

El epicardio y las células derivadas del epicardio: múltiples funciones en el desarrollo cardíaco

Ramón Muñoz-Chápuli, David Macías, Mauricio González-Iriarte, Rita Carmona, Gerardo Atencia y José María Pérez-Pomares

Departamento de Biología Animal. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. España.

Durante el desarrollo cardíaco, el epicardio deriva de un primordio externo al corazón, denominado proepicardio, que está formado por un acúmulo de células mesoteliales situado en la superficie ventral y cefálica del límite hígado-seno venoso (aves) o en la cara pericárdica del septo transversal (mamíferos). El proepicardio entra en contacto con la superficie miocárdica y da lugar a un mesotelio que crece y recubre progresivamente al miocardio. El epicardio genera, por un proceso localizado de transición epitelio-mesénquima, una población de células mesenquimáticas, las células derivadas de epicardio (CDEP). Las CDEP contribuyen al desarrollo del tejido conectivo del corazón y también dan lugar a los fibroblastos y las células musculares lisas de los vasos coronarios. Existen evidencias que sugieren la diferenciación de las CDEP en células endoteliales del plexo subepicárdico primitivo. De confirmarse esto, las CDEP mostrarían propiedades similares a los precursores vasculares bipotenciales derivados de células madre recientemente descritos, cuya diferenciación en endotelio y músculo liso se regula por exposición a VEGF y PDGF-BB, respectivamente. Además de las funciones señaladas en la formación de los tejidos vascular y conectivo del corazón, las CDEP podrían desempeñar un papel modulador esencial para la formación de la capa compacta ventricular del miocardio, un papel que podría estar regulado por el factor de transcripción WT1 y la producción de ácido retinoico.

Palabras clave: *Epicardio. Transición epitelio-mesénquima. Vasculogénesis. Diferenciación.*

The Epicardium and Epicardial-Derived Cells: Multiple Functions in Cardiac Development

The epicardium develops from an extracardiac primordium, the proepicardium, which is constituted by a cluster of mesothelial cells located on the cephalic and ventral surface of the liver-sinus venosus limit (avian embryos) or on the pericardial side of the septum transversum (mammalian embryos). The proepicardium contacts the myocardial surface and gives rise to a mesothelium, which grows and progressively lines the myocardium. The epicardium generates, through a process of epithelial-mesenchymal transition, a population of epicardial-derived cells (EPDC). EPDC contribute to the development of cardiac connective tissue, fibroblasts, and the smooth muscle of cardiac vessels. Recent data suggest that EPDC can also differentiate into endothelial cells of the primary subepicardial vascular plexus. If this is confirmed, EPDC would show the same developmental properties that characterize the stem-cell-derived bipotential vascular progenitors recently described, whose differentiation into endothelium and smooth muscle is regulated by exposure to VEGF and PDGF-BB, respectively. Aside from their function in the development of cardiac connective and vascular tissue, EPDC also play an essential modulating role in the differentiation of the compact ventricular layer of the myocardium, a role which might be regulated by the transcription factor WT1 and the production of retinoic acid.

Key words: *Epicardium. Epithelial-mesenchymal transition. Vasculogenesis. Differentiation.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

Correspondencia: Dr. R. Muñoz-Chápuli.
Departamento de Biología Animal.
Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.
29071 Málaga.
Correo electrónico: chapuli@uma.es

INTRODUCCIÓN

El epicardio es la capa más externa del corazón de los vertebrados. En el organismo adulto está constituido por un mesotelio cúbico que recubre un espacio ocupado por tejido conectivo y vascular. En el embrión temprano, el epicardio adopta la forma de un epitelio escamoso que, o bien se une directamente a la superficie del miocardio, o bien recubre un espacio subepicárdico más o menos poblado de células mesen-

ABREVIATURAS

b-HLH: *basic Helix-Loop-Helix*.
 BMP: *bone morphogenetic proteins*.
 BVES: *blood vessel/epicardial substance*.
 CDEP: células derivadas de epicardio.
 cdks: *cyclin-dependent kinases*.
 FGFs: *fibroblast growth factors*.
 FOG-2: *friend of GATA*.
 NCAM: *neural cell adhesion molecule*.
 PDGF-BB: *platelet-derived growth factor-BB*.
 Rb: retinoblastoma.
 RALDH2: retinaldehído-deshidrogenasa-2.
 SRF: *serum response factor*.
 TGF- β : *transforming growth factors- β* .
 VCAM: *vascular cell adhesion molecule*.
 VEGF: *vascular endothelial growth factor*.
 VEGFR-2: *vascular endothelial growth factor receptor-2*.
 WT: tumor de Wilms.

quimáticas. En este artículo revisaremos los procesos relacionados con el desarrollo del epicardio, la aparición del mesénquima subepicárdico y su diferenciación. Trataremos también las evidencias acerca del papel esencial que el mesénquima subepicárdico desempeña en la diferenciación miocárdica.

El epicardio es, sin duda, el componente cardíaco que tradicionalmente ha atraído menos la atención de los embriólogos y biólogos del desarrollo. Durante largo tiempo el epicardio fue considerado como un simple derivado de la capa más externa del tubo cardíaco. El término «epimiocardio» o «mioepicardio», referido a este primordio común a ambos tejidos¹, ha seguido apareciendo en los libros de texto hasta hace relativamente poco tiempo². Sin embargo, en los últimos años se ha sucedido una serie de estudios que han demostrado, en primer lugar, que el epicardio presenta un desarrollo independiente respecto a miocardio y endocardio, una propuesta avanzada hace casi un siglo³; en segundo lugar, se ha puesto de manifiesto que la mayor parte del tejido conectivo y vascular cardíaco, incluyendo los vasos coronarios, son derivados epicárdicos. La más reciente aportación al tema ha venido de estudios que apuntan a que las células derivadas del epicardio proporcionan señales esenciales para la formación de la capa compacta del miocardio ventricular. El epicardio, por tanto, ha pasado de desempeñar un papel aparentemente pasivo a convertirse en protagonista de episodios clave para la morfogénesis cardíaca. Nuestro objetivo a la hora de escribir este artículo es el de recopilar los conocimientos actuales sobre estas nuevas funciones del epicardio y las células derivadas del mismo.

El epicardio deriva de un primordio mesotelial extracardiaco, llamado proepicardio

El epicardio es la capa de aparición más tardía de las que componen el corazón, y la única que tiene un origen externo al tubo cardíaco primitivo. Aspectos generales acerca de su desarrollo en las vertientes ontogenética y filogenética han sido tratados en una reciente revisión⁴. El epicardio se forma a partir de un acúmulo de tejido mesotelial que aparece a nivel ventral en el límite entre el hígado y el seno venoso. Este acúmulo, que recibe el nombre de proepicardio⁵, puede ser sencillo y situado a la derecha del plano sagital, como en el caso del embrión de pollo, o bilateral, como en el embrión de ratón.

La estructura del proepicardio es variable según las especies en las que se ha descrito. Existen descripciones del proepicardio en representantes de casi todos los grandes grupos de vertebrados. El representante más primitivo, desde el punto de vista filogenético, es un pequeño tiburón, la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*)⁶⁻⁸. En los embriones de estos peces se desarrollan dos grandes cúmulos de células mesoteliales en la porción ventral y anterior del epitelio que recubre el hígado, justo en su unión con el seno venoso. Más tarde, cuando el septo transversal se desarrolla en este límite, los cúmulos mesoteliales proepicárdicos se desplazan hacia la superficie pericárdica del septo. El proepicardio en la pintarroja está formado por células mesoteliales redondeadas, con una escasa matriz extracelular entre ellas. En los peces teleosteos el proepicardio no se ha descrito, aunque se ha señalado que el epicardio de la platija (*Pleuronectes platessa*) deriva de una fuente extracardiaca, sin precisar sus características⁹. La presencia de proepicardio en los anfibios se deduce de los estudios sobre el desarrollo cardíaco del ajolote (*Ambystoma mexicanum*)¹⁰. Estos autores afirman que el epicardio se desarrolla a partir de células del septo transversal. La información a este respecto también es escasa en los reptiles, aunque se ha señalado que el desarrollo epicárdico en la tortuga es similar al descrito en los embriones de pollo¹¹.

La organización del proepicardio ha sido extensamente estudiada en los embriones de pollo y codorniz^{5,12-15}. Su desarrollo comienza alrededor de los estadios HH13-14, con una rápida proliferación del mesotelio que recubre a nivel ventral los cuernos del seno venoso en su límite con el primordio hepático (figs. 1 y 2). A diferencia de lo que ocurre en otros modelos animales, la proliferación del lado izquierdo detiene su desarrollo, mientras que el lado derecho crece hasta alcanzar en el estadio HH17 un tamaño considerable. El proepicardio 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.

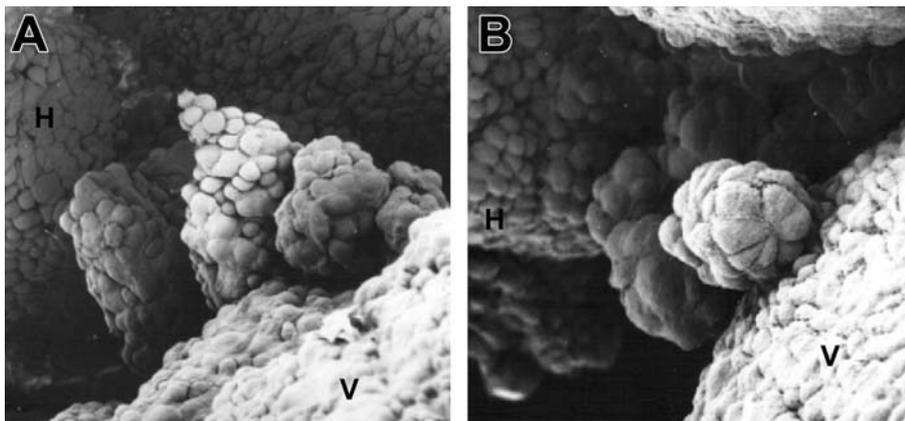


Fig. 1. El proepicardio del embrión de codorniz (estadio HH21) a microscopia electrónica de barrido. A y B. Dos diferentes aspectos de las protuberancias proepicárdicas en fase de adhesión al ventrículo (V). H: superficie del hígado.

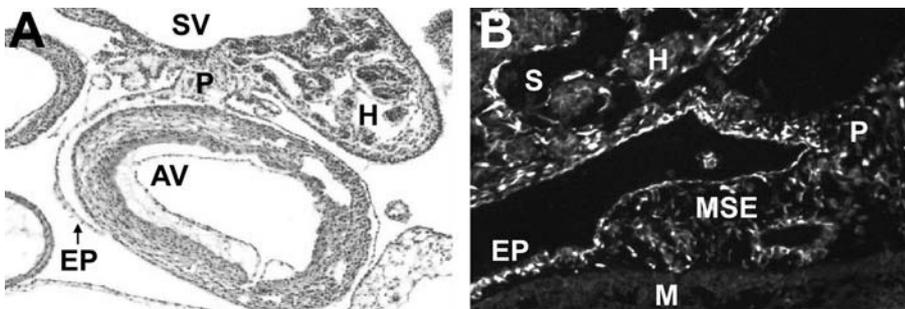


Fig. 2. Secciones histológicas del proepicardio de codorniz en sección transversal. A. Estadio HH21. El proepicardio (P) se localiza en el límite seno venoso (SV)/Hígado (H). Obsérvese cómo el epicardio (EP) se va extendiendo sobre el miocardio del canal atrioventricular (AV). B. Estadio HH22, inmunolocalización del citoqueratina. Se observa la inmunorreactividad del mesotelio proepicárdico y epicárdico, así como la de la mayor parte del mesénquima subepicárdico (MSE). Obsérvese cómo algunas células de los sinusoides hepáticos (S) son también inmunorreactivas. M: miocardio.

El proepicardio es bilateral en los mamíferos, como ya se ha dicho, y se desarrolla en la superficie pericárdica del septo transverso, en las proximidades del seno venoso¹⁶⁻²⁰. Las protuberancias mesoteliales consisten, al principio, en cúmulos de células redondeadas para luego adquirir un aspecto más parecido al descrito para el embrión de pollo, digitaciones cubiertas por mesotelio y conteniendo células mesenquimáticas y matriz extracelular. En embriones de ratón, el proepicardio está presente entre 9,5 y 11 días *post coitum*.

Los factores que controlan el desarrollo del proepicardio son desconocidos. Se ha especulado con un efecto mecánico, de «aspiración», de las contracciones cardíacas sobre el mesotelio del septo transverso¹⁸, 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 desconocidos. De hecho, el proepicardio muestra una fuerte actividad mitótica^{5,18}.

El proepicardio es transferido al corazón, y da lugar al mesotelio epicárdico

Las células proepicárdicas, que se originan y proliferan fuera de los límites del corazón, deben migrar a

la superficie cardíaca para constituir el epicardio primitivo. Se han descrito dos mecanismos principales de transferencia del proepicardio, que en ocasiones coexisten en la misma especie.

En ciertos casos se ha descrito cómo las células proepicárdicas se desprenden y flotan libremente en la cavidad pericárdica. Estas células se adhieren en áreas específicas del miocardio, sobre todo en los surcos atrioventricular y conoventricular. A partir del momento de su adhesión, las células se aplanan y se unen entre sí para formar un epitelio que progresivamente va creciendo sobre la superficie cardíaca. Este mecanismo de transferencia proepicárdica es el único presente en la pintarroja⁸, y se ha descrito en anfibios y mamíferos^{10,17,18}.

El otro mecanismo de transferencia del proepicardio implica la adhesión directa de las vellosidades proepicárdicas a la superficie cardíaca. Dada la posición del proepicardio respecto del corazón, esta adhesión suele ocurrir en la parte posterior (dorsal) de los ventrículos y del surco atrioventricular (fig. 2). La adhesión directa del proepicardio parece ser el mecanismo fundamental de transferencia en el caso de los embriones de pollo, y coexiste en anfibios y mamíferos con la adhesión de cúmulos libres de células proepicárdicas antes descrita.

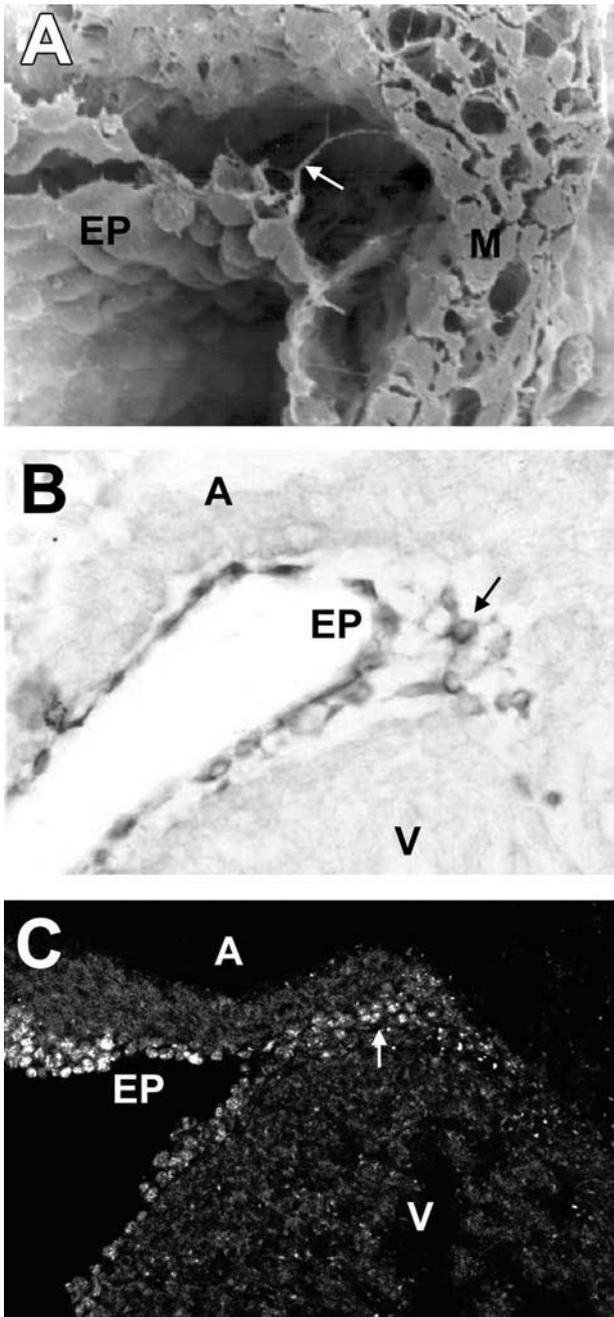


Fig. 3. Evidencias de transición epicardio-mesénquima en embriones de mamífero. A. Embrión de ratón, 11,5 días *post coitum*, microscopía electrónica de barrido. Células del epicardio (EP) del surco atrioventricular emiten largas prolongaciones basales hacia la matriz extracelular subyacente. M: miocardio. B. Embrión de hámster, 11 días *post-coitum*, inmunolocalización de citoqueratina. Las células mesenquimáticas que se generan en el surco atrioventricular son positivas (flecha), demostrando un origen mesotelial. A: atrio; V: ventrículo. C. Embrión de ratón, 11,5 días *post-coitum*, inmunolocalización del factor WT1. Obsérvese la reactividad del epicardio y las células del surco atrioventricular.

Es posible que la amplia comunicación de la cavidad pericárdica con el celoma general del cuerpo en el embrión de ave (por el retraso en el desarrollo del septo transversal) esté relacionada con esta particularidad¹⁰.

En todos los casos, el epicardio progresa alrededor del surco atrioventricular, para extenderse después al ventrículo izquierdo, la superficie ventral del atrio, el ventrículo derecho y, finalmente, el techo del atrio y el tracto de salida²¹. Es interesante señalar que el crecimiento del epicardio se detiene en el límite entre las regiones miocárdica y mesenquimática del tracto de salida, y esta última queda cubierta por el crecimiento del mesotelio pericárdico²².

La adhesión de células proepicárdicas a la superficie del miocardio indica la existencia de algún mecanismo específico de reconocimiento. No se conocen los detalles de dicho mecanismo porque, aunque se han propuesto moléculas candidatas, no existen evidencias decisivas a su favor. Por ejemplo, NCAM (*neural cell adhesion molecule*) se expresa tanto en epicardio como en miocardio en desarrollo^{23,24}. Sin embargo, los ratones mutantes deficientes para NCAM no presentan defectos en el epicardio²⁵. También se ha descrito que el miocardio desnudo presenta áreas discretas cubiertas por fibronectina²⁰, y que la adhesión de células libres implica un fuerte aumento de la expresión de fibronectina en la interfase epicardio-miocardio²⁶. Sin embargo, de nuevo se constata que los ratones deficientes para fibronectina carecen de anomalías en el desarrollo epicárdico²⁷.

A pesar de la ausencia de datos significativos acerca del mecanismo de adhesión de células proepicárdicas al miocardio, sí existen evidencias de que dos moléculas son esenciales para mantener la integridad epicárdica en los momentos iniciales de su desarrollo. Ratones deficientes en VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*)²⁸ o en la subunidad α_4 de las integrinas²⁹ muestran un defecto similar en el desarrollo del epicardio. Esta coincidencia es consistente con el papel de las integrinas α_4 ($\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$) como receptoras para VCAM. Los ratones deficientes para estas dos moléculas muestran una fase normal de adhesión de células proepicárdicas entre los días 9,5 y 11 de desarrollo, pero inmediatamente después el epicardio se desprende y desaparece. Estas mutaciones son letales debido probablemente a una hemorragia pericárdica masiva cuyas causas se discuten más adelante. VCAM-1 se expresa en el miocardio embrionario, mientras que la integrina α_4 se expresa en el epicardio y proepicardio³⁰. Por tanto, su interacción parece esencial para el mantenimiento de la integridad epicárdica.

El epicardio genera una población de células mesenquimáticas por un proceso de transición epitelio-mesénquima

A medida que el epicardio recubre el miocardio embrionario, se va desarrollando un espacio entre estos dos tejidos. Este espacio, al que llamaremos subepicardio, aparece primero alrededor de los surcos atrioventricular y conoventricular, para luego extenderse

por la superficie de los ventrículos y, en el caso de los mamíferos, por el surco interventricular. El subepicardio está muy poco desarrollado en el atrio, sobre todo en su techo, donde el epicardio está directamente adherido al miocardio. La formación del espacio subepicárdico puede estar determinada por un cambio en la expresión de moléculas de adhesión y/o un aumento en la producción de matriz extracelular en la interfase epicardio/miocardio. Dicha matriz extracelular es un medio extraordinariamente complejo, rico en fibronectina y colágenos I, IV, V y VI^{20,31-34}, proteoglicanos y laminina²⁰, GP68³⁵, vitronectina, fibrilina-2 y elastina³³, tenascina-X³⁶ y flectina³⁷.

El espacio subepicárdico se puebla rápidamente por células mesenquimáticas de aspecto fibroblastoide. Durante mucho tiempo se pensó que estas células alcanzaban el subepicardio por migración desde la región del septo transversal¹⁵. Otra posibilidad, que ha sido descrita en embriones de mamífero, es la transferencia de células en el interior de vesículas proepicárdicas liberadas a la cavidad pericárdica y adheridas a la superficie del corazón³⁸. En aves resulta evidente que la transferencia del proepicardio por adhesión directa implica el arrastre de células mesenquimáticas que se incorporan al subepicardio. Sin embargo, se acepta actualmente que buena parte del mesénquima subepicárdico está constituido por células derivadas del epicardio (CDEP)³⁹.

Las CDEP se generan por un fenómeno de transición epicardio-mesénquima, un caso particular de una familia de procesos celulares de gran importancia en el desarrollo, las transiciones epitelio-mesénquima⁴⁰. Dichos procesos consisten en la adquisición por parte de células epiteliales de características mesenquimáticas que les permiten desprenderse de las células vecinas, reorganizar su citoesqueleto, degradar la lámina basal y la matriz extracelular subyacente, y adquirir la capacidad de migrar a través de esta última. Ejemplos de transiciones epitelio-mesénquima son la formación del mesodermo a través de la línea primitiva⁴¹, la diferenciación de la cresta neural⁴², la disgregación del dermomiótomo o la formación del mesénquima valvuloseptal en los cojines endocárdicos⁴³.

En el caso que nos ocupa, la transición epicardio-mesénquima comienza en los surcos atrioventricular y conoventricular, y posteriormente se extiende a otras áreas del epicardio ventricular. No obstante, la mayor parte de CDEP, al menos en embriones de mamíferos, parece generarse en el surco atrioventricular (fig. 3A).

¿Qué proporción del mesénquima subepicárdico está constituida por CDEP? Antes de contestar a esta pregunta es preciso señalar que una parte mayoritaria del mesénquima proepicárdico se origina también por transición epitelio-mesénquima a partir del mesotelio que recubre las vellosidades proepicárdicas⁴⁴. Esto es sugerido por datos morfológicos, pero también por la presencia de marcadores de transición epitelio-mesénqui-

ma en el mesotelio y mesénquima proepicárdicos, como veremos a continuación. Esto significa que células derivadas del mesotelio proepicárdico se incorporan a la población de CDEP generadas *in situ*, con lo que la mayor parte del mesénquima subepicárdico resulta ser un derivado del mesotelio celómico, sea proepicárdico o epicárdico.

La transición epitelio-mesénquima implica una reorganización citoesquelética, como hemos dicho antes. Las células del epicardio (y las del mesotelio proepicárdico) poseen filamentos intermedios constituidos por citoqueratinas²¹. Durante la transformación en mesénquima, estos filamentos son sustituidos por filamentos de vimentina (propios de células mesenquimáticas)⁴⁵. Dicha sustitución no es, por supuesto, instantánea. La expresión de vimentina comienza incluso en fases premigratorias, cuando la célula en transición mantiene todavía su fenotipo epitelial⁴⁰. Por otra parte, la citoqueratina se va degradando progresivamente a lo largo del proceso, pero persiste durante un tiempo en mesénquima derivado de epitelio. Esto implica que la localización de citoqueratina en células mesenquimáticas es marcador de un reciente origen epitelial⁴⁵. De hecho, la gran mayoría de las células mesenquimáticas proepicárdicas y subepicárdicas son inmunorreactivas para anticuerpos anticitoqueratina³⁹ (figs. 2B y 3B). Por otro lado, numerosas células mesoteliales proepicárdicas y epicárdicas son vimentina-positivas, posiblemente indicando que se encuentran en estados premigratorios³⁹.

Así mismo, el factor de transcripción asociado al tumor de Wilms (WT1) se expresa, entre otras localizaciones, en el mesotelio celómico, en el epicardio y en las CDEP^{46,47} (figs. 3C y 5B). La masiva presencia de la proteína WT1 en el mesénquima proepicárdico y subepicárdico del pollo ha sido descrita como evidencia de su origen mesotelial⁴⁸. Por otra parte, ratones portadores de un gen *reporter* WT1, con expresión de β-galactosidasa controlada por el promotor WT1, muestran expresión de este gen en prácticamente la totalidad de células subepicárdicas del ratón⁴⁶.

El mecanismo que regula la transformación epicardio-mesénquima es poco conocido, si bien se han producido últimamente importantes avances en este sentido. La transformación se inicia, y es más intensa, a nivel de los cojines atrioventriculares y del tracto de salida. Dado que en estos cojines se está produciendo simultáneamente otra transición epitelio-mesénquima, la que genera el mesénquima valvuloseptal⁴³, desde un primer momento se sospechó que una misma señal, procedente del miocardio, podría iniciar ambos procesos. Esta señal se asoció a la presencia de «adherones», partículas complejas compuestas por varias proteínas y que han sido localizadas en la matriz extracelular de los cojines y el subepicardio⁴⁹. En la actualidad se piensa que los factores de crecimiento de las familias BMP (*bone morphogenetic proteins*) y

TGF- β (*transforming growth factors- β*) son esenciales para la transformación endotelio-mesénquima^{50,51}. En cambio, la situación es mucho menos clara en el caso del epicardio. Se ha señalado el probable papel desempeñado por FGFs (*fibroblast growth factors*), en concreto FGF-1, 2 y 7⁵². Estos factores estimularon la transformación epicardio-mesénquima *in vitro*, mientras que TGF- β 1, 2 y 3 la inhibieron. Otros autores insisten, sin embargo, en que el estímulo por los FGFs sólo es posible cuando las células epicárdicas han sido previamente activadas por señales de tipo BMP (Markwald, comunicación personal). Es importante señalar que BMP-2 y BMP-4 se expresan específicamente en el miocardio del canal atrioventricular y tracto de salida⁵³.

En cualquier caso, a continuación de la señal o señales que inducen el inicio de la transición epitelio-mesénquima, parece clara la implicación de factores de transcripción de tipo *zinc-finger*, pertenecientes a la familia *Snail*. Al parecer, las funciones de *Snail* en mamíferos son desempeñadas en el embrión de ave por el producto de otro gen, *Slug*⁵⁴. Estos factores son esenciales en la formación del mesodermo, y participan en diferentes procesos embrionarios de transformación epitelio-mesénquima, incluyendo la formación de la cresta neural⁵⁵. La expresión de *Slug* ha mostrado ser esencial para la transformación del endocardio en los cojines endocárdicos^{51,56}, mientras que la presencia de *Slug* ha sido localizada en el epicardio y las CDEP del embrión de pollo⁵⁷.

La función de los factores *Slug/Snail* parece ser represora de la expresión de moléculas de adhesión celular. *Slug*, por ejemplo, reprime la expresión de desmoplaquinas y desmogleínas⁵⁸. Por otra parte, se ha demostrado que *Snail* reprime la expresión de E-cadherina, en lo que puede ser un acontecimiento clave para la transformación epitelio-mesénquima^{59,60}.

Otros factores de transcripción de tipo *zinc-finger*, que probablemente están implicados en la transición epicardio-mesénquima, son Ets-1 y el ya mencionado WT1. Ets-1 activa la expresión de enzimas proteolíticas, y parece ser clave en la degradación de la matriz extracelular que se asocia al fenotipo migrador⁶¹. La presencia de Ets-1 se ha correlacionado con las áreas de transición epicardio-mesénquima en el embrión de pollo⁶². WT1 parece tener alguna función, si no en la transición epicardio-mesénquima propiamente dicha, sí en la diferenciación de las CDEP. WT1 podría reprimir la diferenciación de dichas células, manteniéndolas en un estado mesenquimático y proliferativo⁴⁸. Esto explicaría el menor número de CDEP observadas en el corazón de embriones de ratón deficientes en WT1, como veremos más adelante.

FOG-2 (*friend of GATA*) es un factor de transcripción expresado en el miocardio pero que también parece tener una función esencial para la transición epicardio-mesénquima. FOG-2 es un cofactor de los factores

transcripcionales de la familia GATA, tres de cuyos miembros (GATA4, 5 y 6) se expresan en el corazón embrionario⁶³. La deficiencia en FOG-2 produce un fenotipo cardíaco caracterizado por un bajo número de CDEP, ausencia de vasos coronarios e hipoplasia del miocardio ventricular⁶⁴. FOG-2 podría estar implicado en la generación de la señal miocárdica para el inicio de la transformación epicardio-mesénquima.

A continuación se citan otros factores de transcripción expresados en el epicardio y que podrían tener alguna participación en la generación de las CDEP. La epicardina⁶⁵ (también descrita como capsulina^{66,67} y POD-1⁶⁸) pertenece a la familia bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). Se expresa en el epicardio embrionario y en el mesotelio y mesénquima submesotelial de pulmones, tracto digestivo, riñones y bazo. Su ausencia produce hipoplasia pulmonar y renal⁶⁹, así como agenesia del bazo⁷⁰, pero no se han descrito alteraciones cardíacas en este modelo. Por otro lado, dos genes de expresión epicárdica, *Tbx5*⁷¹ y *Tbx18*⁷², pertenecen a la familia de los factores T-Box (relacionados con *Brachyury*). Mutaciones en *Tbx5* están asociadas al síndrome de Holt-Oram⁷³. Por último, se ha detectado también la expresión epicárdica embrionaria del supresor tumoral Rb (retinoblastoma), una proteína de control del ciclo celular que actúa como sustrato de cdk (*cyclin-dependent kinases*). El patrón de expresión de Rb sugiere una implicación en la transformación endocardio-mesénquima⁷⁴, por lo que no se puede descartar una función paralela en la transformación del epicardio.

Las células derivadas del epicardio se diferencian en tejido conectivo y vascular

El aspecto fibroblastoide de las CDEP fue la causa de que se las considerara en un primer momento como componentes de tejido conectivo del subepicardio. Sin embargo, distintas evidencias apuntan a un papel más activo en cuanto al desarrollo del sistema vascular coronario.

Durante mucho tiempo los vasos coronarios se consideraron como derivados de brotes de la raíz aórtica que crecían para invadir todo el corazón. A finales de los ochenta se formuló la hipótesis (denominada del *in-growth*) de que dichos vasos se organizaban en el subepicardio en forma de un plexo vascular que en un momento determinado conectaba con los senos de Val-salva derecho e izquierdo⁷⁵. El súbito aumento de presión intravascular que origina esta conexión induce la arterialización de segmentos específicos del plexo que constituyen las arterias coronarias.

El plexo vascular subepicárdico primario se organiza, de acuerdo con esta propuesta, por conexión de precursores vasculares, es decir, por vasculogénesis⁷⁶. Una vez establecido, su crecimiento se produce por angiogénesis o proliferación de vasos ya establecidos.

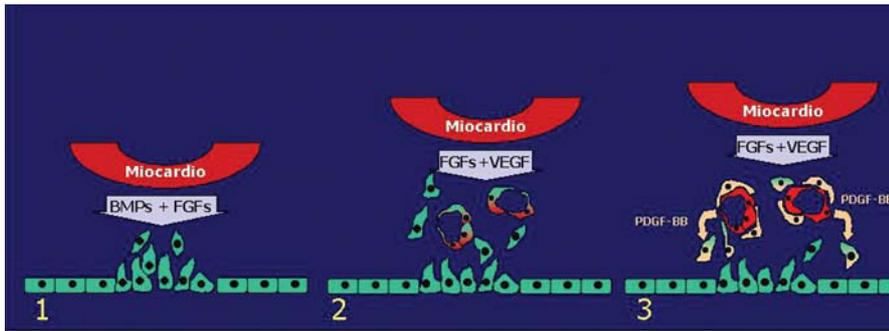


Fig. 4. Modelo hipotético del origen de los vasos coronarios a partir de células derivadas del epicardio (CDEP). 1. En una primera fase, factores de crecimiento de las familias BMP y FGF inducen la transición epicardio-mesénquima. 2. La presencia de VEGF secretado por miocardio y epicardio induce la diferenciación endotelial de las CEDP. 3. En una segunda fase, la producción de PDGF-BB por parte del endotelio así formado induce el reclutamiento de nuevas CDEP y su diferenciación a pericitos y músculo liso.

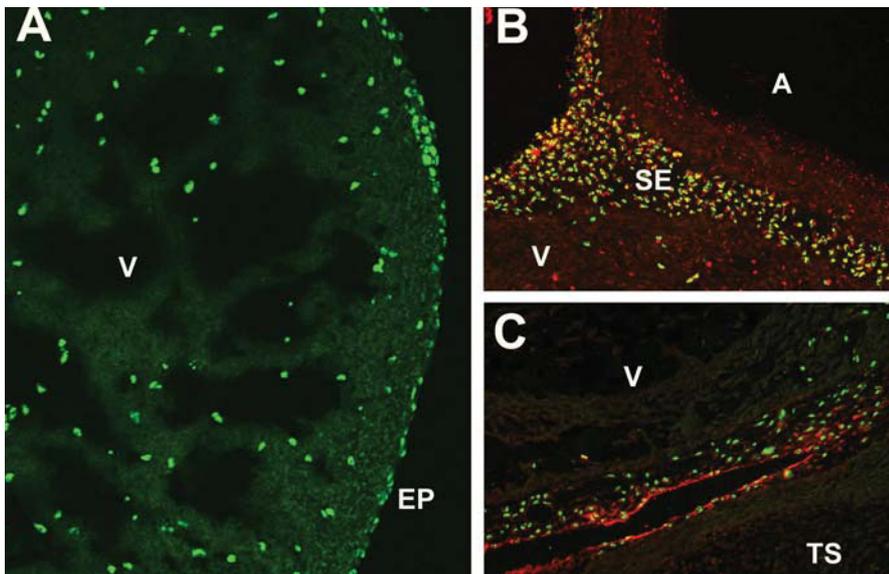


Fig. 5. Función señalizadora de las células derivadas de epicardio (CDEP), puesta de manifiesto en quimeras pollo/codorniz (epicardio de codorniz sobre miocardio de pollo). Las células de la codorniz se reconocen en todos los casos por la inmunolocalización del antígeno QCPN (en verde). A. Estadio HH29. El ventrículo (V) ha sido completamente invadido por CDEP. EP: epicardio. B. Estadio HH32, surco atrioventricular. El factor de transcripción WT1 se ha inmunolocalizado en rojo. Obsérvese la colocalización de QCPN y WT1 en la mayor parte del mesénquima del subepicardio (SE). La colocalización resulta en un color amarillo. También se observa la presencia de células WT1-positivas en el ventrículo (V), pero no en el atrio (A). C. Estadio HH29, surco conoventricular. La enzima retinaldehído-deshidrogenasa se ha inmunolocalizado en rojo. Obsérvese la reactividad del epicardio y de las CDEP, así como la presencia de estas últimas en el ventrículo (V), pero no en el tracto de salida (TS).

El origen vasculogenético de los vasos coronarios planteaba la cuestión del origen y la diferenciación de sus precursores celulares, que debían encontrarse en el mesénquima subepicárdico.

Diversas evidencias experimentales han demostrado que los precursores de la musculatura lisa de la media de los vasos coronarios, así como los fibroblastos de la adventicia, se diferencian a partir de CDEP. Una técnica fundamental para llegar a esta conclusión han sido las «quimeras epicárdicas», desarrolladas mediante injerto del proepicardio de codorniz en la cavidad pericárdica del embrión de pollo, en el estadio de desarrollo HH17²². De esta forma es posible generar embriones de pollo cuyos corazones están cubiertos por epicardio de codorniz, y es posible seguir el destino de las CDEP derivadas de dicho epicardio mediante anticuerpos que reconocen las células de codorniz, pero no las de pollo (fig. 5).

Utilizando quimeras epicárdicas se ha demostrado cómo las CDEP procedentes del donante contribuían a la formación de la musculatura coronaria, adventicia vascular y al esqueleto fibroso del corazón^{77,78}. En este

sistema, el endotelio coronario también derivaba de la codorniz, aunque la explicación dada por los autores de estos trabajos no admitía un origen del endotelio coronario a partir de CDEP, como veremos más adelante. Las quimeras epicárdicas utilizadas en estos experimentos pusieron de manifiesto que las CDEP invaden el miocardio e incluso colonizan los cojines atrioventriculares, alcanzando niveles subendocárdicos. Los cojines del tracto de salida, en cambio, no mostraron presencia de CDEP.

Otros experimentos confirman los resultados anteriores. El cultivo de células proepicárdicas sobre geles de colágeno genera una monocapa de células epiteliales idénticas a las del epicardio. Dichas células, aisladas e inyectadas en la cavidad pericárdica de embriones de pollo, dieron lugar a epicardio, musculatura lisa coronaria y fibroblastos⁷⁹. En otra serie de experimentos se puso de manifiesto que las células epicárdicas generadas sobre geles de colágeno por cultivo de explantes proepicárdicos expresaban *in vitro* marcadores de músculo liso, tales como caldesmon e isoformas específicas de actina y miosina⁸⁰. Este pro-

ceso es estimulado por la presencia de PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*) y dependiente de la expresión de SRF (*serum response factor*), un factor de transcripción de la superfamilia *MADS box*, expresado por el epicardio en cultivo⁸¹. De hecho construcciones genéticas dominante-negativas para SRF inhibieron la diferenciación de músculo liso a partir de CDEP.

La proteína BVES (*blood vessel/epicardial substance*), que probablemente representa a una nueva familia de moléculas de adhesión, ha sido localizada a lo largo de todo el linaje celular proepicardio-epicardio-CDEP-músculo liso vascular, constituyendo una evidencia más del origen epicárdico de la túnica media coronaria^{82,83}.

La diferenciación de células musculares lisas y fibroblastos a partir de CDEP es un hecho bien establecido. Sin embargo, el origen del endotelio coronario permanece aún sometido a discusión. La primera fase de los procesos de vasculogénesis consiste en el ensamblaje de angioblastos, precursores endoteliales mesodérmicos. En una segunda fase, los tubos endoteliales reclutan células mesenquimáticas e inducen su diferenciación hacia células perivasculares (pericitos y musculatura lisa). El origen de los angioblastos que originan el plexo subepicárdico primitivo es incierto, aunque existen dos posibilidades que no son mutuamente excluyentes. La primera posibilidad es que los angioblastos migren hacia el subepicardio desde la región del hígado y septo transversal, bien a través del proepicardio, bien directamente, una vez que el subepicardio haya conectado con la esplacnopleura hepática¹⁵. La segunda posibilidad consiste en una diferenciación a partir de CDEP⁴⁴. En este caso el epicardio sería el origen tanto del endotelio como de la musculatura lisa de los vasos coronarios.

La primera posibilidad cuenta con el respaldo de determinados experimentos, en los cuales las quimeras epicárdicas sólo desarrollaban endotelio derivado del donante si se acompañaba el injerto proepicárdico de un fragmento de tejido hepático⁸⁴. Ésta es la razón por la que otras quimeras, en las que se desarrolló endotelio coronario procedente del donante, no fueron consideradas como prueba de un origen epicárdico de dicho endotelio⁷⁷. Sin embargo, la hipótesis de un origen hepático de los precursores coronarios cuenta con dos dificultades. En primer lugar, quimeras epicárdicas en las cuales el epicardio donante formó un mosaico con el epicardio del hospedador mostraron cómo los límites entre los mesénquimas respectivos estaban perfectamente marcados y coincidían con los límites entre los epicardios⁴⁴. Dicho en otros términos, bajo el epicardio de codorniz sólo se encuentra mesénquima de codorniz, y sólo hay mesénquima de pollo bajo el epicardio de pollo. Lógicamente, los vasos coronarios desarrollados en este sistema fueron un mosaico de células endoteliales procedentes del donante y del receptor. La ausencia de migración horizontal del mesénquima

subepicárdico no se ajusta con la propuesta de una invasión de la superficie cardíaca por parte de angioblastos extracardíacos.

El segundo argumento a considerar en cuanto a un origen hepático de los angioblastos coronarios se basa en las evidencias acerca de la propia vasculogénesis hepática. Es probable que el endotelio de los sinusoides hepáticos sea un derivado celómico, una idea que fue propuesta hace tiempo⁸⁵ y que ha recibido recientemente diferentes apoyos experimentales. Por ejemplo, es posible localizar restos de citoqueratina en las células sinusoidales tempranas del embrión de pollo³⁹ (fig. 2B), mientras que en el ratón transgénico dotado de un gen *reporter* WT1, el endotelio hepático expresa este marcador mesotelial⁴⁶. El marcaje directo del mesotelio hepático del embrión de pollo con un trazador fluorescente muestra que células endoteliales en los sinusoides aparecen marcadas tras sólo 24 h de reincubación⁸⁶.

La posibilidad de que las CDEP se diferencien en angioblastos cuenta con una serie de apoyos experimentales. Por ejemplo, la localización conjunta en células subepicárdicas de restos de citoqueratina con VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2*), también denominado Flk-1⁸⁷, el marcador vascular más temprano conocido, así como una serie de experiencias con quimeras epicárdicas⁴⁴ y datos de marcaje directo del mesotelio proepicárdico y epicárdico con trazadores fluorescentes y retrovirus⁸⁸. De confirmarse estos datos, tanto el corazón como el hígado embrionarios recibirían una aportación de células angioblásticas desde el mesotelio celómico. Éste es un proceso que se puede generalizar a otros órganos en los que se produce vasculogénesis (saco vitelino, pulmones, tubo digestivo, alantoides), y que ha sido situado en un marco evolutivo sobre el origen del sistema circulatorio de vertebrados⁸⁹.

Las células derivadas del epicardio podrían ser precursores vasculares pluripotenciales

La posibilidad de que las CDEP den lugar como mínimo a tres tipos celulares (fibroblastos, células musculares lisas y endotelio) plantea interesantes cuestiones en cuanto a los mecanismos que regularían esta pluripotencialidad. En este contexto es importante señalar el reciente descubrimiento de precursores vasculares bipotenciales derivados de células madre embrionarias y seleccionados por la expresión de VEGFR-2⁹⁰. Estas células, cuando se cultivan en presencia de suero o de PDGF-BB, se diferencian en células musculares lisas. En cambio, en presencia de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dan lugar a células endoteliales. La exposición de estos precursores bipotenciales a ambos factores de crecimiento induce la formación de cultivos mixtos en los que las células musculares lisas rodean a las células endoteliales.

les.

Las CDEP podrían constituir precursores vasculares bipotenciales desde el momento en que expresan receptores de alta afinidad para los dos factores de crecimiento anteriormente citados, VEGFR-2 y PDGFR β ^{87,91} (y datos no publicados). En caso de confirmarse esta hipótesis, un atractivo escenario para el desarrollo de la vascularización cardíaca sería el siguiente (fig. 4): señales miocárdicas (BMPs, FGFs) inducirían la transformación del epicardio en un mesénquima pluripotencial. Las primeras poblaciones de CDEP serían inducidas a diferenciarse en células endoteliales por la alta producción epicárdica y miocárdica de VEGF⁹². Estas células se organizarían en un plexo vascular primario que reclutaría sucesivas CDEP mediante la producción de PDGF-BB, un factor de crecimiento producido por el endotelio⁹³.

Diversas observaciones parecen apoyar este modelo hipotético. La vascularización cardíaca, como la de otros órganos embrionarios, depende de una dosis muy precisa de VEGF. La ausencia de VEGF es letal incluso en heterocigosis^{94,95}, y la sobreexpresión miocárdica de VEGF da lugar a una vascularización defectuosa⁹⁶, con vasos dilatados, muy similar a la que se produce en modelos en los que la señalización por PDGF-BB/PDGFR β está alterada⁹⁷.

El fenómeno de la pluripotencialidad de las CDEP podría tener incluso más alcance del aquí sugerido, ya que existen dos aspectos que no se han tratado, pero que deberán considerarse en el futuro. En primer lugar, a pesar de las numerosas descripciones morfológicas en este sentido, sigue siendo incierta la existencia de hematopoyesis en el corazón embrionario. El desarrollo del plexo vascular subepicárdico se ha descrito, en embriones de mamíferos (humanos incluidos), como un proceso de fusión de «islotes sanguíneos»^{18,98}. Las evidencias a favor de la existencia de un precursor común a células sanguíneas y endoteliales, el conocido como hemangioblasto⁹⁹, sugieren que el proceso de diferenciación de los precursores coronarios podría ser más complejo de lo expuesto, y deja abierta la posibilidad de una potencialidad aún mayor de las CDEP. Es incierto el papel que podría desempeñar en este sentido la sorprendente expresión epicárdica de eritropoyetina y su receptor EPOr¹⁰⁰. Por otro lado, en diversas ocasiones se ha sugerido que el mesénquima subepicárdico podría diferenciarse en miocardiocitos¹⁰¹, si bien no se han encontrado evidencias de esta posibilidad en las quimeras de epicardio²².

Las células derivadas del epicardio modulan el desarrollo miocárdico

Una serie de experiencias recientes ha sugerido que, junto a la contribución ya descrita al desarrollo del tejido vascular y conectivo del corazón, las CDEP podrían desempeñar un papel modulador esencial para el

desarrollo del miocardio ventricular y, en particular, de la capa compacta. Las evidencias que apuntan en este sentido se exponen a continuación.

Las células miocárdicas adultas en cultivo primario sufren un proceso de desdiferenciación por el que cambian su estructura, función y perfil de expresión génica. Se ha mostrado cómo el cocultivo de células epicárdicas y miocárdicas retrasa este proceso y mantiene durante más tiempo el fenotipo contráctil del miocardio¹⁰². Este fenómeno, que requiere contacto entre epicardio y miocardio, se atribuyó a algún tipo de interacción con significado fisiológico.

Tanto en embriones de mamíferos como de aves, las primeras fases de la compactación ventricular coinciden con una invasión del miocardio por parte de CDEP^{48,77}. Es interesante constatar que dicha invasión se produce en el ventrículo, pero no en el atrio (fig. 5). Las células que penetran en el miocardio ventricular mantienen la expresión del factor de transcripción WT1, a diferencia de las CDEP que se diferencian en el tejido vascular¹⁰³. Una primera indicación del papel modulador de las CDEP sobre la diferenciación miocárdica viene del estudio del fenotipo cardíaco de los ratones deficientes en WT1¹⁰⁴. La pérdida de función de WT1 produce graves anomalías en el desarrollo de gónadas, riñones, bazo y glándulas adrenales. Sin embargo, el carácter letal de esta mutación se debe a una insuficiencia cardíaca provocada por una hipoplasia ventricular, es decir, la pared del ventrículo permanece delgada y no se forma la capa compacta. En los ratones WT1^{-/-} se produce normalmente la formación del epicardio y se generan CDEP, aunque en menor cantidad que en los ratones normales. Dado que WT1 se expresa exclusivamente en epicardio y CDEP, y que estas últimas invaden específicamente el miocardio ventricular, parece deducirse que la compactación miocárdica es dependiente de la invasión de CDEP.

Es preciso señalar que este síndrome llamado del miocardio delgado (*thin myocardium*), que caracteriza a la mutación WT1, se produce también asociado a diversas pérdidas de función en genes implicados en el desarrollo epicárdico, ya mencionados en esta revisión, tales como *FOG-2*, *VCAM-1*, α_4 integrina, eritropoyetina y su receptor EPOr.

Se desconoce el mecanismo preciso de la interacción epicardio/miocardio, aunque la señalización por ácido retinoico parece estar implicada. De hecho, el epicardio y las CDEP expresan retinaldehído-deshidrogenasa-2 (RALDH2), una enzima clave en la síntesis de ácido retinoico^{103,105} (fig. 5C). Se ha comprobado que las células que invaden el miocardio también expresan esta enzima, aunque la expresión tiende a disminuir con el tiempo y desaparece con la diferenciación de las CDEP¹⁰³. Esta observación se conecta con el hecho de que los ratones deficientes en el receptor RXR α del retinoico también presentan una hipoplasia ventricular idéntica a la de los ratones WT1^{-/-106,107}. En

primera instancia podría pensarse que el ácido retinoico producido por epicardio y CDEP es la señal que induce la formación de la capa compacta ventricular; sin embargo el proceso parece más complejo, ya que mutaciones condicionadas que anulan específicamente la expresión de RXR α en el miocardio son inocuas^{108,109}. Dado que las CDEP también expresan dicho receptor, es más probable que el ácido retinoico sea esencial en la formación de un bucle autocrino que mantiene a las CDEP en un estado indiferenciado y generador de señales hacia el miocardio. Dichas señales son de naturaleza desconocida, pero podrían mantener al miocardio ventricular en un estado proliferativo. La ausencia de WT1 tal vez provoque la diferenciación prematura de las CDEP, que dejan de producir tanto retinoico como señales hacia el miocardio ventricular.

Las funciones de las CDEP en el desarrollo cardíaco parecen depender, por tanto, de un equilibrio muy fino entre señales procedentes tanto del miocardio como de las propias CDEP, un equilibrio que permite que subpoblaciones precisas de CDEP entren en vías de diferenciación y contribuyan al tejido conectivo y vascular, o bien permanezcan en un estado indiferenciado, migrador y productor de señales autocrinas y paracrinas. La evidencia de que dicho equilibrio está exquisitamente regulado viene de manipulaciones genéticas que afectan a determinados factores de crecimiento. Por ejemplo, ratones en los cuales se produce una sobreexpresión de VEGF-A en el miocardio desarrollan vasos epicárdicos de gran tamaño, como es de esperar, pero también muestran hipoplasia ventricular⁹⁶. Una posible interpretación de este fenómeno es que la ruptura del equilibrio entre subpoblaciones de CDEP disminuye los efectivos de células moduladoras del desarrollo de la capa compacta ventricular.

Un último tema a tratar en este capítulo es el de las posibles relaciones entre las CDEP y la diferenciación del tejido de conducción. Algunas sugerencias se han hecho en este sentido, señalando la coincidencia espacial entre la distribución de las EPDC, los principales vasos coronarios que derivan de ellas y las fibras de Purkinje⁷⁷. Se ha sugerido que la endotelina producida por el endotelio coronario podría mediar la diferenciación del tejido de conducción¹¹⁰.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de este artículo hemos puesto de manifiesto cómo el protagonismo del epicardio en el desarrollo cardíaco ha ido cobrando importancia a lo largo de los últimos años. Esto se ha debido al descubrimiento de que el epicardio proporciona una importante población de células mesenquimáticas y al carácter pluripotencial de dichas células, un carácter cuyo alcance deberá ser valorado en los próximos años.

La pluripotencialidad de las CDEP nos lleva a un concepto que comienza a manejarse entre los estudio-

so del desarrollo cardíaco, la idea de que el epicardio constituye una población de potenciales células madre cardíacas. No debe olvidarse que miocardio y endocardio derivan del mesodermo precardiaco cuando dicho mesodermo constituye un verdadero epitelio celómico, es decir, el mismo tipo celular que se continúa, desde el punto de vista ontogenético, en el proepicardio y epicardio. Por otro lado, la potencialidad de los epitelios celómicos o mesotelios es dramáticamente ilustrada por la heterogeneidad tisular de un grupo de mesoteliomas malignos que dan lugar a elementos óseos, cartilagosos, musculares o hemangioblásticos. Se ha propuesto el término «mesodermoma» para estos tumores, ya que se considera que el mesotelio celómico recupera, en el proceso de tumorigénesis, auténticas propiedades ancestrales mesodérmicas^{111,112}.

Cabe la posibilidad de que el epicardio adulto retenga cierta capacidad de responder a señales que provoquen su transdiferenciación hacia tipos celulares de interés en el tratamiento de diversas patologías. Las posibilidades clínicas que podrían derivarse de esta especulación son muy amplias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mollier S. Die erste Anlage des Herzens bei der Wirbeltieren. En: Hertwig O, editor. Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbeltiere. Jena: Gustav Fischer, 1906.
2. Patten BM. The development of the heart. En: Gould SE, editor. Pathology of the heart and blood vessels. Springfield: CC. Thomas, 1968; p. 20-90.
3. Kurkiewicz T. O histogenezie miesna sercowego zwierzat kregowych - Zur Histogenese des Herzmuskels der Wirbeltiere. Bull Int Acad Sci Cracovie 1909;148-91.
4. Männer J, Pérez-Pomares JM, Macías D, Muñoz-Chápuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. Cells Tiss Org 2001;169:89-103.
5. 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.
6. Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, De Andrés AV, Gallego A, Navarro P. Heart development in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*): a model for the study of the basic vertebrate cardiogenesis. Cardioscience 1994;5:245-53.
7. Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, Gallego A, De Andrés AV. Development of the subepicardial mesenchyme and the early cardiac vessels in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). J Exp Zool 1996;275:95-111.
8. Muñoz-Chápuli R, Macías D, Ramos C, Fernández B, Sans-Coma V. Development of the epicardium in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Acta Zool 1997;78:39-46.
9. Santer RM. An electron microscopical study of the development of the teleost heart. Z Anat Entwickl-Gesch 1972;139:93-105.
10. Fransen ME, Lemanski LF. Epicardial development in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Anat Rec 1990;226:228-36.
11. 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.

12. Ho E, Shimada Y. Formation of the epicardium studied with the electron microscope. *Dev Biol* 1978;66:579-85.
13. Shimada Y, Ho E. Scanning electron microscopy of the embryonic chick heart: formation of the epicardium and surface structure of the four heterotypic cells that contribute to the embryonic heart. En: Van Praagh R, Takao A, editors. Etiology and morphogenesis of congenital heart disease. New York: Futura, 1980; p. 63-80.
14. Shimada Y, Ho E, Toyota N. Epicardial covering over myocardial wall in the chicken embryo as seen with the scanning electron microscope. *Scanning Electron Microsc* 1981;11:275-80.
15. Männer J. The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol* 1992;186:379-85.
16. Virágh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 1981;201:157-68.
17. Komiyama M, Ito K, Shimada Y. Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol* 198;176:183-9.
18. Kuhn HJ, Liebherr G. The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol* 1988;177:225-34.
19. Hirakow R. Epicardial formation in staged human embryos. *Acta Anat Nippon* 1992;67:616-22.
20. Kalman F, Virágh S, Modis L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat Embryol* 1995;191:451-64.
21. Vrancken Peeters M-PFM, Mentink MMT, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol* 1995;191:503-8.
22. Männer J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardialblasts to the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* 1999;255:212-26.
23. Lackie PM, Zuber C, Roth J. Expression of polysialylated N-CAM during rat heart development. *Differentiation* 1991;47:85-98.
24. Watanabe M, Timm M, Fallah-Najmabadi H. Cardiac expression of polysialylated N-CAM in the chicken embryo: correlation with the ventricular conduction system. *Dev Dyn* 1992;194:128-41.
25. Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 1997;8(5):323-35.
26. Macías D, Pérez-Pomares JM, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R. Immunohistochemical study of the origin of the subepicardial mesenchyme in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Acta Zool (Stockholm)* 1998;79:335-42.
27. George EL, Georges-Labouesse EN, Pate-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 1993;119:1079-91.
28. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, et al. Defective development of the embryonic and extra-embryonic circulatory system in vascular cell adhesion molecule (V-CAM-1) deficient mice. *Development* 1995;121:489-503.
29. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Cell adhesion events mediated by α_4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 1995;121:549-60.
30. Pinco KA, Liu S, Yang JT. α_4 integrin is expressed in a subset of cranial neural crest cells and in epicardial progenitor cells during early mouse development. *Mech Dev* 2001;100:99-103.
31. Tidball JG. Distribution of collagens and fibronectin in the subepicardium during avian cardiac development. *Anat Embryol* 1992;185:155-62.
32. Hurlé JM, Kitten GT, Sakai LY, Volpiun D, Solursh M. Elastic extracellular matrix of the embryonic chick heart: an immunohistological study using laser confocal microscopy. *Dev Dyn* 1994;200:321-32.
33. Bouchev D, Drake CJ, Wunsch AM, Little CD. Distribution of connective tissue proteins during development and neovascularization of the epicardium. *Cardiovasc Res* 1996;31:104-15.
34. Kim H, Yoon CS, Kim H, Rah B. Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct* 1999;24:19-26.
35. Morita T, Shinozawa T, Nakamura M, Awaya A, Sato N, Ishiwata I, et al. Expressions of a 68kDa-glycoprotein (GP68) and laminin in the mesodermal tissue of the developing mouse embryo. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1998;75:185-95.
36. Burch GH, Bedolli MA, McDonough S, Rosenthal SM, Bristow J. Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev Dyn* 1995;203:491-504.
37. Tsuda T, Majumder K, Linask KK. Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev Genet* 1998;23:203-14.
38. Van den Eijnde SM, Wenink ACG, Vermeij-Keers C. Origin of subepicardial cells in rat embryos. *Anat Rec* 1995;242:96-102.
39. Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn* 1997;210:96-105.
40. Hay E. An overview of epithelial-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 1995;154:8-20.
41. Viebahn C. Epithelio-mesenchymal transformation during formation of the mesoderm in the mammalian embryo. *Acta Anat* 1995;154:79-97.
42. Duband JL, Monier F, Delannet M, Newgreen D. Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat* 1995;154:63-78.
43. Markwald R, Eisenberg C, Eisenberg L, Trusk T, Sugi Y. Epithelial-mesenchymal transitions in early avian heart development. *Acta Anat* 1996;156:173-86.
44. Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: An immunohistochemical and quail-chimera study. *Dev Biol* 1998;200:57-68.
45. Fitchett JE, Hay E. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 1989;131:455-74.
46. 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.
47. 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.
48. Carmona R, González Iriarte M, Pérez Pomares JM, Muñoz-Chápuli R. Localization of the Wilms' tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tiss Res* 2001;303:173-86.
49. Mjaatvedt CH, Markwald RR. Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an *in vivo* adhesion like complex. *Dev Biol* 1989;136:118-28.
50. Nakajima Y, Yamagishi T, Hokari S, Nakamura H. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat Rec* 2000;258:119-27.
51. Romano LA, Runyan RB. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* 2000;223:91-102.
52. Morabito CJ, Dettman RW, Kattan J, Collier JM, Bristow J. Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transition during avian heart development. *Dev Biol* 2001;234:204-15.
53. Allen SP, Bogardi JP, Barlow AJ, Mir SA, Qayyum SR, Verbeek FJ, et al. Misexpression of noggin leads to septal defects in the outflow tract of the chick heart. *Dev Biol* 2001;235:98-109.
54. Sefton M, Sánchez S, Nieto MA. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 1998;125:3111-21.
55. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of

- cell behaviour by slug, a zinc finger gene. *Science* 1994;264:835-9.
56. Romano LA, Runyan RB. Slug is a mediator of epithelial-mesenchymal cell transformation in the developing chicken heart. *Dev Biol* 1999;212:243-54.
 57. Carmona R, González-Iriarte M, Macías D, Pérez-Pomares JM, García Garrido L, Muñoz-Chápuli R. Immunolocalization of the transcription factor Slug in the developing avian heart. *Anat Embryol* 2000;201:103-9.
 58. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein Slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 1997;137:1403-19.
 59. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
 60. Battle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84-9.
 61. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1993;211:7-18.
 62. Macías D, Pérez-Pomares JM, García-Garrido L, Carmona R, Muñoz-Chápuli R. Immunoreactivity of the ets-1 transcription factor correlates with areas of epithelial-mesenchymal transition in the developing avian heart. *Anat Embryol* 1998;198:307-15.
 63. Franco D, Domínguez J, De Castro MP, Aránega A. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:167-84.
 64. 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 the coronary vessels from epicardium. *Cell* 2000;101:729-39.
 65. Robb L, Mifsud L, Hartley L, Biben C, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. Epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Dev Dyn* 1998;213:105-13.
 66. Lu J, Richardson JA, Olson EN. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mech Dev* 1998;73:23-32.
 67. Hidaï H, Bardales R, Goodwin R, Quertermous T, Quertermous EE. Cloning of capsulin, a basic helix-loop-helix factor expressed in progenitor cells of the pericardium and the coronary arteries. *Mech Dev* 1998;73:33-43.
 68. Quaggin SE, Vanden-Heuvel GB, Igarash P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. *Mech Dev* 1998;71:37-48.
 69. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, et al. The basic-helix-loop-helix protein pod-1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 1999;126:5771-83.
 70. Lu J, Chang P, Richardson JA, Gan L, Weiler H, Olson EN. The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9525-30.
 71. Hatcher CJ, Goldstein MM, Mah CS, Delia CS, Basson CT. Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis. *Dev Dyn* 2000;219:90-5.
 72. Kraus F, Haening B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev* 2001;100:83-6.
 73. Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 1997;15:21-9.
 74. Wagner M, Miles K, Siddiqui MAQ. Early developmental expression pattern of retinoblastoma tumor suppressor mRNA indicates a role in the epithelial to mesenchyme transformation of endocardial cushion cells. *Dev Dyn* 2001;220:198-211.
 75. Bogers AJJC, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Peault BM, Huysmans HA. Development of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol* 1989;180:437-41.
 76. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 1989;251:224-31.
 77. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MPFM, Mentink MMT, 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.
 78. Vrancken Peeters MPFM, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MMT, Poelmann RE. Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol* 1999;199:367-78.
 79. Dettman RW, Denetclaw W, Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intramyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 1998;193:169-81.
 80. Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development* 1999;126:2053-62.
 81. Lu J, Landerholm TE, Wei JS, Dong XR, Wu SP, Liu X, et al. Coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells requires rhoA-mediated actin reorganization and p160 rho-kinase activity. *Dev Biol* 2001;240:404-18.
 82. Reese DE, Zavaljevski M, Streiff NL, Bader D. Bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev Biol* 1999;209:159-71.
 83. Wada AM, Reese DE, Bader DM. Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development* 2001;128:2085-93.
 84. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MMT, Bökenkamp R, Hogers B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 1993;73:559-68.
 85. LeDouarin N. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 1975;53:427-55.
 86. Muñoz-Chápuli R, Carmona R, González-Iriarte M, Pérez-Pomares JM, Macías D, Atencia G, et al. Origin of endothelial cells from mesothelial-derived mesenchymal cells in the liver of avian embryos. *Int J Dev Biol* 2001;45:S155-S6.
 87. Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R. Immunolocalization of the vascular endothelial growth factor receptor-2 in the subepicardial mesenchyme of hamster embryos: identification of the coronary vessel precursors. *Histochem J* 1998;30:627-34.
 88. Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chápuli R. Origin of coronary endothelium from epicardial mesothelium in avian embryos [en prensa].
 89. Muñoz-Chápuli R, Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Carmona R, González M. Differentiation of hemangioblasts from embryonic mesothelial cells? A model on the origin of the vertebrate cardiovascular system. *Differentiation* 1999;64:133-41.
 90. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408:92-6.
 91. Shinbrot E, Peters KG, Williams LT. Expression of the platelet-derived growth factor beta receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo. *Dev Dyn* 1994;199:169-75.
 92. Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, Yue X, Sandra A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn* 1999;215:54-61.
 93. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-5.
 94. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and

- lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.
95. Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.
 96. Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular growth factor gene expression. *Development* 2000;127:3941-6.
 97. Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient in PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994;8:1875-87.
 98. Hutchins GM, Kessler-Hanna A, Moore GW. Development of the coronary arteries in the embryonic human heart. *Circulation* 1988;77:1250-8.
 99. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125:725-32.
 100. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999;126:3597-605.
 101. Morris EWT. Observations on the source of embryonic myocardial cells. *J Anat* 1976;121:47-64.
 102. Eid H, Larson DM, Springhorn JP, Attawia MA, Nayak RC, Smith TW, et al. Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res* 1992;71:40-50.
 103. Pérez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, González-Iriarte M, Muñoz-Chápuli R, et al. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially-derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 2002;274:307-26.
 104. 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.
 105. 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.
 106. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR α mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994;8:1007-18.
 107. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, et al. Genetic analysis of RXR α developmental function: convergence of RXR and RAR signalling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 1994;78:987-1003.
 108. Chen J, Kubalak SW, Chien KR. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXR α gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* 1998;125:1943-9.
 109. Tran CM, Sucov HM. The RXR α gene functions in a non-cell-autonomous manner during mouse cardiac morphogenesis. *Development* 1998;125:1951-6.
 110. Gourdie RG, Wei Y, Kim D, Klatt SC, Mikawa T. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6815-8.
 111. Donna A, Betta P. Mesodermomas: a new embryological approach to primary tumours of coelomic surfaces. *Histopathology* 1981;5:31-44.
 112. Krisman M, Muller KM, Jaworska M, Johnen G. Severe chromosomal aberrations in pleural mesotheliomas with unusual mesodermal features. Comparative genomic hybridization evidence for a mesothelioma subgroup. *J Mol Diagn* 2000;2:209-16.