

Estudios de linaje del epicardio durante el desarrollo y la regeneración cardiaca

Juan Manuel González-Rosa, Laura Padrón-Barthe, Miguel Torres y Nadia Mercader

Departamento de Biología del Desarrollo Cardiovascular. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

Trazar la historia celular de la morfogénesis embrionaria de un sistema complejo como el cardiovascular es uno de los mayores retos planteados en biología del desarrollo. Para ello es necesario describir las relaciones de linaje entre las células del órgano en distintos estadios, definir los cambios topológicos que experimentan los tejidos durante la morfogénesis y establecer las interacciones entre células de las distintas estructuras.

Por otro lado y a pesar de las grandes expectativas generadas en el área de la medicina regenerativa, los avances en la reparación del sistema cardiovascular son muy limitados.

Recientes descubrimientos apuntan hacia un papel del epicardio durante la regeneración cardiaca, si bien se desconoce si actúa como fuente de señales o de progenitores durante este proceso. Conocer el origen, la diversificación y el potencial de las células epicárdicas durante el desarrollo, la homeostasis y en situaciones patológicas es el objetivo prioritario tanto para el conocimiento básico como para el diseño de terapias celulares eficaces. El objetivo de este artículo es aportar una visión general de los métodos de trazado de linaje clásicos, su potencial y limitaciones, así como presentar metodologías novedosas para el estudio del origen y diferenciación del epicardio y de su papel en regeneración cardiaca.

Palabras clave: Corazón. Trazado de linaje. Epicardio. Desarrollo. Regeneración.

Lineage Tracing of Epicardial Cells During Development and Regeneration

Tracing the history of individual cells during embryonic morphogenesis in a structure as complex as the cardiovascular system is one of the major challenges of developmental biology. It involves determining the relationships between the various lineages of cells forming an organ at different stages, describing the topological rearrangements tissues undergo during morphogenesis, and characterizing the interactions between cells in different structures. However, despite the great expectations raised in the field of regenerative medicine, only limited progress has been made in using regenerative therapy to repair the cardiovascular system. Recent research has highlighted the role of the epicardium during cardiac regeneration, but it is still unclear whether it is important for molecular signaling or acts as a source of progenitor cells during this process. Consequently, increasing knowledge about the origin, diversification and potential of epicardial cells during development and homeostasis and under pathological conditions is of fundamental importance both for basic research and for the development of effective cellular therapies. The aims of this article were to provide a general overview of the classical techniques used for tracing cell lineages, including their potential and limitations, and to describe novel techniques for studying the origin and differentiation of the epicardium and its role in cardiac regeneration.

Key words: Heart. Lineage tracing. Epicardium. Development. Regeneration.

DESARROLLO CARDIACO Y ORIGEN DEL EPICARDIO

El corazón de los vertebrados es un órgano pulsátil complejo, cuyo correcto funcionamiento es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la vida del animal, incluso en etapas embrionarias tem-

pranas en que su estructura y composición difieren profundamente respecto a su organización definitiva. Su estructuración en cámaras —que responde, en esencia, a la necesidad de recibir la sangre y propulsarla, minimizando el flujo retrógrado— difiere entre grupos y constituye una importante adaptación hacia la mejora de la eficiencia mecánica, lo que resulta en un gran avance en comparación con las bombas impulsoras lineales o vasos peristálticos de otros cordados¹. A pesar de estas diferencias estructurales, en todos los vertebrados el corazón consta de una pared muscular miocárdica de grosor variable, tapizada internamente por una cubierta de células endocárdicas y externamente por el epicar-

Financiación: Ministerio de Ciencia y Educación (N.M., RYC-2006-001694 y BFU2008-00212/BMC; J.M.G.-R., FPU AP2008-00546) y Fundación ProCNIC.

Correspondencia: Dr. M. Torres.
Departamento de Biología del Desarrollo Cardiovascular. CNIC.
Melchor Fernández Almagro, 3. 28029 Madrid. España.
Correo electrónico: mtorres@cnic.es

ABREVIATURAS

4-OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

CDEP: células derivadas de epicardio.

CreER^{T2}: Cre recombinasa inducible por tamoxifeno.

EYFP: *enhanced yellow fluorescent protein* (proteína amarilla fluorescente mejorada).

PE: proepicardio.

Desde el punto de vista ontogénico, el corazón de los vertebrados está constituido principalmente por tejido mesodérmico, originado durante la gastrulación con la ingresión de células a partir del epiblasto y su posterior migración anterolateral para dar lugar a los campos precardiacos bilaterales². Debido a las fuerzas mecánicas originadas por el cierre del portal intestinal anterior y el plegamiento general del embrión, los campos bilaterales se mueven hacia la línea media, donde se reunirán para dar lugar a un tubo cardiaco primitivo único constituido por una capa interna de células endocárdicas tapizada externamente por una capa de células miocárdicas. Hasta finales de la década de los sesenta se consideró que prácticamente todas las estructuras presentes en el corazón adulto derivaban del tubo cardiaco primitivo³. Sin embargo, varios estudios han demostrado que las células que componen el corazón derivan de dos campos de precursores cardiacos reclutados secuencialmente durante el desarrollo. Las células que componen el tubo cardiaco primitivo dan lugar al ventrículo izquierdo y los atrios, mientras que el ventrículo derecho y el tracto de salida derivan de mesodermo pericárdico, que se añade al tubo cardiaco por medio de sus polos arterial y venoso⁴. Además del mesodermo pericárdico, las células de la cresta neural también contribuyen a la formación del corazón, que dan lugar al músculo liso de los grandes vasos, participan en la septación del tracto de salida y actúan de forma paracrina sobre algunas poblaciones de miocardiocitos.

Como se ha mencionado anteriormente, el miocardio está recubierto de una capa epitelial denominada epicardio. Entre el epicardio y el miocardio se establece el espacio subepicárdico, rico en matriz extracelular, donde tendrá lugar la aparición de la vasculatura coronaria, uno de los eventos más tardíos en el desarrollo cardiaco. Durante la formación de la vasculatura coronaria se desarrolla un plexo vascular arterial y venoso que se conectará posteriormente a la aorta proximal y al atrio derecho respectivamente. El epicardio, el mesénquima y los vasos coronarios del subepicardio y vasos intramurales se consideraron clásicamente derivados del miocardio primitivo —denotado en origen como

epimiocardio, una mezcla de miocardiocitos y células indiferenciadas⁵—. Aunque se había apuntado a que el epicardio procedía de una fuente mesenquimática extracardiaca, situada cerca del tracto de entrada y que sería capaz de migrar sobre la superficie del corazón⁶, la idea pasó inadvertida hasta que un detallado estudio del tubo cardiaco primitivo del embrión de pollo demostró la ausencia de células indiferenciadas y evidenció las diferencias citológicas entre miocardio y epicardio primitivo⁷.

La mayor parte del epicardio deriva de una estructura transitoria denominada proepicardio (PE), que se desarrolla a partir de células del mesotelio celómico a nivel del tracto de entrada⁸⁻¹². En el embrión de las aves, el PE presenta una estructura en «racimo de uvas» estimada en no más de 200 células (fig. 1A). Si bien la mayor parte del epicardio deriva del PE, una pequeña porción que abarca el tracto de salida más distal se origina a partir del pericardio cefálico^{13,14}. Experimentos recientes de trazado de linaje han mostrado que el PE deriva de la fuente precursora común que genera la mayoría de los tipos celulares del corazón y que, por lo tanto, no representa realmente una estructura extracardiaca. Los precursores cardiacos tempranos pueden ser reconocidos por la expresión de los factores de transcripción *Nkx2.5* e *Isl1*. Las células del PE derivan de una población *Nkx2.5*⁺*Isl1*⁺, si bien no expresan estos genes^{15,16}. Adicionalmente, estudios de falta de función han demostrado que el PE no se forma correctamente en los ratones mutantes que carecen de *Nkx2.5*, mientras que *Isl1* no parece ser esencial para el desarrollo epicárdico¹⁵.

La especificación de células del mesodermo pericárdico hacia el linaje proepicárdico en el tracto de entrada parece estar controlada por la acción opuesta de FGF2 (*fibroblast growth factor 2*, factor de crecimiento de fibroblastos) y BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*, proteína morfogénica ósea)¹⁷. El miocardio del tracto de entrada expresa BMP2, que induce la diferenciación hacia miocardiocitos sobre el mesénquima pericárdico, mientras que las células proepicárdicas expresan FGF2. La inhibición experimental de la señalización mediada por FGF2 bloquea la formación del PE, de forma que las células pericárdicas se incorporan al tracto de entrada (fig. 1A'). Este modelo de especificación evidencia la plasticidad y potencialidad del mesodermo pericárdico para dar lugar a componentes miocárdicos y no miocárdicos del corazón. No obstante, no se ha determinado hasta la fecha si este mesénquima representa una población bipotencial (en el que una misma célula es capaz de generar miocardio y epicardio) o si alberga dos poblaciones separadas.

Algunos genes expresados de forma temprana en el PE incluyen los que codifican para la retinal-

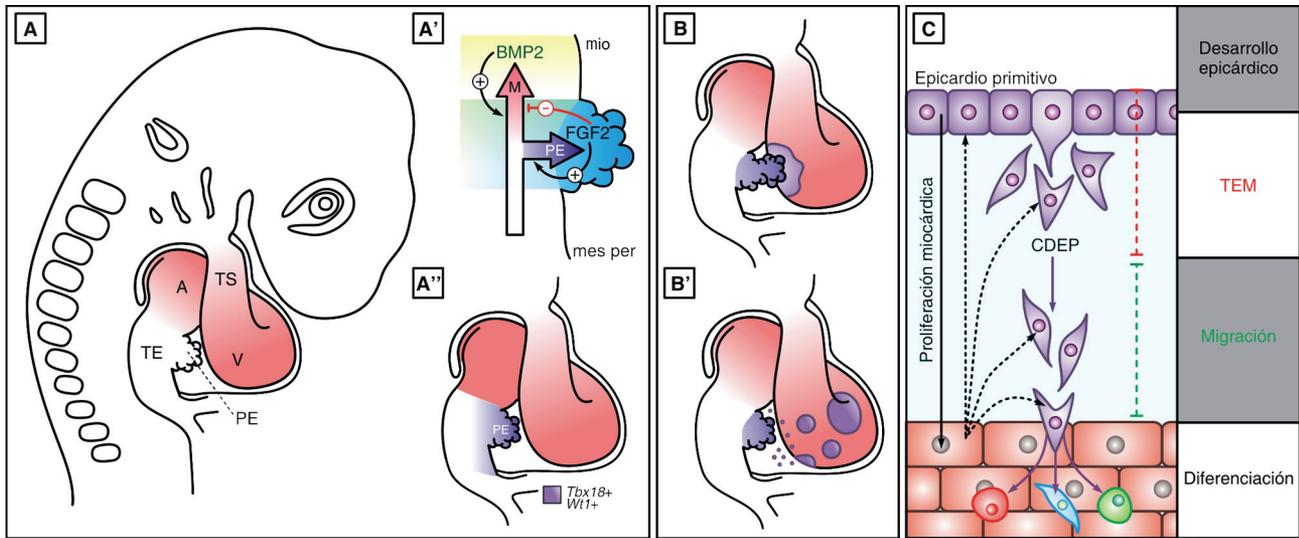


Fig. 1. Representación esquemática del desarrollo del epicardio y de la generación de las células derivadas de epicardio (CDEP). A: vista lateral de la porción anterior de un embrión de pollo que muestra la localización del proepicardio (PE) próxima al tracto de entrada (TE) del corazón. El tubo cardiaco se representa en rojo (adaptado de Pérez-Pomares et al, 2002)⁴¹. A': la señalización mediada por FGF2 (azul) es esencial para la especificación del linaje proepicárdico (flecha violeta) y contrarresta la señalización de BMP2 (verde), que dirige la diferenciación del mesodermo pericárdico hacia miocardiocitos del TE (flecha roja). A'': la expresión de *Tbx18* y de *Wt1* puede ser detectada en el proepicardio (violeta). B: en los embriones de aves, la adhesión del PE (violeta) a la superficie del miocardio (rojo) permite la transferencia de las células proepicárdicas al tubo cardiaco. B': en el ratón y la pintarroja, se ha sugerido que agregados de células proepicárdicas se liberan a la cavidad pericárdica y progresivamente se adhieren a la pared del miocardio. C: algunas células del epicardio primitivo experimentan un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) y se acumulan en el espacio subepicárdico o migran en el interior de la pared miocárdica y se diferencian en células endoteliales, fibroblastos o músculo liso. Estos procesos están controlados de forma autocrina o paracrina (flechas negras discontinuas) por factores expresados por el epicardio, las CDEP o el miocardio. El epicardio también influye en la proliferación de la pared miocárdica (flecha negra). A: aurícula; CDEP: células derivadas de epicardio; mes per: mesénquima pericárdico; M: mio; TS: tracto de salida; V: ventrículo.

dehído-deshidrogenasa 2 (*Raldh2*)^{18,19}, el factor de transcripción T-box 18 (*Tbx18*)^{20,21} o la proteína del tumor de Wilm (*Wt1*)^{22,23} (fig. 1A''). No obstante, ninguno de estos genes se expresa exclusivamente en el PE o en el epicardio primitivo. La pérdida de función de *Raldh2*, la enzima principal en la síntesis de ácido retinoico (AR) conlleva graves malformaciones cardíacas. La inactivación del receptor de retinoico RXR α en el PE en mutantes nulos y en mutantes condicionales afecta gravemente al desarrollo epicárdico^{24,25}. Además de en el epicardio, *Tbx18* se expresa en la pared celómica del pericardio y parte del miocardio del tracto de entrada. La ausencia de *Tbx18* afecta al desarrollo y la especificación de esta región, sin que se haya obtenido hasta la fecha evidencia de su papel biológico en la formación del epicardio²⁶. La expresión de *Wt1* en la región cardíaca puede ser detectada inicialmente en las células mesoteliales que tapizan la cavidad pericárdica y posteriormente en el PE y el epicardio primitivo^{22,23}. Los ratones mutantes para *Wt1* muestran defectos cardiovasculares letales, especialmente relacionados con el epicardio, su función señalizadora y la formación de sus derivados²⁷⁻²⁹.

Las células proepicárdicas se adhieren a la superficie del corazón a la altura del canal auriculoventricular y del tracto de entrada y forman una envuelta epitelial que se conoce como epicardio primitivo.

Aunque el mecanismo de translocación de estas células a la superficie del miocardio parece variar entre diferentes modelos animales (fig. 1B y B'), en el embrión de las aves la unión del PE a la superficie del miocardio del canal auriculoventricular permite la transferencia de las células proepicárdicas al corazón³⁰⁻³². Esta adhesión preferencial a determinadas áreas (conservada evolutivamente, independientemente de la modalidad de transferencia) parece radicar en la acumulación de matriz extracelular en la superficie miocárdica, dado que el tratamiento con algunas proteasas impide la unión del PE a la superficie ventricular³¹. Por el contrario, en un modelo de elasmobranquios (la pintarroja) y un modelo de mamíferos (el ratón) el PE libera agregados de células que se desprenden y se adhieren progresivamente a la superficie miocárdica^{33,34}. Se ha propuesto que este fenómeno está dirigido por el latido cardíaco, que podría promover la unión y la separación alternas entre el PE y la pared miocárdica, lo que da lugar a la formación de agregados que permanecen adheridos a la superficie del tubo cardíaco o que quedan temporalmente libres en la cavidad pericárdica hasta su posterior reasociación³⁵. No obstante, no se puede excluir la posibilidad de que ambos mecanismos coexistan en algunas especies. Por otra parte, no se descarta que otros mecanismos puedan estar involucrados en este proceso,

dado que en el ajolote mutante letal, que carece de latido cardiaco, las células proepicárdicas se adhieren al miocardio, si bien su migración sobre la superficie miocárdica parece estar comprometida³⁶. Se ha propuesto que el factor de transcripción *Tbx5* puede controlar la migración de las células epicárdicas, dado que en los estudios de ganancia y pérdida de función se ven afectadas la migración y la supervivencia de las células PE³⁷.

Algunas células epicárdicas sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM) y delaminan del epicardio primitivo para invadir el espacio subepicárdico³⁸ (fig. 1C). Un estudio reciente ha aportado evidencias moleculares de la implicación de *Wt1* en el control transcripcional directo de genes clave en la iniciación de la TEM y, por lo tanto, en la formación de los derivados epicárdicos²⁸. Algunas de las células derivadas de epicardio (CDEP) permanecen como células mesenquimáticas en el espacio subepicárdico, mientras que otras migran entre los miocardiocitos, y en determinadas localizaciones llegan a alcanzar el espacio subendocárdico. La generación de las CDEP por medio de la TEM, su migración y diferenciación parecen estar controladas fundamentalmente por señales paracrinas que provienen del miocardio^{39,40}. Aunque se trata de un aspecto controvertido, como se discutirá posteriormente, en general se acepta que *in vivo* las CDEP dan lugar a endotelio y músculo liso de la vasculatura coronaria y los fibroblastos intersticiales, y contribuyen a la formación de las válvulas y el anillo fibroso auriculoventricular, y se ha hipotetizado acerca de su potencial para diferenciarse en miocardiocitos.

EL EPICARDIO COMO FUENTE DE SEÑALES

Diferentes experimentos con embriones de pollo en los que se eliminó el PE o se impidió su adhesión al miocardio han demostrado que el correcto desarrollo del miocardio requiere la presencia del epicardio. En su ausencia, el crecimiento de la capa compacta del miocardio no progresa, y se ven comprometidos el desarrollo de las válvulas auriculoventriculares y el septo interventricular^{14,41-43}. El desarrollo de un epicardio defectuoso conlleva la aparición de protrusiones del miocardio ventricular, lo que indica que el epicardio controla las propiedades mecánicas pasivas de la pared miocárdica⁴³. Notablemente, los efectos de la ablación proepicárdica en el embrión de ave son similares al fenotipo del ratón mutante para el gen *Wt1*, que presenta una capa compacta miocárdica muy fina, un desarrollo anómalo de las válvulas auriculoventriculares, una septación interventricular incompleta y ausencia de vasos coronarios y otros derivados epicárdicos^{27,29}.

En los últimos años se ha acumulado un importante cuerpo de evidencias que soporta la noción

de una señalización paracrina desde el epicardio al miocardio en desarrollo que involucra moléculas como el AR o diferentes FGF. Adicionalmente, se ha demostrado recientemente que los fibroblastos intermiocárdicos, que son, al menos parcialmente, derivados epicárdicos, promueven la proliferación del miocardio durante el desarrollo cardiaco⁴⁴.

EPICARDIO Y REGENERACIÓN CARDIACA

El papel del epicardio durante la regeneración miocárdica ha atraído un interés creciente en la comunidad científica en los últimos años. En el modelo de regeneración del pez cebra, la resección del ápex ventricular (hasta un 20% del ventrículo) se repara completamente por un recrecimiento de la región amputada, incluidos el miocardio, el tejido endocárdico y la vasculatura coronaria⁴⁵. Se ha apuntado a que el epicardio tiene un papel importante durante la regeneración del corazón del pez cebra. La amputación del ápex induce una fuerte expresión de marcadores epicárdicos, y células precursoras endoteliales se acumulan en el sitio de amputación⁴⁶ (fig. 2A). Hasta la fecha, se desconoce si el epicardio contribuye exclusivamente de una forma paracrina, estimulando la proliferación miocárdica o como una fuente de células, proveyendo CDEP que se incorporan a la pared miocárdica. Estudios del epicardio en el pez cebra indican que las CDEP se incorporan al corazón adulto no sólo durante la regeneración, sino que participan en su crecimiento continuo, dado que se ha descrito una expresión muy intensa de marcadores epicárdicos durante el crecimiento rápido en adultos⁴⁷. La implicación del epicardio durante los procesos regenerativos parece no ser única de los teleosteos. La inducción de un infarto de miocardio en ratones eleva notablemente la expresión de los marcadores *Tbx18*, *Wt1* y *Raldh2* en el epicardio^{48,49} (fig. 2B) y la marcación lentiviral de células epicárdicas indica una participación de CDEP en la regeneración del miocardio dañado que contribuye a la formación de miocardiocitos (fig. 2C). Además, se han detectado células positivas para los marcadores de células madre c-kit y CD34 en el espacio subepicárdico de corazones fetales o adultos humanos⁵⁰. En cultivo, estas células expresan marcadores propios de miocardiocitos, células endoteliales y células musculares lisas en el caso de explantes murinos, y de células musculares lisas en el caso de muestras de corazones humanos⁵¹ (fig. 2D). En un estudio reciente, el trasplante de CDEP humanas en el corazón de ratones tras una oclusión coronaria resultó en una mejora significativa de la función cardiaca: esto demostró que hay un potencial terapéutico genuino de las CDEP en la restauración de la función cardiaca tras un infarto de miocardio⁵², si bien se

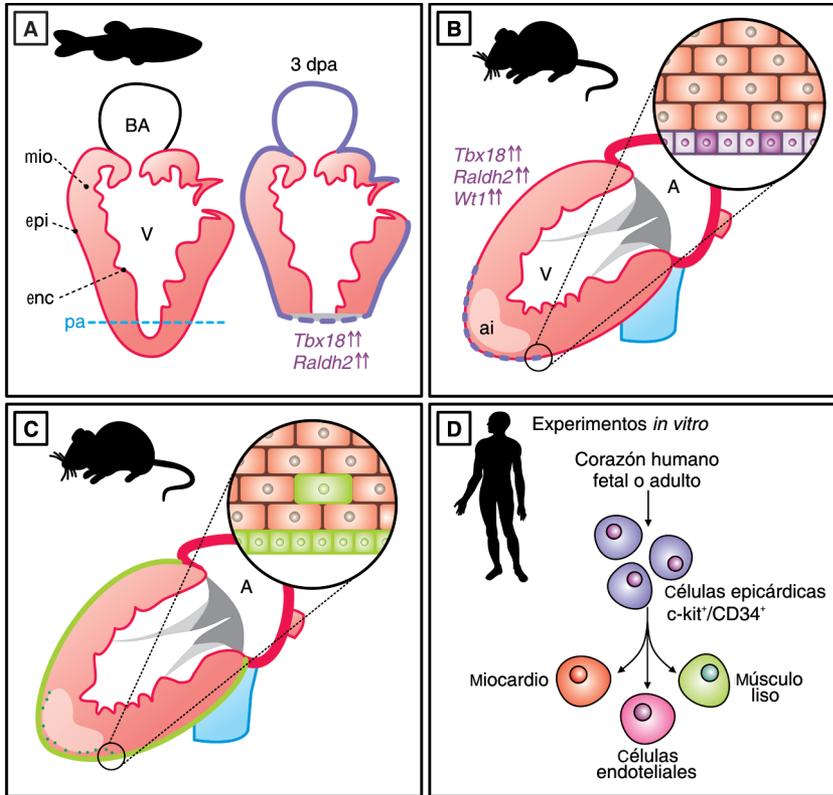


Fig. 2. Papel del epicardio durante la regeneración cardíaca. A: la resección del ápex ventricular (línea azul) promueve la reexpresión de factores de transcripción característicos del desarrollo del epicardio en la superficie del corazón adulto en pez cebra (línea violeta). B: la generación de un daño isquémico en corazón de ratón adulto induce la reexpresión de *Tbx18*, *Raldh2* y *Wt1* en una subpoblación de células epicárdicas o en sus derivados (línea violeta discontinua; véase detalle). C: el trazado lentiviral de las células del epicardio adulto mediante la expresión de GFP (verde) indica la contribución del epicardio a la regeneración del miocardio tras un daño isquémico inducido (véase detalle). D: potencialidad *in vitro* de células epicárdicas humanas *c-kit*⁺/*CD34*⁺. A: aurícula; ai: área infartada; BA: bulbo arterioso; dpa: días tras la amputación; enc: endocardio; epi: epicardio; mio: miocardio; pa: plano de amputación; V: ventrículo.

desconoce el tipo celular al que dieron lugar o si su efecto fue exclusivamente paracrino.

Dada su posible aplicación terapéutica para el tratamiento del infarto de miocardio, se están realizando numerosos estudios para la reactivación del epicardio y la inducción de la TEM. Recientemente se ha descrito el efecto de diferentes moléculas en la migración y proliferación del epicardio y las CDEP. La administración de timosina $\beta 4$ induce la reexpresión de marcadores epicárdicos embrionarios y favorece la formación de capilares en la zona borde del infarto en ratones adultos tras la ligación de una arteria coronaria⁵³. Actualmente se está investigando el efecto de la administración de FGF y VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular, *vascular endothelial growth factor*) en la angiogénesis después de un daño miocárdico de isquemia-reperusión⁵⁴. Resulta esencial, en virtud de todo ello, comprender el linaje de las CDEP durante el desarrollo y la regeneración a fin de esclarecer su potencial real y conocer las señales que permiten su diferenciación a distintos tipos celulares. A continuación se detallan los distintos abordajes experimentales utilizados hasta la fecha para estudiar el destino de CDEP y se discuten los resultados obtenidos. Además, se presentan técnicas alternativas para el estudio del linaje epicárdico que ayudarán a esclarecer su importancia durante el desarrollo y la regeneración.

MÉTODOS DE TRAZADO DE LINAJE

Los estudios de trazado de linaje permiten entender los procesos de morfogénesis y proporcionan información sobre las relaciones genealógicas de células dentro de una estructura. El estudio del trazado de linaje se puede realizar mediante el aislamiento de células precursoras y su cultivo *in vitro* o mediante su trazado *in vivo*.

En biología del desarrollo se ha usado clásicamente el sistema de quimerización heteroespecífica codorniz-pollo para estudiar el linaje de distintos tipos celulares durante la organogénesis *in ovo*. Esta técnica se basa en el trasplante de tejido de un embrión de codorniz (donante) a un embrión de pollo (aceptor). Las células del donante se pueden reconocer posteriormente mediante el empleo de anticuerpos específicos que reconocen antígenos propios de la codorniz ausentes en el pollo, y así estudiar su contribución durante el desarrollo de un órgano determinado. Alternativamente, se puede realizar la marcación celular mediante el uso de agentes fluorescentes lipófilos, como la carboxianina DiI, que se incorporan a la membrana de la célula y permiten su seguimiento durante un corto periodo del desarrollo del animal. Otra técnica usada frecuentemente en aves es la marcación con retrovirus defectivos en replicación que portan una construcción *reporter* LacZ. Esta estrategia

permite determinar el destino final de las células infectadas mediante tinción con el sustrato de la enzima betagalactosidasa (codificada en el genoma viral), que produce un precipitado coloreado. Si este experimento se realiza usando un título viral bajo, se obtiene un número de clones que, con una alta probabilidad, descienden de una única célula infectada, permitiendo el estudio de la pluripotencialidad de una célula precursora y el momento de su especificación de linaje⁵⁵.

En el ratón, la técnica de trazado de linaje usada con más frecuencia^{56,57} se basa en la tecnología *Cre-loxP*. La proteína Cre es una recombinasa de la superfamilia de las integrasas λ originalmente presente en el bacteriófago P1 de *Escherichia coli*. Aunque se trate de una enzima viral, se ha demostrado que funciona eficientemente en células eucariontes⁵⁸. Junto con la transgénesis y el *gene targeting* son una herramienta muy importante para la investigación genética en el ratón, que permite desarrollar, por ejemplo, modelos de ganancia o pérdida de función condicional. Las proteínas Cre reconocen unas secuencias diana en el ADN, denominadas *loxP*. Estas secuencias tienen una estructura única palindrómica repetida a ambos lados de una secuencia central. La asimetría de la secuencia central les confiere una orientación. Las dos dianas *loxP* presentes en diferentes lugares del ADN se cortan por la parte central y vuelven a recomponerse intercambiando las mitades. Así, el resultado obtenido será diferente dependiendo de la orientación de las dianas y de su presencia en una misma o en distintas moléculas de ADN: en el primer caso, se eliminará el fragmento situado entre las dos dianas (fig. 3A), y en el segundo, se intercambiarán los fragmentos de ADN presentes en las distintas moléculas (fig. 3B)⁵⁹. Varios estudios han mostrado que la actividad de un gran número de proteínas puede controlarse gracias a su fusión al dominio de unión a ligando del receptor nuclear de estrógenos (ER). En ausencia del ligando (betaestradiol), el receptor

de estrógenos permanece retenido en el citoplasma de la célula mediante su asociación al citoesqueleto de actina⁶⁰. El 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) es un análogo sintético del estradiol que se une al dominio ER. Debido a diferencias estructurales con el ligando natural, la unión de 4-OHT produce ciertos cambios conformacionales en el dominio ER, impidiendo el reclutamiento de coactivadores por parte de éste⁶¹. Mediante la mutación de este dominio^{62,63} se han conseguido las variantes ER^T y ER^{T2}, que presentan una afinidad muy reducida por el ligando natural (betaestradiol) y una afinidad aumentada por el 4-OHT, y conservan intacta la capacidad de regulación de la localización subcelular del dominio silvestre. De este modo, un organismo transgénico que exprese de forma estable la recombinasa Cre fusionada al dominio ER^T (Cre-ER^T) no presenta actividad Cre apreciable. Únicamente tras la administración de 4-OHT y sólo durante el tiempo que tarda en eliminarse el fármaco, la recombinasa Cre se translocará al núcleo y estará activa. Localizando el gen *Cre-ER^T* bajo el promotor específico de un tipo celular determinado se obtiene un control tanto espacial como temporal de su actividad, que se ve limitada a los periodos en que se administre el 4-OHT.

Una de las aplicaciones importantes de este método es su combinación con el de las líneas *reporter*. De este modo se puede observar la restricción de tejido o de linaje como consecuencia de la recombinación, gracias a un marcador, de forma permanente y transmisible a su descendencia⁶⁴⁻⁶⁶. Una de las primeras líneas de ratón *reporter* se obtuvo por modificación genética dirigida del locus ROSA26 (*reverse orientation splicing acceptor*). Este locus se utiliza para conseguir la expresión ubicua y homogénea de un transgén en el embrión de ratón o en el adulto⁶⁷. En caso de que haya actividad Cre, cada célula del animal expresa un marcador de forma permanente y transmisible a su descendencia. Los marcadores más utilizados son el LacZ⁶⁴ y la proteí-

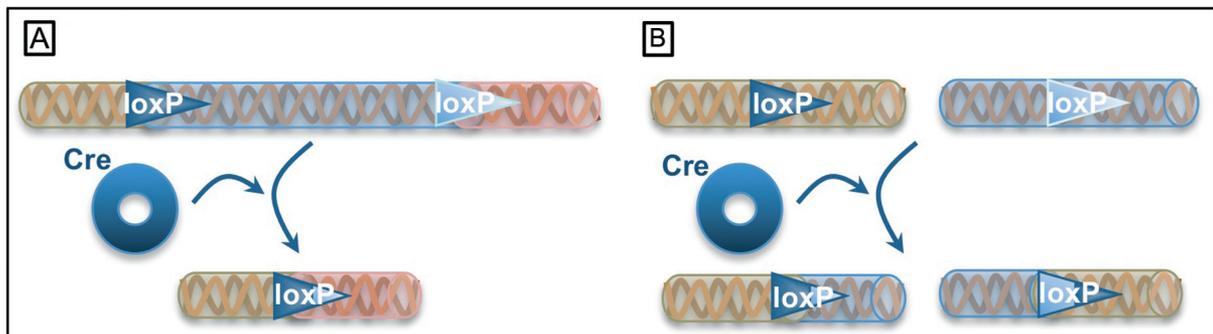


Fig. 3. Sistema *Cre-loxP*. A: eliminación por acción de la recombinasa Cre de un fragmento de ADN comprendido entre dos secuencias *loxP* situadas en el mismo sentido de una molécula. B: la unión de la recombinasa Cre a dos dianas *loxP* situadas en moléculas de ADN diferentes producirá el intercambio de fragmentos entre las dos moléculas.

na fluorescente mejorada EGFP (verde)⁶⁶, así como la EYFP (amarilla) y la ECFP (cian), obtenidas a partir de mutaciones de ésta⁶⁸.

La técnica *Cre-loxP* se ha utilizado para realizar estudios de trazado de linaje en el corazón, mediante el control transcripcional de la enzima Cre bajo el promotor de genes con expresión específica en diferentes tipos celulares o regiones del corazón. De este modo, usando las líneas *Isl1-Cre* o *Nkx2.5-Cre* se puede estudiar el linaje de poblaciones de progenitores cardíacos⁶⁹⁻⁷¹. La línea α MHC-MerCreMer, por ejemplo, permite la activación controlada de la Cre recombinasa en el miocardio⁷² y la línea *Nppa-Cre* restringe su expresión a miocardiocitos auriculares⁷³. Con la línea *Wnt1-Cre* se puede estudiar la distribución de los derivados de la cresta neural cardíaca⁷⁴, mientras que la línea *Tie2-Cre* permite el trazado del linaje endocárdico⁷⁵. Mediante el uso de las líneas α MHC-Cre, *Tie2-Cre* y *Wnt1-Cre* se ha estudiado la formación de las válvulas cardíacas, confirmando que derivan del endocardio⁷⁶. Como se mencionará también más adelante, el linaje epicárdico se ha trazado mediante líneas que expresan *Gata5-Cre*, *Wt1-Cre* o *Tbx18-Cre*^{15,16,24,77,78}.

Una alternativa al uso de la recombinasa Cre es la técnica que utiliza el *reporter* LacZ portador de una duplicación intragénica no funcional (nLaacZ). Cuando nLaacZ sufre un evento espontáneo de recombinación intragénica, se convierte en la forma funcional nLacZ, que será transmitida de manera estable a la descendencia. El empleo de esta técnica de trazado de linaje de baja frecuencia ha permitido recientemente estudiar las relaciones de linaje de diferentes poblaciones miocárdicas con resolución clonal⁷⁹⁻⁸¹. De igual manera, el uso de la recombinación mediada por Cre a baja frecuencia de recombinación permite el análisis clonal, ya que potencialmente posibilita la obtención de células marcadas descendientes de una única célula.

APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TRAZADO CLÁSICOS AL ESTUDIO DEL EPICARDIO

Clásicamente, el epicardio se había considerado una capa inerte de recubrimiento, cuyo único cometido era la protección mecánica de la superficie miocárdica. Sin embargo, estudios destinados a descifrar el origen y el desarrollo de la vasculatura cardíaca aportaron las primeras evidencias de su implicación en la morfogénesis coronaria. La caracterización inicial del epicardio primitivo permitió describir la presencia de islotes sanguíneos y de infiltrados mesenquimáticos subepicárdicos, sin que se especificara ni discutiera su origen⁸²⁻⁸⁴.

Gran parte del conocimiento sobre la formación del epicardio y sus derivados proviene de estudios

en embriones de aves (fig. 4A). Uno de estos estudios pioneros —destinado inicialmente a establecer si el desarrollo de las coronarias se producía por la conexión de una red de capilares a la base de la aorta (*ingrowth*) o si éstos procedían de un sobrecrecimiento de la base de ésta (*outgrowth*)— empleando la marcación retroviral aportó las primeras evidencias de que los precursores de la vasculatura coronaria ingresan en el corazón vía el mesotelio dorsal. La inyección de partículas retrovirales en la cavidad pericárdica de embriones de pollo resultó en la marcación de componentes de la vasculatura coronaria (músculo liso y endotelio) y de fibroblastos intersticiales. Para estudiar si estos tres tipos celulares provenían de un mismo progenitor celular, se procedió a realizar infecciones a bajo título viral. Estas condiciones experimentales nunca produjeron clones que contuviesen estas tres poblaciones, lo que indica que los progenitores estaban especificados de forma temprana⁸⁵. En un estudio posterior, la marcación retroviral se realizó exclusivamente en el PE de embriones de pollo⁸⁶, lo que permitió concluir que esta estructura daba lugar al epicardio, células mesenquimales subepicárdicas, músculo liso y células endoteliales de la vasculatura coronaria, así como pericitos y fibroblastos intersticiales del miocardio. Además, los autores detectaron células positivas para marcadores de músculo liso y endotelio vascular en el PE y no obtuvieron clones mixtos con contribución de diferentes tipos celulares en inyecciones a bajo título viral, lo que apoya la hipótesis de especificación temprana y monoclonalidad de las CDEP. La marcación de las células proepicárdicas con DiI confirmó su contribución al epicardio y la posterior infiltración del miocardio por un subgrupo de éstas⁸⁶. La contribución de células proepicárdicas a músculo liso y endotelio vascular de las coronarias se confirmó con estudios que empleaban el sistema de quimerización heteroespecífica codorniz-pollo^{87,88}. Sin embargo, un tercer estudio de trazado con este sistema indicó que las células endoteliales de las coronarias proceden del primordio hepático en desarrollo y no del PE⁸⁹, si bien ingresan en el corazón a través del puente que éste establece con el miocardio⁹⁰.

Estudios más recientes en el ratón mediante la tecnología *Cre-loxP* han examinado el destino de los precursores epicárdicos que expresan *Wt1* o *Tbx18*^{16,77,78} (fig. 4B). En el primer abordaje, se generó una línea de ratón *Tbx18-Cre*, que se cruzó con la línea *reporter* ROSA26-LacZ. Estos experimentos han confirmado que la musculatura lisa, los pericitos de los vasos coronarios, parte de los fibroblastos del intersticio cardíaco y de las válvulas mitral y tricúspide proceden de una población *Tbx18*⁺. Sin embargo, y a diferencia de los resultados de trazado clásico en aves, estos experimentos mostraron

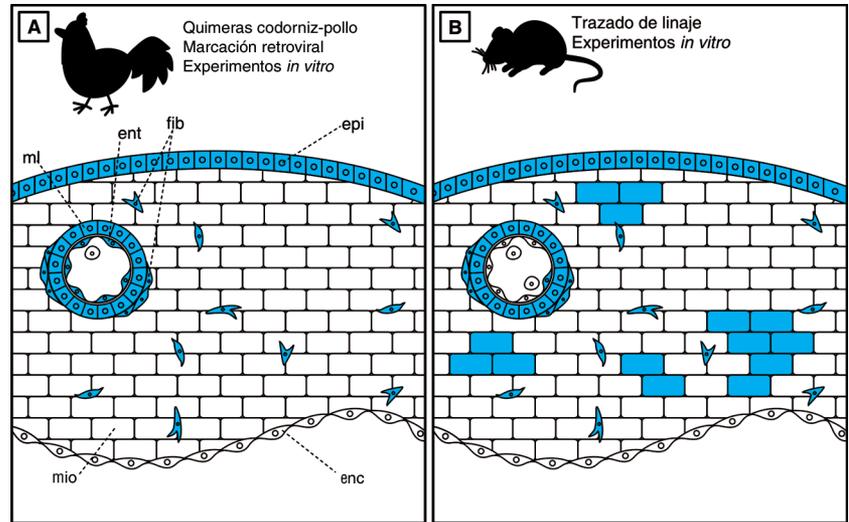


Fig. 4. Destino de las CDEP en el pollo (A) y en el ratón (B) (células azules). enc: endocardio; ent: endotelio; epi: epicardio; fib: fibroblastos; mio: miocardio; ml: músculo liso.

una contribución al linaje miocárdico (especialmente en el septo interventricular [30%] y en menor medida en las paredes de ventrículos y aurículas). Un segundo estudio con una línea inducible *Wtl*-Cre-ER^{T2} confirmó los resultados obtenidos con la línea *Tbx18*-Cre, si bien mostró leves diferencias en las proporciones de miocardiocitos derivados de la población *Wtl*⁺ (el 10% de miocardiocitos del septo interventricular, el 14% en ventrículos y el 18% en aurículas). En ambos estudios la contribución al endotelio de las coronarias fue minoritaria. La tinción del epicardio de embriones de ratón con colorantes fluorescentes y el posterior análisis de la colocalización de las células trazadas con marcadores miocárdicos confirma estos resultados. Recientemente se ha mostrado que células *Wtl*⁺ pueden dar lugar al anillo fibroso auriculoventricular que aísla eléctricamente aurículas y ventrículos⁷⁷.

LIMITACIONES DE LOS ABORDAJES ACTUALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LINAJE DE CDEP DURANTE EL DESARROLLO Y LA REGENERACIÓN CARDIACA

Las distintas estrategias empleadas en el estudio del linaje de las CDEP presentan notables discordancias entre los resultados. Si bien estas divergencias pueden deberse al uso de diferentes técnicas de trazado de linaje, no debe descartarse la posible variación debida al empleo de modelos animales distintos.

En primer lugar, los trasplantes heterotípicos, aunque informativos, tienen un potencial muy limitado. Una crítica importante es la dificultad o imposibilidad de generar trasplantes que carezcan por completo de contaminaciones con tejido circundante que permitan, en consecuencia, trazar una pobla-

ción homogénea determinada. Esta limitación condiciona igualmente las aproximaciones retrovirales o el empleo de sustratos fluorescentes, en las que no se asegura que sólo resulte marcada el área de interés. En este sentido es importante destacar que la metodología de quimerización heteroespecífica, la marcación fluorescente o la infección retroviral no resultan de especial utilidad para diferenciar entre las posibles contribuciones del PE comparado con el mesotelio hepático, dada su proximidad anatómica, las limitaciones de la microcirugía o la dificultad en la marcación de células de una población excluyendo otra.

El empleo de líneas *Cre-loxP* dirigidas por un promotor específico de tejido ha sido de gran utilidad para la caracterización del desarrollo cardiovascular. Para usar esta técnica como método de trazado de linaje es indispensable disponer de un gen cuya expresión sea específica de los precursores de un determinado tipo celular. Sin embargo, aunque la expresión de la recombinasa Cre bajo un promotor determinado permite el trazado del linaje de las células que expresan el gen en cuestión, no necesariamente refleja sólo el linaje del tejido donde se expresa ese gen. En el caso del epicardio, *Tbx18* se expresa en el PE y el epicardio, pero también en algunas áreas miocárdicas, lo que supone que el análisis de la descendencia de células *Tbx18*⁺ no equivale al estudio de la descendencia de células derivadas del epicardio⁹¹. Además, no todas las células proepicárdicas expresan *Tbx18* o *Wtl*, de manera que, de forma independiente, las líneas *Wtl*-Cre y *Tbx18*-Cre no reflejan la progenie proepicárdica en su totalidad. De esta forma, las diferencias encontradas entre las dos líneas pueden deberse a que las poblaciones *Tbx18*⁺ y *Wtl*⁺ no se solapan completamente. Por otra parte, y a diferencia de algunos de los experimentos realizados en el pollo, los

estudios en el ratón han evidenciado que tan sólo una población muy pequeña del endotelio vascular coronario procede del epicardio. Se ha descrito una población de células *Tbx18*⁻ que expresa el marcador endotelial *Flk1* en el PE de ratón, lo que indica que diferentes poblaciones celulares derivadas del mesotelio coexisten en esta estructura⁷⁸. Además, esta población podría representar los angioblastos hepáticos que potencialmente migran a través del PE, y que darían lugar a las células endoteliales de la vasculatura, mientras que las células proepicárdicas contribuirían a los fibroblastos intersticiales y la musculatura lisa⁸⁹. En cualquier caso, la falta de una línea Cre específica de epicardio es actualmente una limitación clara para el estudio del linaje epicárdico en ratones.

El uso del sistema nLaacZ tampoco ofrece mayores ventajas para el estudio del trazado de linaje epicárdico. Dado que este sistema se basa en el revelado de clones bajo el control de un promotor específico de tejido, sólo revela parte del clon, excluyendo las relaciones de linaje entre estas células y sus hermanas en tejidos adyacentes. Se pierde así parte de la información genealógica de las células que componen un clon.

Como consecuencia de estas limitaciones, el conocimiento disponible en este momento no sólo es fragmentario, sino que muchos de los conceptos aceptados tradicionalmente están sujetos a serias dudas. Respecto a los mecanismos de mantenimiento y regeneración de los tejidos adultos⁹², el panorama es aún más incierto. Las recientes identificaciones de distintas poblaciones de células troncales residentes o importables al tejido cardíaco no se han acompañado de demostración funcional de su implicación en la renovación del tejido ni durante su homeostasis en condiciones fisiológicas ni durante la regeneración de lesiones. La necesidad de conocer el patrón de renovación celular del corazón adulto, saludable o enfermo, así como de determinar el origen de poblaciones de células troncales que pudieran realizar una función de mantenimiento y reparación natural del tejido cardíaco, es de altísima prioridad hoy en día, tanto para la ciencia básica como para la investigación traslacional. Resultados recientes apuntan a la posibilidad de que el miocardio adulto se renueve parcialmente durante su crecimiento normal o en condiciones de estrés por infarto o sobrecarga patológica^{93,94}. Sin embargo, se desconoce el origen de las poblaciones celulares que pudieran ser la causa de esta renovación miocárdica. De igual manera, en los casos en que se han ensayado terapias celulares en aplicaciones clínicas, los beneficios de la inyección de células han sido marginales y no han ido acompañados de la incorporación funcional de las células trasplantadas⁹⁵. Será, por lo tanto, esencial profundizar en el entendimiento de mecanismos que permitan

a las células colonizar eficiente y funcionalmente órganos adultos para conseguir estrategias eficaces de terapia celular en el futuro.

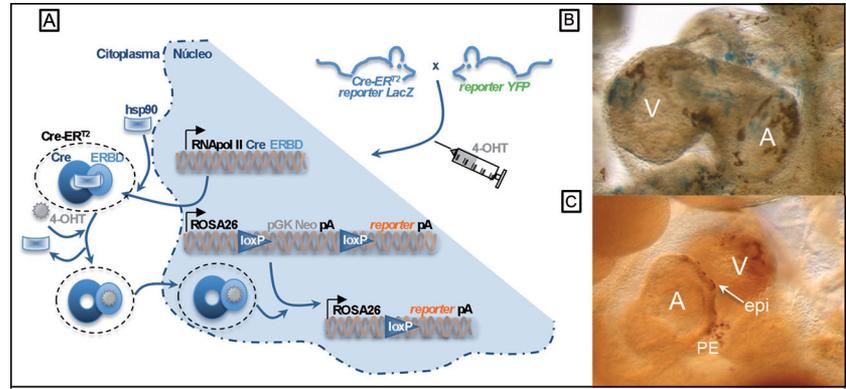
PERSPECTIVAS FUTURAS

Mientras que las técnicas de embriología clásica empleadas en los modelos de anfibio y aves posiblemente han alcanzado su desarrollo máximo y, por lo tanto, no se esperan avances cualitativos en estos modelos, es evidente que las aproximaciones genéticas en modelos como el ratón o el pez cebra se encuentran en una fase intensa de desarrollo y se pueden esperar contribuciones importantes en un futuro próximo. Las dos limitaciones señaladas anteriormente, la poca fiabilidad o ausencia de promotores idóneos y la policlonalidad de las marcas inducidas, impiden actualmente abordar una descripción exhaustiva del potencial de los precursores cardíacos en diferentes tejidos y estadios.

Una opción relevante en esta área es el abordaje de análisis clonal *in vivo* mediante un marcado de linaje al azar a baja frecuencia. Esta aproximación, que resumimos a continuación, tiene el potencial de establecer un mapa exhaustivo de la historia celular del sistema cardiovascular en general y del epicardio en particular, tanto durante la embriogénesis como en la homeostasis fisiológica y patológica. La aproximación se basa en la combinación de una Cre recombinasa inducible por tamoxifeno (CreER^{T2}) dirigida por un promotor ubicuo y dos *reporter* simultáneos independientes (LacZ y EYFP) (fig. 5A). La administración del fármaco (4-OHT) a hembras gestantes cuyos embriones portan ambos transgenes en condiciones limitantes produce la recombinación y activación de uno de los dos *reporter* en células al azar en el embrión. La cantidad de células recombinadas es dependiente de la dosis de 4-OHT que se administra. Una vez se produce la recombinación, la célula y toda su descendencia quedan marcadas permanentemente. Gracias a la expresión ubicua tanto del transgén como del *reporter*, el sistema es válido para estudios de trazado de linaje en cualquier estadio embrionario o durante la vida adulta, y puede aplicarse a cualquier órgano o tejido. El sistema tiene los requisitos necesarios para un análisis clonal informativo, ya que ofrece la posibilidad de inducir dos marcas independientes heredables en células al azar con control temporal y de frecuencia de marcación. Además, la utilización de dos marcas independientes permite determinar el origen común o independiente de varios linajes celulares, al ser marcados por el mismo o un distinto *reporter*. Esta técnica puede utilizarse para analizar la distribución topológica de las células pertenecientes a un mismo clon.

Mediante esta técnica se ha podido definir la contribución de los linajes celulares durante el cre-

Fig. 5. Análisis clonal con doble *reporter*. A: cruce de animales transgénicos portadores de una combinación de Cre recombinasa inducible por tamoxifeno (Cre-ER^{T2}) dirigida por un promotor ubicuo y dos *reporter* independientes (LacZ y YFP). En ausencia de una inducción, la Cre-ER^{T2} se encuentra inactiva dada su unión a la proteína hsp90 (*heat shock protein 90*), que produce su retención en el citoplasma. En esta situación, los genes *LacZ* y *YFP* no se expresan. La activación de la recombinasa Cre-ER^{T2} se induce mediante administración de 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). La unión de 4-OHT al dominio ER^{T2} anula la retención citoplasmática de la Cre-ER^{T2} y produce su translocación nuclear. En el núcleo, la recombinasa se une a sus dianas *loxP*, produce su recombinación y permite la expresión del *reporter* LacZ o YFP. Vistas lateral izquierda (B) y derecha (C) de dos corazones embrionarios de ratón a 9,5 días de gestación. B: inducción a alta frecuencia. Nótese la presencia de clones LacZ⁺ (células azules) y GFP⁺ (células marrones) en diversas regiones del corazón. C: inducción a baja frecuencia. Se pueden apreciar las células derivadas de un único clon GFP⁺ (color marrón) en el epicardio (indicado con una flecha) y el proepicardio (PE). A: aurícula; epi: epicardio; ERDB: *oestrogen receptor binding domain*; PE: proepicardio; V: ventrículo.



cimiento y formación del patrón de los primordios embrionarios en el ratón. Esta aproximación se ha demostrado eficiente para determinar bordes de restricción de linaje, como el que define dos compartimentos en las mitades ventral y dorsal del mesénquima de la extremidad de vertebrados en desarrollo, y para el trazado de linajes celulares⁹⁶.

La técnica del doble clon permitirá estudiar el origen del epicardio, trazar el linaje de las CDEP durante el desarrollo y aclarará las discrepancias y controversias actuales en este campo, permitiendo establecer relaciones de linaje sin las limitaciones impuestas por promotores específicos y con el escrutinio de todas las poblaciones celulares de manera no sesgada (fig. 5B). De igual manera, la aplicación de esta técnica en corazones adultos permitirá estudios similares durante la homeostasis y situaciones patológicas del órgano. Aunque clásicamente el corazón en mamíferos se ha considerado un órgano posmitótico, recientes estudios han demostrado una tasa de renovación de miocardiocitos en el adulto⁹⁷. El estudio de la dinámica de expansión o supervivencia a largo plazo de clones compuestos exclusivamente por células de miocardio diferenciado permitirá medir su tasa real de renovación y explorar los mecanismos implicados en este proceso. Experimentos similares en animales sometidos a ejercicio intenso e inducción experimental de enfermedad cardíaca permitirán identificar la existencia y el origen tisular de poblaciones celulares naturales capaces de regenerar el miocardio tras una lesión. Diversos estudios apuntan a un papel del epicardio en promover la proliferación de miocardiocitos o incluso participar en la regeneración cardíaca como fuente de células precursoras. La técnica del doble clon será de gran utilidad para entender mejor el papel del epicardio durante los procesos de regeneración cardíaca y permitirá analizar posibles coincidencias entre el epicardio y otros tipos celulares

que puedan representar poblaciones renovadoras del corazón. Además, también ayudará a esclarecer el papel del pericardio en el corazón adulto. La apertura del saco pericárdico induce la adhesión del pericardio al miocardio⁹⁸. Además, estudios de ablación epicárdica han descrito puentes de unión entre el miocardio y el pericardio⁴³. Será interesante estudiar si el mesotelio celómico retiene el potencial de contribuir a células cardíacas en la homeostasis y la regeneración del corazón adulto. Todos estos estudios podrían promover prometedoras oportunidades clínicas en el diseño de terapias regenerativas del sistema cardiovascular.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moller PC, Philpott CW. The circulatory system of Amphioxus (*Branchiostoma floridae*). I. Morphology of the major vessels of the pharyngeal area. *J Morphol.* 1973;139:389-406.
2. Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:45-68.
3. DeHaan R. Morphogenesis of the vertebrate heart. En: DeHaan RL, Ursprung H, editores. *Organogenesis*. New York: Holt Reinhardt & Winston; 1965. p. 377-419.
4. Dyer LA, Kirby ML. The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev Biol.* 2009;336:137-44.
5. Mollier S. Die erste Anlage des Herzens bei den Wirbeltieren. Hertwig O, editor. *Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere [The first anlage of the heart in vertebrates]*. Jena: Gustav Fischer; 1906. p. 1026-51.
6. Kurkiewicz T. O histogenezie miesnia sercowego zwierzat kregowych. Cracovi: Bull l'Acad Sci; 1909. p. 148-91.
7. Manasek FJ. Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1969;22:333-48.
8. Ho E, Shimada Y. Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol.* 1978;66:579-85.

9. Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec.* 1981;201:157-68.
10. Lie-Venema HH, Van den Akker NN, Bax NN, Winter EE, Maas SS, Kekarainen TT, et al. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal.* 2007;7:1777-98.
11. Perez-Pomares JM, Gonzalez-Rosa JM, Munoz-Chapuli R. Building the vertebrate heart – an evolutionary approach to cardiac development. *Int J Dev Biol.* 2009;53:1427-43.
12. Smart N, Dube KN, Riley PR. Coronary vessel development and insight towards neovascular therapy. *Int J Exp Pathol.* 2009;90:262-83.
13. Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Wessels A. Epicardial-like cells on the distal arterial end of the cardiac outflow tract do not derive from the proepicardium but are derivatives of the cephalic pericardium. *Dev Dyn.* 2003;227:56-68.
14. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Bergwerff M, Mentink MM, Poelmann RE. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000;87:969-71.
15. Zhou B, Von Gise A, Ma Q, Rivera-Feliciano J, Pu WT. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375:450-3.
16. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 2008;454:109-13.
17. Van Wijk B, Van den Berg G, Abu-Issa R, Barnett P, Van der Velden S, Schmidt M, et al. Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways. *Circ Res.* 2009;105:431-41.
18. Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol.* 2000;219:129-41.
19. Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, McCaffery P, Drager UC, et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 1998;199:55-71.
20. Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev.* 2001;100:83-6.
21. Haenig B, Kispert A. Analysis of TBX18 expression in chick embryos. *Dev Genes Evol.* 2004;214:407-11.
22. Moore AW, Schedl A, McInnes L, Doyle M, Hecksher-Sorensen J, Hastie ND. YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb. *Mech Dev.* 1998;79:169-84.
23. Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res.* 2001;303:173-86.
24. Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, et al. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18455-60.
25. Jenkins SJ, Hutson DR, Kubalak SW. Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha^{-/-} epicardium. *Dev Dyn.* 2005;233:1091-101.
26. Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, De Gier-de Vries C, Soufan AT, et al. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res.* 2006;98:1555-63.
27. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development.* 1999;126:1845-57.
28. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet.* 2010;42:89-93.
29. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74:679-91.
30. Viragh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kalman F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol.* 1993;188:381-93.
31. Nahirney PC, Mikawa T, Fischman DA. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn.* 2003;227:511-23.
32. Manner J. The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol.* 1992;186:379-85.
33. Munoz-Chapuli R, Macias D, Ramos C, De Andres V, Gallego A, Navarro P. Cardiac development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): a model for the study of vertebrate cardiogenesis. *Cardioscience.* 1994;5:245-53.
34. Komiyama M, Ito K, Shimada Y. Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol.* 1987;176:183-9.
35. Rodgers LS, Lalani S, Runyan RB, Camenisch TD. Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. *Dev Dyn.* 2008;237:145-52.
36. Fransens ME, Lemanski LF. Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Anat Rec.* 1990;226:228-36.
37. Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM, et al. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics.* 2004;18:129-40.
38. Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn.* 1997;210:96-105.
39. Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, et al. FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell.* 2000;101:729-39.
40. Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev.* 2001;15:839-44.
41. Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Munoz-Chapuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol.* 2002;46:1005-13.
42. Pennisi DJ, Ballard VL, Mikawa T. Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart. *Dev Dyn.* 2003;228:161-72.
43. Manner J, Schlueter J, Brand T. Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn.* 2005;233:1454-63.
44. Ieda M, Tsuchihashi T, Ivey KN, Ross RS, Hong TT, Shaw RM, et al. Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through beta1 integrin signaling. *Dev Cell.* 2009;16:233-44.
45. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science.* 2002;298:2188-90.
46. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, Burns CG, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell.* 2006;127:607-19.
47. Wills AA, Holdway JE, Major RJ, Poss KD. Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development.* 2008;135:183-92.

48. Limana F, Bertolami C, Mangoni A, Di Carlo A, Avitabile D, Mocini D, et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: Role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:609-18.
49. Wagner KD, Wagner N, Bondke A, Nafz B, Flemming B, Theres H, et al. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J.* 2002;16:1117-9.
50. Limana F, Zacheo A, Mocini D, Mangoni A, Borsellino G, Diamantini A, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007;101:1255-65.
51. Van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, Van der Velde-van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NA, et al. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells.* 2007;25:271-8.
52. Winter EM, Grauss RW, Hogers B, Van Tuyn J, Van der Geest R, Lie-Venema H, et al. Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation.* 2007;116:917-27.
53. Bock-Marquette I, Shrivastava S, Pipes GC, Thatcher JE, Blystone A, Shelton JM, et al. Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:728-38.
54. Van der Laan AM, Piek JJ, Van Royen N. Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:515-23.
55. Sanes JR. Analysing cell lineage with a recombinant retrovirus. *Trends Neurosci.* 1989;12:21-8.
56. Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 2000;26:99-109.
57. Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell.* 2004;6:7-28.
58. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:6232-6.
59. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 1981;150:467-86.
60. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:6991-5.
61. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1980-9.
62. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods.* 2001;24:71-80.
63. Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10887-90.
64. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 1999;21:1.
65. Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5037-42.
66. Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood.* 2001;97:324-6.
67. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 1991;5:1513-23.
68. Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, et al. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol.* 2001;1:4.
69. Moses KA, DeMayo F, Braun RM, Reedy JL, Schwartz RJ. Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice. *Genesis.* 2001;31:176-80.
70. Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol.* 2008;323:98-104.
71. Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003;5:877-89.
72. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, et al. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 2001;89:20-5.
73. De Lange FJ, Moorman AF, Christoffels VM. Atrial cardiomyocyte-specific expression of Cre recombinase driven by an Nppa gene fragment. *Genesis.* 2003;37:1-4.
74. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development.* 2000;127:1607-16.
75. Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol.* 2001;230:230-42.
76. De Lange FJ, Moorman AF, Anderson RH, Manner J, Soufan AT, De Gier-de Vries C, et al. Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Circ Res.* 2004;95:645-54.
77. Zhou B, Von Gise A, Ma Q, Hu YW, Pu WT. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosus of the mammalian heart. *Dev Biol.* 2010;338:251-61.
78. Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 2008;454:104-8.
79. Meilhac SM, Kelly RG, Rocancourt D, Eloy-Trinquet S, Nicolas JF, Buckingham ME. A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development.* 2003;130:3877-89.
80. Meilhac SM, Esner M, Kelly RG, Nicolas JF, Buckingham ME. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell.* 2004;6:685-98.
81. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005;6:826-35.
82. Tidball JG. Distribution of collagens and fibronectin in the subepicardium during avian cardiac development. *Anat Embryol.* 1992;185:155-62.
83. Hiruma T, Hirakow R. Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat.* 1989;184:129-38.
84. Hirakow R. Epicardial formation in staged human embryos. *Kaibogaku Zasshi.* 1992;67:616-22.
85. Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9504-8.
86. Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol.* 1996;174:221-32.
87. Manner J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec.* 1999;255:212-26.
88. Guadix JA, Carmona R, Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM. In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. *Dev Dyn.* 2006;235:1014-26.
89. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Bokenkamp R, Hogers B. Development of the cardiac coronary

- vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res.* 1993;73:559-68.
90. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res.* 1998;82:1043-52.
 91. Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature.* 2009;458:E8-9.
 92. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation.* 2006;113:1451-63.
 93. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkenin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* 2007;13:970-4.
 94. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324:98-102.
 95. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature.* 2008;451:937-42.
 96. Arques CG, Doohan R, Sharpe J, Torres M. Cell tracing reveals a dorsoventral lineage restriction plane in the mouse limb bud mesenchyme. *Development.* 2007;134:3713-22.
 97. Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest.* 2010;120:20-8.
 98. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology.* 2002;7:171-91.