene lugar la separación de la arteria pulmonar y la aorta por la presencia de las crestas tronco-conales que contribuirán a la formación de las válvulas semilunares aórtica y pulmonar.



**Figura 6.** Formación de las válvulas semilunares pulmonar y aórtica. **A-C.** Corte transversal en el que quedan finalmente constituidas cada una de ellas por tres sigmoideas rodeadas de un anillo fibroso. **D-F** Corte sagital de una de las válvulas en el que se representa el proceso de adelgazamiento que da lugar a la forma de "nido de golondrina" característico de estas. (Arteaga, 2017).

Finalmente, el corazón queda constituido por cuatro cámaras cardíacas, las dos superiores, aurículas (izquierda y derecha) y las inferiores, ventrículos (izquierdo y derecho), cada una con su correspondiente tracto de entrada y de salida.

## 1.2. Desarrollo del proepicardio/epicardio

El epicardio es la capa más externa y la última en aparecer de las capas que componen el corazón. Esta capa proviene de un grupo de células extracardiacas llamadas proepicardio. Este grupo de células puede ser único y situado a la derecha del plano sagital como ocurre con el embrión del pollo o bilateral como ocurre en el caso del ratón (Virágh et al. 1993).

El desarrollo del proepicardio en pollo y codorniz comienza sobre los estadios HH13-14 con una rápida proliferación del mesotelio que recubre a nivel ventral los cuernos del seno venenoso en su límite con el primordio hepático. La proliferación del lado izquierdo se detiene mientras que la del derecho crece hasta alcanzar en el estadio HH17 un gran tamaño. En este estadio está formado por múltiples digitaciones o protrusiones que dan al conjunto un aspecto de coliflor. Las digitaciones están tapizadas por mesotelio y contienen numerosas células mesenquimáticas en una abundante matriz extracelular (Hiruma y Hirakow, 1989; Ho y Shimada, 1978).

Los factores que controlan el desarrollo del proepicardio son desconocidos. Se ha especulado con un efecto mecánico, de «aspiración», de las contracciones cardiacas sobre el mesotelio del septo transversal (Kuhn, 1988), pero es mucho más probable que el mesotelio de las zonas en las que se desarrolla el proepicardio reciba algún tipo de señal proliferativa de origen y naturaleza aún desconocidos (Virágh et al. 1993, Kuhn y Lieberr, 1988).

Existen dos mecanismos que describen cómo se desprenden las células proepicárdicas y flotan en la cavidad pericárdica. Las células se adhieren en áreas específicas del miocardio, los surcos atrioventricular y conoventricular. En cuanto se adhieren se aplanan y se unen entre sí para formar un epitelio que va creciendo sobre la superficie cardiaca. Este mecanismo se ha descrito en anfibios y mamíferos (Komiyama, Ito y Shimada, 1987; Kuhn y Lieberr, 1988; Fransen y Lemanski, 1990).

El otro mecanismo implica la adhesión directa de las vellosidades proepicárdicas a la superficie cardiaca. Suele ocurrir en la parte posterior de los ventrículos y del surco atrioventricular. Esta adhesión directa puede ser el mecanismo fundamental de transferencia en el caso de embriones de pollo (Fransen, 1990).

En ambos casos el epicardio progresa alrededor del surco atrioventricular, para extenderse después al ventrículo izquierdo, superficie ventral del atrio, el ventrículo derecho y finalmente el techo del atrio y tracto de salida. El crecimiento del epicardio se para en el límite entre la región miocárdica y mesenquimática del tracto de salida (Vrancken et al. 1995).

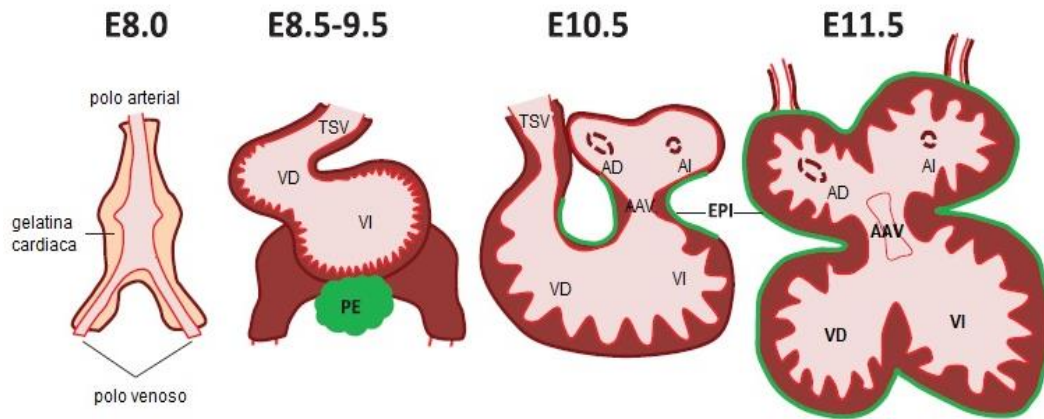
Aún no se conoce el mecanismo específico por el cual las células del proepicardio se adhieren al miocardio, simplemente se han propuesto algunas moléculas como por ejemplo NCAM la cual se expresa tanto en el epicardio como miocardio (Watanabe, 1992). Más recientemente se ha descartado esta hipótesis debido a que ratones deficientes para NCAM no presentan alteraciones en el epicardio (Cremer et al. 1997).

### **1.3. Regulación transcripcional del proepicardio/epicardio**

La regulación transcripcional del corazón es esencial ya desde un primer momento debido a que el corazón es el primer órgano en desarrollarse. Existen diversos reguladores como Wilms' tumor-1 (Wt1), Pod1 (Tcf21) o Tbx18 que juegan un papel esencial en el desarrollo del proepicardio.

La expresión de Wt1 se puede observar por primera vez en el proepicardio, su expresión es necesaria para la transformación de células epiteliales a mesenquimales que forman las células derivadas del epicardio que contribuirán a la formación de vasos coronarios y fibroblastos intersticiales. Su expresión también se da en células endoteliales del corazón, y durante el desarrollo de distintos órganos incluidos los riñones, las gónadas y el bazo (Kreidberg et al. 1993; Männer et al. 2010).

En ratones, la primera expresión de Wt1 se puede observar en el estadio E9.5 en las células del proepicardio antes de que se desprendan para cubrir el corazón hasta hacerlo por completo con células Wt1 positivas en el estadio E12.5 (Armstrong et al. 1993; Vicente-Steijn et al. 2015; Zhou et al. 2008). En humanos esta cobertura completa con células positivas para Wt1 se observa en la semana 5 (Duim et al. 2016), después el epicardio permanece positivo para Wt1 durante todo el desarrollo embrionario tanto para ratones como para humanos (Moore et al. 1999; Armstrong et al. 1993; von Gise et al. 2011).



**Figura 7.** Expresión de células *Wt1* (positivas en verde) a lo largo del desarrollo cardíaco. AAV, almohadilla atrioventricular; AD, aurícula derecha; AI, aurícula izquierda; EPI, epicardio; PE, proepicardio; TSV, tracto de salida ventricular; VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo. Modificado de Duim et al. (2016).

En ratones knockout *Wt1* se descubrió que este factor de transcripción es importante para el desarrollo cardíaco. Descubrieron que en su ausencia la vasculatura del corazón no se forma y produce muerte prenatal (Kreidberg et al. 1993; Moore et al. 1999). Además, este tipo de ratones muestra una reducción del mesénquima subepicárdico (Moore et al. 1999) y las células epicárdicas son incapaces de desprenderse del epicardio y las células derivadas del epicardio tampoco migran al subepicardio (von Gise et al. 2011; Guadix et al. 2011).

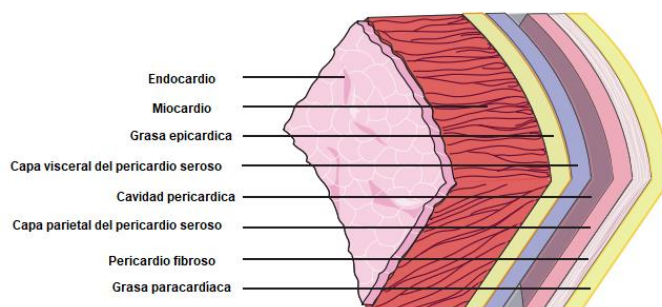
La EMT (transición epitelio-mesénquima) está regulada por varios genes, entre ellos *Wt1*. Ratones Knockdown para *Wt1* en células epicárdicas reducen la expresión de *Snail* y *Slug*, mientras que la expresión de la E-cadherina estaba aumentada (Peinado, Portillo, y Cano, 2004). *Snail* y *Slug* son reguladores clave en el proceso de la EMT y tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión de la E-cadherina (Peinado, Portillo, y Cano, 2004). Además, se demostró que *Wt1* regula directamente *RALDH2*, una enzima que está involucrada en la síntesis de ácido retinoico y que se expresa en el epicardio (von Gise et al. 2011, Guadix et al. 2011; Moss et al. 1998). La señalización del ácido retinoico es esencial durante el desarrollo embrionario, ya que se ha demostrado que la deficiencia de este ácido provoca anomalías cardíacas similares a las obtenidas en ratones *Wt1*-knockout (Wessels y Pérez-Pomares, 2004, Hoover et al. 2008). En pollos, un aumento en la señalización del ácido retinoico dio lugar a un aumento en *Wt1* (Braitsch et al. 2012), lo que pone de manifiesto una retroalimentación positiva entre *Wt1* y el ácido retinoico.

En relación al factor de transcripción Tcf21, se expresa en el epicardio y en las células derivadas del epicardio en el corazón de embriones de ratón y pollo (Quaggin et al. 1998, von Scheven et al. 2006). La pérdida de Tcf21 produce muerte neonatal, defecto en los pulmones, riñón y bazo (Quaggin et al. 1999). Además, la pérdida de Tcf21 en ratones lleva a una mayor diferenciación de células derivadas del epicardio en células de músculo liso y una reducción del número de fibroblastos intersticiales en el corazón embrionario. Y al igual que Wt1, Tcf21 presenta una retroalimentación positiva con el ácido retinoico (Braitsch et al. 2012).

Tbx18 es otro factor de transcripción que se expresa en el proepicardio, epicardio y células derivadas del epicardio necesario durante la embriogénesis (Kraus et al. 2001). Contribuye a la formación del miocardio del asta sinusal a partir del mesénquima pericárdico (Bussen et al. 2004; Christoffels et al. 2006).

#### 1.4. Papel del epicardio en patologías cardiovasculares

El tejido adiposo epicárdico es una capa ubicada en la capa visceral de pericardio que compone el epicardio. Biológicamente este tejido es muy activo y se encuentra entre el miocardio y la capa visceral del pericardio seroso (Gaborit et al. 2017).



**Figura 8.** Esquema de las capas del corazón en el que se puede ver que la capa de tejido adiposo epicárdico se encuentra ubicada entre el miocardio y la capa visceral del pericardio seroso. Modificado de Gaborit et al. (2017).

Este tejido libera unas adipocinas y quimioquinas que parecen ser un elemento clave en la aterogénesis y que podría representar una diana terapéutica para el futuro (Gaborit et al. 2017). El tejido adiposo cardiaco hasta hoy está muy poco estudiado, aunque en los últimos estudios publicados se manifiesta una fuerte relación entre él y el desarrollo de enfermedades de las arterias coronarias en humanos (Chechi y Richard, 2015; Cildir, Akincilar y

Tergaonkar, 2013; Ouwens et al. 2010). Este tejido en las enfermedades de las arterias coronarias presenta un fenotipo proinflamatorio y un patrón específico de microRNAs (Baker et al. 2009). En 2003 Mazurek et al. descubrieron que los pacientes con enfermedades de las arterias coronarias presentaban niveles más elevados de quimiocinas, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y varias citoquinas inflamatorias como IL-6, IL 1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$  (Mazurek, 2003). También observaron la presencia de células inflamatorias infiltradas incluyendo macrófagos, linfocitos y mastocitos en el tejido adiposo epicárdico. Los mediadores inflamatorios producidos por este tejido podían tener un efecto tóxico local en la vasculatura (Chaowalit y López-Jiménez, 2008; Sacks y Fain , 2007; Yudkin, Eringa y Stehouwer, 2005)

Después de este estudio, otros grupos confirmaron que el tejido adiposo epicárdico es un verdadero órgano endocrino y una fuente de moléculas bioactivas de acción local (Sacks y Fain, 2007).

En cuanto a los miRNAs, detectaron que los pacientes con enfermedades de las arterias coronarias presentaban en el tejido adiposo epicárdico unas vías metabólicas afectadas y una disminución de miR-103-3p (Vacca et al. 2016). Además, se han observado un aumento de los niveles de subproductos de procesos oxidativos (ROS) y una disminución de antioxidantes como la catalasa (Salgado-Somoza et al. 2010).

Todos estos procesos se encuentran alterados debido a la acción de miR-103-3p que altera el transcrito CCL13 en los adipocitos primarios epicárdicos. Todo esto apunta a que este miRNA tiene un papel en la regulación de las vías inflamatorias y promoción del metabolismo de los adipocitos porque una baja producción de miR-103-3p puede inducir cambios proinflamatorios en el tejido adiposo cardiaco de pacientes con obesidad y enfermedades de las arterias coronarias (Vacca et al. 2016).

### **1.5. Papel del epicardio en regeneración cardiovascular**

En diversos estudios se ha descubierto que si el proepicardio de un embrión de pollo se incubaba en unas condiciones determinadas era capaz de dar lugar a cardiomiocitos, y que los resultados eran aún más potentes si se añadía Bmp y, por el contrario, podían verse disminuidos si se adicionaba Fgf (Kruithof, 2006), por los cuales se dedujo que los precursores del epicardio podían servir como

fuelle de cardiomiocitos si se producían las señales apropiadas. A raíz de esto fue como se demostró que las células derivadas del epicardio generaban cardiomiocitos en un corazón isquémico si se pretrataban con timosina  $\beta_4$ , aunque tanto el número de células generadas como el mecanismo que lo generaba sigue siendo poco conocido (Smart et al. 2011).

Existen algunos modelos como por ejemplo el del pez cebra, el cual es capaz de regenerarse por completo tras una eliminación de hasta un 20% del ápex ventricular, tanto la vasculatura coronaria, miocardio y endocardio (Poss et al. 2002). Cuando se le amputa el ápex, se produce la expresión de marcadores epicárdicos y de células precursoras endoteliales que se acumulan en el sitio de corte (Lepilina, 2006).

Estudios con el modelo del pez cebra han descubierto que las células derivadas del epicardio se incorporan al corazón durante la regeneración del corazón adulto y participan activamente en su continuo crecimiento ya que se han encontrado marcadores epicárdicos durante el crecimiento rápido en adultos (Wills et al. 2008).

Cuando se induce un infarto de miocardio a ratones se eleva la expresión de los marcadores Tbx18, Wt1 y Raldh2 en el epicardio (Limana, 2010; Wagner et al. 2002) y una marcación lentiviral de células epicárdicas dicen que existe una participación de células derivadas del epicardio en la regeneración del miocardio que ha sufrido daño y contribuye a la formación de miocardiocitos. Un estudio en el que realizaron un trasplante de células derivadas del epicardio humanas en el corazón de ratones a los cuales se les había provocado una oclusión coronaria resultó una mejora significativa de la función cardíaca, lo que demostró que existe un potencial terapéutico de forma natural de las células derivadas del epicardio en la restauración de la función cardíaca tras un infarto de miocardio (Winter, Gittenberger-de Groot, 2007). Debido a la posible aplicación para el tratamiento del infarto de miocardio se están realizando estudios para intentar la reactivación del epicardio y la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT). Se ha probado con la administración de timosina  $\beta_4$ , que induce la reexpresión de algunos marcadores epicárdicos embrionarios y formación de capilares sobre la zona periférica en la cual se ha sufrido el infarto en ratones adultos (Smart et al. 2011).

Por tanto, una vez se ha formado el epicardio del corazón adulto, este puede ser de gran importancia tras una enfermedad cardiovascular ya que los precursores del epicardio se pueden diferenciar en cardiomiocitos (Wessels y Pérez-Pomares, 2004), por lo que estas células podrían ser una fuente de células madre cardíacas con potencial para una posible futura regeneración cardíaca (Smart et al. 2011).

### **1.6. RNAs no codificantes en el desarrollo cardiovascular**

Los *non-coding RNAs* se definen como RNAs que no codifican proteínas. Actualmente se ha identificado que gran parte del genoma (>80%) codifica para este tipo de moléculas (Carcini et al. 2005; Harrows et al. 2012). La clasificación de los *non-coding RNAs* se ha realizado burdamente en función del tamaño de los mismos. Los ncRNAs menores de 200 bp se denominan RNA no codificantes pequeños y los mayores de 200 bp se denominan ncRNA largos (lncRNAs) (Esteller, 2011; Harrows et al. 2012). Los microRNAs constituyen dentro de los ncRNAs pequeños, la familia de ncRNAs más estudiada. Los microRNAs tienen una longitud de 22-24 nucleótidos y actúan preferencialmente regulando a nivel post-transcripcional, la expresión de mRNAs mediante la unión por complementariedad a la 3'UTR y promoviendo de ese modo la degradación y/o bloqueo transduccional (Beermann et al. 2016). Los lncRNAs son estructuralmente más diversos teniendo una organización génica semejante a los mRNAs; son transcritos por la RNA polimerasa II, tienen intrones y exones, realizan procesos de *splicing* alternativo y presentan un rango de longitud muy amplio (Barwari et al. 2016; Fang et al. 2018). A nivel funcional los lncRNAs pueden ejercer múltiples funciones, tanto a nivel epigenético, transcripcional como post-transcripcional, entre los que cabe destacar el papel de competidores endógenos (ceRNA) y/o esponjas secuestradoras de microRNAs (Fang S, et al. 2018; Schmitz et al. 2016; Wapinski O y Chang HY, 2011; Rosa A y Ballarino M, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

Debido al gran número de estudios relacionados con los efectos de los microRNAs y lncRNAs sobre distintas partes del desarrollo cardiovascular en los últimos años nuestro objetivo es realizar una investigación bibliográfica con la

información relacionada sobre el tema para tener un conocimiento actualizado en la materia.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Papel de los microRNAs en el desarrollo cardiovascular**

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de ARNs no codificantes que por lo general tienen un tamaño de unos 22-24 nucleótidos en su estado maduro. Estos miRNAs actúan normalmente suprimiendo la acción de genes bien inhibiendo su traducción o bien promoviendo la degradación de transcritos de mRNA (Kiriakidou et al. 2007; Humphreys et al. 2005). Desde su descubrimiento hace más de 25 años se han identificado más de 1400 miRNAs en mamíferos (Rota et al. 2011) y se piensa que aproximadamente regulan más del 50% de la expresión de genes que codifican proteínas (Bartel, 2009).

##### **3.1.1. Funciones de los miRNAs en cardiomiocitos**

El tipo de célula cardíaca en el que más se ha estudiado los microRNAs son los cardiomiocitos. Se ha observado que ratones mutantes condicionales para *Dicer1* (endonucleasa responsable de producir miRNAs maduros) en el tejido cardíaco demuestran que los miRNAs no solo son necesarios para el desarrollo cardíaco sino también para el mantenimiento y la función cardíaca posnatal (Chen et al. 2008; Da Costa Martins et al. 2008; Huang et al. 2010; Saxena y Tabin, 2010).

La eliminación específica de *Dicer1* en cardiomiocitos embrionarios conlleva un retraso en el desarrollo ventricular, además de edema y muerte embrionaria en ratones E12.5 (Zhao et al. 2007) y la eliminación del mismo *Dicer1* utilizando un factor de transcripción que inactiva los objetivos con una cinética espacio-temporal ligeramente diferente conduce a un defecto de doble salida-ventrículo derecho lo que sugiere que los miRNAs juegan un papel importante en la regulación de la alineación de las principales arterias y ventrículos (Saxena y Tabin, 2010). La inhibición de *Dicer1* en la etapa media de gestación utilizando la línea *cTnt-Cre* lleva a la letalidad embrionaria de ratones E15.5 (Peng et al. 2018). La inactivación de *Dicer1* durante la última etapa de gestación utilizando controladores *MHC-Cre* da lugar a una miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca y muerte a los cuatro días del nacimiento (Cheng et al. 2008). Todos

estos datos en su conjunto nos indican que los microRNAs tienen un gran papel en funciones complejas de distintas etapas cardiogénicas.

En particular miR-1, miR-133, miR-208 y miR-499 tienen una alta expresión en el tejido cardíaco desde las primeras etapas del desarrollo del corazón hasta adulto. En embriones de pollo, mediante hibridación *in situ* demostraron que miR-1 se expresa durante las primeras etapas del desarrollo, al inicio de la diferenciación de los cardiomiocitos y durante la formación del tubo cardíaco (Darnell et al. 2006). Se obtuvieron además resultados similares mediante tinción con X-gal en ratones transgénicos en los cuales LacZ estaba impulsado por fragmentos miR-1 aguas arriba (Zhao et al. 2005).

Además de todas las investigaciones relativas a la síntesis global de miRNAs se ha demostrado que muchos miRNAs son críticos para el desarrollo de cardiomiocitos, miR-1 y miR-133 son dos microRNAs altamente conservados, que tiene una expresión específica en los músculos cardíacos y esqueléticos durante el desarrollo y en adultos (Zhao et al. 2005; Chen et al. 2006). MiR-1 regula el crecimiento negativamente y la diferenciación cardíaca inhibiendo la traducción del factor de transcripción HAND2 (Zhao et al. 2005), los niveles de este factor de transcripción son críticos para la expansión de los cardiomiocitos ventriculares (Zhao et al. 2005; McFadden et al. 2005; Yamagishi et al. 2001; Srivastava et al. 1997). En ratones que carecen de miR-1-2 presentan defectos en morfogénesis cardíaca, la conducción cardíaca e hipoplasia ventricular (Zhao et al. 2007), y ratones con sobreexpresión de miR-1 el número de cardiomiocitos que proliferan está disminuido, de la misma manera que miR-133 regula negativamente la proliferación de cardiomiocitos al inhibir sus genes diana, como la ciclina D2 y el factor de transcripción SFR (Liu et al. 2008). Sin embargo, en ratones con una delección de miR-133a-1 o miR-133a-2 son fenotípicamente normales, lo que hace pensar que miR-133a-1 y miR-133a-2 realizan las mismas funciones durante el desarrollo cardíaco, pero ratones con alteraciones tanto en miR-133a-1 o miR-133a-2 presentan defectos ventriculares y septales además de la letalidad del embrión (Liu et al. 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de miR-133 en cardiomiocitos embrionarios causa la letalidad embrionaria debido a la reducción de la proliferación de cardiomiocitos (Liu et al. 2008).

Al margen de los dos microRNAs más expresados en el corazón, existen otros tantos que regulan la proliferación y apoptosis de los cardiomiocitos, como son

el grupo miR-17-92, la familia miR-15 y los miR-590, miR-199a, miR-320 y miR-98 miR-128 y miR-142 (Liu et al. 2010; Malizia y Wang, 2011; Peng et al. 2014).

miR-17-92 promueve la proliferación de cardiomiocitos en el corazón embrionario, corazón postnatal y corazón adulto mediante la regulación negativa del supresor de tumores PTEN (Cheng et al. 2013). Ratones con mutaciones en estos microRNAs mueren al poco de nacer debido a una combinación de doble salida-ventrículo derecho y ventrículo-septal defectuosos (Mendell, 2008; Wang et al. 2010). Este complejo promueve la diferenciación miocárdica reprimiendo los genes progenitores *Isl1* y *Tbx1* (Wang et al. 2010). Los ratones que específicamente sobreexpresan estos miRNAs en las células cardiacas presentan un mayor número de cardiomiocitos, lo cual protege más fuertemente el corazón de una lesión inducida por un infarto de miocardio (Cheng et al. 2013) y regula de forma negativa la expresión de *Isl1* y *Tbx1* (Wang et al. 2010). En embriones knock-out para miR-17-92 la expresión de *Isl1* y *Tbx1* está aumentada, lo que conlleva a la inhibición de la diferenciación de los cardiomiocitos y una sobreexpresión de miR-17 (Cheng et al. 2013).

En cuanto a la familia de los miR-15 (miR-195, miR-15a, miR-15b, miR-16 y miR-497) se ha demostrado que inhiben la proliferación de cardiomiocitos mediante la supresión de distintos reguladores del ciclo celular (Porrello et al. 2011) e inducen la apoptosis actuando frente al factor antiapoptótico *Bcl2* (Cimmino et al. 2005). Una sobreexpresión de miR-195 en corazones de ratón postnatales o embrionarios provocaba una hipertrofia e insuficiencia cardiaca (Porrello et al. 2011; Van Rooij et al. 2006).

Por otro lado, miR-590 y miR-199a promueven la proliferación de cardiomiocitos en corazones de roedores adultos y neonatales (Eulalio et al. 2012). También demostraron que miR-320 induce la apoptosis de cardiomiocitos mediante la disminución de la expresión de la proteína de choque térmico 20, la cual es una proteína cardioprotectora y participa en la regulación de una lesión cardiaca inducida por isquemia/reperfusión (Ren et al. 2009). miR-98 miR-128 y miR-142 actúan directamente sobre un ARNm, el *Tgfb1*, los cuales reprimen la actividad TGF $\beta$  en el miocardio en desarrollo (Peng et al. 2014), ya que es de gran importancia mantener los niveles adecuados de TGF $\beta$  porque una elevación anormal en la actividad TGF $\beta$  perjudicaría a la proliferación de

cardiomiocitos y a la supervivencia de los embriones de ratón (Peng et al. 2014; Charng et al. 1998).

También existen diversos miRNAs que actúan de manera específica en el músculo, los llamados myomiRs, que regulan la expresión de los genes de la miosina cardíaca, en roedores existen dos isoformas de miosina que se expresan en el músculo cardíaco,  $\alpha$ MHC (MYH6) y  $\beta$ MHC (MYH7). La familia myomiR, compuesta por los microRNAs miR-208a, miR-208b, y miR-499, que está implicada en la reactivación del programa genético cardíaco fetal cuando el corazón está expuesto a condiciones de estrés cardíaco o en respuesta al hipotiroidismo (Van Rooij et al. 2009; Callis et al. 2009; Van Rooij et al. 2008). miR-208a, miR-208b y miR-499 son codificados dentro de los intrones de los genes Myh6, Myh7 y Myh7b, respectivamente (Van Rooij et al. 2009), para los cuales miR-208a y miR-208b su expresión va pareja a la expresión de los genes en los cuales se encuentran durante el desarrollo del corazón tanto normal como enfermo (Callis et al. 2009). Los miRNAs, miR-208 y miR-499 actúan en la regulación de la expresión de la miosina regulando la actividad de varios represores transcripcionales de Myh7 (Callis et al. 2009; Van Rooij et al. 2008). En diversos experimentos con ratones knock-out para miR-208a no mostraron ningún fenotipo determinado por lo que sugiere que este microRNA no es esencial para el desarrollo cardíaco (Callis et al. 2009; Van Rooij et al. 2008). Sin embargo, estos ratones eran resistentes a la hipertrofia cardíaca y fibrosis inducida por la expresión transgénica de calcineurina, lo que indica que miR-208a es indispensable para la respuesta al estrés cardíaco (Van Rooij et al. 2008) y una sobreexpresión de este es suficiente para producir hipertrofia cardíaca (Callis et al. 2009).

miRNA	Función
miR-1	Regula crecimiento y diferenciación cardíaca inhibiendo transcripción de HAND2
miR-133	Regula crecimiento y proliferación de cardiomiocitos al inhibir sus genes ciclina D2 y factor de transcripción SFR
miR-208 y miR-499	Regula la expresión de la miosina regulando la actividad de varios represores transcripcionales de Myh7
miR-17-92	Promueve proliferación de cardiomiocitos en el corazón embrionario, corazón postnatal y corazón adulto mediante regulación del supresor de tumores PTEN
miR-15	Inhiben la proliferación de cardiomiocitos mediante la supresión de distintos reguladores del ciclo celular

miR-590	Promueve proliferación de cardiomiocitos en corazones adultos y neonatales
miR-320	Induce apoptosis de cardiomiocitos mediante disminución de la expresión de la proteína de choque térmico 20
miR-98 miR-128 miR-142	Actúan sobre el transcrito <i>Tgfbr1</i> y reprimen la actividad de TGF $\beta$ por lo que regulan la proliferación de cardiomiocitos.

**Tabla1.** Resumen funciones de miRNAs en cardiomiocitos.

### **3.1.2. Funciones de los miRNAs en las células de la cresta neural cardíaca**

La síntesis de microRNAs es esencial también para el desarrollo de las células de la cresta neural cardíaca (NCC). Ratones con una delección de *Dicer1* o *Dgcr8* (proteína que colabora en el procesamiento de los miRNAs) en las células de la cresta neural presentan diversos defectos cardiovasculares, entre ellos arco aórtico interrumpido y defectos de doble salida del ventrículo-septal (Huang et al. 2010; Huang et al. 2010; Zehir et al. 2010; Nie et al. 2011; Chapnik et al. 2012). La inhibición de miRNAs en estas células no inhibe la migración de las mismas al tracto de salida ventricular, sino que perjudica la supervivencia y diferenciación de los derivados de los NCC después de que estos migren a sus lugares de destino (Nie et al. 2011).

Distintos miRNAs pueden regular la diferenciación de las células de la cresta neural en el músculo liso. miR-145 puede potenciar la reprogramación dependiente de miocardina de los fibroblastos adultos en células vasculares del músculo liso (CVML) (Cordes et al. 2009). miR-143 y miR-145 trabajan juntos para regular la diferenciación y proliferación de CVML apuntando a una red de factores de transcripción que incluyen *Klf4*, *Myocardin* y *Elk1*. En CVML cultivadas la expresión de miR-143/145 se regula a la baja, por el contrario, una inducción de ellos aumenta la diferenciación de las CVML y reprime su proliferación (Cordes et al. 2009, Cheng et al. 2009). Esos datos indican que miR-143/145 pueden jugar un papel importante en el control del cambio de fenotipo a células musculares lisas (CML). miR-143 tiene como diana *Elk1* que codifica un activador de la proliferación de CML y miR-145 tiene como diana la miocardina que codifica un activador de diferenciación de CML, además de *Klf4* y calmodulina quinasa II- $\Delta$  los cuales regulan positivamente la proliferación celular. Los ratones doble knock-out para miR-143/145 son viables y no presentan ninguna anomalía, pero los ratones postnatales son hipotensos

debido a que presentan una reducción de la túnica de la aorta y arteria femoral (Cordes et al. 2009; Xin et al. 2009; Boettger et al. 2009).

miRNA	Función
miR-143	Actúa regulando el factor de transcripción Elk1 el cual codifica un activador de la proliferación de células musculares lisas
miR-145	Actúa sobre la miocardina que codifica un activador diferenciación de células musculares lisas

**Tabla 2.** Resumen funciones miRNAs en células de la cresta neural cardíaca.

### 3.1.3. Función de los miRNAs en células endocárdicas

Las funciones de los miRNAs en las células endocárdicas se ha estudiado principalmente en el modelo del pez cebra y pollo (Bonet et al. 2015), los miR-23 y miR-218 están involucrados en la diferenciación y migración de las células endocárdicas en el pez cebra (Lagendijk et al. 2011; Fish et al. 2011). miR-23 restringe la formación de almohadilla endocárdica al inhibir su objetivo directo, *Has2* y la producción extracelular de ácido hialurónico. Una pérdida de la función de miR-23 conduce a una excesiva diferenciación de las células de la almohadilla endocárdica en los corazones embrionarios del pez cebra (Lagendijk et al. 2011). En las células endoteliales de los ratones, el miR23, inhibe la EMT inducida por TGF $\beta$  (Lagendijk et al. 2011). El miR-218 regula la formación del tubo cardíaco lineal en el pez cebra mediante la regulación negativa de la señal Slit/Robo durante la migración del campo cardíaco, y, por otro lado, la inhibición de miR-218 retrasa la fusión del campo cardíaco y reduce la tasa de migración endocárdica (Fish et al. 2011).

miRNA	Función
miR-23	Restringe la formación de la almohadilla endocárdica al actuar sobre <i>Has2</i> y restringe la producción extracelular de ácido hialurónico
miR-218	Regula la formación del tubo cardíaco lineal actuando sobre la señal Slit/Robo

**Tabla 3.** Resumen funciones de miRNAs en células endocárdicas.

### 3.1.4. Función de los miRNAs en células epicárdicas

En el epicardio, *Dicer1* también es necesario para el desarrollo de la vasculatura coronaria (Singh et al. 2011), en ratones con una deleción específica de *Dicer1* en el epicardio mueren inmediatamente tras el nacimiento y muestran unos defectos vasculares debido a una EMT deteriorada y muestran una reducción en la diferenciación y proliferación de células epicárdicas (Singh et al. 2011). En estos corazones mutados la EMT de la célula epicárdica se ve gravemente

afectada y la expresión de los reguladores de la EMT también se ve alterada (se ve reducida la expresión de *WT1*, *Snail2* y *Twist1* y se ve incrementada la expresión de la cadherina E). Ratones que tienen una mutación en *Dicer1* también presentan una disminución de la proliferación de las células del epicardio y una diferenciación fallida del músculo liso en vasculatura coronaria que se está desarrollando (Singh et al. 2011). Algunos de los miRNAs más representativos que regulan la transición epitelio-mesenquima incluyen miR-21, miR-31, miR-103/107 y la familia miR-200, todos ellos tienen un importante papel en el desarrollo del epicardio (Singh et al. 2011; Brønnum et al. 2013; Brønnum et al. 2013). miR-21 modula la EMT fibrogénica en las células mesoteliales epicárdicas regulando sobre *Pdcd4* (muerte celular programada 4) y *Spry1*. (Brønnum et al. 2013). La sobreexpresión de miR-21 en los EMC no estimulados lleva a una reducción en la expresión del biomarcador mesenquimal E-cadherina, mientras que la delección de miR-21 durante la EMT inducida por TGFβ promueve la expresión de la E-cadherina (Brønnum et al. 2013). Por otro lado, miR-21 y mir-31 regulan negativamente la EMT fibrogénica en las células epicárdicas/mesoteliales (CEM) reprimiendo directamente el progenitor cardiaco, el gen *Isl1*. En las CEM no estimuladas ISL1 promueve las características mesenquimales y en TGFβ - inducida por CEM, El miR-31 reduce la expresión de *Isl1* y por lo tanto inhibe la EMT (Brønnum et al. 2013). Y por último miR-103/107 actúan promoviendo la EMT actuando sobre *Dicer1* (Martello et al. 2010) y la familia de los miR-200 actúan suprimiendo la EMT regulando la acción de *Zeb1/Zeb2* y *Sec23a* (Park et al. 2008; Korpál et al. 2011).

miRNA	Función
miR-21	Actúa sobre PDCD4 regulando la EMT fibrogénica
miR-31	Reduce la expresión de ISL1 e inhibe la EMT
miR-103/107	Promueve la EMT regulando la acción de Dicer1
miR-200	Suprimen la EMT regulando la acción de ZEB1/ZEB2 y Sec23a

**Tabla 4.** Resumen funciones de los miRNAs en células epicárdicas.

En definitiva, la regulación de la expresión de genes por microRNAs es indispensable para la cardiogénesis en mamíferos. Conociendo cómo actúan los miRNAs durante el desarrollo cardiaco en diferentes tipos celulares podemos avanzar enormemente en el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas para enfermedades cardiacas en pacientes humanos. Basándonos en las funciones de los miRNAs endógenos en diferentes tipos de células podemos diseñar

imitaciones de los mismos para modular su actividad y así tratar distintas enfermedades. La validez de este enfoque ha sido demostrada en modelos animales con insuficiencia cardíaca, hipertrofia miocárdica y fibrosis cardíaca (Ucar et al. 2012; Thum et al. 2011).

### **3.2. Papel de lncRNAs en el desarrollo cardiovascular**

Los lncRNAs son una subclase de transcritos de ARN que codifican transcritos mayores de 200 nucleótidos pero que no dan lugar a proteínas. Actualmente hay descubiertos más de 3000 lncRNAs y están involucrados en distintos procesos biológicos como el crecimiento de las células, proliferación y apoptosis. Los lncRNAs pueden actuar de cuatro formas diferentes; a) pueden actuar de guía uniéndose a factores de transcripción o subunidades proteicas conduciéndolos hacia sus dianas, por lo que pueden promover o suprimir la actividad de un gen (Grote et al. 2013), b) pueden facilitar el ensamblaje de distintos complejos siendo un componente fundamental de los mismos (Tsai et al. 2010), c) existen unos lncRNAs potenciadores que pueden actuar potenciando la transcripción, promoviendo y manteniendo la conformación genómica 3D requerida para que la maquinaria transcripcional tenga acceso a las regiones promotoras (Mousavi et al. 2013) y d) están los lncRNAs reguladores de la transcripción que actúan como moléculas señuelo que compiten con factores de transcripción o complejos de remodelación de la cromatina por sus objetivos genéticos (Redon, Reichenbach y Lingner, 2010).

Diversos estudios han sugerido que los lncRNAs plasmáticos tienen un gran potencial como biomarcadores para diagnóstico y juegan un papel en la evaluación efectiva de los tratamientos de enfermedades cardiovasculares o cáncer, además de la regulación transcripcional y postranscripcional en múltiples procesos celulares.

Varios lncRNAs se conoce que están implicados en procesos de desarrollo cardíaco como son *Braveheart* (Klattenhoff et al. 2013), *Fendrr* (Grote et al. 2013), *Carmen* (Ounzin et al. 2015), *Upperhand* (Anderson et al. 2016), *Terminator*, *Alien* y *Punisher* (Kurian et al. 2015), *Miat* (Ohnishi et al. 2000) y *H19* (Pachnis et al. 1984), aunque la distribución en los tejidos de estos durante el desarrollo cardíaco es poco conocida. Entre los lncRNAs que tienen un papel importante en la proliferación y reparación de cardiomiocitos se han descubierto

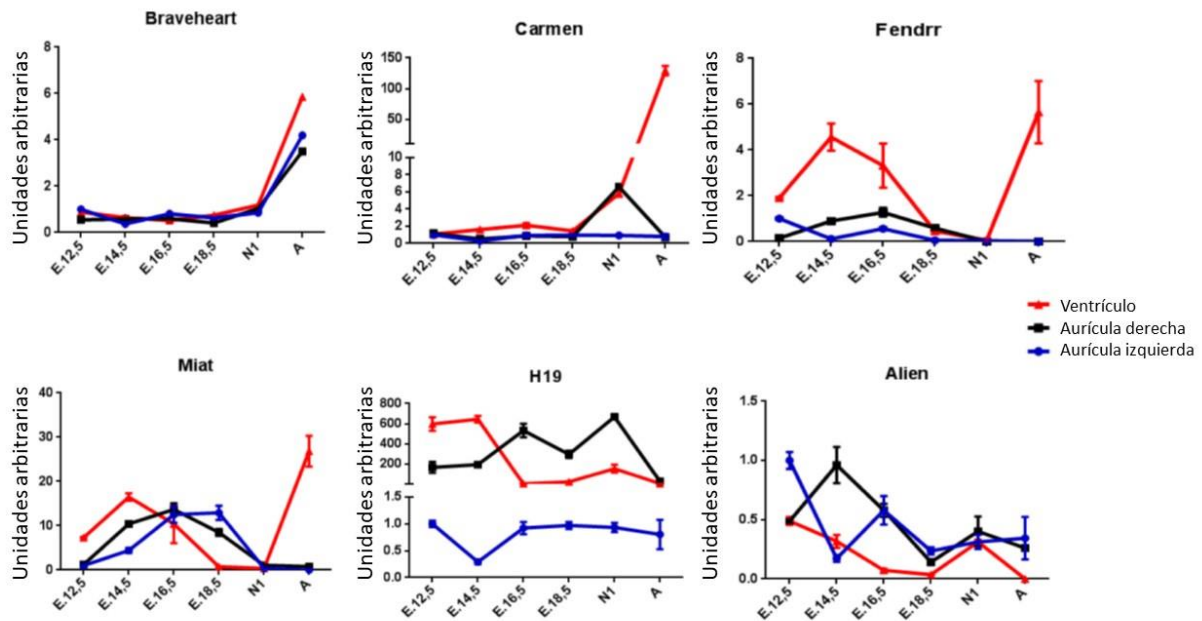
*Cpr* (Ponnusamy, 2019), *NR\_045363* (Wang 2019), *Crrl* (Cheng, 2018) y *uc.167* (Song, 2016).

*Braveheart* tiene un papel fundamental en la conversión del mesodermo nascente a linaje cardiomiogénico en la cardiomiogénesis temprana mediante la modulación de *Mesp1* (Hou et al. 2017; Klattenhoff et al. 2013; Xue et al. 2016). *Carmen* es esencial para precursores cardiacos específicos y además es reactivado tras un fallo cardiaco (Ounzain et al. 2015; Anderson et al. 2016; Kurian et al. 2015; Xue et al. 2016; Plaisance et al. 2016). *Fendrr* se encuentra localizado a los alrededores de *Foxh1*, un factor de transcripción, es esencial para el correcto desarrollo cardiaco, de hecho, ratones con deficiencia de *Fendrr* muestran hipoplasia cardiaca (Grote et al. 2013). Además de que múltiples estudios demuestran que el deterioro de la expresión del *Fendrr* está asociado a diferentes procesos oncogénicos (Dong et al. 2018; Gyvyte et al. 2018; He et al. 2019; Shi et al. 2019; Zhao et al. 2018). *Alien* se expresa en progenitores vasculares durante la diferenciación cardiovascular. En el modelo del pez cebrá una disminución de este lncRNA dio lugar a la alteración de distintos derivados del mesodermo, incluidos el patrón cardiovascular y la morfogénesis de la cámara cardiaca (Kurian et al. 2015), y en relación a *Miat* y *H19* están implicados en distintas patologías cardiacas como el infarto de miocardio e isquemia (Bitaranfan et al. 2019; Zhu et al. 2016). *Cpr* es un long non-coding que presenta mayor expresión en el corazón adulto que en la etapa embrionaria. Una disminución de los niveles de *Cpr* conlleva un aumento significativo en la proliferación de cardiomiocitos en corazones adultos y postnatales y una sobreexpresión de *Cpr* conlleva a una disminución de los mismos (Ponnusamy et al. 2019). *NR\_045363* se expresa principalmente en cardiomiocitos, una sobreexpresión de este produce un aumento en la proliferación de los cardiomiocitos y una disminución inhibe la proliferación de los cardiomiocitos (Wang et al. 2019). En cuanto a *Crrl* está involucrado en la regulación de la proliferación de cardiomiocitos, una pérdida de *Crrl* promueve la proliferación de los mismos (Cheng et al. 2018). Por último, *uc.167* el cual no es específico del corazón, pero se expresa mayoritariamente en él, y sugieren que tiene un papel en el desarrollo del tabique ventricular y una sobreexpresión de *uc.167* inhibe la proliferación y promueve la apoptosis en células del miocardio embrionario (Song et al. 2016).

Recientemente se ha analizado la expresión diferencial de estas lncRNAs durante el desarrollo cardíaco mostrando que *Miat*, *Alien* y *H19* tienen una expresión preferencial en estadios embrionarios y *Braveheart*, *Fendrr* y *Carmen* en estadios adultos (García-Padilla et al. 2019).

Para ello utilizaron ratones CD1 en diferentes estadios de desarrollo, desde E12.5 hasta E18.5 y también corazones de ratón neonatales en el día 1 y corazones adultos.

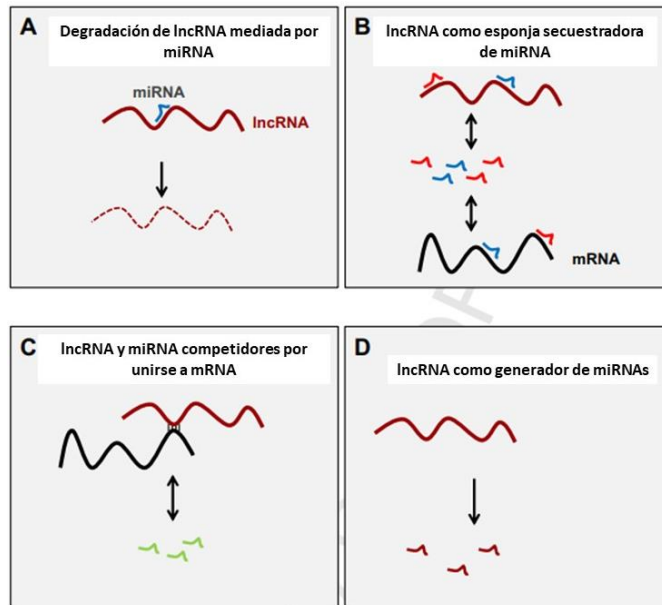
En sus resultados obtuvieron que *Braveheart* mostraba unos niveles de expresión basal durante todas las etapas embrionarias en todas las estructuras cardíacas y que alcanzaba su máxima expresión en etapas adultas. *Carmen* mostraba unos niveles parecidos a los de *Braveheart* durante el desarrollo embrionario alcanzando su máximo en etapas neonatales en la aurícula y ventrículo derecho, además en etapa adulta aumenta la expresión en las cámaras ventriculares mientras que en la aurícula derecha vuelve a los valores basales, por lo que solo se observa un aumento transitorio en la aurícula derecha, pero no en la izquierda en etapas neonatales. *Fendrr* muestra una expresión ventricular bastante elevada en las primeras etapas embrionarias, pero alcanza su máximo en edad adulta, en la aurícula derecha e izquierda presentan una expresión basal en estadios embrionarios, fetales y adultos. *Miat* muestra una expresión dinámica durante el desarrollo embrionario en las tres cámaras analizadas mientras en la edad adulta esta elevada expresión solo se mantiene en las cámaras ventriculares. *H19* también muestra una expresión elevada en etapas embrionarias que disminuye en etapas neonatales y adultas, pero se mantiene una expresión mejorada en las cámaras atriales derecha e izquierda, también se observa una expresión elevada en la aurícula derecha y en las cámaras ventriculares durante todas las etapas analizadas mientras que la expresión en la aurícula izquierda es significativamente menor. Y por último *Alien* muestra una expresión predominante en etapas embrionarias tempranas (E12.5-E14.5) pero disminuye conforme se avanza en el desarrollo.



**Figura 9.** Perfiles de expresión durante el desarrollo cardiaco de los distintos lncRNAs analizados desde estadio E12,5 hasta la edad adulta en aurícula derecha, la aurícula izquierda y los ventrículos, según lo revelado por la qPCR. Obsérvese que *Braveheart*, *Carmen* y *Fendrr* muestran preferentemente niveles de expresión más altos en el corazón del adulto, mientras que *Miat*, *H19* y *Alien* muestran un perfil de expresión más dinámico durante las etapas embrionarias mientras que disminuyen en la edad adulta. También cabe destacar que varios lncRNAs muestran una expresión específica de la cámara, como por ejemplo *Carmen* y *Fendrr*, que se expresan preferentemente en los ventrículos o *H19* en la aurícula y ventrículos derechos. Modificado de García-Padilla et al. (2019).

### 3.3. Interacción lncRNA-microRNAs en el desarrollo cardiovascular

En los últimos años se ha empezado a estudiar un nuevo nivel de regulación mediada por la interacción de los ncrRNAs, en especial los microRNAs y lncRNAs de mamíferos (Yoon, Abdelmohsen y Gorospe, 2014). Se han descubierto hasta el momento que estas moléculas pueden interactuar entre sí para regular distintos procesos de cuatro maneras diferentes (Figura 10).

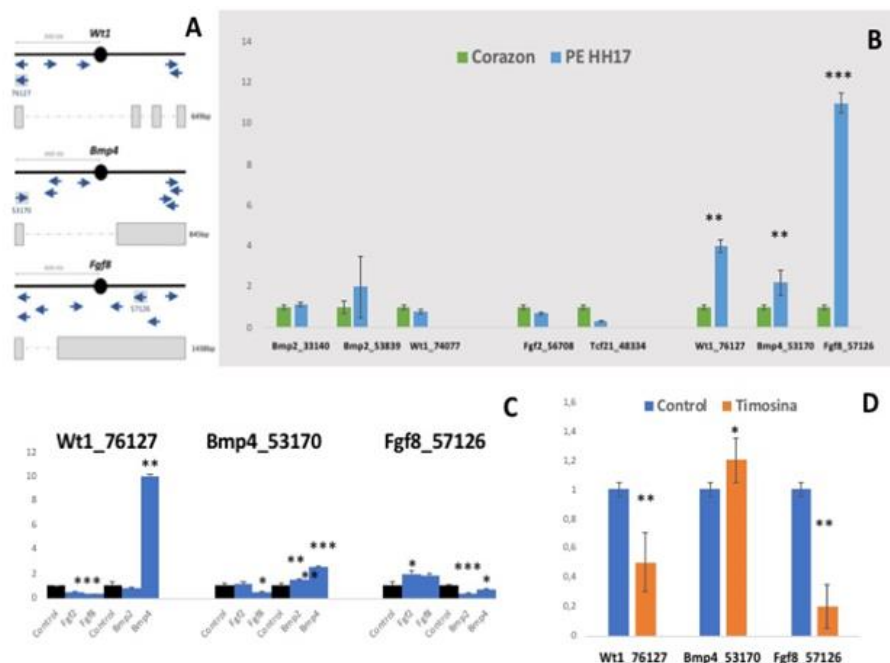


**Figura 10.** Métodos de interacción directa post-transcripcional entre lncRNAs y miRNAs. **A.** Algunos lncRNAs son degradados por miRNAs. **B.** Otros lncRNAs pueden servir como esponjas a las cuales se unen los miRNAs impidiendo su acción, como puede ocurrir con *H19* el cual secuestra el miRNA let-7. **C.** Los lncRNAs y miRNAs también pueden competir por unirse al ARNm y anular su traducción. **D.** Y por último los lncRNA pueden generar miRNAs como por ejemplo *H19* que puede generar miR-206. Modificado de Yoon, Abdelmohsen y Gorospe (2014).

Diversos estudios han abordado las relaciones existentes entre los lncRNAs y los miRNAs y se ha descubierto que los lncRNAs *CHRF*, *Plscr4*, *MIAT* y *ROR* están involucrados en la regulación de la hipertrofia cardiaca y mantienen una interacción con distintos miRNAs que regulan el proceso. El lncRNA *CHRF* provoca la hipertrofia de cardiomiocitos al inhibir mediante el método de secuestro de miRNAs a miR-489 el cual es antihipertrófico y que actúa promoviendo la acción del gen *Myd88* (Wang et al. 2014). De la misma manera, *MIAT* actúa sobre miR-93 y mir-150 los cuales también son antihipertróficos (Zhu et al. 2016; Li et al. 2018), y *ROR* actúa sobre miR-133 que también inhibe la hipertrofia de los cardiomiocitos (Jiang et al. 2016). En contraste, *Plscr4* es un lncRNA antihipertrófico que actúa sobre miR-214 para promover la expresión del gen *Mfn2* (Lv et al. 2018).

Sin embargo, el estudio de las interacciones lncRNA-microRNAs en el desarrollo cardiovascular es aún escaso. En nuestro laboratorio se han analizado recientemente las interacciones de lncRNAs y microRNAs a nivel del proepicardio/epicardio, y se han identificado 8 lncRNAs con expresión en el proepicardio de pollo (Dueñas et al. 2020). Estos lncRNAs se encuentran

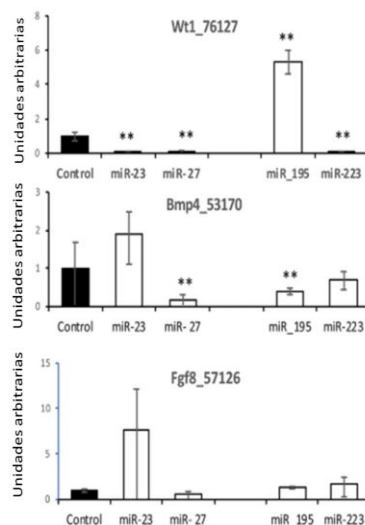
próximos en el genoma a los factores de transcripción *Wt1*, *Tbx18* y *Tcf21* y de crecimiento *Bmp2*, *Bmp4*, *Fgf2* y *Fgf8* (Figura 11A) los cuales son relevantes en la especificación y determinación de células del proepicardio/epicardio embrionario (Kruithof et al. 2006). De estos, tres lncRNAs (*Wt1\_76127*, *Bmp4\_53170* y *Fgf8\_57126*) presentan una mayor expresión en el proepicardio que en el corazón embrionario, dos de ellos (*Fgf2\_56708* y *Tcf21\_48334*) presentan menor expresión en el proepicardio que en el corazón embrionario, y los tres restantes (*Bmp2\_33140*, *Bmp2\_53839* y *Wt1\_74077*) no muestran diferencias significativas entre los dos tejidos (Figura 11B). El análisis de la sobreexpresión de los factores de crecimiento demostró que los lncRNAs *Wt1\_76127*, *Bmp4\_53170* y *Fgf8\_57126* están regulados por dichos factores de crecimiento, y aumentaban su expresión mediante la administración de Bmps y disminuía por Fgfs (*Fgf8\_57126*) y viceversa (*Wt1\_76127*, *Bmp4\_53170*) (Figura 11C). Del mismo modo, la expresión de *Bmp4\_53170* se incrementa por la administración de timosina  $\beta$ 4, un agente estimulador de la conversión de células epicárdicas a cardiomiocitos (Smart et al. 2011) (Figura 11D).



**Figura 11.** A. Esquema de la disposición genómica de los diferentes lncRNAs cercanos a *Wt1*, *Bmp4* y *Fgf8*. B. qPCR de la expresión de distintos lncRNAs en el corazón embrionario respecto al proepicardio en estadio HH17 de desarrollo de pollo. C. qPCR de la expresión de *Wt1\_76127*, *Bmp4\_53170* y *Fgf8\_57126* en PE HH17 tratados con *Bmp2*, *Bmp4*, *Fgf2* y *Fgf8* respectivamente. Obsérvese que la administración de Bmps y Fgfs tiene efectos inversos en la expresión de estos lncRNAs. D. qPCR de la expresión de *Wt1\_76127*, *Bmp4\_53170* y *Fgf8\_57126* en PE HH17 tratados con timosina beta 4. Obsérvese que la administración de

timosina  $\beta$ 4 incrementa la expresión de Bmp4\_53170, mientras que disminuye la expresión de los otros dos lncRNAs, Wt1\_76127 y Fgf8:57126 (Dueñas et al. 2020).

De estos 8 lncRNAs probaron también si los microRNAs miR-195, miR-223 (RNAs que mejoran la cardiomiogénesis), miR-23 y miR-27 (RNAs que la bloquean) eran capaces de regular la expresión de alguno de ellos. Obtuvieron que los explantes que fueron tratados con miR-23 y miR-27 inhibieron significativamente la expresión de Wt1\_76127 pero no la expresión de Bmp4\_53170 y Fgf\_57126. Por el otro lado, miR-195 consiguió aumentar la expresión de Wt1\_76127 e inhibió la de Bmp4\_53170 y no hubo diferencias para Fgf\_57126 y en relación a miR-223 bloqueó la expresión de Wt1\_76127 y no mostró diferencias significativas en relación a Fgf\_57126 ni Bmp4\_53170. Todos estos datos demuestran que los miRNAs pueden regular estos lncRNAs y que además los miRNAs que promueven la cardiomiogénesis frente a los que la inhiben presentan funciones regulatorias complementarias en principalmente Wt1\_76127 y Bmp4\_53170 lo cual refuerza aún más su implicación en una posible cardiomiogénesis derivada.



**Figura 12.** qPCR del análisis de Wt1\_76127 Bmp4\_53170 y Fgf8\_57126 en explantes de PE/ST tratados con miR-23, miR-27, miR-195 y miR-223 respectivamente de embriones de pollo HH17 (Dueñas et al. 2020).

#### 4. CONCLUSIONES

En resumen, los non-coding RNAs componen un nuevo campo de estudio con un gran potencial para conseguir comprender cómo funciona el complejo campo de la regulación. La regulación cardíaca que llevan a cabo los microRNAs y

lncRNAs es de vital importancia para el correcto desarrollo del corazón, ya que todos los tipos distintos de células que podemos encontrar en él contienen distintos non-coding RNAs que ayudan a su funcionamiento y mantienen su homeostasis.

Si se consiguiese entender la manera de actuar de todos ellos se podría avanzar mucho en el desarrollo de distintas estrategias terapéuticas de diferentes enfermedades cardíacas en humanos, ya sea mediante el diseño de miRNAs para modular la acción de algún gen o nuevos fármacos más específicos para contrarrestar la posible falta o sobreproducción de algún non-coding RNA.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Abad, D. E., Gabarre, J. A., Izquierdo, A. M., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., & Izquierdo, A. G. (2006). Pallister-Killian syndrome presenting with a complex congenital heart defect and increased nuchal translucency. *Journal of ultrasound in medicine: official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 25(11), 1475–1480. <https://doi.org/10.7863/jum.2006.25.11.1475>

Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Behringer, R. R., Rowitch, D. H., Schedl, A., Epstein, J. A., & 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(17), 6502–6507. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401711101>

Aldiss, P., Davies, G., Woods, R., Budge, H., Sacks, H. S., & Symonds, M. E. (2017). 'Browning' the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk. *International journal of cardiology*, 228, 265–274.

Álvarez-Miguel, I.S., Miguel-Lasobras, E.M., Martín-Romero, F.J., Domínguez-Arroyo, J.A., González-Carrera, E. (2006). Polaridad durante el desarrollo embrionario inicial. *Rev. Asoc. Est. Biol. Rep.*, 11 (2): 35-45.

Anderson, K. M., Anderson, D. M., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2016). Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development. *Nature*, 539(7629), 433–436. <https://doi.org/10.1038/nature20128>

Armstrong, J. F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W. A., Hastie, N. D., & Bard, J. B. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mechanisms of development*, 40(1-2), 85–97.

Arteaga M; García P; Sanchez Gómez (2017) *Desarrollo del sistema cardiovascular*.

Baker, A. R., Harte, A. L., Howell, N., Pritlove, D. C., Ranasinghe, A. M., da Silva, N. F., Youssef, E. M., Khunti, K., Davies, M. J., Bonser, R. S., Kumar, S., Pagano, D., & McTernan, P. G. (2009). Epicardial adipose tissue as a source of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase mediated inflammation in patients with coronary artery disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(1), 261–267. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2579>

Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

Barwari, T., Joshi, A., & Mayr, M. (2016). MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 68(23), 2577–2584.

Beermann, J., Piccoli, M. T., Viereck, J., & Thum, T. (2016). Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiological reviews*, 96(4), 1297–1325.

Bitarafan, S., Yari, M., Broumand, M. A., Ghaderian, S., Rahimi, M., Mirfakhraie, R., Azizi, F., & Omrani, M. D. (2019). Association of Increased Levels of lncRNA H19 in PBMCs with Risk of Coronary Artery Disease. *Cell journal*, 20(4), 564–568. <https://doi.org/10.22074/cellj.2019.5544>

Boettger, T., Beetz, N., Kostin, S., Schneider, J., Krüger, M., Hein, L., & Braun, T. (2009). Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *The Journal of clinical investigation*, 119(9), 2634–2647. <https://doi.org/10.1172/JCI38864>

Bonet, F., Dueñas, Á., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Aránega, A. E., & Franco, D. (2015). MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 244(10), 1259–1275. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24309>

Braitsch, C. M., Combs, M. D., Quaggin, S. E., & Yutzey, K. E. (2012). Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of

epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Developmental biology*, 368(2), 345–357.

Brand T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental biology*, 258(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00112-x](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00112-x)

Brønnum, H., Andersen, D. C., Schneider, M., Nossent, A. Y., Nielsen, S. B., & Sheikh, S. P. (2013). Islet-1 is a dual regulator of fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition in epicardial mesothelial cells. *Experimental cell research*, 319(4), 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.019>

Brønnum, H., Andersen, D. C., Schneider, M., Sandberg, M. B., Eskildsen, T., Nielsen, S. B., Kalluri, R., & Sheikh, S. P. (2013). miR-21 promotes fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial mesothelial cells involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. *PloS one*, 8(2), e56280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056280>

Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A., & Kispert, A. (2004). The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes & development*, 18(10), 1209–1221. <https://doi.org/10.1101/gad.300104>

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., Willis, M. S., Selzman, C. H., & Wang, D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(9), 2772–2786. <https://doi.org/10.1172/JCI36154>

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., Aidinis, V., ... RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group) (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), 1559–1563. <https://doi.org/10.1126/science.1112014>

Chaowalit, N., & Lopez-Jimenez, F. (2008). Epicardial adipose tissue: friendly companion or hazardous neighbour for adjacent coronary arteries?. *European heart journal*, 29(6), 695–697. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm643>

Chapnik, E., Sasson, V., Blelloch, R., & Hornstein, E. (2012). Dgcr8 controls neural crest cells survival in cardiovascular development. *Developmental biology*, 362(1), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.008>

Charng, M. J., Frenkel, P. A., Lin, Q., Yamada, M., Schwartz, R. J., Olson, E. N., Overbeek, P., & Schneider, M. D. (1998). A constitutive mutation of ALK5 disrupts cardiac looping and morphogenesis in mice. *Developmental biology*, 199(1), 72–79. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8905>

Chechi, K., & Richard, D. (2015). Thermogenic potential and physiological relevance of human epicardial adipose tissue. *International journal of obesity supplements*, 5(Suppl 1), S28–S34. <https://doi.org/10.1038/ijosup.2015.8>

Chen, G., Li, H., Li, X., Li, B., Zhong, L., Huang, S., Zheng, H., Li, M., Jin, G., Liao, W., Liao, Y., Chen, Y., & Bin, J. (2018). Loss of long non-coding RNA CRRL promotes cardiomyocyte regeneration and improves cardiac repair by functioning as a competing endogenous RNA. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 122, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.08.013>

Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., Conlon, F. L., & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics*, 38(2), 228–233. <https://doi.org/10.1038/ng1725>

Chen, J. F., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S. M., Schneider, M. D., Selzman, C. H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G. J., & Wang, D. Z. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2111–2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710228105>

Chen, J., Huang, Z. P., Seok, H. Y., Ding, J., Kataoka, M., Zhang, Z., Hu, X., Wang, G., Lin, Z., Wang, S., Pu, W. T., Liao, R., & Wang, D. Z. (2013). mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circulation research*, 112(12), 1557–1566. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300658>

Cheng, J. X., Chen, L., Li, Y., Cloe, A., Yue, M., Wei, J., Watanabe, K. A., Shammo, J. M., Anastasi, J., Shen, Q. J., Larson, R. A., He, C., Le Beau, M. M., & Vardiman, J. W. (2018). RNA cytosine methylation and methyltransferases

mediate chromatin organization and 5-azacytidine response and resistance in leukaemia. *Nature communications*, 9(1), 1163.

Cheng, Y., Liu, X., Yang, J., Lin, Y., Xu, D. Z., Lu, Q., Deitch, E. A., Huo, Y., Delphin, E. S., & Zhang, C. (2009). MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation research*, 105(2), 158–166.

Christoffels, V. M., Mommersteeg, M. T., Trowe, M. O., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Soufan, A. T., Bussen, M., Schuster-Gossler, K., Harvey, R. P., Moorman, A. F., & Kispert, A. (2006). Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circulation research*, 98(12), 1555–1563.

Cildir, G., Akıncılar, S. C., & Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends in molecular medicine*, 19(8), 487–500. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.05.001>

Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>

Cordes, K. R., & Srivastava, D. (2009). MicroRNA regulation of cardiovascular development. *Circulation research*, 104(6), 724–732.

Cordes, K. R., Sheehy, N. T., White, M. P., Berry, E. C., Morton, S. U., Muth, A. N., Lee, T. H., Miano, J. M., Ivey, K. N., & Srivastava, D. (2009). miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 460(7256), 705–710. <https://doi.org/10.1038/nature08195>

Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., & Represa, A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Molecular and cellular neurosciences*, 8(5), 323–335. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0588>

da Costa Martins, P. A., Bourajjaj, M., Gladka, M., Kortland, M., van Oort, R. J., Pinto, Y. M., Molkenin, J. D., & De Windt, L. J. (2008). Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*, 118(15), 1567–1576.

Després, J. P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, *444*(7121), 881–887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>

Dong, B., Zhou, B., Sun, Z., Huang, S., Han, L., Nie, H., Chen, G., Liu, S., Zhang, Y., Bao, N., Yang, X., & Feng, H. (2018). LncRNA-FENDRR mediates VEGFA to promote the apoptosis of brain microvascular endothelial cells via regulating miR-126 in mice with hypertensive intracerebral hemorrhage. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, *25*(8), e12499.

Dueñas, A., Expósito, A., Muñoz, M., de Manuel, M. J., Cámara-Morales, A., Serrano-Osorio, F., García-Padilla, C., Hernández-Torres, F., Domínguez, J. N., Aránega, A., & Franco, D. (2020). MiR-195 enhances cardiomyogenic differentiation of the proepicardium/septum transversum by Smurf1 and Foxp1 modulation. *Scientific reports*, *10*(1), 9334. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66325-x>

Duim, S. N., Smits, A. M., Kruihof, B. P., & Goumans, M. J. (2016). The roadmap of WT1 protein expression in the human fetal heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *90*, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.008>

Esteller M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics*, *12*(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>

Eulalio, A., Mano, M., Dal Ferro, M., Zentilin, L., Sinagra, G., Zacchigna, S., & Giacca, M. (2012). Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*, *492*(7429), 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature11739>

Fang, S., Zhang, L., Guo, J., Niu, Y., Wu, Y., Li, H., Zhao, L., Li, X., Teng, X., Sun, X., Sun, L., Zhang, M. Q., Chen, R., & Zhao, Y. (2018). NONCODEV5: a comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic acids research*, *46*(D1), D308–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1107>

Fish, J. E., Wythe, J. D., Xiao, T., Bruneau, B. G., Stainier, D. Y., Srivastava, D., & Woo, S. (2011). A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *138*(7), 1409–1419. <https://doi.org/10.1242/dev.060046>

Fishman, M. C., & Chien, K. R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development (Cambridge, England)*, *124*(11), 2099–2117.

Franco, D., Domínguez, J., de Castro Md, M., & Aránega, A. (2002). Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco

[Regulation of myocardial gene expression during heart development]. *Revista española de cardiología*, 55(2), 167–184. [https://doi.org/10.1016/s0300-8932\(02\)76576-7](https://doi.org/10.1016/s0300-8932(02)76576-7)

Fransen, M. E., & Lemanski, L. F. (1990). Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *The Anatomical record*, 226(2), 228–236. <https://doi.org/10.1002/ar.1092260212>

Gaborit, B., Sengenès, C., Ancel, P., Jacquier, A., & Dutour, A. (2017). Role of Epicardial Adipose Tissue in Health and Disease: A Matter of Fat?. *Comprehensive Physiology*, 7(3), 1051–1082.

García-Labbé, D., Ruka, E., Bertrand, O. F., Voisine, P., Costerousse, O., & Poirier, P. (2015). Obesity and coronary artery disease: evaluation and treatment. *The Canadian journal of cardiology*, 31(2), 184–194.

García-Martínez, V., & Schoenwolf, G. C. (1993). Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Developmental biology*, 159(2), 706–719. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1276>

García-Martínez, V., Darnell, D. K., López-Sánchez, C., Sosić, D., Olson, E. N., & Schoenwolf, G. C. (1997). State of commitment of prospective neural plate and prospective mesoderm in late gastrula/early neurula stages of avian embryos. *Developmental biology*, 181(1), 102–115.

García-Padilla, C., Domínguez, J. N., Aránega, A. E., & Franco, D. (2019). Differential chamber-specific expression and regulation of long non-coding RNAs during cardiac development. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1862(10), 194435. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194435>

González-Sánchez, A., & Bader, D. (1990). In vitro analysis of cardiac progenitor cell differentiation. *Developmental biology*, 139(1), 197–209.

Greulich, S., Maxhara, B., Vandenplas, G., de Wiza, D. H., Smiris, K., Mueller, H., Heinrichs, J., Blumensatt, M., Cuvelier, C., Akhyari, P., Ruige, J. B., Ouwens, D. M., & Eckel, J. (2012). Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction. *Circulation*, 126(19), 2324–2334.

Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Währisch, S., Beisaw, A., Macura, K., Bläss, G., Kellis, M., Werber, M., & Herrmann, B. G. (2013). The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Developmental cell*, 24(2), 206–214.

Guadix, J. A., Ruiz-Villalba, A., Lettice, L., Velecela, V., Muñoz-Chápuli, R., Hastie, N. D., Pérez-Pomares, J. M., & Martínez-Estrada, O. M. (2011). Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development (Cambridge, England)*, *138*(6), 1093–1097.

Gupta, P. P., Fonarow, G. C., & Horwich, T. B. (2015). Obesity and the obesity paradox in heart failure. *The Canadian journal of cardiology*, *31*(2), 195–202.

Gyvyte, U., Kupcinskas, J., Juzenas, S., Inciuraite, R., Poskiene, L., Salteniene, V., Link, A., Fassan, M., Franke, A., Kupcinskas, L., & Skieceviciene, J. (2018). Identification of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) deregulated in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *PloS one*, *13*(12), e0209342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209342>

Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., Steward, C., ... Hubbard, T. J. (2012). GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome research*, *22*(9), 1760–1774. <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>

Harvey R. P. (2002). Patterning the vertebrate heart. *Nature reviews. Genetics*, *3*(7), 544–556. <https://doi.org/10.1038/nrg843>

Hatem S. N. (2014). Is epicardial adipose tissue an epiphenomenon or a new player in the pathophysiology of atrial fibrillation?. *Archives of cardiovascular diseases*, *107*(6-7), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2014.06.002>

Hatem, S. N., & Sanders, P. (2014). Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation. *Cardiovascular research*, *102*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu045>

He, W., Zhong, G., Wang, P., Jiang, C., Jiang, N., & Huang, J. (2019). Downregulation of long noncoding RNA FENDRR predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *Oncology letters*, *17*(1), 103–112.

Hiruma, T., & Hirakow, R. (1989). Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *The American journal of anatomy*, *184*(2), 129–138.

Ho, E., & Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Developmental biology*, *66*(2), 579–585.

Hoover, L. L., Burton, E. G., Brooks, B. A., & Kubalak, S. W. (2008). The expanding role for retinoid signaling in heart development. *TheScientificWorldJournal*, 8, 194–211.

Hou, J., Long, H., Zhou, C., Zheng, S., Wu, H., Guo, T., Wu, Q., Zhong, T., & Wang, T. (2017). Long noncoding RNA Braveheart promotes cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0454-5>

Huang, T., Liu, Y., Huang, M., Zhao, X., & Cheng, L. (2010). Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *Journal of molecular cell biology*, 2(3), 152–163.

Huang, Z. P., Chen, J. F., Regan, J. N., Maguire, C. T., Tang, R. H., Dong, X. R., Majesky, M. W., & Wang, D. Z. (2010). Loss of microRNAs in neural crest leads to cardiovascular syndromes resembling human congenital heart defects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(12), 2575–2586.

Huang, Z. P., Neppl, R. L., & Wang, D. Z. (2010). MicroRNAs in cardiac remodeling and disease. *Journal of cardiovascular translational research*, 3(3), 212–218. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9165-y>

Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(47), 16961–16966.

Jiang, F., Zhou, X., & Huang, J. (2016). Long Non-Coding RNA-ROR Mediates the Reprogramming in Cardiac Hypertrophy. *PloS one*, 11(4), e0152767.

Kirby, M.L. (2007). Cardiac Development. Oxford University Press.

Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., & Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129(6), 1141–1151.

Klattenhoff, C. A., Scheuermann, J. C., Surface, L. E., Bradley, R. K., Fields, P. A., Steinhauser, M. L., Ding, H., Butty, V. L., Torrey, L., Haas, S., Abo, R., Tabebordbar, M., Lee, R. T., Burge, C. B., & Boyer, L. A. (2013). Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, 152(3), 570–583. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.003>

Komiyama, M., Ito, K., & Shimada, Y. (1987). Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anatomy and embryology*, 176(2), 183–189.

Korpál, M., Ell, B. J., Buffa, F. M., Ibrahim, T., Blanco, M. A., Celià-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., Wei, Y., Hu, G., Garcia, B. A., Ragoussis, J., Amadori, D., Harris, A. L., & Kang, Y. (2011). Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine*, 17(9), 1101–1108.

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.

Kraus, F., Haenig, B., & Kispert, A. (2001). Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mechanisms of development*, 100(1), 83–86.

Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., & Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, 74(4), 679–691.

Kruithof, B. P., van Wijk, B., Somi, S., Kruithof-de Julio, M., Pérez Pomares, J. M., Weesie, F., Wessels, A., Moorman, A. F., & van den Hoff, M. J. (2006). BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Developmental biology*, 295(2), 507–522.

Kuhn HJ, Liebherr G. (1988). The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol*, 177, pp. 225-34

Kuhn, H. J., & Liebherr, G. (1988). The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anatomy and embryology*, 177(3), 225–234.

Kurian, L., Aguirre, A., Sancho-Martinez, I., Benner, C., Hishida, T., Nguyen, T. B., Reddy, P., Nivet, E., Krause, M. N., Nelles, D. A., Esteban, C. R., Campistol, J. M., Yeo, G. W., & Belmonte, J. (2015). Identification of novel long noncoding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development. *Circulation*, 131(14), 1278–1290.

Legendijk, A. K., Goumans, M. J., Burkhard, S. B., & Bakkers, J. (2011). MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production. *Circulation research*, 109(6), 649–657.

Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G., & Poss, K. D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 127(3), 607–619.

Levin M. (1997). Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 19(4), 287–296. <https://doi.org/10.1002/bies.950190406>

Levin M. (2005). Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mechanisms of development*, 122(1), 3–25.

Levin, M., Pagan, S., Roberts, D. J., Cooke, J., Kuehn, M. R., & Tabin, C. J. (1997). Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Developmental biology*, 189(1), 57–67.

Li, Y., Jiang, B., Wu, X., Huang, Q., Chen, W., Zhu, H., Qu, X., Xie, L., Ma, X., & Huang, G. (2018). Long non-coding RNA MIAT is estrogen-responsive and promotes estrogen-induced proliferation in ER-positive breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(1), 45–50.

Limana, F., Bertolami, C., Mangoni, A., Di Carlo, A., Avitabile, D., Mocini, D., Iannelli, P., De Mori, R., Marchetti, C., Pozzoli, O., Gentili, C., Zacheo, A., Germani, A., & Capogrossi, M. C. (2010). Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(4), 609–618.

Lin, I. E., & Taber, L. A. (1994). Mechanical effects of looping in the embryonic chick heart. *Journal of biomechanics*, 27(3), 311–321.

Liu, N., & Olson, E. N. (2010). MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Developmental cell*, 18(4), 510–525.

Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A. H., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & development*, 22(23), 3242–3254. <https://doi.org/10.1101/gad.1738708>

López-Sánchez, C., García-López, V., Mijares, L., Domínguez, JA., Sánchez Margallo, FM., Álvarez-Miguel, IS., García-López, V. (2013). Gastrulación: proceso clave en la formación de un nuevo organismo. *ASEBIR* 18(1), 29-41

López Serna, N. (2012). Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo. McGraw-Hill Education, (6).

Lovren, F., Teoh, H., & Verma, S. (2015). Obesity and atherosclerosis: mechanistic insights. *The Canadian journal of cardiology*, 31(2), 177–183.

Lv, L., Li, T., Li, X., Xu, C., Liu, Q., Jiang, H., Li, Y., Liu, Y., Yan, H., Huang, Q., Zhou, Y., Zhang, M., Shan, H., & Liang, H. (2018). The lncRNA Plscr4

Controls Cardiac Hypertrophy by Regulating miR-214. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 10, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.12.018>

Malizia, A. P., & Wang, D. Z. (2011). MicroRNAs in cardiomyocyte development. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*, 3(2), 183–190. <https://doi.org/10.1002/wsbm.111>

Manasek, F. J., Burnside, M. B., & Waterman, R. E. (1972). Myocardial cell shape change as a mechanism of embryonic heart looping. *Developmental biology*, 29(4), 349–371. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90077-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90077-2)

Männer J. (2000). Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *The Anatomical record*, 259(3), 248–262.

Männer, J., Wessel, A., & Yelbuz, T. M. (2010). How does the tubular embryonic heart work? Looking for the physical mechanism generating unidirectional blood flow in the valveless embryonic heart tube. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 239(4), 1035–1046. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22265>

Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A. R., Daidone, M. G., Biciato, S., & Piccolo, S. (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*, 141(7), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.017>

Mazurek, T., Zhang, L., Zalewski, A., Mannion, J. D., Diehl, J. T., Arafat, H., Sarov-Blat, L., O'Brien, S., Keiper, E. A., Johnson, A. G., Martin, J., Goldstein, B. J., & Shi, Y. (2003). Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*, 108(20), 2460–2466.

McFadden, D. G., Barbosa, A. C., Richardson, J. A., Schneider, M. D., Srivastava, D., & Olson, E. N. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development (Cambridge, England)*, 132(1), 189–201.

Mendell J. T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133(2), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.001>

Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D., & Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 126(9), 1845–1857.

Moorman, A. F., & Christoffels, V. M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiological reviews*, 83(4), 1223–1267.

Moss, J. B., Xavier-Neto, J., Shapiro, M. D., Nayeem, S. M., McCaffery, P., Dräger, U. C., & Rosenthal, N. (1998). Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Developmental biology*, 199(1), 55–71. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8911>

Mousavi, K., Zare, H., Dell'orso, S., Grontved, L., Gutierrez-Cruz, G., Derfoul, A., Hager, G. L., & Sartorelli, V. (2013). eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Molecular cell*, 51(5), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.022>

Nie, X., Wang, Q., & Jiao, K. (2011). Dicer activity in neural crest cells is essential for craniofacial organogenesis and pharyngeal arch artery morphogenesis. *Mechanisms of development*, 128(3-4), 200–207.

Ohnishi, Y., Tanaka, T., Yamada, R., Suematsu, K., Minami, M., Fujii, K., Hoki, N., Kodama, K., Nagata, S., Hayashi, T., Kinoshita, N., Sato, H., Sato, H., Kuzuya, T., Takeda, H., Hori, M., & Nakamura, Y. (2000). Identification of 187 single nucleotide polymorphisms (SNPs) among 41 candidate genes for ischemic heart disease in the Japanese population. *Human genetics*, 106(3), 288–292.

Ounzain, S., Micheletti, R., Arnan, C., Plaisance, I., Cecchi, D., Schroen, B., Reverter, F., Alexanian, M., Gonzales, C., Ng, S. Y., Bussotti, G., Pezzuto, I., Notredame, C., Heymans, S., Guigó, R., Johnson, R., & Pedrazzini, T. (2015). CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 89(Pt A), 98–112.

Ouwens, D. M., Sell, H., Greulich, S., & Eckel, J. (2010). The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(9), 2223–2234.

Pachnis, V., Belayew, A., & Tilghman, S. M. (1984). Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(17), 5523–5527. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5523>

Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*, 22(7), 894–907.

Peinado, H., Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International journal of developmental biology*, 48(5-6), 365–375. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041794hp>

Peng, Y., Song, L., Zhao, M., Harmelink, C., Debenedittis, P., Cui, X., Wang, Q., & Jiao, K. (2014). Critical roles of miRNA-mediated regulation of TGF $\beta$  signalling during mouse cardiogenesis. *Cardiovascular research*, 103(2), 258–267. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu126>

Plaisance, I., Perruchoud, S., Fernandez-Tenorio, M., Gonzales, C., Ounzain, S., Ruchat, P., Nemir, M., Niggli, E., & Pedrazzini, T. (2016). Cardiomyocyte Lineage Specification in Adult Human Cardiac Precursor Cells Via Modulation of Enhancer-Associated Long Noncoding RNA Expression. *JACC. Basic to translational science*, 1(6), 472–493. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.06.008>

Ponnusamy, M., Liu, F., Zhang, Y. H., Li, R. B., Zhai, M., Liu, F., Zhou, L. Y., Liu, C. Y., Yan, K. W., Dong, Y. H., Wang, M., Qian, L. L., Shan, C., Xu, S., Wang, Q., Zhang, Y. H., Li, P. F., Zhang, J., & Wang, K. (2019). Long Noncoding RNA CPR (Cardiomyocyte Proliferation Regulator) Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Repair. *Circulation*, 139(23), 2668–2684.

Porrello, E. R., Johnson, B. A., Aurora, A. B., Simpson, E., Nam, Y. J., Matkovich, S. J., Dorn, G. W., 2nd, van Rooij, E., & Olson, E. N. (2011). MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circulation research*, 109(6), 670–679. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.248880>

Poss, K. D., Wilson, L. G., & Keating, M. T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601), 2188–2190.

Quaggin, S. E., Schwartz, L., Cui, S., Igarashi, P., Deimling, J., Post, M., & Rossant, J. (1999). The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 126(24), 5771–5783.

Quaggin, S. E., Vanden Heuvel, G. B., & Igarashi, P. (1998). Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. *Mechanisms of development*, 71(1-2), 37–48. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00201-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00201-3)

Ramasubramanian, A., Latacha, K. S., Benjamin, J. M., Voronov, D. A., Ravi, A., & Taber, L. A. (2006). Computational model for early cardiac looping. *Annals of biomedical engineering*, 34(8), 1655–1669.

Ren, X. P., Wu, J., Wang, X., Sartor, M. A., Jones, K., Qian, J., Nicolaou, P., Pritchard, T. J., & Fan, G. C. (2009). MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*, *119*(17), 2357–2366.

Rosa, A., & Ballarino, M. (2016). Long Noncoding RNA Regulation of Pluripotency. *Stem cells international*, *2016*, 1797692.

Rota, R., Ciarapica, R., Giordano, A., Miele, L., & Locatelli, F. (2011). MicroRNAs in rhabdomyosarcoma: pathogenetic implications and translational potentiality. *Molecular cancer*, *10*, 120.

Sacks, H. S., & Fain, J. N. (2007). Human epicardial adipose tissue: a review. *American heart journal*, *153*(6), 907–917.

Salgado-Somoza, A., Teijeira-Fernández, E., Fernández, A. L., González-Juanatey, J. R., & Eiras, S. (2010). Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, *299*(1), H202–H209. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00120.2010>

Saxena, A., & Tabin, C. J. (2010). miRNA-processing enzyme Dicer is necessary for cardiac outflow tract alignment and chamber septation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(1), 87–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912870107>

Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *73*(13), 2491–2509.

Schoenwolf, G. C., & Garcia-Martinez, V. (1995). Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cellular & molecular biology research*, *41*(4), 233–240.

Schoenwolf, G. C., Garcia-Martinez, V., & Dias, M. S. (1992). Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *193*(3), 235–248. <https://doi.org/10.1002/aja.1001930304>

Schultheiss, T. M., Xydas, S., & Lassar, A. B. (1995). Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development (Cambridge, England)*, *121*(12), 4203–4214.

Shi, Y., Chen, C., Xu, Y., Liu, Y., Zhang, H., & Liu, Y. (2019). LncRNA FENDRR promotes high-glucose-induced proliferation and angiogenesis of human retinal endothelial cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 83(5), 869–875. <https://doi.org/10.1080/09168451.2019.1569499>

Singh, M. K., Lu, M. M., Massera, D., & Epstein, J. A. (2011). MicroRNA-processing enzyme Dicer is required in epicardium for coronary vasculature development. *The Journal of biological chemistry*, 286(47), 41036–41045.

Smart, N., Bollini, S., Dubé, K. N., Vieira, J. M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A. N., Lythgoe, M. F., Pu, W. T., & Riley, P. R. (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature*, 474(7353), 640–644. <https://doi.org/10.1038/nature10188>

Song, G., Shen, Y., Ruan, Z., Li, X., Chen, Y., Yuan, W., Ding, X., Zhu, L., & Qian, L. (2016). LncRNA-uc.167 influences cell proliferation, apoptosis and differentiation of P19 cells by regulating Mef2c. *Gene*, 590(1), 97–108.

Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M. L., Brown, D., & Olson, E. N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nature genetics*, 16(2), 154–160.

Stalsberg, H., & DeHaan, R. L. (1969). The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Developmental biology*, 19(2), 128–159.

Taber, L. A., Lin, I. E., & Clark, E. B. (1995). Mechanics of cardiac looping. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(1), 42–50.

Tatsuguchi, M., Seok, H. Y., Callis, T. E., Thomson, J. M., Chen, J. F., Newman, M., Rojas, M., Hammond, S. M., & Wang, D. Z. (2007). Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(6), 1137–1141.

Thum, T., Chau, N., Bhat, B., Gupta, S. K., Linsley, P. S., Bauersachs, J., & Engelhardt, S. (2011). Comparison of different miR-21 inhibitor chemistries in a cardiac disease model. *The Journal of clinical investigation*, 121(2), 461–463.

Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., & Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5992), 689–693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>

Ucar, A., Gupta, S. K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentzsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T. G., Nessling, M., Richter, K., Schiffer, M., ... Thum, T. (2012). The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nature communications*, 3, 1078. <https://doi.org/10.1038/ncomms2090>

Vacca, M., Di Eusanio, M., Cariello, M., Graziano, G., D'Amore, S., Petridis, F. D., D'orazio, A., Salvatore, L., Tamburro, A., Folesani, G., Rutigliano, D., Pellegrini, F., Sabbà, C., Palasciano, G., Di Bartolomeo, R., & Moschetta, A. (2016). Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 109(2), 228–239. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv266>

van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J., Jr, & Olson, E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental cell*, 17(5), 662–673.

van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., Williams, A. H., McAnally, J., Gerard, R. D., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18255–18260. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608791103>

van Rooij, E., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Hill, J., & Olson, E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5824), 575–579.

Vicente-Steijn, R., Scherptong, R. W., Kruithof, B. P., Duim, S. N., Goumans, M. J., Wisse, L. J., Zhou, B., Pu, W. T., Poelmann, R. E., Schali, M. J., Tallquist, M. D., Gittenberger-de Groot, A. C., & Jongbloed, M. R. (2015). Regional differences in WT-1 and Tcf21 expression during ventricular development: implications for myocardial compaction. *PloS one*, 10(9), e0136025.

Virágh, S., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., & Kálmán, F. (1993). Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anatomy and embryology*, 188(4), 381–393.

von Gise, A., Zhou, B., Honor, L. B., Ma, Q., Petryk, A., & Pu, W. T. (2011). WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental biology*, 356(2), 421–431.

von Scheven, G., Bothe, I., Ahmed, M. U., Alvares, L. E., & Dietrich, S. (2006). Protein and genomic organisation of vertebrate MyoR and Capsulin genes and their expression during avian development. *Gene expression patterns : GEP*, 6(4), 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.09.008>

Voronov, D. A., Alford, P. W., Xu, G., & Taber, L. A. (2004). The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo. *Developmental biology*, 272(2), 339–350.

Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Poelmann, R. E., & Gittenberger-de Groot, A. C. (1995). Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anatomy and embryology*, 191(6), 503–508.

Wagner, K. D., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., & Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 1117–1119.

Wang, J., Chen, X., Shen, D., Ge, D., Chen, J., Pei, J., Li, Y., Yue, Z., Feng, J., Chu, M., & Nie, Y. (2019). A long noncoding RNA NR\_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 127, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.12.005>

Wang, J., Greene, S. B., Bonilla-Claudio, M., Tao, Y., Zhang, J., Bai, Y., Huang, Z., Black, B. L., Wang, F., & Martin, J. F. (2010). Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-mediated mechanism. *Developmental cell*, 19(6), 903–912.

Wang, K., Liu, F., Zhou, L. Y., Long, B., Yuan, S. M., Wang, Y., Liu, C. Y., Sun, T., Zhang, X. J., & Li, P. F. (2014). The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circulation research*, 114(9), 1377–1388. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302476>

Wang, P. Y., Sexton, A. N., Culligan, W. J., & Simon, M. D. (2019). Carbodiimide reagents for the chemical probing of RNA structure in cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 25(1), 135–146. <https://doi.org/10.1261/rna.067561.118>

Wapinski, O., & Chang, H. Y. (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in cell biology*, 21(6), 354–361.

Watanabe, M., Timm, M., & Fallah-Najmabadi, H. (1992). Cardiac expression of polysialylated NCAM in the chicken embryo: correlation with the ventricular conduction system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 194(2), 128–141.

Wessels, A., & Pérez-Pomares, J. M. (2004). The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*, 276(1), 43–57.

Wills, A. A., Holdway, J. E., Major, R. J., & Poss, K. D. (2008). Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 135(1), 183–192. <https://doi.org/10.1242/dev.010363>

Winter, E. M., & Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64(6), 692–703. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6522-3>

Xin, M., Small, E. M., Sutherland, L. B., Qi, X., McAnally, J., Plato, C. F., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2009). MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes & development*, 23(18), 2166–2178.

Xue, Z., Hennelly, S., Doyle, B., Gulati, A. A., Novikova, I. V., Sanbonmatsu, K. Y., & Boyer, L. A. (2016). A G-Rich Motif in the lncRNA Braveheart Interacts with a Zinc-Finger Transcription Factor to Specify the Cardiovascular Lineage. *Molecular cell*, 64(1), 37–50.

Yamagishi, H., Yamagishi, C., Nakagawa, O., Harvey, R. P., Olson, E. N., & Srivastava, D. (2001). The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Developmental biology*, 239(2), 190–203. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0417>

Yoon, J. H., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2014). Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. *Seminars in cell & developmental biology*, 34, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.015>

Yudkin, J. S., Eringa, E., & Stehouwer, C. D. (2005). "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet (London, England)*, 365(9473), 1817–1820.

Zehir, A., Hua, L. L., Maska, E. L., Morikawa, Y., & Cserjesi, P. (2010). Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Developmental biology*, 340(2), 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.039>

Zhao, D., Ge, H., Ma, B., Xue, D., Zhang, W., Li, Z., & Sun, H. (2018). The interaction between ANXA2 and lncRNA Fendrr promotes cell apoptosis in caerulein-induced acute pancreatitis. *Journal of cellular biochemistry*, 10.1002/jcb.28097. Advance online publication.

Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., Tsuchihashi, T., McManus, M. T., Schwartz, R. J., & Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129(2), 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.030>

Zhao, Y., Samal, E., & Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436(7048), 214–220.

Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K. R., & Pu, W. T. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature*, 454(7200), 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature07060>

Zhu, X. H., Yuan, Y. X., Rao, S. L., & Wang, P. (2016). lncRNA MIAT enhances cardiac hypertrophy partly through sponging miR-150. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(17), 3653–3660.