



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BÚSQUEDA DE microRNAs CANDIDATOS QUE PARTICIPAN EN EL  
DESARROLLO DE LOS TRACTOS DE SALIDA VENTRICULARES Y TRONCOS  
ARTERIALES EN EL CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CARMEN LICET PÉREZ DE GANTE**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**BÚSQUEDA DE microRNAs CANDIDATOS QUE PARTICIPAN EN EL  
DESARROLLO DE LOS TRACTOS DE SALIDA VENTRICULARES Y TRONCOS  
ARTERIALES EN EL CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**CARMEN LICET PÉREZ DE GANTE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2015**

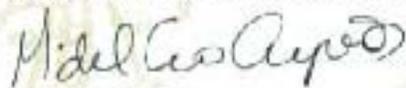
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de noviembre de 2014, aprobó el juraco para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PÉREZ DE GANTE CARMEN LICET** con número de cuenta **302121957**, con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE microRNAs CANDIDATOS QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO DE LOS TRACTOS DE SALIDA VENTRICULARES Y TRONCOS ARTERIALES EN EL CORAZÓN DE EMBRIÓN DE POLLO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CONCEPCIÓN SÁNCHEZ GÓMEZ**:

Presidente: DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO  
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL GARCÍA PELÁEZ  
Secretario: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO  
Suplente: M EN B. E. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA  
Suplente: DR. JESUS CHIMAL-MONROY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de enero de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Le doy las gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo recibido para la elaboración de este proyecto.

Agradezco la beca otorgada de CONACYT con clave, número de registro o número de proyecto) y otros apoyos recibidos.

Agradezco a los miembros del Comité Tutor, por la paciencia, esfuerzo y aportaciones que hicieron en la realización de este trabajo.

## *Agradecimientos...*

*“Cuando quieres alguna cosa, todo el mundo conspira para que lo consigas”*

**Agradezco a mis padres una vez más, por darme la oportunidad de realizar mis sueños, por impulsarme a tomar decisiones y hacerlas realidad. Gracias por haber estado en esos momentos tan difíciles, que se me presentaron a lo largo de este trabajo.**

**A mi hermano Israel que ha estado ahí en las buenas y en las malas acompañándome.**

**A la Dra. Briceida, gracias doctora!!! Usted ha sido mi gran cómplice en este sueño, sin su apoyo y comprensión no lo hubiera logrado. Mil graciaaaaasssss!!!!**

**A la Dra. Concepción por haberme recibido en su laboratorio y darme la confianza para seguir adelante.**

**A Israel Morales Balcázar por estar ahí siempre y no dejarme caer, por ser la alegría de mi día y siempre animarme a seguir adelante. Ich Liabe!!!!**

**A mi amigaaaaa Maribel, no sé cómo nos encontramos en este camino, sin embargo, doy gracias por tenerte cerca, por tus valiosos consejos y paciencia.**

**A mis tutores Dr. Arenas y Dr. Chimal porque en este camino he aprendido muchas cosas gracias a ustedes, a veces con desesperación, frustración y enojo; después de haber recorrido este largo camino, el futuro se ve más alentador.**

**A todos mis amigos y las personas que han estado cerca de mí, a todos ustedes por motivarme a seguir siempre adelante, saben que hay un reconocimiento especial en mi corazón y que fueron parte de esta travesía: Edgar, Lili, Rosario, Natalia, Alicia, El Chamoy, Aline, Vilchis, Linda, Tere, Grace, Rosy, Oscar, Lupita, Cele.**

**A nuestra lucecita de alegría "Toulouse" te amamos donde quiera que estés.**

**Ahhh y un reconocimiento muy especial a Vicente y a Daniel, gracias por estar ahí al pendiente de mi y de levantar mi ánimo cuando lo necesite, los quiero!!!!**

**A todos y a cada uno de ustedes GRACIAS.**

# ÍNDICE

<b>I.- LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>i</b>
<b>II.-ABREVIATURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>III.- RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>IV.- ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>V.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
V. 1.- Fisiología del corazón maduro.	
V. 2.- Desarrollo embrionario del corazón.	
V. 3. -Período premorfológico cardíaco.	
V. 3. 1.-Especificación del mesodermo cardiogénico.	
V. 4.- Periodo morfológico cardíaco.	
V. 4. 1.-Corazón en tubo recto.	
V. 4. 2.-Etapa de asa en C.	
V. 4. 3.-Etapa de asa en S.	
V. 4. 4.-Etapa de asa avanzada.	
V. 4. 5.- Estadio 24HH.	
V. 5.- Componentes embrionarios que participan en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares y troncos arteriales.	
V. 5. 1.-Tronco arterioso o segmento distal del tracto de salida embrionario.	
V. 5. 2.-El cono o segmento proximal del tracto de salida embrionario.	
V. 6.- Importancia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) en el desarrollo cardíaco.	

V. 7.-Modelo del desarrollo de cojines y crestas endocárdicas.

V. 8.-Miocardización y Proliferación miocárdica.

V. 9.- microRNAs (miRNAs)

V. 10.-Biogénesis de microRNAs.

**VI.- ANTECEDENTES.....23**

VI.1.-La relación de microRNAs y el corazón.

**VII.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....23**

**VIII.- OBJETIVOS.....24**

VIII.1.- Objetivos Generales

VIII.2.- Objetivos Particulares.

**IX.- MATERIALES Y METODOS.....24**

IX.1.-Selección de microRNAs relacionados con el sistema cardiovascular.

IX.2.-Obtención de tejido embrionario.

IX.3.-Obtención de tejido de pollo juvenil.

IX.4.-Extracción de ARN total.

IX.5.-Síntesis de cDNA (RT).

IX.6.-Preparación de reacción de RT.

IX.7.-RT-qPCR tiempo real.

IX.8.-Análisis estadístico.

**X. RESULTADOS.....29**

X.1.- Elección de microRNAs para el estudio.

X.2.- Extracción de ARN de las estructuras embrionarias y de las estructuras maduras.

- X.3.- Sobre-expresión de los microRNAs en la estructura madura del TSVD y del segmento embrionario de corazón de pollo estadio E24HH.
- X.4.- Expresión diferencial de los 4 microRNAs seleccionados a lo largo del desarrollo embrionario E24HH-E36HH.

<b>XI.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>XII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>XIII.-PERSPECTIVAS.....</b>	<b>51</b>
<b>XIV.-LITERATURA CITADA.....</b>	<b>52</b>
<b>XV.- ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## **I.- LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.**

<b>ILUSTRACIONES</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Fig. 1</b>	<b>Morfogénesis Cardíaca.</b>	<b>9</b>
<b>Fig. 2</b>	<b>Corte Histológico y fotomicrografía electrónica del corazón de embrión de pollo E26HH.</b>	<b>10</b>
<b>Fig. 3</b>	<b>TGF-<math>\beta</math> latente.</b>	<b>13</b>
<b>Fig. 4</b>	<b>Vía de señalización de TGF-<math>\beta</math>.</b>	<b>14</b>
<b>Fig. 5</b>	<b>Representación de los cojines del tracto de salida embrionario (OFT) y canal AV (AVC). Cascadas de señalización en la TEM.</b>	<b>15</b>
<b>Fig. 6</b>	<b>Biogénesis de microRNAs.</b>	<b>22</b>
<b>Fig. 7</b>	<b>Secuencia del desarrollo normal del corazón (de izquierda a derecha) del estadio E22HH al E36HH.</b>	<b>25</b>
<b>Tabla 1</b>	<b>Lista de microRNAs evaluados en E24HH y estructuras maduras cardíacas.</b>	<b>32</b>
<b>Fig. 8</b>	<b>Gel de Agarosa al 1% teñido con Red Nucleic Acid Stain, se muestra dos bandas integras de ARN ribosomal (rARN28s, rARN18s).</b>	<b>35</b>
<b>Fig. 9</b>	<b>Gel de Agarosa al 1% teñido con Red Nucleic Acid Stain.</b>	<b>36</b>
<b>Fig. 10</b>	<b>Patrón de expresión de los 9 microRNAs por RT-qPCR tiempo real en las estructuras maduras del corazón de pollo (6 semanas).</b>	<b>37</b>

<b>Fig. 11</b>	<b>Patrón de expresión de los 9 microRNAs por RT-qPCR tiempo real en el tejido del segmento embrionario de corazón de pollo estadio E24HH.</b>	<b>37</b>
<b>Fig. 12</b>	<b>Mapa de color que muestra el nivel de expresión de los 9 microRNAs en el tejido del corazón embrionario estadio E24HH respecto a la expresión en las estructuras maduras.</b>	<b>38</b>
<b>Fig. 13</b>	<b>Comparación del patrón de expresión de los 4 microRNAs relacionados con TGF-<math>\beta</math> del estadio E24HH al E36HH respecto al TSVD.</b>	<b>39</b>
<b>Fig. 14</b>	<b>Acción de microRNA-1 en E24HH y en TSVD.</b>	<b>42</b>
<b>Fig. 15</b>	<b>Acción de microRNA-15a y miRNA-30d en E24HH y TSVD.</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 16</b>	<b>Acción de microRNA-126 en E24HH y TSVD.</b>	<b>44</b>
<b>Fig. 17</b>	<b>Acción de microRNA-27b en TSVD y E24HH.</b>	<b>45</b>
<b>Fig.18</b>	<b>Acción del miRNA-24 en la regulación negativa de la enzima furina encargada de la activación del TGF-<math>\beta</math> maduro.</b>	<b>46</b>
<b>Fig. 19</b>	<b>Modelo Hipotético de acción de los microRNAs relacionados con TGF-<math>\beta</math> y desarrollo de las crestas conales.</b>	<b>48</b>

## II. ABREVIATURAS

AGO1: proteína Argonauta 1.

Akt: proteína cinasa B, proteína serina/treonina cinasa.

AKT2: gen llamado "v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2".

ALK1: receptor activina cinasa 1.

ALK2: receptor activina cinasa 2.

ALK5: receptor de activina cinasa 5.

ANF: factor natriurético atrial.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

ATF/CREB: factor de transcripción activador/ elemento de unión a AMPc.

AV: atrio ventricular.

Bcl-2: proteína llamada "linfoma de células B2" regulador de muerte celular.

Bim: proteína proapoptótica.

bMHC: cadena pesada de miosina beta.

BMP: proteínas morfogénicas del hueso.

CAP: adición al extremo 5' de la estructura denominada caperuza o casquete.

CE: células endoteliales.

CITED: familia de coactivadores transcripcionales.

Csx: homeobox específico cardíaco.

DGCR8: cofactor proteico DiGeorge de la región génica 8.

dpc: días post-coito.

dsRBD: dominio de unión a la cadena doble de ARN.

DUF283: dominio de enzima Dicer.

eIF4E: factores de iniciación de la traducción.

End: endogлина.

FGF: factor de crecimiento fibroblástico.

Fgfr1: receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1.

FOXP1: gen llamado “forkhead box P1”.

GATA4: factor de transcripción donde G = Guanina, A = Adenina y T = Timina.

GDFs: factores de crecimiento y diferenciación.

GDNFs: factores neurotróficos derivados de la glia.

HA: ácido hialurónico.

HAND1: factor de transcripción hélice-asa-hélice.

Has2: ácido hialurónico sintetasa 2.

JNK: cinasas c-Jun N-terminal.

LAP: proteína asociada a la latencia.

LLC: complejo grande de TGF- $\beta$  latente.

LTBP: proteína de unión a TGF- $\beta$  latente.

MADS: proteínas de dominio MADS.

MAPK: cinasas activadas por mitógenos.

MEC: matriz extracelular.

MEF2c: factor potenciador específico de miocito 2C.

Mesp1: homólogo del Mesodermo posterior 1.

MF20: marcaje de la cadena pesada miosina.

miRISC: complejo de silenciamiento que degrada o silencia ARNm.

microRNAs ó miRNAs: ARNs no codificantes de secuencias pequeñas.

MIS: sustancia inhibidora Mulleriana.

MKK3/6-p38: vía de señalización p-38 cinasas activadas por mitógenos.

MMP2: metaloproteinasas de matriz 2.

msh-2: proteína de reparación de errores de DNA o proteína homóloga MutS 2.

Nkx2.5: factor de transcripción cardíaco.

OFT: tracto de salida embrionario.

p53: gen supresor tumoral.

PAZ: dominio de enzima Dicer.

PBP: proteína de unión al poli A.

PECAM: molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria.

PI3: fosfatidil-inositol 3.

pre-miRNA: estructuras cortas de 70-nucleótidos en forma de tallo-lazo.

pri-miRNAs: transcritos primarios con una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas en 3'.

Pum2: Pumilio 2.

Ran/GTP: parte del transporte unidireccional de proteínas de carga a través de filamentos citoplasmáticos.

Ras: reguladores moleculares importantes en variedad de rutas de transmisión de señales celulares.

RIIIDs: RNAasa III.

R-Smad: receptores que regulan a SMADs.

RT-qPCR: reacción de la polimerasa en tiempo real.

SARA: anclaje de las Smads para la activación del receptor.

SFH: segundo campo cardiogénico.

SLC: pequeño complejo dimérico latente.

SMADs: proteínas efectoras intracelulares.

Snail: factor de transcripción con dedos de zinc.

ssRNAs: ARN no codificante de cadena sencilla.

TAK1: proteínas mitogénicas cinasa cinasa cinasa.

TbRI ó Tgfb1: receptor cinasa 1 de TGF- $\beta$ .

TbR-II ó TgfbR1: receptor cinasa 2 de TGF- $\beta$ .

Tgfb3: receptor III de TGF- $\beta$  llamado también Betaglicano.

TBX5: llamado "caja T" factor de transcripción implicados en el desarrollo de las extremidades y del corazón.

TEM: transformación epitelio mesénquima.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ .

TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2 y TGF $\beta$ -3: isoformas 1, 2 y 3 de TGF- $\beta$ .

TIMPs: inhibidores de metaloproteinasas de la MEC.

TSVD: tracto de salida del ventrículo derecho.

UTR: región no traducida de un gen.

VD: ventrículo derecho.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

VI: ventrículo izquierdo.

### III.- RESUMEN

**Introducción:** Mediante marcaje *in vivo*, de corazón del embrión de pollo, se ha demostrado que el cono dará origen al tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD), el cojín superior del canal AV participará en la formación del tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), el tronco origina las sigmoideas de la arteria aorta y pulmonar y el saco aórtico formará el tronco de la arteria aorta y pulmonar. En el pollo, el proceso de transformación de las estructuras embrionarias a maduras comienza cerca del E24HH y finaliza en E36HH. Los procesos morfogénéticos que están involucrados, son la transformación del endocardio en mesénquima (TEM) durante la formación de las crestas conales, proliferación y diferenciación miocárdica, en los que el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tiene un papel preponderante. Recientemente se ha identificado secuencias pequeñas de ARN no codificantes (microRNAs o miRNAs) que modulan la expresión génica, inhibiendo la traducción ARNm sin embargo, aun se desconoce el papel de estas moléculas en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares. **Objetivo:** Identificar microRNAs candidatos para participar en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares y troncos de las grandes arterias en el corazón de embrión de pollo. **Método:** De la literatura y bases bioinformáticas, se seleccionaron 9 microRNAs relacionados con el sistema cardiovascular, se obtuvo el tejido embrionario de pollo (E24HH-E36HH) y el tejido maduro de pollo (6 semanas de nacido), se extrajo el ARN y se realizó la síntesis del cDNA (RT) y la RT-qPCR tiempo real. El análisis de la expresión de los miRNAs se realizó por el método de  $2^{-\Delta Ct}$  y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA de una vía y una prueba post-hoc. **Resultados:** Se seleccionaron 9 microRNAs implicados en el desarrollo cardiovascular: microRNA-15 y microRNA-30 están involucrados hipertrofia e infarto al miocardio; el Let-7a, microRNA-23 y microRNA-27b descritos en el corazón prenatal y patológico adulto; el microRNA-1 es el mejor caracterizado en el corazón embrionario; microRNA-24 y microRNA-126 angiogénicos vasculares, mientras que el microRNA-206 es miogénico aparentemente no cardíaco. La mayoría de estos microRNAs se encuentran expresados en las estructuras maduras de la aorta y del TSVD, sin embargo, el número de veces de expresión es mayor en este último. Por otro lado, en el TSVI y la pulmonar, no se expresan microRNA-27b, microRNA-15a, microRNA-23b, microRNA-126, microRNA-206 y Let-7a; y la expresión de microRNA-1, microRNA-24, microRNA-30d es baja a comparación de los microRNAs expresados en la aorta y TSVD. El segmento del corazón embrionario de pollo E24HH mostró sobre-expresados 8 microRNAs, sin embargo, su grado de expresión es menor al del TSVD. Los 4 miRNAs evaluados entre E24HH a E36HH y relacionados con el TGF- $\beta$  fueron microRNA-24, microRNA-23b, microRNA-206 y Let-7a; este último no se expresó a lo largo del desarrollo embrionario. El microRNA-206 y microRNA-23b se expresan en el estadio E24HH y posteriormente deja de expresarse y el microRNA-24 se mantiene expresado durante toda la embriogénesis. **Conclusiones:** La expresión de microRNAs en nuestra zona de interés y la información que se tiene de los blancos de los microRNAs y la posible relación con los procesos morfogénéticos, en la transformación de las estructuras embrionarias a maduras, permite sugerir que en el tejido embrionario la sub-expresión de microRNA-1, promueve la proliferación del miocardio ventricular e inhibe de la diferenciación cardíaca. Mientras que la sobre-expresión de microRNA-1 en el TSVD, se relaciona con la inhibición de la proliferación de miocardio ventricular y mantenimiento de la diferenciación miocárdica. En el tejido embrionario la expresión

de microRNA-15a correlaciona con la apoptosis, mientras que la expresión de microRNA-30d, con la inhibición de la apoptosis, manteniendo un balance de este proceso. Sin embargo en la estructura madura TSVD, la expresión del microRNA-30d y la sub-expresión de microRNA-15a inhibiría la apoptosis. microRNA-126 en el tejido embrionario promueve la angiogénesis y la TEM; mientras que en el adulto, al encontrarse sub-expresado puede inhibir ambos procesos. El microRNA-27b al encontrarse sub-expresado en el tejido embrionario activa la diferenciación inicial y terminal cardiaca; mientras que en el adulto al encontrarse expresado inhibe la diferenciación cardiaca. Al determinar el patrón de expresión de microRNA206, microRNA23b, microRNA24 desde el estadio E24HH al E36HH, indica que estos microRNAs pudieran facilitar un cambio en el programa genético, modificando las características de la MEC y/o asegurando la transición del proceso de TEM hacia la proliferación y maduración del mesénquima de las crestas conales. Las bases bioinformáticas, señalan que Let-7a tiene como blanco probable al receptor 1 de TGF- $\beta$ , al no encontrarse expresado en el tejido embrionario, ni adulto, quizá este blanco, no se encuentre regulado por Let-7a o el receptor se expresa constitutivamente en el tejido.

## IV. ABSTRACT

**Introduction:** By making live heart of chick embryo has been shown that the conus will give rise to the outflow tract of the right ventricle (RVOT), the upper cushion the AV canal participate in the formation of the outflow tract of the left ventricle (LVOT). The trunk originates sigmoid artery to aorta and pulmonary, aortic sac to form the trunk pulmonary and artery aorta. In the chicken the transformation of embryonic structures mature stars near (E24HH) the ends (E36HH). The morphogenetic processes involved are the transformation of the endocardium mesenchyme (TEM) during the formation of the conal ridges myocardial proliferation and differentiation in what transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) plays an important role. Have recently been identified small noncoding RNA sequences (miRNAs) which modulate gene expression by inhibiting mRNA translation. However, although the role of these molecules in the development of ventricular outflow tracts are unknown. **Objective:** To identify miRNAs candidates to participate in the development of ventricular outflow tracts and trunks or large arteries in the heart of the chick embryo. **Method:** From literature and databases bioinformatics 9 miRNAs related to the cardiovascular system is selected, chicken embryonic tissue (E24HH-E36HH) and the mature tissue of chicken (6 weeks old) were obtained RNA was extracted and made de cDNA (RT) and real time RT-qPCR. Analysis of expression of miRNAs was performed by the method  $2^{-\Delta C_t}$  statistical analysis was performed using ANOVA and a via post-hoc test. **Results:** 9 were selected miRNAs implicated in cardiovascular development: miRNA-15 and miRNA-30 are involved hypertrophy and myocardial attack. Let-7a, miRNA-23 and miRNA-27b described in the prenatal and adult heart disease, the miRNA-1 is the best characterized in the embryonic heart, miRNA-24 and miRNA-126 vascular angiogenics. Whereas myogenic miRNA-206 is apparently no heart. Most of these miRNAs are expressed in mature structures to aorta and the RVOT. However, the number of times of expressions is higher in the latter. On the other hand, in the TSVI and pulmonary no miRNA-27b, miRNA-15a, miRNA-23b, miRNA-126 and miRNA-206, Let-7a are expressed. The expression of miRNA-1, miRNA-24, miRNA-30 is low in compared to the miRNAs expressed in a aorta and RVOT. The segment of the embryonic chicken heart E24HH was overexpressed in 8 miRNAs. Them however, the degree of expression is less than the RVOT. Among 4 miRNAs evaluated E24HH to E36HH and related to TGF- $\beta$  were miRNA-24, miRNA-23b, miRNA-206 and Let-7a. The latter is not express throughout embryonic development. The miRNA-206 and miRNA-23b are expressed in the stage 24HH and after ceases to be expressed and the miRNA-24 is expressed during throughout embryogenesis. **Conclusions:** The expression of miRNAs is the reason for our interest and information that makes the target miRNAs and the possible relationship with the morphogenetic processes in the transformation of the embryonic structures allows to suggest that mature in the issue the sub miRNA-1 expression promotes the proliferation of ventricular myocardium and inhibits cardiac differentiation. While the on miRNA -1 expression in the RVOT is related to the inhibition of the proliferation of the ventricular myocardium and maintenance of the myocardial differentiation. In the embryonic tissue expression of the miRNA-15a correlated with apoptosis while the expression miRNA-30d with the inhibition of apoptosis, maintaining the balance of this process. However in mature RVOT the structure, the expression of miRNA-30d and the sub expression of miRNA-15a to inhibit apoptosis miRNA-126 in the embryonic tissue promotes the angiogenesis and the TEM. While in the adult to the sub expressed

can inhibit both processes. The miRNA-27b to be sub expressed in the embryonic tissue activates the initial and terminal differentiation heart whereas in the adult to be found expressed heart inhibits the differentiation. In determining the pattern of expression of miRNA-206, miRNA-23b, miRNA-24 from the stage E24HH to E36HH indicates that these miRNAs could facilitate a change in the genetic program by the characteristics of the MEC and/or ensuring the transition of TEM process toward the proliferation and maturation of the mesenchyme of conal crests. Bioinformatics databases indicate that Let-7a is targeting likely to 1 receptor for TGF- $\beta$  not being expressed in the embryonic or adult tissue, perhaps this white is not regulated by Let-7a or the receiver is expressed constitutively in the tissue.

## V. INTRODUCCIÓN

### V. 1.- Fisiología del corazón maduro.

El corazón es el órgano central y más importante en todos los vertebrados, es un músculo hueco que ejerce una labor de bombeo, en su lado derecho impulsa la sangre venosa a la circulación arterial pulmonar para su oxigenación y el lado izquierdo impulsa la sangre una vez oxigenada (arterial) a la circulación sistémica (Anderson y Becker 1980, Baño-Rodrigo *et al.*, 1986). Dentro de la cavidad torácica, el corazón está ubicado en la parte anterior e inferior del mediastino, limitado anteriormente por el esternón y posteriormente por la columna vertebral (Guadalajara 1985; Cayre *et al.*, 2003). Esta estructura está formada por cuatro cavidades dos atrios y dos ventrículos, estos últimos conectados por un tracto de salida derecho e izquierdo con su respectiva gran arteria la pulmonar y aorta (Anderson y Becker 1980; Guadalajara 1985; Baño-Rodrigo *et al.*, 1986).

Los ventrículos al igual que los atrios están divididos por un tabique, en este caso denominado interventricular, que corresponde a la pared interna de cada uno de los ventrículos y que no permite la mezcla de sangre venosa y arterial (Baño-Rodrigo *et al.*, 1986). Se distinguen por su morfología más que por su posición, lo que hace necesario puntualizar lo siguiente:

1.- La cámara de entrada soporta las válvulas atrio-ventriculares, que regulan el paso de sangre desde los atrios a los ventrículos. La cámara de entrada del ventrículo derecho (VD) contiene a la válvula denominada tricúspide que se encuentra formada por tres valvas (anterior, septal y posterior). La cámara de entrada del ventrículo izquierdo (VI) contiene a la válvula mitral y se describe como bivalva por estar compuesta por dos valvas (anterior y la posterior) (Anderson y Becker 1980; Baño-Rodrigo *et al.*, 1986).

2.-La región anatómica de las cámaras de salida o tractos de salida son estructuras importantes debido a que es el segmento sub-arterial que permite el flujo de sangre, desde los ventrículos a su arteria correspondiente. Las cámaras de salida se extienden desde las regiones de salida de los ventrículos derecho e izquierdo a los márgenes de la cavidad pericárdica, continúan hacia el mediastino y comunican con la aorta ascendente y las arterias pulmonares derecha e izquierda, respectivamente. Una característica clave dentro de cada uno de los tractos de salida es que no permiten el regreso de la sangre gracias a que poseen valvas unidas, articuladas semilunarmemente (Baño-Rodrigo *et al.*, 1986).

Una peculiaridad del VD es que su cámara de entrada y la de salida se encuentran anatómicamente separadas por una barra muscular sobresaliente llamada cresta supraventricular, además, las valvas de la válvula pulmonar se soportan por una funda libre de musculatura infundibular (Anderson y Becker 1980). En el VI, la cámara de salida da soporte a la válvula aórtica y aunque poseen la misma estructura básica que la del VD hay diferencias importantes, las dos valvas de la válvula aórtica se encuentran en continuidad posterior con una de las valvas de la válvula mitral, esta área de continuidad fibrosa forma el techo del ventrículo izquierdo (Anderson y Shirali 2009).

Cabe señalar, que es crucial el reconocimiento de las diferencias sutiles que existen en la estructura normal de los tractos de salida, los defectos en su formación, estructura o funcionamiento en el desarrollo embrionario, genera una alta prevalencia de las llamadas cardiopatías tronco-conales (Webb *et al.*, 2003). Siendo causa frecuente de morbilidad y mortalidad infantil; representan la

clase mas común de defectos al nacer, afectando a 1 de cada 100 niños cada año (Marín-García 2004). Se estima que alrededor de dos tercios de los niños que sobreviven mueren durante el primer año de vida (Guadalajara 1985; Bruneau 2008). En nuestro país se desconoce la prevalencia real de las cardiopatías congénitas, la poca información de la que se dispone, se basa en las tasas de mortalidad. Se estima que la mortalidad total de la población pediátrica menor de 10 años fue de 15 548 pacientes durante el periodo del 2004 al 2007, de los cuales el 83% correspondió a menores de un año (Calderón-Colmenero *et al.*, 2010).

Hasta hace poco tiempo, los defectos cardiacos congénitos eran vistos como anomalías cardiacas, estructurales del corazón y de los grandes vasos, causadas por mutaciones que ocurrían en la etapa fetal y eran detectables después del nacimiento. Actualmente, se sabe, que es imprescindible el conocimiento del desarrollo embriológico normal del corazón, que permita entender las transformaciones que sufre el corazón a lo largo de su desarrollo, y lleven a una mejor comprensión de patologías congénitas (Arteaga *et al.*, 1987; Markwald y Butcher 2007). En este aspecto, el estudio del desarrollo de los tractos de salida es de suma importancia, ya que los mecanismos que subyacen a su formación, división y desarrollo siguen siendo controversiales (Webb *et al.*, 2003).

## V.2.-Desarrollo Embrionario del corazón

El desarrollo embrionario normal del corazón tetracameral de aves y mamíferos, depende de manera importante de eventos previos como la especificación del mesodermo, en mesodermo esplácnico, después en mesodermo cardiogénico y más tarde, la morfogénesis de las cámaras cardíacas embrionarias, que sufrirán una remodelación hasta formar un corazón maduro. Este proceso para su estudio suele dividirse en dos periodos:

I. Premorfogenético en el que no existe la manifestación anatómica del órgano, solamente se observan poblaciones celulares con ubicación específica y capacidad cardiogénica.

II. Morfogenético en el que se manifiesta el corazón en diferentes etapas del desarrollo.

## V. 3.- Período Premorfogenético cardíaco.

La morfogénesis del corazón en un órgano maduro y funcional es un proceso complejo que requiere la integración paulatina de varias poblaciones celulares, que progresivamente se van añadiendo durante su desarrollo (Brand 2003).

La etapa más temprana del desarrollo cardiaco en que se han identificado células con capacidad cardiogénica en el embrión de pollo es en la blástula (E3HH). En esta etapa se descubrieron dos pre-aéreas cardiogénicas en el epiblasto a cada lado de la mitad posterior de la línea primitiva incipiente.

En 1969 Stalberg y De Haan empleando marcaje celular en pollo (E3HH-E4HH), descubrieron que las células con capacidad cardiogénica de las pre-áreas cardíacas, tienen un patrón de movimiento convergente hacia la línea media, ingresan a la línea primitiva y migran en sentido antero-lateral, organizándose en dos grupos opuestos de forma oval y originando las áreas cardiogénicas, a esta etapa se le llama gastrulación (E4HH). Estos grupos cardiogénicos están ubicados a cada lado de la línea primitiva, cuyo tercio anterior, se extiende por arriba del nodo de Hensen y se caracterizan por

ser células con capacidad para formar miocardio y endocardio, que en la actualidad se le conoce como el **primer campo cardiogénico**.

### V.3.1.-Especificación del mesodermo cardiogénico

En varias especies se ha observado, que el endodermo subyacente al mesodermo, es importante en la inducción de la diferenciación de mesodermo pre-cardíaco a células cardíacas, a través de la secreción de diversas proteínas como proteínas morfogénicas del hueso (BMP) y factores de crecimiento fibroblásticos (FGF), lo que ha sugerido que el endodermo es vital en la diferenciación cardíaca y en la especificación de los campos cardiogénicos (Nascone y Mercola 1995; Schultheiss *et al.*, 1995; Lough y Sugi 2000; Chen y Fishman 2000; Wei y Mikawa 2000; Waldo *et al.*, 2001; Katherine y Kirby 2002).

Por observaciones *in vivo*, se sabe que tanto BMP como FGF son necesarios en la inducción cardiogénica. Incluso se ha demostrado que en aves BMP2 promueve la expresión de los primeros factores de transcripción cardíacos como Nkx2.5, GATA4 y MEF2c. En concordancia con estos hallazgos, se descubrió que células del mesodermo no cardiogénico (E5HH a E7HH) a las que se les la administró, *in vitro* BMP2 y BMP4 se diferencian a miocardio, mientras que los antagonistas de BMPs, *Noggin* o *Codin*, inhiben completamente la inducción de la expresión de Nkx2.5 y la indiferenciación del mesodermo pre-cardíaco (Schuhheiss *et al.*, 1997; Katherine y Kirby 2002). Por su parte, el factor de crecimiento fibroblástico FGF-2, adicionado al medio de cultivo del explante de mesodermo pre-cardíaco, promovió la diferenciación de células contráctiles (Zhu *et al.*, 1996). Mientras que la inducción cardiogénica de las células del segundo campo cardíaco, parece ser controlada por FGF-8 y BMP-2 presentes en el tracto de salida embrionario (Wagner y Siddiqui 2007).

Nkx2.5 es homólogo de *tinman* en *Drosophila* y es esencial en la formación del corazón. En ratón Nkx2.5 es indispensable en el reclutamiento temprano de células al linaje cardíaco. La expresión de Nkx2.5 y  $\alpha$ -actina de musculo liso en el primer campo cardiogénico, constituye la primera marca molecular de la transformación al linaje miocárdico (Yatskievych *et al.*, 1997; Waldo *et al.* 2001). En ratón la mutación de Nkx-2.5, provoca defectos cardíacos y lleva a la muerte del embrión (Liberatore *et al.*, 2002). Además, varios estudios señalan que Nkx2.5 interfiere en la activación de otros factores de transcripción esenciales como GATA (Lints *et al.*, 1993; Schultheiss 1995).

Otro marcador temprano cardíaco e indispensable es MEF2C, que pertenece a la subfamilia del factor de transcripción MADS y se une a elementos ricos en AT en regiones reguladoras de numerosos genes musculares específicos. En el ratón es detectado cerca de los 7dpc poco después de la activación de Nkx2.5 y Gata. En *Drosophila* la inactivación del gen MEF2 produce la pérdida de la diferenciación de los tres linajes musculares, sin defecto aparente en la especificación de mioblastos y sugiere que esta proteína, participa en los procesos de diferenciación. En embriones de ratón, se ha observado que la pérdida de función del gen MEF2C, causa defectos cardíacos y vasculares que provocan letalidad a los 9dpc (Dodou *et al.*, 2004).

Una vez que se han formado las áreas cardiogénicas y se han expresado los primeros marcadores tempranos cardíacos, las células migran en sentido cefalomedial, sobre una matriz extracelular rica en fibronectina, hacia la región central y anterior del embrión; casi simultáneamente, el mesodermo lateral se separa, la capa que está en contacto directo con el endodermo y que corresponde al

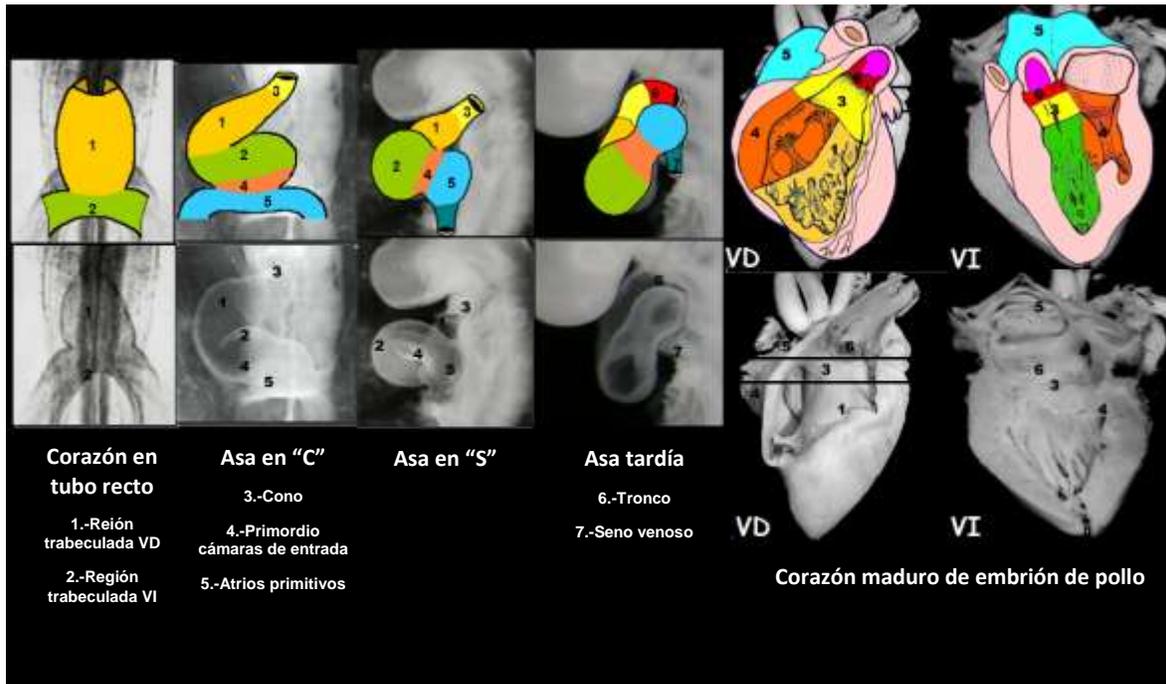
mesodermo espláncnico, formara la creciente cardiogénica, la cual mantiene la forma de una herradura ubicada en el extremo anterior de la placa neural (gástrula tardía E6HH). Después, el embrión se pliega ventralmente, dando como resultado la formación del pliegue neural y el intestino portal anterior. En la actualidad, es posible identificar la creciente cardiogénica mediante hibridación *in situ* de los transcritos Nkx 2.5, troponina C o la cadena pesada de miosina cardíaca. En aves, las células de la creciente cardiogénica, van formando dos tubos endocárdicos denominados primordios cardíacos primitivos derecho e izquierdo, los cuales debido al proceso de tabulación del embrión, se acercan y fusionan en la línea media ventral (Dodou *et al.*, 2004). Poco más tarde (E9HH), el disco embrionario comienza a plegarse en relación con el tubo neural en crecimiento (Wagner y Siddiki 2007) y los tubos endocárdicos quedan cubiertos de una capa delgada de miocardio, dando origen a un tubo mioendocárdico incompleto, cuya pared dorsal corresponde al intestino portal anterior al que se le denomina tubo cardíaco recto (Manasek 1968; Netter y van Mierop 1969). Este proceso marca el inicio de la etapa morfogenética del desarrollo del corazón.

#### V.4.-Periodo morfogenético cardíaco.

V.4.1.-Corazón en tubo recto. Clásicamente con base en la embriología descriptiva Davis (1927) propuso que en el corazón en tubo recto, estaban presentes todos los esbozos o primordios de las cavidades del órgano definitivo (cavidades cardíacas primitivas). Sin embargo, mediante el marcaje *in vivo* en el embrión del pollo, se demostró, que solo se manifiestan los primordios de las regiones trabeculadas ventriculares: la región trabeculada del ventrículo anatómicamente derecho, que se encuentra en la parte cefálica del tubo recto y la región trabeculada del ventrículo anatómicamente izquierdo, que se encuentra en la parte caudal del tubo recto (de la Cruz *et al.*, 1989; Anselmi y de la Cruz 1998). A continuación se van integrando al corazón, poblaciones celulares del mesodermo espláncnico del segundo campo cardiogénico (SFH), adyacente al extremo caudal y cefálico del tubo recto. Las células que se encuentran en posición cefálica antes de diferenciarse a miocardio comienzan a expresar Nkx2.5 y Gata4, los cuales promueven la transcripción de FGF-8 y BMP2 (Waldo *et al.* 2001). Durante la formación del corazón en tubo recto, se traducen las proteínas que antes se encontraban como transcritos como Nkx 2.5, troponina C, la cadena pesada de miosina cardíaca, factor natriurético atrial (ANF) y miosina de cadena ligera I.

V.4.2.- Etapa de asa en C. El proceso de torsión y plegamiento inicia cuando el tubo se elonga por la acumulación de nuevo miocardio en sus extremos caudal y cefálico proveniente del SFH, hasta tomar la forma de asa en C. Casi simultáneamente, el corazón de aves (E11HH) comienza a contraerse y a funcionar como una bomba peristáltica, a pesar de carecer de válvulas y sistema de conducción. Inicialmente se integran tres nuevos segmentos: en la parte caudal aparecen los atrios primitivos (Anselmi y de la Cruz 1998) y el primordio de las cámaras de entrada o región atrioventricular (de la Cruz *et al.*, 1991). En posición superior y en relación con los arcos faríngeos surge el cono o segmento proximal del tracto de salida embrionario, constituyendo en este momento el extremo más cefálico del tubo cardíaco (de la Cruz *et al.*, 1977; Arteaga y García Peláez 2013). (Fig.1).

V.4.3.- Etapa de asa en S (E14HH-E16HH). Caudalmente aparece el seno venoso y en el extremo cefálico del corazón se manifiesta el tronco o segmento distal del tracto de salida embrionario uniendo al cono con el saco aórtico. Al principio el tracto de salida embrionario, muestra una capa miocárdica compacta y una capa endocárdica (García Peláez y Arteaga 1993). De esta etapa en adelante, se va a llevar a cabo la transformación total de las estructuras embrionarias a estructuras anatómicas definitivas (Fig.1).

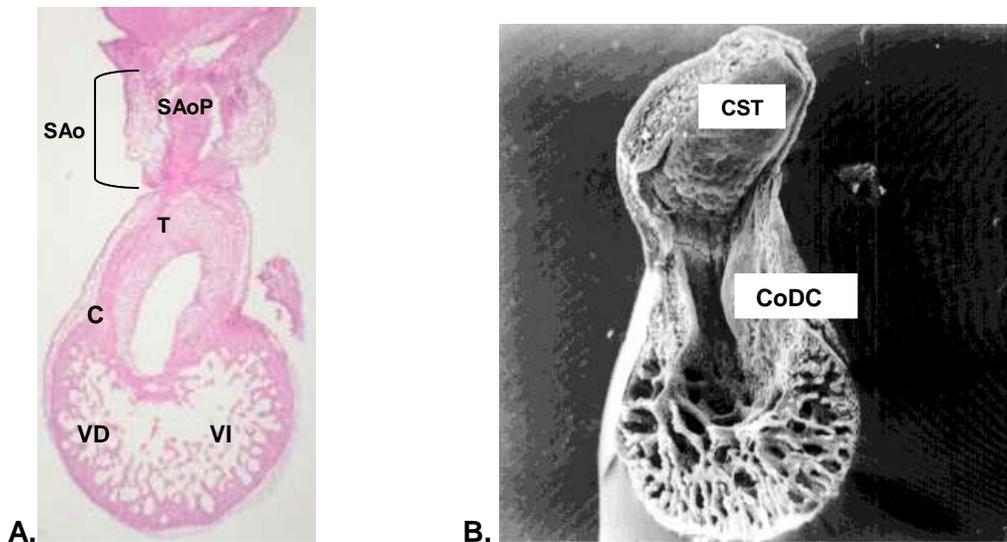


**Fig. 1. Morfogénesis Cardíaca.** Integración paulatina de poblaciones celulares hasta la formación de un corazón maduro en un modelo de corazón de embrión de pollo. VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo.

V.4.4.- Etapa de asa avanzada (E17HH-E18HH). El segmento más cefálico del corazón es el tronco que está en continuidad con el saco aórtico, ubicado dentro del mesénquima faríngeo. Mientras que el ventrículo, se caracteriza por su pared trabeculada (Sánchez Gómez *et al.*, 2005).

En esta etapa, se forma en el interior del tronco, cono y canal AV unos engrosamientos mesenquimales denominados crestas troncales (superior e inferior), cojines conales (dextrodorsal y sinistroventral) y cojines del canal atrio ventricular (AV) (superior e inferior); por un proceso de transformación endotelio-mesénquima (TEM) (García- Peláez *et al.*, 1984) (Fig.2.B).

Además entre el 4° y 6° par de arcos aórticos, se desarrolla el septum aórtico-pulmonar una cresta de forma semilunar que se acentúa progresivamente. Aproximadamente hacia el E22HH en el pollo, células provenientes de la cresta neural, ubicadas en el romboencéfalo posterior (rombómeros 6-8) migran y participan en la remodelación de los arcos faríngeos, invaden el saco aórtico y contribuyen con el mesénquima del septum aórtico-pulmonar (Waldo *et al.*, 1998). Se ha encontrado que estas células se expanden caudalmente, formando dos prolongaciones de mesénquima condensado que en un futuro participará en la formación de la arteria aorta y pulmonar (Todorovic *et al.* 2007) (Fig.2.A).



**Fig. 2. Corte Histológico y fotomicrografía electrónica del corazón de embrión de pollo de E26HH. A.** Corte Sagital mostrando el septum aórtico pulmonar (SAoP), el tronco (T) y el cono (C) que conforman el tracto de salida embrionario (OFT), ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI). De arriba abajo. Cortesía Pliego. **B.** Fotomicrografía electrónica donde se muestra la cresta superior del tronco (CST) y el cojín dextrodorsal del cono (CoDC). De arriba abajo. Cortesía Qayyum y colaboradores 2001.

V.4.5.- Estadio 24HH. El saco aórtico empieza a proyectarse hacia la cavidad pericárdica, en este momento el tracto de salida embrionario (OFT), es un conducto único constituido por tres regiones llamados cono, tronco y saco aórtico (Waldo *et al.*, 1998) (Fig. A). Este conducto conecta al ventrículo derecho en desarrollo con los arcos faríngeos. La pared del saco aórtico a diferencia del tronco y cono, no es miocardio y consta de fibroblastos, que forman un tejido mesenquimatoso compacto con poca matriz extracelular. En esta etapa aumentan las células fibroblásticas en las crestas del tronco; y aumenta la matriz extracelular y fibroblastos en los cojines del cono (Sánchez *et al.*, 2005).

En este momento comienza la septación del OFT con una remodelación del tronco y saco aórtico a la formación definitiva de dos vasos: el tronco de la aorta y el tronco de la pulmonar y la formación de cada una de las valvas semilunares (aortica y pulmonar); la remodelación del cono forma la cresta supraventricular y parte del VD; la remodelación del canal AV contribuirá al cierre de septum ventricular (Waldo *et al.*, 1998).

#### V.5.- Componentes embrionarios que participan en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares y troncos arteriales.

En la actualidad, es casi universalmente aceptado que los componentes embrionarios que participan en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares, válvulas arteriales y tronco de las grandes arterias son el saco aórtico, el canal atrio-ventricular, el tronco arterioso y el cono (los dos últimos derivados del segundo campo cardiogénico anterior). Sin embargo, la participación que tiene cada uno de estos esbozos embrionarios en la formación de las estructuras anatómicas maduras aún sigue en controversia.

**El saco aórtico.** Waldo y colaboradores (1998), han descrito que la división del saco aórtico por el septum aortopulmonar, induce la formación del canal aórtico y pulmonar; mientras que el mesénquima que forma al saco aórtico, originará las paredes de la base de la aorta ascendente y tronco de la pulmonar. No obstante otros autores suponen que el saco aórtico, solo participa en un pequeño segmento distal de los troncos arteriales (García-Peláez y Arteaga 1993), mientras que Anderson y colaboradores (2012) sugiere que participa en el desarrollo de ramas de la aorta y arteria pulmonar.

#### V.5.1.-Tronco arterioso o segmento distal del tracto de salida embrionario.

Algunos autores piensan que ambos tractos arteriales y las valvas sigmoideas provienen de la estructura embrionaria denominada tronco (Kramer 1942; Streeter 1942; De Vries y Saunders, 1962; Anderson *et al.*, 1974; Thompson y Firtzharris 1979; Steding y Seidl 1980). Sin embargo, una implicación de esta idea es que la capa miocárdica del tronco se convierte en células de músculo liso para formar la pared arterial o que de alguna manera, se retraen hacia la región del cono.

Otros autores sugieren que el tronco, no participa en la formación de la región proximal del tronco de las grandes arterias y sugieren por la evidencia encontrada, sus crestas compuestas por mesénquima, desarrollan las sigmoideas aórtica y pulmonar constituidas por tejido conectivo fibroso (Waldo *et al.*, 1998; Quayyum *et al.*, 2001; Sánchez Gómez *et al.*, 2005). Mientras que la pared miocárdica, externa por un proceso de transdiferenciación, se transforma en tejido conectivo fibroso (Arguello *et al.*, 1978) que da origen al anillo de inserción de las sigmoideas y al tejido que las rodea externamente.

#### V.5.2.- El cono o segmento proximal del tracto de salida embrionario.

Hasta hace poco tiempo, se pensaba, que la pared anterior del cono era el único que daba origen a la cámara de salida del VD y que la pared posterior se transformaba en el tracto de salida del VI (de la Cruz *et al.*, 1977). Ahora por marcaje *in vivo*, en el pollo se demostró que toda la pared externa del cono da origen a estructuras anatómicas del VD y estructuras relacionadas (Rana *et al.*, 2007; Lazzarini 2011). Respecto a las crestas del cono, compuestas por mesénquima, participan en el desarrollo del tabique que separa ambos tractos de salida ventriculares y en la formación de la cresta supraventricular (Arteaga *et al.*, 1987) que corresponde al límite ventricular del tracto de salida del VD. Por otro lado mediante marcaje *in vivo*, del cojín ventro-superior del canal AV y su rastreo hasta formar un corazón maduro, se descubrió que dicho cojín origina tanto la pared fibrosa (continuidad mitro-aórtica) como la muscular del tracto de salida del ventrículo izquierdo (de la Cruz *et al.*, 1983).

Es difícil de entender la formación del tracto de salida embrionario por varias razones. En primer lugar, los tejidos que conforman el tracto de salida embrionario son derivados de diferentes fuentes. El miocardio y parte del endotelio, provienen del mesénquima del segundo campo cardiogénico; otra parte migra de regiones no cardiogénicas provenientes de la cresta neural (Waldo *et al.*, 1998; Jian *et al.*, 2000). Diferentes autores, han tratado de mapear la zona, con diferentes marcadores, pero el principal problema radica en que varias de estas moléculas, no son específicas y se expresan en el segundo y en el primer campo cardiogénico, lo que lleva a conclusiones erróneas del destino final de las estructuras embrionarias (Webb *et al.*, 2003).

En segundo lugar, se les ha dado diferente nombre a las regiones del tracto de salida embrionario debido, al rápido cambio morfológico durante el desarrollo y estos mismos términos, han sido empleados indiscriminadamente en diferentes regiones y viceversa (Waldo *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 2003). En tercer lugar, no hay un consenso en el número de cojines o crestas que se encuentran dividiendo el tracto de salida embrionario, ni su patrón de fusión. Estos son algunos de los problemas a los que se enfrentan al tratar de llegar a un conceso, de los límites de los componentes embrionarios.

Se sabe que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) está relacionado en el desarrollo cardíaco normal, en la formación de cojines cardíacos y la remodelación del tracto de salida embrionario y la falta del TGF- $\beta$  lleva a la muerte del embrión en estadios tempranos del desarrollo cardíaco (Azhar *et al.*, 2009, Arthur y Bamforth 2011).

#### V.6.- Importancia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) en el desarrollo cardíaco

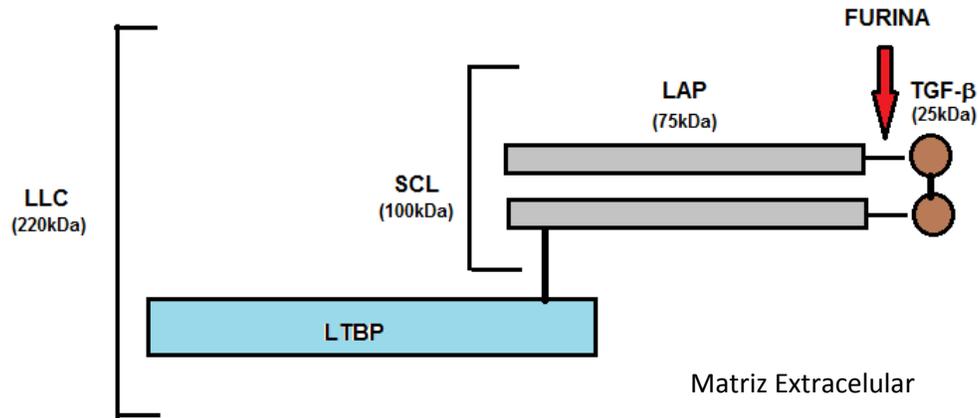
El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) es una citocina pleiotrópica, esencial en varios procesos biológicos, durante el desarrollo embrionario, en la inhibición del crecimiento epitelial, en el sistema inmune, en la hematopoyesis, en la síntesis de matriz extracelular (MEC), entre otros. La desregulación de la señalización de TGF- $\beta$ , está asociada a diferentes patologías, como enfermedades autoinmunes e inflamatorias, fibrosis y cáncer (Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004). La familia de TGF- $\beta$  es un grupo muy grande de proteínas multifuncionales, comprende más de 60 diferentes proteínas identificadas en diferentes organismos, entre las que se encuentran las activinas e inhibinas, las proteínas formadoras del hueso (BMPs), los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la sustancia inhibidora Muleriana (MIS) y los factores neurotróficos derivados de la glía (GDNFs) (Massague y Chen 2000; Horiguchi *et al.*, 2012; Leight *et al.*, 2012).

La diversidad funcional de TGF- $\beta$  es atribuida a varias características de su biología: existen tres diferentes isoformas (1, 2 y 3) y todas son secretadas en un estado de latencia. Existen dos formas de latencia:

El TGF- $\beta$  latente puede ser unido a LTBP (proteína de unión a TGF- $\beta$  latente; isoformas LTBP1, LTBP2, LTBP3 y LTBP4) que a su vez se une covalentemente por un enlace disulfuro a LAP (proteína asociada a la latencia), formando un complejo grande latente (LLC, 220kDa) (Nakajima *et al.*, 2000). Las isoformas LTBP1 y LTBP3 se unen eficientemente a las tres isoformas TGF- $\beta$  y LAP; mientras que LTBP4 se une solo a TGF- $\beta$ 1-LAP y la isoforma LTBP2 no se une a LAP. Aunque las LTBP no son requeridas para la latencia de TGF- $\beta$ , se ha reportado que facilitan su secreción, almacenamiento, localización en la MEC y activación del complejo TGF- $\beta$ -LAP (Massagué y Ye-Guang Chen 2000; Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004; Horiguchi *et al.*, 2012). (Fig.3)

El TGF- $\beta$  latente se puede unir solo a LAP y formar un pequeño complejo dimérico latente (SLC, 392 aminoácidos). La habilidad de LAP para conferir latencia, consiste en evitar la unión del TGF- $\beta$  secretado, a sus receptores; y además asegurar un reservorio extracelular de TGF- $\beta$ . La síntesis y secreción de TGF- $\beta$  maduro latente conlleva a una modificación pos-transcripcional por un

procesamiento proteolítico en el sitio RXXR del extremo carboxilo, que es cortado por la endoproteasa furina. Sin embargo, el dominio biológicamente activo es de 112 aminoácidos (el TGF- $\beta$  maduro) y permanece asociado de manera no covalente a su precursor LAP (Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004).



**Figura. 3. TGF- $\beta$  latente.** El LLC (complejo latente grande), está formado por el TGF- $\beta$  (café), LAP (proteína asociada a la latencia) y LTBP (proteína de unión al TGF- $\beta$  latente). Se indica el sitio de corte de la furina. Tomado de Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004.

En la MEC por estudios *in vivo*, se han identificado diversos mecanismos de activación de reservas del TGF- $\beta$ , siendo claves en la regulación de la concentración local del TGF- $\beta$  activo, entre los que destacan proteasas, trombospondina-1, plasmina, especies reactivas de oxígeno, metaloproteinasas de matriz 2 (MMP2) e integrinas; mientras que la decorina y fibromodulina se unen y secuestran el TGF- $\beta$  libre (Nakajima *et al.*, 2000; Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004; Horiguchi *et al.*, 2012).

Una vez libre el TGF- $\beta$  activo, puede ser traslocado hacia sus receptores que se encuentran en la superficie celular y comenzar la compleja cascada de señalización, que incluye una ruta canónica Smad y varias rutas no canónicas. La señalización de las tres isoformas de TGF- $\beta$  son mediadas por un solo receptor tipo II (5 variantes; T $\beta$ R-II) y un receptor tipo I (7 variantes; T $\beta$ RI, ALK1, ALK2, ALK5) capaces de responder a TGF- $\beta$ . Una de las diferencias entre los dos receptores, es que el tipo II es una cinasa constitutivamente activada, mientras que el receptor I es activado por el receptor II por medio de una fosforilación y en respuesta a la unión del ligando a ambos receptores. El betaglicano y la endoglina son proteínas que se encuentran en la superficie celular, las cuales en ciertos tipos celulares, son consideradas correceptores, aunque no tienen un dominio cinasa intracelular, se acoplan a TGF- $\beta$  y pueden regular el acceso a sus receptores (Horiguchi *et al.*, 2012; Azhar *et al.*, 2011).

La señalización canónica de TGF- $\beta$  comienza en la membrana plasmática, cuando se une a su receptor tipo II, permitiendo que el ligando pueda interactuar con el receptor tipo I formándose un complejo heterotetramérico. Cuando esto ocurre, el receptor T $\beta$ RII transfosforila al receptor tipo I en el dominio GS (rico en glicinas y serinas), que se encuentra cerca de la región transmembranal. Esta fosforilación permite que ALK5 se active y pueda transmitir las señales del TGF- $\beta$ , al interior

de la célula activando proteínas R-Smad (activadas por el receptor; Smad 2 o 3). La proteína SARA (anclaje de las Smads para la activación del receptor), favorece que las proteínas citoplasmáticas R-Smads interaccionen con el dominio de cinasa del receptor I, ocurriendo la fosforilación de los dos últimos residuos de serina del motivo SSXS, localizados en su extremo terminal, una vez activadas las R-Smads disminuye su afinidad por SARA, se disocian del receptor y forman un complejo con Smad4 que es translocado hacia el núcleo, donde funciona como coactivador transcripcional regulando la transcripción de varios genes (Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004).

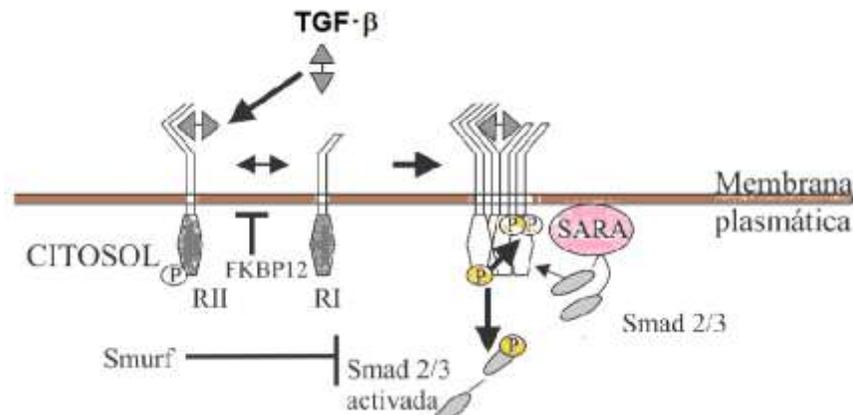


Fig. 4. Vía de señalización de TGF-β. Tomado de Sosa-Garrocho y Macias-Silva 2004.

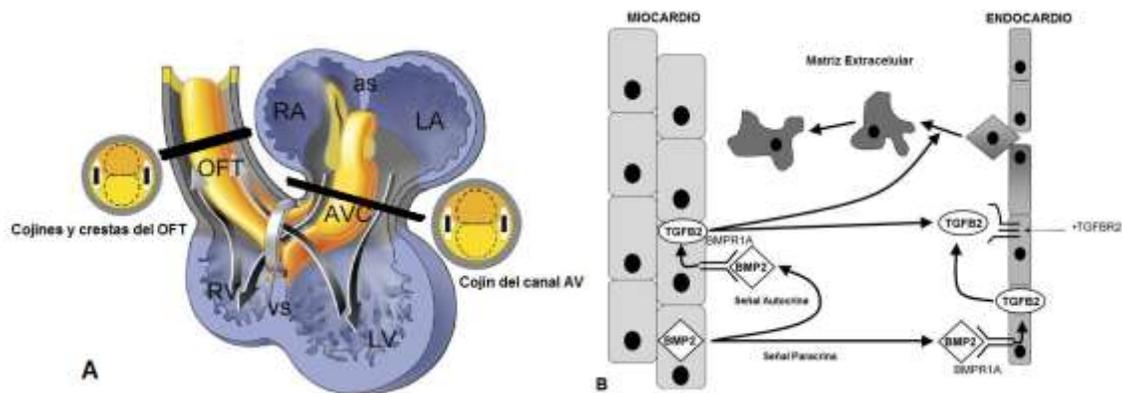
En el desarrollo embrionario es de suma importancia la expresión de las diferentes isoformas de TGF-β. En ratones nulos para TGF-β1, se observan severos defectos cardíacos con valvas atrio-ventriculares desorganizadas. En ratones nulos para TGF-β2 lleva a la mortalidad perinatal, por defectos cardíacos en la septación ventricular y agrandamiento de los cojines AV, que se encuentran asociadas con doble salida del ventrículo derecho. Cuando TGF-β2, se encuentra inactivo, se presentan alteraciones graves, debido a que la transformación epitelio mesénquima (TEM) se detiene al inicio de la formación de los cojines endocárdicos, no hay migración de las células provenientes de la cresta neural y además, se presenta un patrón anómalo de muerte celular (apoptosis) en el cuarto arco faríngeo, que se observa como una interrupción del arco aórtico. Los ratones nulos para TGF-β3 muestran defectos relativamente menos graves, como hipoplasia de las paredes ventriculares y alteraciones menores en la posición y curvatura de la vena aórtica (Arthur y Bamforth 2011).

En la última etapa hacia la transformación del tracto de salida, los procesos morfogénéticos que subyacen en el corazón, están parcialmente caracterizados, como es el caso de la formación de cojines por TEM, miocardización y la proliferación miocárdica y en todos estos procesos parece ser muy importante la expresión de TGF-β.

La TEM es un proceso indispensable para la formación del tejido mesenquimal de las crestas del cono, en aves comienza hacia el E15HH y culmina hacia E24HH (Azhar *et al.*, 2011).

### V.7.-Modelo del desarrollo de cojines y crestas endocárdicas.

En el desarrollo embrionario de pollo hacia E10HH al E14HH el cono y el tronco forman un tubo cardíaco continuo, cubierto por una capa externa miocárdica y otra capa interna endocárdica, separadas una de la otra por una capa acelular llamada MEC (Bernake y Markwald 1979; Yoshimatsu y Watabe 2011). Hacia el E15HH al E22HH comienza progresivamente la transformación del endocardio a células con fenotipo migratorio mesenquimatoso y hacia el E17HH comienza la invasión de células del mesénquima a la MEC que recubre al tronco, cono y canal AV dando origen a los cojines o crestas cardíacas (Barnett y Desgrosellier 2003; Sánchez *et al.*, 2005). (Fig.5A y B).



**Fig. 5. Representación de los cojines del tracto de salida embrionario (OFT) y canal AV (AVC). Cascadas de señalización en la TEM. A.** Líneas diagonales (negro) en el OFT y de AVC indican corte a nivel de cojines; Abreviaturas: atrio izquierdo y derecho (LA, RA); ventrículo izquierdo y derecho (LV, RV); septum ventricular (VS); septum atrial (AS). **B.-** Durante la formación del cojín del canal AV las células del endocardio adquieren un fenotipo mesenquimatoso, por la influencia del miocardio adyacente y la matriz extracelular es invadida por células mesenquimatosas. Esta transformación es inducida por BMP que tienen efecto en el endocardio. La señalización paracrina y autocrina de BMP son transmitidos a través de su receptor 1A (BMPR1). La señalización autocrina de BMP induce la producción de TGF- $\beta$ 2 en el miocardio y endocardio. Tomado van Wijk *et al.*, 2007.

Similar a las transformaciones epitelio mesénquima que ocurren en otros tejidos, la formación de cojines endocárdicos en el corazón embrionario, es un proceso específico con modificaciones biológicas y bioquímicas donde las células del endocardio adquieren un fenotipo mesenquimatoso, bajo la influencia inductiva del miocardio adyacente (Ramsdell y Markwald 1997). Los signos morfológicos tempranos de la TEM, incluye pérdida de la polaridad apical/basolateral y de uniones intracelulares adhesivas; cambio en la forma celular del endocardio, formando células alargadas tipo fibroblasto, que posteriormente migraran y comenzaran la síntesis MEC (Ramsdell y Markwald 1997; Yoshimatsu y Watabe 2011). Esto está relacionado con la pérdida de expresión de proteínas marcadoras de adhesividad en células epiteliales, como claudina 1 y VE-cadherina y un aumento de marcadores mesenquimatosos como N-caderina,  $\alpha$ -actina de músculo liso, vimentina, proteína específica fibroblástica 1, fibronectina, colágena y el factor de transcripción Snail (Nakajima *et al.*, 2000; Carver *et al.*, 2001).

Por los estudios en explantes de embriones de pollo en matrices de colágena, se sabe que la TEM es restringida al OFT y canal AV, donde las células endocárdicas, sufren cambios estructurales para

formar células migratorias mesenquimales (Bernanke y Markwald 1982). La formación de los cojines cardíacos en el pollo comienza aproximadamente E16HH-E24HH y en el ratón a los 9.5dpc-11dpc (Boyer *et al.*, 1999). Hay varios factores de transcripción que juegan un papel importante en la TEM, sin embargo, es esencial TGF- $\beta$  en la transformación de las células mesenquimatosas, migración y regulación de la deposición de los componentes de la MEC (Nakajima *et al.*, 2000; Butcher y Markwald 2007). En el tejido cardíaco de pollo y ratón, se han identificado un patrón diferente de las tres isoformas de TGF- $\beta$  antes, durante y al final de la TEM (Camenisch *et al.*, 2002; Azhar *et al.*, 2009).

En el corazón de embrión de pollo el ARNm de TGF- $\beta$ 2, se encuentra más abundante en el ventrículo que en el canal AV; mientras que el ARNm de TGF- $\beta$ 3, se encuentra concentrado 5 veces más en células endocárdicas del canal AV y OFT (E16HH-E17HH), que en los ventrículos; además hay una acumulación de este transcrito, en los cojines AV en el estadio E15HH (Vincent *et al.*, 1998; Potts *et al.*, 1992; Azhar *et al.*, 2009). Estudios con oligodesoxinucleótidos modificados antisense de ARNm de TGF- $\beta$  en el canal AV, se encontró que TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 tienen poco efecto en la TEM, sin embargo la reducción del ARNm de TGF- $\beta$ 3 bloquea la invasión de las células mesenquimatosas a los cojines endocárdicos (Potts *et al.*, 1992).

Lo anterior es apoyado, por los estudios de Ramsdell y Markwald (1997); Boyer y colaboradores (1999), quienes evaluaron la TEM del canal AV en el pollo, utilizando un anticuerpo para TGF- $\beta$ 2 y un anticuerpo monoclonal para TGF- $\beta$ 3; encontrando expresado a TGF- $\beta$ 2 en el miocardio y endotelio antes de la TEM (E14HH); y posterior a la TEM (E19HH) con un aumento en el área ventricular. Por otro lado se encontró la expresión del ARNm de TGF- $\beta$ 3, restringida al miocardio en el E14HH y E19HH y nula expresión en el endocardio. Hacia el E17HH se encontró el ARNm y la proteína de TGF- $\beta$ 3 en endocardio, células mesenquimatosas y miocardio del canal AV. Además se encontró que en los explantes de cojín AV, el bloqueo de TGF- $\beta$ 2 y la eliminación del tejido miocárdico en el E14HH (antes de TEM), inhiben la separación célula-célula y estas células mantienen sus características de endocardio, aun cuando se dejará el miocardio en el cultivo. Al bloquear TGF- $\beta$ 3 y al retirar el miocardio en el E14HH tiene nulo efecto en el proceso de la separación célula-célula del endocardio, sin embargo, la inhibición de TGF- $\beta$ 3 en el E16HH (durante la TEM) inhibe la formación de células mesenquimales. Todos estos datos sugieren que las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 tienen un papel diferente en la TEM en el corazón de embrión de pollo.

De igual forma los receptores de Tgfbr1 y Tgfbr2 juegan un papel importante en el desarrollo del corazón, siendo esenciales en la embriogénesis y la eliminación de cualquier receptor lleva a la muerte del embrión (Choudhary *et al.*, 2006; Arthur y Bamforth 2011).

En las células de endotelio es esencial Tgfbr1 y Tgfbr2, en los ratones knockout Tgfbr1 lleva a la reducción severa de las células mesenquimatosas de los cojines del canal AV a los 10-11dpc y posteriormente mueren los embriones a los 13dpc. En ratones knockout Tgfbr2 el embrión muere a los 11.5dpc, dos días antes que el knockout de Tgfbr1 y parece ser que la TEM ocurre con normalidad en los cojines del canal AV, sin embargo a los 11.5dpc, se detecta una baja celularidad en el cojín inferior del canal AV, consistente con los defectos en la proliferación de las células

mesenquimatosas. Una pequeña proporción de estos mutantes sobreviven hasta 12.5dpc, observándose una septación ventricular retrasada (Nakajima *et al.*, 2000; Arthur y Bamforth 2011).

Por otro lado, se sabe que los dos co-receptores TGF- $\beta$  (endoglina y betaglicano) juegan un papel importante en corazones de embriones de pollo en la TEM del canal AV y del OFT. La endoglina por su parte se encuentra expresada en las células endocárdicas y en las células mesenquimatosas de los cojines cardíacos; mientras que el betaglicano, es expresado en el miocardio durante la cardiogénesis (Arthur y Bamforth 2011).

La endoglina es una glicoproteína de superficie celular que forma complejo con TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, pero tiene muy baja afinidad por TGF- $\beta$ 2. En trabajos de Bourdeau y colaboradores (1999) en ratones nulos para endoglina (End-/-), se encontró, que los embriones mueren a los 10-10.5dpc afectados principalmente por defectos en los vasos sanguíneos y en el desarrollo cardíaco. Respecto al desarrollo cardíaco, se encontró que a los 9.0dpc en el canal AV no se detectan células mesenquimatosas y no hay formación de cojines cardíacos, lo que sugiere la falla en la TEM. A los 10.5dpc el corazón deja de latir y se encuentra una extensiva necrosis.

Examinando la expresión de la endoglina en aves, se encontró expresada en el miocardio y endocardio hacia E10HH, posteriormente hacia el E14HH-E15HH la expresión se reduce confirmado por western blot y hacia el E20HH solo se observa en el canal AV y OFT, que coincide con la producción de mesénquima en los cojines cardíacos, además este patrón es similar a la expresión de TGF- $\beta$ 3 (Vincent *et al.*, 1998; Mercado-Pimentel *et al.*, 2007). Se ha visto que la endoglina interacciona con el receptor TGFBR1, conocido en células endoteliales como receptor de activina cinasa 5 (ALK5). La activación Alk5 inhibe la migración y proliferación de células endoteliales (Mercado-Pimentel *et al.*, 2007). Relacionado con lo anterior los trabajos de Li y colaboradores (2000) usando oligodesoxinucleótidos antisentido (bloqueadores de la traducción) de endoglina en cultivos de células endoteliales umbilicales de humano (HUVECs), encontraron que cuando se bloquea la expresión de la proteína endoglina en las HUVECs, hay un aumento en la proliferación y además aumento en la migración celular. Lo que podría sugerir el papel que juega la endoglina en la TEM.

También se sabe que el receptor tipo III (Tgfr3) o betaglicano juega un papel importante en la TEM. Este receptor se une a todas las isoformas del TGF- $\beta$ , pero puede jugar un papel selectivo, al facilitar la interacción de TGF- $\beta$ 2 con el receptor Tgfr1 y Tgfr2. Se ha observado que las células sin betaglicano, no responden a la señal de TGF- $\beta$ 2 como en el caso de células endoteliales, mioblastos de músculo esquelético y progenitores hematopoyéticos; además la expresión forzada de betaglicano en estas células, aumenta la unión de TGF- $\beta$ 2 a los receptores (Massagué y Ye-Guang Chen 2000; Vincent *et al.*, 1998).

Para investigar el rol de betaglicano, en el corazón se utilizaron explantes de pollo del canal AV durante la TEM y el antisuero policlonal del dominio extracelular de betaglicano. Primero se probó la especificidad del antisuero y posteriormente, se realizó la inmunolocalización de betaglicano, encontrándolo en células endocárdicas que recubren el cojín del canal AV y en un conjunto de células migratorias mesenquimatosas. Para determinar el rol funcional de betaglicano en la TEM, se

probó la adición de antisuero en explantes del canal AV en geles de colágena de E14HH, E16HH y E18HH. Se observó que en los explantes controles, las células endocárdicas forman una monocapa, posteriormente invaden la matriz y subsecuentemente la migración constituyendo la TEM. En las células endocárdicas incubadas con el antisuero, se encontraban pocas células mesenquimatosas y una abundante cantidad de células endocárdicas poligonales. En el 70% de los casos la formación del mesénquima disminuye. En el E18HH se encuentra un decremento del 50% en la migración celular en la matriz de colágena. Para determinar, si la expresión de betaglicano es suficiente para conferir la transformación de las células endoteliales, se transfectaron células endoteliales ventriculares, que previamente se sabe que expresan Tgfr1, Tgfr2 pero no betaglicano. Se identificaron las células infectadas con el retrovirus y se evaluó si tenían, una morfología endotelial o mesenquimal. En la transfección con TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2, no se observa algún cambio en la morfología celular, sin embargo la transfección con betaglicano y TGF- $\beta$ 2, hay un incremento dramático en el porcentaje de células mesenquimatosas. Se usa TGF- $\beta$ 2 como vehículo debido a que se sabe que por sí solo no favorece la TEM ventricular (Brown *et al.*, 1999). Estos hallazgos sugieren que el betaglicano podría influir en el futuro del endocardio formando células competentes para responder a TGF- $\beta$ 2 (Massagué y Ye-Guang Chen 2000; Vincent *et al.*, 1998).

Además para que se dé un cambio de fenotipo de endocardio a células migratorias, varios estudios señalan que es de suma importancia la deposición de MEC, dentro de la membrana basal del miocardio. La MEC es un reservorio de TGF- $\beta$ , por microscopía confocal se ha detectado que está constituida por varias proteínas de matriz como fibronectina, laminina, proteoglicanos, colágena tipo IV y I, fibulina, ácido hialurónico (HA) (Hurle *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 2000; Azhar *et al.*, 2011).

Antes se creía que la MEC no tenía importancia, sin embargo actualmente se ha estudiado el papel que juega en enfermedades como cáncer y la metástasis. Se descubrió que cambios en la rigidez de la MEC, pueden regular muchas funciones celulares como la maduración de adhesiones focales, división celular, formación de fibras de actina y motilidad celular; los cambios en la elasticidad, regulan la diferenciación de varios tipos celulares como células mesenquimatosas, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales; y además regula otras funciones celulares, tales como la proliferación, apoptosis y migración (Leight *et al.*, 2012). Se ha reportado que la elasticidad de la MEC, está implicada en la modulación de la activación de TGF- $\beta$  y que a su vez, TGF- $\beta$  puede inducir la síntesis de MEC. Estudios *in vitro*, sugieren que TGF- $\beta$  incrementa la actividad de promotores de colágena tipo I, fibronectina y proteoglicanos. Mientras que la inhibición de TGF- $\beta$ , provoca decremento en la secreción de metaloproteinasas (MMPs, degradadoras de macromoléculas como colágena y proteoglucanos) e incremento de inhibidores de metaloproteinasas de la MEC (TIMPs) (Heine *et al.*, 1987; Horiguchi *et al.*, 2012).

Un componente importante de la MEC y de los cojines endocárdicos es el HA glucosaminoglicano que posee la habilidad de inducir señalización celular (Butcher y Markwald 2007). El HA es el único glucosaminoglicano, abundante durante la formación de cojines cardíacos, se ha reportado que durante la remodelación de las valvas sus niveles decrecen (Azhar *et al.*, 2011). Estudios de Camenisch y colaboradores (2002) identificaron a la enzima ácido hialurónico sintetasa 2 (Has2) una de las principales enzimas para la producción del HA. En el ratón la expresión de Has2 es

prominente en los cojines endocárdicos del canal AV y en OFT. La ausencia de Has2, lleva a la mortalidad por aparente falla cardíaca a los 9.5dpc con edema pericardial, nulo desarrollo de las crestas del OFT, de las trabéculas del ventrículo derecho y de la MEC. Para corroborar lo anterior, se utilizaron explantes Has2 -/- del canal AV en matrices de colágena para ver el efecto en la TEM y se encontró falla en la migración, transformación e invasión endotelial. Cuando se adiciona HA producido por el explante control, induce en el explante Has2-/- la TEM. A su vez cuando al explante control, se le adiciona hialuronidasa (enzima degradante del HA), se inhibe la transformación de células endoteliales e invasión a la matriz de colágeno. Estos resultados sugieren que el HA es un importante componente en la migración, transformación e invasión del endocardio.

Además se ha encontrado una relación del TGFb2 con HA, en ratones TGFb2 -/- se ve afectada la regulación de la MEC y en particular la producción del HA, provocando un aumento en volumen o tamaño de los cojines endocárdicos (Azhar *et al.*, 2011). La señalización de TGF- $\beta$  juega un importante papel en la formación de los cojines cardíacos, pero también es indispensable en los diferentes procesos morfogenéticos, posteriores como la septación del OFT y remodelación del tracto de salida (Arthur y Bamforth 2011).

#### V.8.- Miocardización y Proliferación miocárdica

Actualmente la miocardización del cono comienza hacia el E28HH y culmina hacia E38HH en el pollo. Este proceso comienza cuando los dos cojines endocárdicos del cono, se fusionan y se incorporan al componente ventricular muscular, que en un futuro originará la cresta supraventricular. Los cojines están formados por mesénquima, que es remplazado por cardiomiocitos y a este proceso se le llama miocardización. El grupo de van den Hoffman y colaboradores (1999) describieron este proceso en embriones de pollo, primero tiñeron todas las células miocárdicas del OFT (desde la región trabeculada VD hasta el límite superior, donde se bifurcan el saco aórtico y los arcos faríngeos), usando como marcaje miosina de cadena pesada (MF20), encontrando que hacia el E24HH las crestas del OFT están completamente llenas de células mesenquimatosas, en el E28HH las células miocárdicas, que flanquean las crestas endocárdicas comienzan a formar células alargadas adyacente al mesénquima, hacia el borde mas distal del OFT. En el E30HH y en estadios posteriores, los cardiomiocitos invaden el mesénquima de los cojines endocardiales. A medida que avanza el desarrollo, quedan dispuestos en una red, mezclada con mesénquima de las crestas. Este proceso se completa alrededor del E38HH cuando el septum interventricular primero formado por mesénquima se convierte en miocardio.

Las observaciones anteriores llevaron a los autores a sugerir una transformación del mesénquima de las crestas conales a miocardio. Para probar esto, se extrajo el OFT de embriones de E16HH-E30HH, exponiendo el endocardio en un gel de colágena, después de una semana se hizo una tinción inmunohistoquímica de MF20. En la mayoría de los cultivos de OFT del E16HH-E20HH, se encontraron superficies lisas y sin presencia de miocardio. Desde el E21HH-E31HH se encontraron protuberancias de miocardio que formaban redes extensas en el gel de colágeno.

Por otro lado, se observó que en E21HH el miocardio del OFT, se extiende hasta la bifurcación de los arcos faríngeos, mientras que hacia el E26HH el componente de miocardio se extiende solo hasta la mitad del OFT (cono o parte proximal). Para determinar que la formación de miocardio fuera intrínseca de la parte proximal del OFT, se prepararon tres cultivos de ápices de ventrículo, de

tronco y de cono; en el primer y segundo cultivo nunca se observó miocardización, mientras, que en el explante del cono, se observó miocardización. Sin embargo era en una menor extensión, en comparación con explantes completos que contenían todo el OFT. Estos resultados sugirieron que el mesénquima de la porción distal (tronco) del OFT, secretaba señales estimuladoras de la miocardización del cono. Para determinar esto, se realizaron cultivos, por separado del segmento conal y de un explante que contenía tronco y cono; observando que había una menor miocardización en el explante del cono, que cuando los explantes contenían tronco y cono. Esta observación sugirió que el mesénquima del tronco, secretaba factores en el medio que estimulaban la miocardización del cono.

Se ha sugerido que en el proceso de miocardización está implicado TGF- $\beta$ . Molin y colaboradores (2003) rastrearon por hibridación *in situ*, en ratón las isoformas de TGF- $\beta$ , durante el periodo morfogénico del corazón embrionario (9.5-15.5dpc), encontrando el ARNm de TGF- $\beta$ 2 presente en el miocardio del tracto de salida desde los 12.5dpc en adelante. En estadios posteriores a la miocardización TGF- $\beta$ 2, continúa expresándose en el mesénquima residual, localizado a nivel de la valva aortica. Esto correlaciona con los resultados obtenidos por Sanford y colaboradores (1997) con ratones knockout de TGF- $\beta$ 2, donde encuentran una incompleta miocardialización del tracto de salida, que da como origen a la patología conocida como tronco arterial común.

El crecimiento y desarrollo ventricular en mamíferos durante el periodo fetal y neonatal es dependiente en gran medida de cambios que ocurren en la población de cardiomiocitos (Engelmann *et al.*, 1992). En modelos animales como pollo y rata la proliferación miocárdica, se detiene poco después del nacimiento, sin embargo, se reporta un incremento del tamaño celular (Akhurst *et al.*, 1990; Engelmann *et al.*, 1992; Sedmera y Thompson 2011). A TGF- $\beta$  se le relaciona con la proliferación y crecimiento celular, y en dos vías principales: TAK1-MKK3/6-p38/JNK y la vía dependiente de SMADS (Monzen *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Monzen *et al.*, 2001).

#### V.9.-microRNAs (miRNAs)

Parcialmente se conocen los procesos morfogénicos que participan en el desarrollo de las estructuras anatómicas maduras del corazón, sin embargo las redes moleculares que subyacen a estos procesos siguen sin ser esclarecidos. Hace muy poco se encontró que ARNs no codificantes de secuencias pequeñas, denominados microRNAs (miRNAs), eran de importancia biológica en animales y plantas. Los miRNAs han sido en la última década, las moléculas más estudiadas, ya que se sabe que modulan la expresión génica (sub o sobreexpresión), tanto en la progresión de enfermedades como cáncer; y en procesos normales como la embriogénesis y desarrollo temprano de nematodos, insectos, peces y mamíferos (Álvarez-García y Miska 2005; Kloosterman y Plasterk 2006; Inui *et al.*, 2010).

El primer miRNA descubierto en 1993 fue lin-4 que participa en el desarrollo del nematodo *C. elegans*. Más tarde, hacia el año 2000, se empezaron a descubrir miRNAs pequeños con secuencias altamente conservadas, como la familia de Let7. En la actualidad, mediante predicciones computacionales, procedimientos experimentales o estrategias combinadas, se han descrito cientos de miRNAs en diversas especies desde gusanos, moscas, peces, virus, ranas, plantas hasta mamíferos, incluyendo humanos (Álvarez-García y Miska 2005; Takada *et al.*, 2006).

## V.10.- Biogénesis de microRNAs

Los microRNAs son secuencias pequeñas de ARN no codificante de cadena sencilla (ssRNAs), su secuencia madura tiene un tamaño promedio de 19-25 nucleótidos. Los miRNAs modulan la expresión génica, mediante el apareamiento de una secuencia semilla del microRNA (2-8 nucleótidos en 5') con una secuencia complementaria ARNm blanco en la región 3'UTR, lo que conduce a la escisión del ARNm y a la represión de la traducción, induciendo su degradación (Kloosterman y Plasterk 2006; Inui *et al.*, 2010; Meister y Schmidt 2010). Los miRNAs y sus blancos forman complejas redes de regulación, por ejemplo un solo microRNA se puede unir a diferentes blancos de ARNm ó varios y diferentes microRNAs se pueden unir en el control de un único blanco ARNm (Kim 2005). Recientemente se ha estudiado la ausencia o pérdida de función de microRNAs en mutantes para investigar el rol biológico particularmente en embriogénesis y desarrollo temprano (Álvarez-García y Miska 2005).

La mayoría de microRNAs están codificados en regiones intergénicas y se pueden encontrar en intrones y exones. La ruta de síntesis de miRNA comienza en el núcleo donde los microRNAs inmaduros son transcritos por la RNA polimerasa II y subsecuentemente se adiciona CAP (Figura 5). Estas moléculas además de ser poliadeniladas, sufren un proceso de corte y empalme. Resultando un pri-miRNA de 70-100 nucleótidos de largo, con forma de tallo-asa, que será reconocida por la proteína nuclear Drosha (Kim 2005; Meister y Schmidt 2010).

Drosha es una proteína de  $\approx 16\text{kDa}$ , muy conservada en animales. Contiene dos dominios RNAasa III (RIIDs) y un dominio de unión a la cadena doble de ARN (dsRBD) cruciales para la catálisis. La región central de la proteína adyacente a RIIDs es esencial para el procesamiento de los pri-miRNAs. En humanos Drosha forma un complejo grande  $\approx 650\text{kDa}$  conocido como microprocesador (Loohuis *et al.*, 2012; Kim 2005).

En los análisis de secuencias con mutaciones, se ha observado que Drosha reconoce a los pri-miRNAs por su estructura terciaria, las dobles cadenas alrededor del sitio de corte y el largo del asa terminal ( $>10$  nucleótidos) resultan vitales en el reconocimiento (Kim 2005).

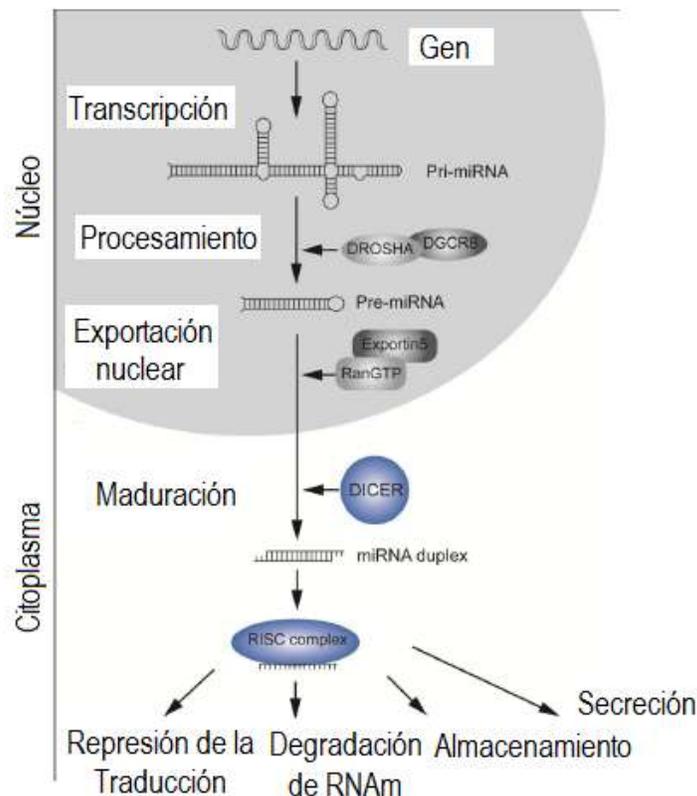
Drosha a su vez, se une al cofactor proteico DiGeorge de la región génica 8 (DGCR8) en mamíferos; Pasha en *D. melanogaster* y *C. elegans*. DGCR8/ Pasha, es una proteína  $\approx 120\text{kDa}$  que contiene dos motivos de unión a dsRBDs. El rol bioquímico de DGCR8/ Pasha no es claro, sin embargo se cree que asiste a Drosha en el reconocimiento del sustrato. Una vez unidos genera un pre-miRNA con 2 nucleótidos en posición 3' que sobresalen y con una conformación tallo-asa de  $\approx 22$  nucleótidos, que posteriormente se convertirá en un miRNA maduro. La característica en 3' de sobresalir y la conformación tallo-asa, es esencial en el reconocimiento de microRNA por la exportina 5, proteína que transporta el pre-miRNA del núcleo al citoplasma con alta eficiencia de una manera dependiente Ran/GTP (Loohuis *et al.*, 2012; Kim 2005).

En el citoplasma los pre-miRNAs son reconocidos y procesados por la RNAsa III denominada, Dicer una proteína multidominio  $\approx 200\text{kDa}$ , contiene los dominios RIIDs, dsRBD, RNA helicasa, así como un dominio DUF283 y un dominio que reconoce a PAZ. Este último, se encuentra en un grupo conservado de proteínas conocidas como argonautas. Los estudios estructurales y bioquímicos del dominio PAZ de *D. melanogaster* indican que se une al extremo 3' que sobresale

del pre-miRNA. Estas características se asocian con la estabilidad del miRNA y la formación del complejo efector (Loohuis *et al.*, 2012, Kim 2005).

La hebra del dúplex pre-miRNA que se selecciona, es la hebra con el más débil apareamiento de bases en 5', esta es cargada en el complejo de silenciamiento de miRISC, que degrada o silencia mRNAs. Durante este proceso el complejo miRISC, es asistido por un conjunto de proteínas como argonauta 1 (AGO1), argonauta 2 (AGO2) y Pumilio2 (Pum2) (Kloosterman y Plasterk 2006; Loohuis *et al.*, 2012).

En animales, los miRNAs regulan la expresión génica por apareamiento imperfecto o casi perfecto de bases en región 3' no traducida (UTR) del ARN blanco inhibiendo o provocando la degradación ARNm (Figura 5). La región semilla de los miRNAs (de 2-8 nucleótidos) es la más importante en el reconocimiento y silenciamiento (Kloosterman y Plasterk 2006). En las células eucariotas, el ARNm es circularizado por los factores de iniciación como eIF4E y la proteína denominada PBP (proteína de unión al poli A). Las proteínas AGO estimulan la función inhibitoria de la traducción dependiente miRNA, al competir con eIF4E por el sitio unión 5' cap, previniendo la circularización del ARNm y reduciendo la eficacia del inicio de la traducción (Loohuis *et al.*, 2012; Kloosterman y Plasterk 2006).



**Fig. 6. Biogénesis de microRNAs.** Los microRNAs son transcritos en el núcleo como moléculas precursoras de ARN (pre-miRNA), estos son procesados por una enzima llamada Droscha unido a un cofactor DGCR8 en una estructura tipo tallo-asa de doble cadena pequeña (pri-miRNA). Es exportada hacia el citoplasma y es procesada en un microRNA maduro de cadena sencilla por la endonucleasa Dicer. Una vez maduro el microRNA es incorporado en el complejo RISC regulando la expresión génica postranscripcional. Tomado Meister y Schmidt 2010.

## **VI. ANTECEDENTES**

### **VI.1.-La relación de microRNAs y el corazón.**

Actualmente se ha tenido un gran interés en el estudio de microRNAs como una posible herramienta a futuro en la lucha contra diferentes enfermedades. En el corazón, los primeros miRNAs descritos, se encontraron en corazones maduros con diferentes patologías (Takada *et al.*, 2006).

En la actualidad en la literatura se encuentra una amplia variedad de artículos referentes a la expresión de microRNAs, sin embargo el estudio de los microRNAs en el corazón embrionario se torna complicado, debido a varios factores: primero hay pocos reportes que estudian la expresión de microRNAs en el desarrollo embrionario normal; segundo los estudios relacionan la expresión de microRNAs con alguna etapa específica del desarrollo; tercero la zona de interés del tracto de salida embrionario (OFT) es una región, en la que no hay un consenso del límite embrionario, ni de las estructuras anatómicas a las que dará origen; cuarto el OFT es una unidad morfológica, que no está dividida en unidades anatómicas separadas.

Hay disponibles varios estudios que miden la expresión de miRNAs, sin hacer mayor hincapié, en la relación que guardan con los procesos morfogénéticos que ocurren en esta zona. Algunos de estos estudios son como los de Xua y colaboradores (2006) realizaron una evaluación de 25 microRNAs en corazón de embrión de pollo (E18HH) y corazón de pollo post natal, donde se compara la expresión diferencial de los microRNAs, entre los corazones de los embriones y de individuos neonatos, sin abordar los blancos involucrados o procesos en los que se relaciona su expresión, o la relación que existe entre el estadio embrionario y las estructuras maduras.

Otros trabajos, estudian la pérdida de expresión de los microRNAs y el impacto que tienen en procesos complejos y su repercusión que trae consigo en el desarrollo. Lagendijk y colaboradores (2011) observaron que en embriones de pez cebra nulos para Dicer, hay un crecimiento anormal de crestas endocárdicas cardíacas, por la deposición excesiva de matriz extracelular (HA), lo que lleva a malformaciones cardíacas severas y a la muerte del embrión. Al investigar encuentran una relación íntima entre la expresión del microRNA-123 y la inhibición de la enzima Has2 que tiene impacto en la producción del HA y afecta la deposición de matriz extracelular. Este microRNA es un modulador importante de la matriz extracelular y su afectación tiene impacto en la remodelación hacia un corazón maduro.

Se sabe que el corazón se forma paulatinamente por la integración de poblaciones celulares con diferentes orígenes y que hacia el último tercio del desarrollo (pollo E24HH), hay un proceso complejo de remodelación de los primordios embrionarios denominados saco aórtico, tronco, cono, cojín del canal AV, que van a dar origen a las estructuras maduras del TSVD, TSVI, válvulas arteriales y troncos arteriales. Por lo anterior sabemos, que hay una relación estrecha al evaluar la expresión de microRNAs en este segmento embrionario y en las estructuras maduras.

## **VII.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los tractos de salida ventriculares son las estructuras anatómicas que conectan a los ventrículos con la región proximal o troncos arteriales. Estas regiones anatómicas del corazón se forman por el

aporte de células de diversas fuentes, al menos el saco aórtico, tronco, cono y cojín superior del canal AV. La migración celular, la transformación del endocardio en mesénquima, la miocardización y proliferación celular son algunos de los procesos celulares más relevantes, involucrados en la formación de los tractos de salida ventriculares y troncos arteriales. A pesar de los esfuerzos encaminados a desentrañar las redes moleculares que regulan estos procesos, no se ha logrado resolver la incógnita. Los microRNAs son un grupo de moléculas candidatas que en las dos últimas décadas, han mostrado ser importantes en la regulación postranscripcional de la expresión de genes durante la embriogénesis en diferentes órganos y sistemas. Aunque resultan excelentes candidatas para regular los procesos morfogenéticos involucrados en el desarrollo de las estructuras cardíacas mencionadas, su función ha sido escasamente estudiada y no se ha establecido cual o cuales microRNAs participan. Debido a esta falta de información, resulta importante determinar cuáles miRNAs pudieran intervenir en la transformación del saco aórtico, tronco, cono y cojín superior del canal AV en los tractos de salida ventriculares, tronco y válvulas arteriales.

## **VIII.- OBJETIVOS**

### VIII.1.- Objetivo General

Identificar microRNAs candidatos que participan en el desarrollo de los tractos de salida ventriculares y troncos de las grandes arterias en el corazón de embrión de pollo.

### VIII.2.- Objetivos Particulares

1. Determinar en el corazón embrionario de pollo E24HH la expresión de 9 microRNAs reportados en la literatura que intervienen en los procesos morfogenéticos característicos del desarrollo conal y comparar con el tejido de corazón juvenil.
2. Seleccionar 4 microRNAs relacionados directa o indirectamente con la función de TGF- $\beta$  y determinar su expresión relativa en el tejido del corazón embrionario de pollo a lo largo del desarrollo (E24HH-E36HH) y compararla con tejido de corazón juvenil (pollo 6 semanas nacido).

## **IX.-MATERIALES Y MÉTODOS**

### IX.1.-Selección de microRNAs relacionados con el sistema cardiovascular

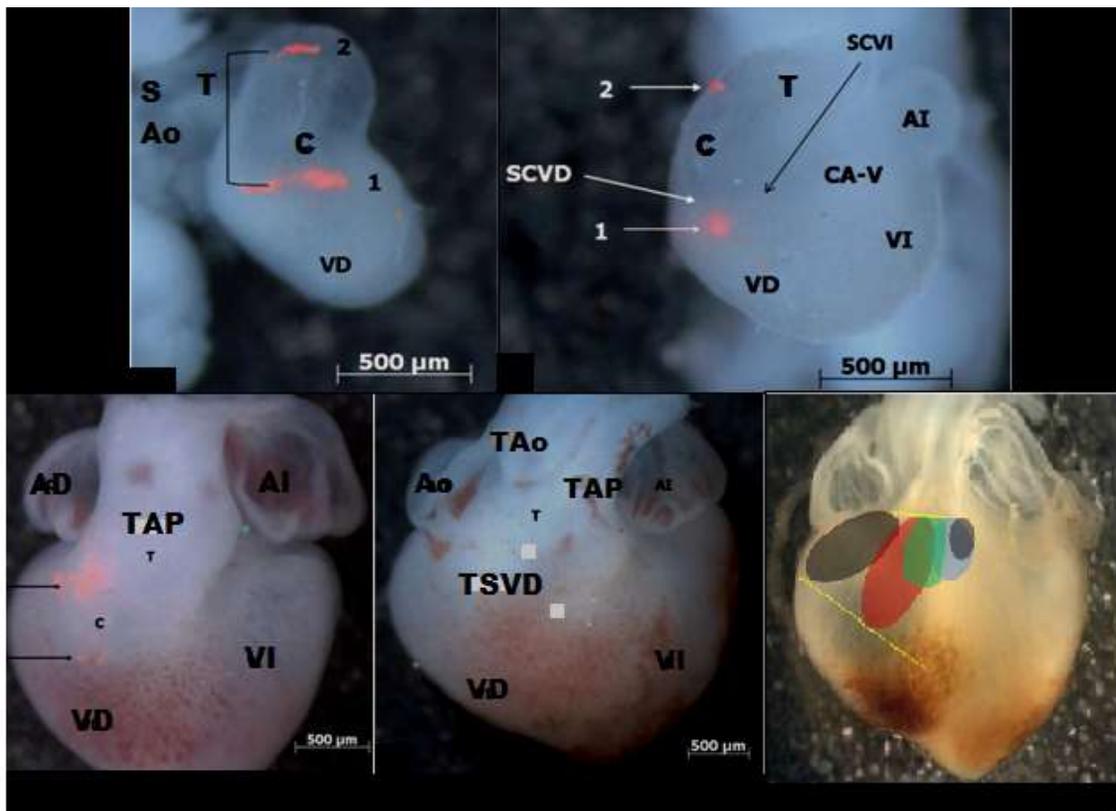
La selección de microRNAs involucrados en el desarrollo del sistema cardiovascular se basó en los siguientes puntos:

- 1.- En las bases bioinformáticas <http://pictar.mdc-berlin.de/> y <http://www.mirbase.org/>; y en la literatura, se buscaron microRNAs relacionados con el desarrollo del sistema cardiovascular.
- 2.- En las bases bioinformáticas <http://mirdb.org/> y <http://www.targetscan.org/> se buscaron los posibles blancos de los microRNAs encontrados en el punto anterior.
- 3.- De la búsqueda bioinformática se encontró una amplia variedad de posibles blancos, algunos de ellos se encontraban descritos en la literatura, sin embargo, validados en otros modelos; y otros sin

validar pero relacionados con corazón, estos últimos se seleccionaron los blancos que tuvieran un marcaje alto (alta posibilidad de empalme del microRNA con blanco).

## IX.2.-Obtención de tejido embrionario

La obtención del tejido de cada etapa embrionaria, se basó en el análisis del destino del cono por marcaje *in vivo* llevado a cabo en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental (Ortega-Espinosa 2011), colocando una marca roja (gelatina y partículas de hierro) o negra (gelatina y partículas de carbón activado) a nivel de los surcos cono-ventriculares y otra en el límite cono-troncal en el corazón de pollo del E22HH (4 días de incubación). Los cambios de posición y relaciones espaciales de la estructura marcada, se rastrearón a lo largo del tiempo hasta que el embrión alcanzó E36HH (aproximadamente 10 días de incubación) (Fig. 7).



**Fig. 7.- Secuencia del desarrollo normal del corazón (de izquierda a derecha) de E22HH al E36HH.** Sao: saco aórtico; T: tronco; C: cono; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; AD: atrio derecho; AI: atrio izquierdo; TAP: tronco arteria pulmonar; TAo: tronco arteria pulmonar; TSVD: tracto de salida del ventrículo derecho. Cortesía: Ortega-Espinosa 2011.

Cada semana por cuatro meses se incubaron ochenta huevos fértiles de pollo (*Gallus domesticus*) comercializados por “Aves libres de patógenos específicos” S.A de C.V; a una temperatura  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad relativa 85%, el tiempo suficiente para obtener embriones de los estadios E24HH (cuatro días), E26HH (cuatro días y medio), E28HH (cinco días y medio), E30HH (seis días y medio), E32HH (siete días y medio), E34HH (ocho días), E36HH (diez días). La edad de los embriones se determinó según Hamburger y Hamilton (1951).

Con el propósito de disectar las zonas de interés, se extrajo el embrión de pollo del cascarón, se colocó en una caja Petri con una solución fría de suero fetal bovino al 5% en buffer de fosfatos (PBS 1x) [anexo]. Una vez eliminado el exceso de vitelo y sangre, con la ayuda de una tijera de disección Vannas y una pinza de relojero del número 5, se cortó el fragmento del corazón que contenía el cono, tronco, saco aórtico y cojín superior del canal AV o las estructuras a las que dan origen (Figura 7). Todo se realizó en frío. El tejido se colocó en tubos de microcentrifuga (1.5 ml) para macerarlo manualmente. Se almacenaron las muestras a -80°C hasta su posterior uso.

### IX.3.-Obtención de tejido de pollo juvenil

Se obtuvieron 4 pollos de 6 semanas de nacidos (etapa juvenil) comercializados por “Aves libres de patógenos específicos” S.A de C.V. Se sacrificaron por decapitación para perfundir el corazón con PBS frío y eliminar el exceso de sangre. Se extrajo por separado el tracto de salida del ventrículo derecho, el tracto de salida del ventrículo izquierdo, el tronco de la aorta, y el tronco de la arteria pulmonar. Inmediatamente cada estructura anatómica se homogenizó, empleando un triturador de tejido. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido siguiendo el mismo procedimiento empleado para el tejido embrionario.

Para evitar la degradación y/o contaminación del ARN, el procedimiento se realizó en frío, con material estéril y en el menor tiempo posible.

### IX.4.-Extracción de ARN

El ARN total fue aislado a partir de las estructuras embrionarias de cada estadio; y de las estructuras anatómicas definitivas por el método de extracción fenólica con TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies).

A cada tubo de microcentrifuga (que contiene el tejido de interés), se le agregó 1ml de TRIzol y se homogenizó, hasta la completa disgregación del tejido. Se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se agregó en frío 200µl de Cloroformo 99% (Sigma Aldrich), se agitó 15 segundos en el vórtex y se dejó reposar 2-3 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se centrifugó a 12,000rpm por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa con sumo cuidado de no tocar las paredes del tubo y se transfirió a un tubo de centrifuga nuevo. Se agregó 500µl de 2-propanol >99%(Sigma Aldrich). Se centrifugó 10 minutos a 12,000rpm a 4°C; se decantó el sobrenadante y en frío se agregó 1ml de etanol al 75% (Sigma Aldrich), se agitó en el vórtex para desprender el botón de ARN, se centrifugó 5 minutos 7,500rpm a 4°C. Este procedimiento se repitió tres veces.

En el último lavado, se eliminó todo el etanol; y el botón se dejó secar quitando los excesos que quedan de etanol y se resuspendió en 20µl de agua DEPC estéril.

Para conocer la concentración de ARN total se preparo una dilución 1:100 en agua DEPC, que se colocó en una celda para espectrofotómetro GeneQuant. Se considera que el rendimiento óptimo, se encuentra entre las relaciones cercanas a 1.8--2 unidades de OD260.

Además para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometieron las muestras a una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%.

Se disolvió 2g de agarosa MP multipurpose (Pierce) en 100ml de TAE 1x [anexo]. Se calentó hasta su completa homogenización, una vez más frío se agregó 3µl Red Nucleic Acid Stain (Invitrogen Life Technologies), se agitó y se vertió la agarosa en la base para el gel y se colocó el peine. Una vez gelificado, se retiro el peine y se colocó adentro de la cámara de electroforesis y se cubrió con TAE1X (0.5-1 cm por arriba del gel).

Se hizo una mezcla de cada muestra con 5µl de la muestra ARN con 3µl agua DEPC y 2µl de colorante azul de bromofenol (0.25%) y se colocó en cada carril.

La electroforesis se llevó a cabo a 80 volts durante 40 minutos. El ARNA se observó en un transiluminador Appligene con luz ultravioleta. Se tomó una fotografía del gel.

Las muestras que se emplearon para la síntesis de cDNA son las que se observan con tres bandas integras de ARN (Fig. 8).

#### IX.5.-Síntesis de cDNA (RT)

El cDNA se sintetizó partir de 50ng de ARN total, obtenido del fragmento del corazón embrionario de cada etapa que constaba del cono, tronco, saco aórtico y cojín superior del canal AV; y de las estructuras anatómicas maduras (tractos de salida del VD, tracto de salida del VI, tronco de la pulmonar y aorta). Para cada miRNA (previamente seleccionado) se empleó una sonda específica TaqMan y se siguió el protocolo sugerido por Applied Biosystems.

#### IX.6.-Preparación de reacción de RT.

Se agregaron todos los reactivos de TaqMan MicroRNA Reverse Transcription fríos. En un tubo de microcentrífuga se preparó la RT Master Mix.

Para una reacción RT es necesario mezclar agua libre de nucleasas 4.16µl; 10xRT Buffer 1.5µl; dNTP 0.15µl; RNAase inhibitor 0.19µl y Multiscribe RT enzyme 1.0µl.

Cada reacción se realizó en tubos ópticos MicroAmp Óptico de 0.2mL: 5µL de ARN total; 7µl de RT de la Master Mix y se mezcló. Por último se agregó 3µl del primer específico y se colocó en hielo.

Se realizó la transcripción reversa de acuerdo con las condiciones descritas en el kit de Applied Biosystems en un termociclador SureCycler 8800 por 30 minutos 16°C; 30 minutos 42°C; 5

minutos 85°C y posteriormente ∞ 4°C. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su posterior utilización.

#### IX.7.-RT-qPCR tiempo real.

El PCR en tiempo real se realizó usando TaqMan Universal Master Mix II Protocol de Applied Biosystems. Para una reacción de PCR tiempo real con 20µl incluye: agua libre de nucleasas 7.67µl; TaqMan small RNA Assay (20x) 1µl; Producto de la reacción RT 1.33µl y Taqman Universal PCR Master Mix (2x) 10µl. Se colocó un triplicado de NTC (reacción sin templado) y se uso como gen constitutivo U6. Se colocó en una placa de 96 pozos y fueron incubados el primer segmento a 50°C por 2 minutos; el segundo segmento 95°C 10 minutos; tercer segmento 40 ciclos 95°C por 15 segundos y 60°C 1 minuto; cuarto segmento 25°C 10 minutos. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

#### IX.8.-Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis de la expresión de los miRNAs se realizo por el procedimiento de  $2^{-\Delta Ct}$  que representa  $2^{-[(Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ del gen endógeno)]}$ . El análisis estadístico se llevo a cabo utilizando una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Tukey. Las diferencias en los niveles de expresión con una  $p < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativa.

## X.- RESULTADOS.

### X.1.- Elección de microRNAs para el estudio.

Debido a la escasa información disponible, no solo en la zona de interés, sino incluso en la embriogénesis en general del corazón, se decidió elegir los siguientes microRNAs relacionados con el sistema cardiovascular microRNA15a, microRNA27b, microRNA126, microRNA23b, microRNA24, microRNA206 y Let7. Dos de ellos el microRNA-15a y microRNA-30 están involucrados en enfermedades cardiovasculares adultas, hipertrofia e infarto al miocardio; el Let-7a, microRNA-23 y microRNA-27b, han sido descritos en el corazón prenatal y patológico adulto; el miRNA-1 es el mejor caracterizado en el corazón embrionario; microRNA-24 y microRNA-126 se han descrito como angiogénicos vasculares, mientras que el microRNA-206 es miogénico aparentemente no cardíaco.

**1. miRNA-1: principal participante en el desarrollo de corazón, embrionario miogénico.** Se ha encontrado expresado principalmente en el corazón siendo de suma importancia en el desarrollo pre-natal y pos-natal cardíaco (Zhao *et al.*, 2007; Wystub *et al.*, 2013; Heidersbach *et al.*, 2013); regula la expresión de algunos factores de transcripción importantes en la diferenciación miocárdica como MyoD, Mef2c y Hand2, los cuales a su vez pueden promover la expresión de miRNA-1 (Ivey *et al.*, 2008; Takaya *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2007). También se ha determinado que la delección de miRNA-1 en la etapa embrionaria, desregula la proliferación del miocardio ventricular y provoca defectos pos-natales en la septación ventricular (Zhao *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2011; Jian *et al.*, 2010).

Además de las funciones y blancos de miRNA-1 señalados en el miocardio, *in vitro* en un modelo alterno de células endoteliales y músculo liso de aorta de rata adulta, se estableció el que miRNA-1, inhibe la proliferación del músculo liso a través del blanco validado Pim-1 (cinasa de serina/treonina) (Chen *et al.*, 2011).

**2.- Let-7: función en desarrollo embrionario y en estados patológicos del adulto.** El conocimiento del papel de la familia de Let-7, específicamente en la biología del corazón en la etapa adulta, se remonta a la primera década del presente siglo, cuando se determinó que la desregulación en la expresión de Let-7, causa enfermedades cardíacas como miocardiomiopatía, falla cardíaca e infarto al miocardio (Long *et al.*, 2012); en la actualidad no existe información fidedigna de los procesos moleculares y celulares regulados por Let-7, responsables de estas enfermedades. No obstante la información del papel de Let-7 en desarrollo cardíaco prenatal es aún más escasa. Al caracterizar el perfil de expresión de miRNAs en el corazón embrionario de ratón de etapas 12.5, 14.5, 16.5 y 18.5dpc, se encontró que varios miembros de la familia de Let7 son expresados a lo largo de todas estas etapas (Cao *et al.*, 2012). Además mediante un análisis bioinformático se determinó que FOXP1, TBX5, HAND1 y AKT2 son posibles blancos de Let-7 (Long *et al.*, 2012). A pesar que dichos genes blanco están involucrados en el desarrollo cardíaco aún no se han validado. En un modelo alterno en células HeLa, se ha validado como blancos a la familia de RAS, NRAS y KRAS, estas tres isoformas tienen sitios de unión a Let-7. En muestras de pacientes con cáncer de pulmón se encontró a Let-7 expresado y se observó que su disminución lleva a un aumento de la proteína RAS (Johnson *et al.*, 2005).

En la búsqueda en la bases bioinformáticas <http://www.targetscan.org/> se descubrió que el receptor 1 de TGF- $\beta$ , es un posible blanco de Let-7 con un score de 75. Sin embargo, aún no se ha validado.

**3.- Familia de miRNA-23: descritos en etapa prenatal y estados patológicos en el adulto.** Se conocen al menos dos miembros de la familia miRNA-23 importantes en la biología cardíaca, el miRNA-23a del que se tiene mayor información, mientras que miRNA-23b, aún es poco conocido en este aspecto. Tanto miRNA-23a como miRNA-23b se han descrito en el corazón embrionario de ratón del 12.5-18dpc, sin embargo, en ningún caso se ha determinado su papel en la cardiogénesis (Cao *et al.*, 2012).

Específicamente miRNA-23a se ha caracterizado como un agente pro-hipertrofico mediante el empleo de ratones transgénicos o miocitos cardíacos cultivados *in vitro* (Lina *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). También se ha determinado que la expresión de miRNA-23a, es regulada por el factor de transcripción activador de células T-3 (NFATc3), mientras que sus blancos validados son la proteína con dedo de zinc 1 específica de músculo y el receptor 1 del ácido lisofosfatídico (LPA1) (Van Rooij *et al.*, 2006).

El miRNA-23b se ha descrito como regulador de la matriz extracelular, al inhibir a la ácido hialurónico sintetasa lo que conlleva a una inhibición del ácido hialurónico importante en la TEM de los cojines atrio-ventriculares del embrión de pez cebra. La falta de este miRNA en el corazón embrionario, provoca hipertrofia de los cojines y desarrollo anormal de las válvulas (Lagendijk *et al.*, 2011). Sin embargo este efecto no se ha evaluado en otros vertebrados.

**4.-miR-27b: descritos en etapas prenatal y estados patológicos en adultos, actividad miogénica.** La función de miR-27b varía según el modelo animal empleado. En cultivo *in vitro* de somitas de ratón la función de miR-27b, se encuentra relacionada positivamente con la miogénesis de músculo estriado y en corazón embrionario de ratón, se ha descrito la presencia de miR27b en el miocardio ventricular en la cardiogénesis y se ha validado al blanco Mef2c (Crist *et al.*, 2009; Chinchilla *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2012). Sin embargo el papel más explorado, es el efecto hipertrofico de miR27b en la etapa posnatal, relacionada con la desregulación génica que conduce a la expresión abundante de miR27b, lo que lleva a la fibrosis cardíaca, es decir, la sustitución del miocardio ventricular por tejido conectivo, mediante la inhibición de la metaloproteasa 13 (MMP13) (Wang *et al.*, 2012).

**5.-La Familia de miR-15: participa en estados patológicos en el adulto.** Incluye al miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-195, miR-322, miR-424, miR-457 y miR-497, varios de ellos se han descrito sobreexpresados en diversas enfermedades cardíacas, promoviendo el arresto mitótico y apoptosis en cardiomiocitos posnatales. Sus blancos validados son CDKs (cinasas dependientes de ciclinas), CHEK1 (cinasa 1 reguladora del ciclo celular), el factor de crecimiento fibroblástico y su receptor (Porrello *et al.*, 2011; Hullinger *et al.*, 2012). Así mismo, se encontró que en células MEG-01 el miR-15 inhibe la supervivencia celular teniendo como blanco Bcl2 (Cimmino *et al.*, 2005).

**6.- miRNA-30d: con propiedad pro-hipertrofica y en estados patológicos en el adulto.** Pertenece a una familia que incluye a varias de estas moléculas como miRNA-30a, miRNA-30b, miRNA-30c, miRNA-30d y miRNA-30e. En general, la mayoría de estos miRNAs se han caracterizado como promotores de hipertrofia (Duisters *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2013; Pan *et al.*,

2013; Yin *et al.*, 2013). En ratas adultas con infarto al miocardio el miRNA-30a, incrementa el tamaño celular y promueve la expresión de marcadores moleculares hipertróficos (Jentzsch *et al.*, 2012). De manera concordante miRNA-30 y let-7b se encuentran en suero de pacientes con infarto agudo al miocardio 4, 8 y 16 horas posteriores al inicio de la enfermedad (Long *et al.*, 2012). Cabe mencionar que en fibroblastos cardíacos de la línea Hek293 y miocardiocitos se descubrió que miRNA-30d inhibe la apoptosis, regulando negativamente la expresión de la proteína p53 (Li *et al.*, 2010).

**7.- miRNA-24: con función angiogénica vascular.** En modelos murinos, se ha encontrado relacionado con el infarto al miocardio y hipoxia, promoviendo la vasculogénesis y angiogénesis (Fiedler 2011; Fiedler *et al.*, 2013; Meloni *et al.*, 2013). Además se ha documentado que la inhibición local de miRNA-24 en ratones adultos con infarto al miocardio, optimiza la angiogénesis, la remodelación y funcionamiento del ventrículo izquierdo (Wang *et al.*, 2012; Wang y Qian 2014). Así mismo, el decremento de miRNA-24 en el miocardio infartado, modula la fibrosis cardíaca, pero aún se desconoce de qué forma lo hace. En el cultivo *in vitro* de miocardiocitos de corazones infartados, se encontró que miRNA-24 es modulador de apoptosis reprimiendo a la proteína Bim (van Rooij *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2011). En un modelo *in vitro* de cultivo de malla ocular humana, se encontró que en el estrés ocular está sobre expresado el TGFb1 y hay una disminución del miRNA-24, al buscar en las bases bioinformáticas se encontró que el miRNA-24 tiene como blanco validado a la enzima furina encargada del la maduración del TGFb1 en la matriz extracelular (Luna *et al.*, 2011)

**8.- miR-126: regulador positivo, angiogénico vascular.** Inicialmente fue descrito en el corazón de ratón adulto y posteriormente en el corazón embrionario de ratón y pollo. No obstante, estudios más recientes en ratón y pez cebra lo caracterizan como una molécula clave en la regulación positiva de la angiogénesis y vasculogénesis teniendo como blancos validados a Spred1 y PIK3R2 (Fish *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2011).

Se conoce que la deleción específica de miR-126 en el embrión de ratón provoca muerte embrionaria por defectos en la angiogénesis acompañados de pérdida de la integridad vascular manifestándose por zonas hemorrágicas con debilitamiento endotelial y defectos en la proliferación del endotelio. Un bajo porcentaje de embriones *miR-126* *-/-* llegan a término, presentando falla cardíaca, pérdida de miocardio y deficiencias en la vasculatura en la región ventricular e incapacidad para generar nuevos vasos sanguíneos (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2006 Wang *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013).

**9.-miRNA-206: con función miogénica aparentemente no cardíaco.** Junto con miR-1 y miR-133 se caracterizan por su función miogénica. En la etapa embrionaria en ratón y aves miR-206 inicialmente se identificó, tanto en músculo esquelético como en corazón. Con el paso del tiempo, empleando técnicas más precisas, se estableció que miR-206 está específicamente expresado en musculo esquelético, mientras que miR-1 y miR-133 se sobreexpresan en musculo esquelético y corazón (Sweetman *et al.*, 2006).

Esta información es controversial, ya que miRNA-206 se ha involucrado en la patogénesis de diversas enfermedades cardíacas como el infarto al miocardio, falla cardíaca y obstrucción pulmonar crónica (Shan *et al.*, 2009). Concordantemente con este hallazgo, en un modelo murino

con infarto al miocardio, miRNA-1 y miRNA-206 se encontraron sobreexpresados y se concluyó que estas moléculas eran responsables de la muerte del miocardio, mediada por el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (Jalali *et al.*, 2012). En fibroblastos HEK-293 de corazón murino, se determinó que miRNA-206 inhibe metaloproteinasas 3 (TIMP3) (Limana 2011), mientras que en células HeLa, promueve la apoptosis teniendo como blanco validado notch3 (Song *et al.*, 2009). La endotelina es otro blanco descubierto en la base bioinformática <http://mirdb.org/> con un score de 86, el cual aún no es validado.

En la diferenciación miogénica *in vitro* de células C2C12, TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión miR-206 (Winbanks *et al.*, 2012).

**Tabla 1.- Lista de miRNAs encontrados en la literatura. Evaluados en E24HH y en las estructuras maduras cardíacas.** Literatura que refiere la expresión de miRNAs en el desarrollo cardíaco, evaluados en diferentes modelos, regiones anatómicas y etapas del desarrollo.

miRNA	Modelo animal/región anatómica/etapa	Cita
<b>miRNA-1</b>	Ratón /corazón/ embrionaria	Zhao et al., (2007) <sup>174</sup>
	Rata/ ventrículos/ posnatal	Wystub et al., (2013) <sup>166</sup>
	Ratón Knockout /corazón/ desarrollo	Heidersbach et al., (2013) <sup>60</sup>
	Ratón y línea celular derivada cardiomiocitos	Ivey et al., (2008) <sup>68</sup>
	Células madre embrionarias de ratón	Takaya et al., (2009) <sup>146</sup>
	Embriones de ratones nulos MEF2	Liu et al., (2007) <sup>96</sup>
	Embriones nulos miR-1 y línea celular/ corazón/13.5dpc.	Zhao et al., (2005) <sup>175</sup>
	Línea celular humano/ células musculo liso de aorta	Chen et al., (2011) <sup>33</sup>
	Cultivo de células ventriculares/corazón /posnatal	Fu et al., (2011) <sup>54</sup>
	Línea celular/ células de musculo liso de aorta	Jian et al., (2010) <sup>71</sup>
Células madre embrionarias diferenciación a células de musculo liso.	Xie et al., (2011) <sup>167</sup>	
<b>miRNA-15a</b>	Cerdo/ cirugía reperfusión isquémica/ adultos	Hullinger et al., (2012) <sup>65</sup>
	Ratón/ ventrículos cardiacos/ 1-10 días recién nacidos	Porrello et al., (2011) <sup>122</sup>
<b>miRNA-23b</b>	Embriones de pez cebra nulos dicer/ canal AV/corazón	Lagendijk et al., (2011) <sup>84</sup>
	Ratón con bandejo aórtico- torácico/ corazón Muestras de ventrículo izquierdo de pacientes con hipertrofia cardíaca	Van Rooij et al., (2006) <sup>151</sup>
	Ratón knockout de miRNA 23b/ adulto	Wang et al., (2012) <sup>159</sup>
	Rata / ventrículo/ neonatal	Lina et al., (2009) <sup>94</sup>
	Embriones de ratón/ corazón/ etapa 12.5pc, 14.5pc, 16.5pc, 18.5pc	Cao et al., (2012) <sup>29</sup>
<b>miRNA-24</b>	Células humanas de musculo liso/ aorticas	Fiedler et al., (2013) <sup>52</sup>
	Ratón/ corazón /posnatal	van Rooij et al., (2006) <sup>151</sup>
	Ratón / ligación arteria coronaria corazón /8-	Fiedler (2011) <sup>51</sup>

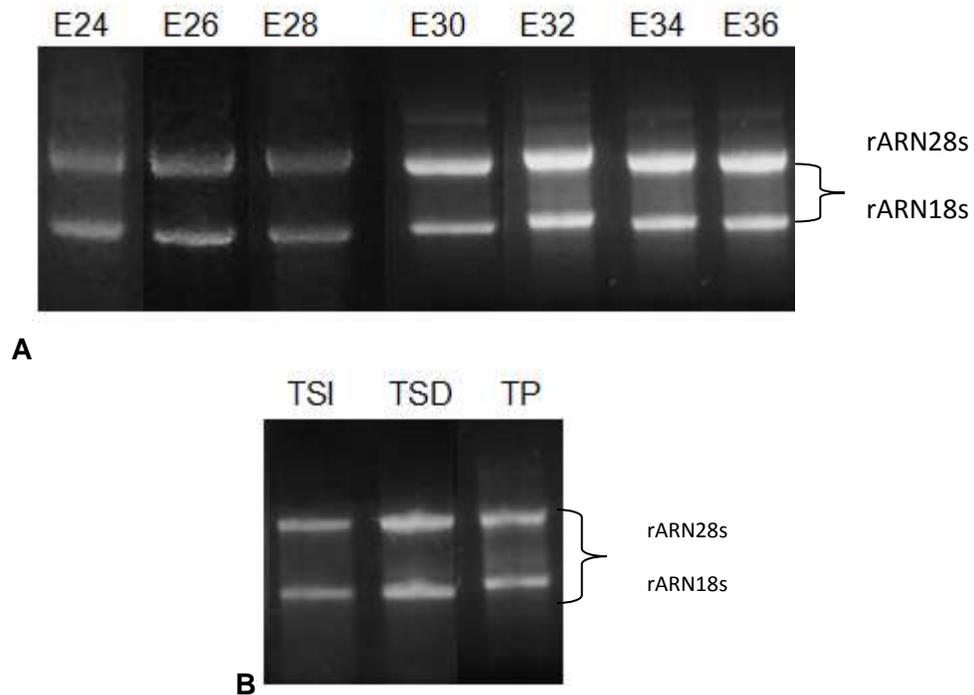
	10 semanas nacidos	
	Ratón / infarto miocardio / posnatal	Meloni et al., (2013) <sup>107</sup>
	Cultivo primario de cardiomiocitos de ratón	Wang y Qian (2014) <sup>160</sup>
	Cardiomiocitos primarios de corazón de ratón neonatal/ Ratones ligación izquierda arteria aorta	Qian et al., (2011) <sup>125</sup>
	Ratón/ ligación izquierda arteria aorta	Wang et al., (2012) <sup>157</sup>
	Cultivo de malla trabecular de ojo humano	Luna et al., (2011) <sup>100</sup>
<b>miRNA-27b</b>	Pez cebra y ratón knockdown/ angiogénesis /adulto	Biyashev et al., (2012) <sup>19</sup>
	Miotomos embrionarios de ratón y células satélite/ desarrollo muscular	Crist et al., (2009) <sup>40</sup>
	Embriones de ratón/ ventrículo /neonatal	Chinchilla et al., (2011) <sup>36</sup>
	Ratón transgénico/ corazón / etapa posnatal	Hou et al., (2012) <sup>64</sup>
	Ratón transgénico/ corazón/ posnatal	Wang et al., (2012) <sup>158</sup>
<b>miRNA-30d</b>	Embriones de pez cebra/ aorta	Jiang et al., (2013) <sup>72</sup>
	Rata / cultivo cardiomiocitos tratados con fenilefrina / adulto	Jentsch et al., (2012) <sup>70</sup>
	Rata/ cultivo de cardiomiocitos/ neonatal	Li et al., (2010) <sup>121</sup>
	Rata/ cultivo de cardiomiocitos / de 10, 12, 15, 16, 18, 19, y 21semanas.	Duisters et al., (2009) <sup>46</sup>
	Ratón/ aorta /pos-natal	Yin et al., (2013) <sup>171</sup>
	Ratas/ cardiomiocitos /pos-natal	Pan et al., (2013) <sup>120</sup>
	Pacientes con infarto agudo miocárdico / muestras sanguíneas: plasma / adulto	Long et al., (2012) <sup>97</sup>
	Ratón/ cultivo de cardiomiocitos ventriculares/10 semanas	Mishra et al., (2010) <sup>109</sup>
<b>miRNA-126</b>	Ratón/ corazón /pos-natal	Lagos-Quintana et al., (2002) <sup>85</sup>
	Embriones de ratón/ tejido cardíaco /E12.5, E14.5, E16.5 y E18.5	Cao et al.,(2012) <sup>29</sup>
	Embrión de pollo/ corazón /18 días de incubación y adulto 7 meses	Xu et al., (2006) <sup>168</sup>
	Ratón nulo miRNA-126/ corazón y aorta/ embrión y pos-natal	Wang et al., (2008) <sup>161</sup>
	Ratón y pez cebra/ vascular / embriones	Fish et al., (2008) <sup>53</sup>
	Pez cebra/ vascular / embriones	Jun et al., (2011) <sup>75</sup>
	Rata/ cultivo miocitos /pos-natal 1-3 días.	Shi et al., (2013) <sup>13</sup>
	Ratón/ células mesenquimales en angiogénesis / pos-natal.	Chen et al., (2011) <sup>34</sup>
<b>miRNA-206</b>	Embriones pollo/miogénesis/2-5pc	Sweetman et al., (2006) <sup>144</sup>
	Rata/modelo de infarto miocardio/adulto	Shan et al., (2009) <sup>136</sup>
	Ratón C57BL16/ligación arteria aorta/ adulto	Limana et al., (2011) <sup>92</sup>
	Ratón con hipertensión arterial / cultivo de células musculo liso	Jalali et al., (2012) <sup>69</sup>
	Línea celular C2C12 ratón/ miogénesis	Winbanks et al., (2012) <sup>165</sup>
<b>Let-7a</b>	Embriones de ratón/ corazón/ etapa 12.5pc, 14.5pc, 16.5pc, 18.5pc.	Cao et al., (2012) <sup>29</sup>

	Muestras de plasma /Pacientes con infarto agudo al miocardio/ $52 \pm 12.3$ años	Long et al., (2012) <sup>97</sup>
--	--	-----------------------------------

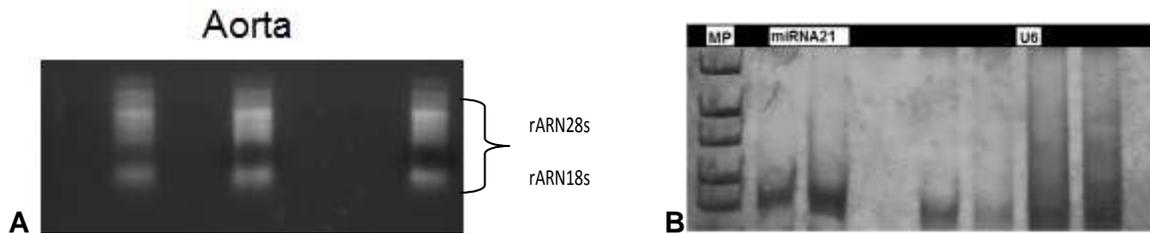
## X.2.- Extracción de RNA de las estructuras embrionarias y maduras.

La pureza e integridad del ARN total obtenido del tejido del segmento embrionario y de las estructuras maduras, se evaluó por medio de un gel de agarosa al 1%, teñido con Red Nucleic Acid. Se encontró que en general cumplió con las recomendaciones necesarias para ser utilizado en RT-PCR en tiempo real (Fig. 8A y B). No obstante el ARN total extraído de la aorta mediante la técnica de TriZol presentó algunos problemas, ya que al evaluar su integridad se observaba un barrido (Fig. 9A). Por esta razón se decidió repetir el procedimiento con diversos cambios como: realizar la extracción con un kit comercial (QuickGene RNA tissue kit), precipitación de acetato de sodio, limpieza de la cámara con hidróxido de sodio y cambio de todas las soluciones.

Aun con todos estos cambios aparecía el barrido en el gel de agarosa. Para corroborar que el ARN total de la aorta no estaba degradado, se decidió hacer una PCR punto final amplificando el miRNA-21 en el tejido de la aorta, obteniendo resultados positivos (Fig. 9B) indicativos de que el ARN total obtenido de la aorta, se podía utilizar en el protocolo de RTPCR en tiempo real.



**Fig. 8. Gel de Agarosa al 1% teñido con Red Nucleic Acid, se muestra dos bandas integra de ARN ribosomal (rARN28s, rARN18s).** A. Segmento embrionario de los estadios E24HH, E26HH, E28HH, E30HH, E32HH, E34HH, E36HH de embriones de pollo. B. Estructuras maduras tracto de salida izquierdo (TSI), tracto de salida derecho (TSD) y tronco de la pulmonar (TP) de pollos de 6 semanas de nacidos.



**Figura 9. Gel de Agarosa al 1% teñido con Red Nucleic Acid. A.** Se observa que el ARN total de la aorta, no muestra dos bandas definidas del ARN ribosomal. **B.** Gel de poliacrilamida 13%, teñido con una solución de plata mostrando la PCR punto final del miR21 de la aorta. Abreviaciones: peso molecular (MP) gen endógeno (U6).

### X.3.- Sobreexpresión de los miRNAs en la estructura madura del TSVD y del segmento embrionario de corazón de pollo estadio E24HH.

La mayoría de los 9 miRNAs se encuentran expresados en la aorta y en TSVD del corazón maduro, aunque no en los mismos niveles que el TSVD. En el TSVD, 7 miRNAs se expresan un número de veces mayor, que en cualquier otra estructura madura (comparar en Figura 10 Grafica A con B, C y D). En la aorta 7 de los 9 miRNAs están expresados aunque no en los mismos niveles que en el TSVD; los microRNAs que no se detectaron fueron Let-7a, miRNA-126 y miRNA-206 (Fig. 10 Grafica A y D). Por otra parte en el TSVI solo se observaron miRNA-24, miRNA-30d y miRNA-1; y en la pulmonar miRNA-24, miRNA-30d y miRNA-27b.

Al comparar la expresión de los miRNAs en estructuras histológica y funcionalmente similares se notó en los tractos de salida un patrón de expresión de los miRNAs muy similar, siendo el miRNA-24, miRNA-30d, miRNA-1 los mas expresados (Fig. 10 Grafica A y B).

Por otro lado en la aorta y la pulmonar la expresión de los miRNAs es menor y diferente al de los TSV (Figura 10 Grafica C y D). En la aorta 7 de los 9 miRNAs están expresados (miRNA-30d, Let7a, miRNA-24, miRNA-15a, miRNA-27b, miRNA-1, miRNA-23b) y en la pulmonar solo 3 de 9 están expresados (miRNA-24, miRNA-30d, miRNA-27b) (Fig. 10 C y D).

El segmento del corazón embrionario de pollo E24HH mostró sobreexpresados 8 de los 9 miRNA elegidos (Fig.11. Grafica E), no se detecto solo Let7a; sin embargo el grado de expresión no es como lo que se observa en TSVD (Fig. 10A-11).

En el mapa de color (Fig.12) según los datos obtenidos y organizados por un dendograma, se observó que el TSVD y el tejido embrionario E24HH son los que tienen los miRNAs con mayor grado de expresión.

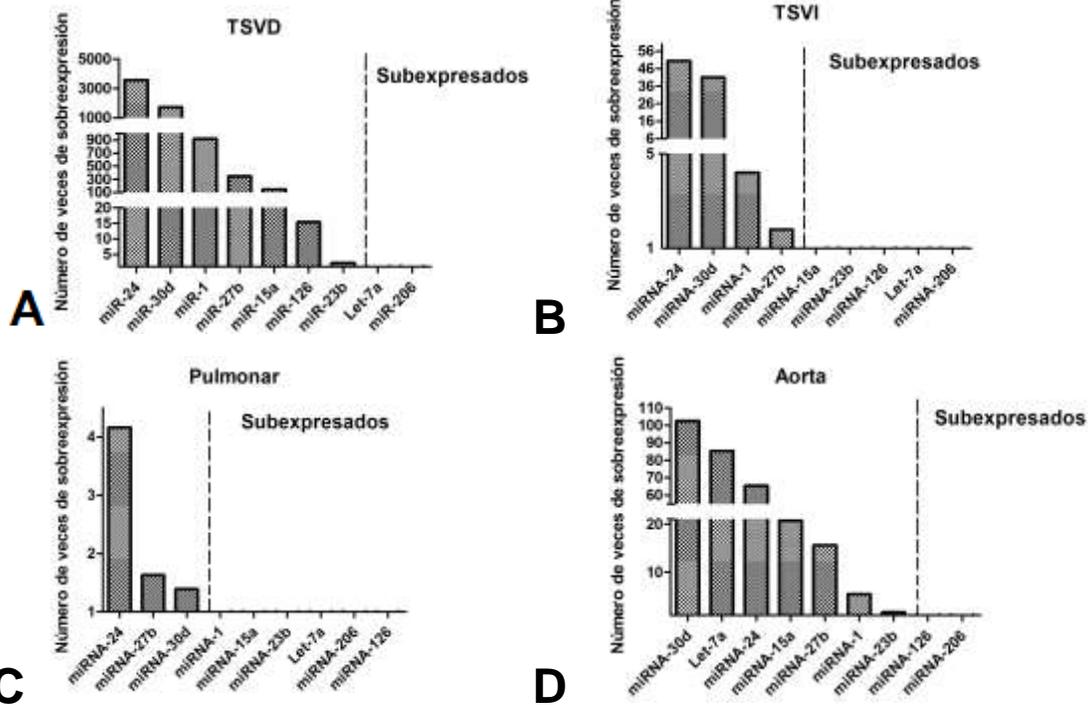


Figura 10. Patrón de expresión de los 9 miRNAs por RT-PCR tiempo real en las estructuras del corazón de pollo de 6 semanas. **Grafica A.** Tracto de Salida del Ventriculo Derecho (TSVD). **Grafica B.** Tracto de Salida del Ventriculo Izquierdo (TSVI). **Grafica C.** Tronco de la arteria pulmonar (TAP). **Grafica D.** Tronco de la arteria aorta (TAo).

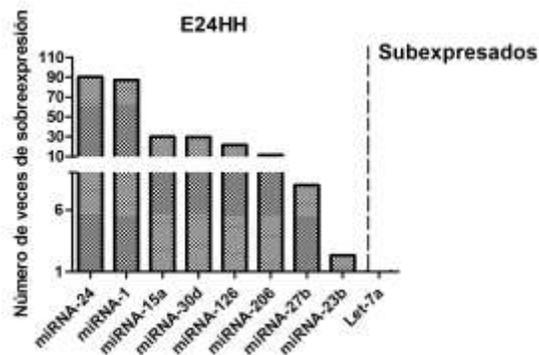
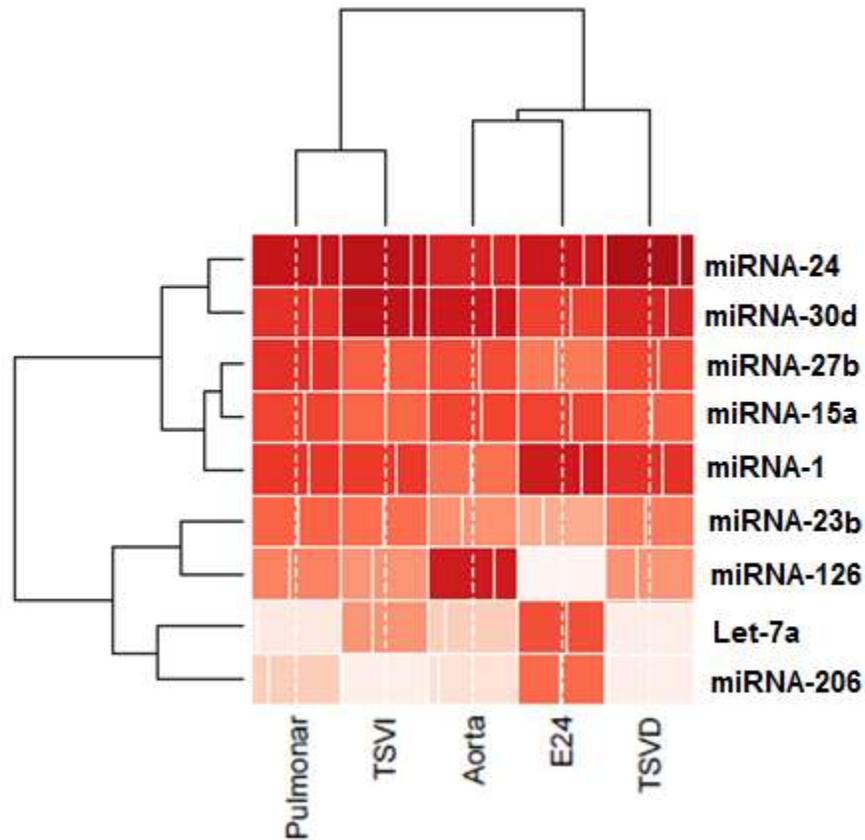
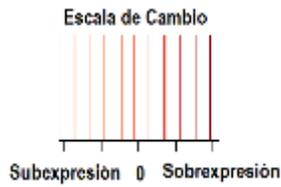


Figura 11. Patrón de expresión de los 9 miRNAs por RT-PCR tiempo real en el tejido del segmento embrionario de corazón de pollo estadio E24HH.



**Fig. 12. Mapa de color que muestra el nivel de expresión de los 9 microRNAs en el tejido del corazón embrionario estadio E24HH respecto a la expresión relativa en las estructuras maduras.** Las intensidades de color rojo denotan la expresión del miRNA, mientras mayor intensidad del color, mayor es el valor de expresión con respecto a las columnas. Además se muestra el dendograma (renglones y columnas), el cual muestra los tejidos y miRNAs que están relacionados, según la intensidad de expresión de los miRNAs evaluados. Las columnas que se encuentran a la derecha son las estructuras que tienen mayor expresión de miRNAs y las columnas que se encuentran más hacia la izquierda son que tienen una menor sobreexpresión de miRNAs. Note que al comparar la expresión de los miRNAs se encuentra más relacionado el tejido embrionario con el TSVD.

#### X.4.- Expresión diferencial de los 4 miRNAs seleccionados a lo largo del desarrollo embrionario E24HH-E36HH.

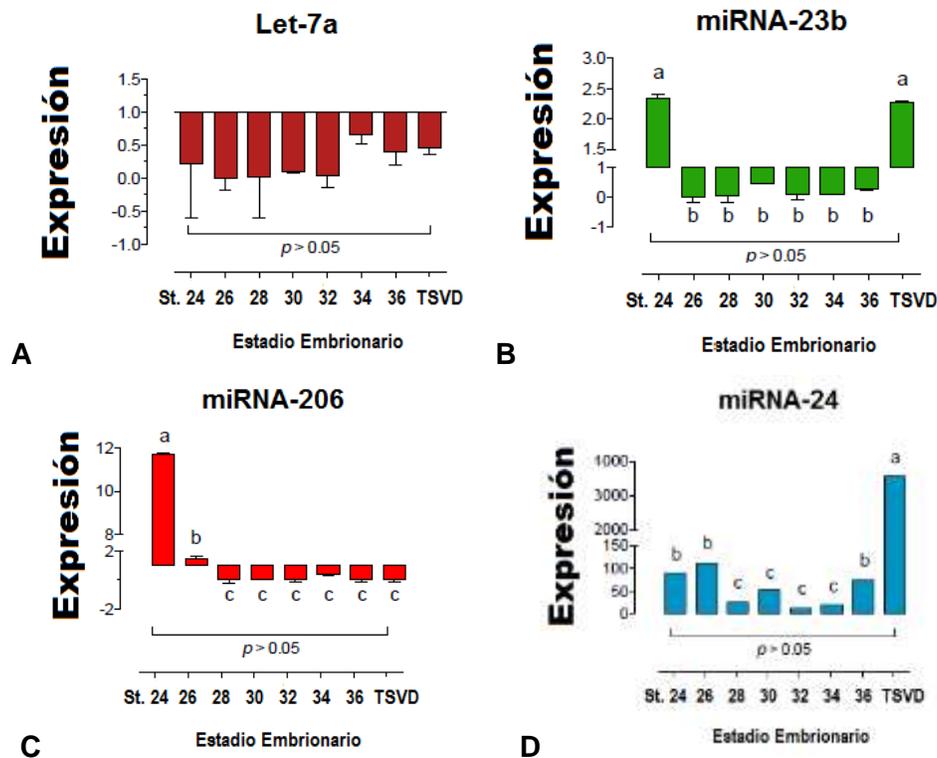
Con base en el análisis de expresión de los 9 miRNAs en las estructuras maduras y tejido embrionario, los miRNAs se agruparon según su blanco y vía de señalización o proceso morfogénico involucrado en el desarrollo del TSVD para evaluar su expresión, durante la cardiogénesis intermedia y tardía de pollo (E24HH-E36HH). Se escogieron los miRNA-24, miRNA-23b, miRNA-206 y Let-7a que pueden estar involucrados en la transformación epitelio mesénquima, proceso importante hacia el final de la remodelación de las crestas de cono y del tronco estructuras precursoras del TSVD.

En la figura 13 se presenta la expresión de los 4 miRNAs seleccionados tanto en la etapa embrionaria como en la estructura madura.

Se observó por un lado que el Let-7a no se expresó ni en el desarrollo embrionario (24HH-36HH) ni en TSVD (Fig.13 Grafica A).

El miRNA-206 y miRNA-23b durante la embriogénesis tienen un patrón de expresión parecido, pero difieren en la estructura madura (Comparar Fig.13 Grafica B y C). Los dos se expresan en el estadio 24HH y posteriormente estadio 26HH-36HH dejan de expresarse; mientras que en TSVD solamente se encontró expresado miRNA-23b.

Por otra parte, el miRNA-24 se mantiene expresado durante toda la embriogénesis; teniendo mayor presencia en E24HH, E26HH y E36HH. En el TSVD la expresión es mayor que en la etapa embrionaria (Fig. 13 Grafica D).



**Figura 13. Comparación del patrón de expresión de los 4 miRNAs relacionados con TGF- $\beta$  del estadio E24HH al E36HH respecto al TSVD. A.** Expresión del miRNA-24. **B.** Expresión Let7a. **C.** Expresión del miRNA-23b. **D.** Expresión del miRNA-206 ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Tukey. Dentro de cada panel a, b, c indican diferencias significativas en el nivel de expresión de los miRNAs  $p < 0.05$ .

## XI.- DISCUSIÓN

El desarrollo embrionario del corazón y de las grandes arterias es un proceso complejo, genéticamente orquestado en el que intervienen diversos mecanismos celulares como la migración, proliferación celular, TEM, diferenciación celular, apoptosis, entre otros. Recientemente se han descrito pequeñas secuencias de RNA no codificante ó microRNAs (miRNAs) que inhiben la traducción del ARNm a proteínas y que tienen impacto en el patrón de expresión génica, que repercute en un cambio en los procesos morfogenéticos antes mencionados. En el desarrollo de los tractos de salida ventriculares y tronco-arteriales, es poca la información que se tiene acerca de la expresión de miRNAs así como de su función. Esto se puso de manifiesto al buscar en las bases bioinformáticas y en la literatura. Debido a este hecho se decidió elegir los siguientes 9 miRNAs relacionados con el sistema cardiovascular: miR-15a, miR-27b, miR-126, miR-23b, miR-24, miR-206 y Let-7a. Inicialmente se determinó el patrón de expresión de cada miRNA por RT-PCR tiempo real en el tejido del corazón embrionario E24HH y en las estructuras maduras: tronco de la arteria aorta y pulmonar; TSVD y TSVI. Se eligió el E24HH por ser la etapa en la que la mayoría de los autores coinciden que se expresan todas las estructuras precursoras.

En el caso del tejido maduro lo primero que llamó la atención fue que en tejido del tronco de la aorta y el tronco de la pulmonar, la expresión de los miRNAs en general no fue tan importante, como en las otras estructuras de constitución histológica miocárdica. Esto posiblemente es debido a la fisiología del tejido maduro (tejido vascular vs miocardio). También cabe mencionar que aunque la aorta y pulmonar tienen aparentemente una constitución histológica vascular similar, su patrón de expresión de miRNAs fue diferente. Sobre este punto Webb y colaboradores en 2003 mencionan que a pesar de que las valvas aortica y pulmonar poseen la misma estructura básica, hay diferencias significativas en la estructura de la aorta, en comparación con la raíz arterial pulmonar. Debido a que las valvas de la válvula pulmonar están soportadas por un anillo de musculatura infundibular, que se levantan de la base ventricular. En contraste, dos de las valvas de la válvula aórtica, están en continuidad posterior con una de las valvas de la mitral (aurícula-ventricular izquierda). Esta zona de continuidad fibrosa, forma el techo del ventrículo izquierdo. Sin embargo esta peculiaridad anatómica, no explica del todo las diferencias en el patrón de expresión de miRNAs, por lo que es necesario abordar este tema de manera más específica.

Al analizar la expresión de miRNAs en el tejido embrionario de E24HH se encontró que 8 de 9 miRNAs, están expresados con un patrón parecido al del TSVD. Este resultado podría estar relacionado con el hecho de que en el E24HH el cono esbozo del corazón embrionario que da origen al TSVD, es una estructura histológicamente más desarrollada que el tronco, saco aórtico o cojines del canal AV. Cabe recordar que el cono y sus crestas endocárdicas, se transforman en un 40% del corazón maduro, en la pared libre del TSVD y la cresta supraventricular (Rana *et al.*, 2007; Lazarrini 2012), mientras que los otros segmentos embrionarios dan origen a estructuras más pequeñas y menos voluminosas a comparación TSVD.

Los miRNAs expresados en el estadio embrionario E24HH fueron miRNA-24, miRNA-1, miRNA-15a, miRNA-30d, miRNA-126, miRNA-206, miRNA-27b y miRNA-23b.

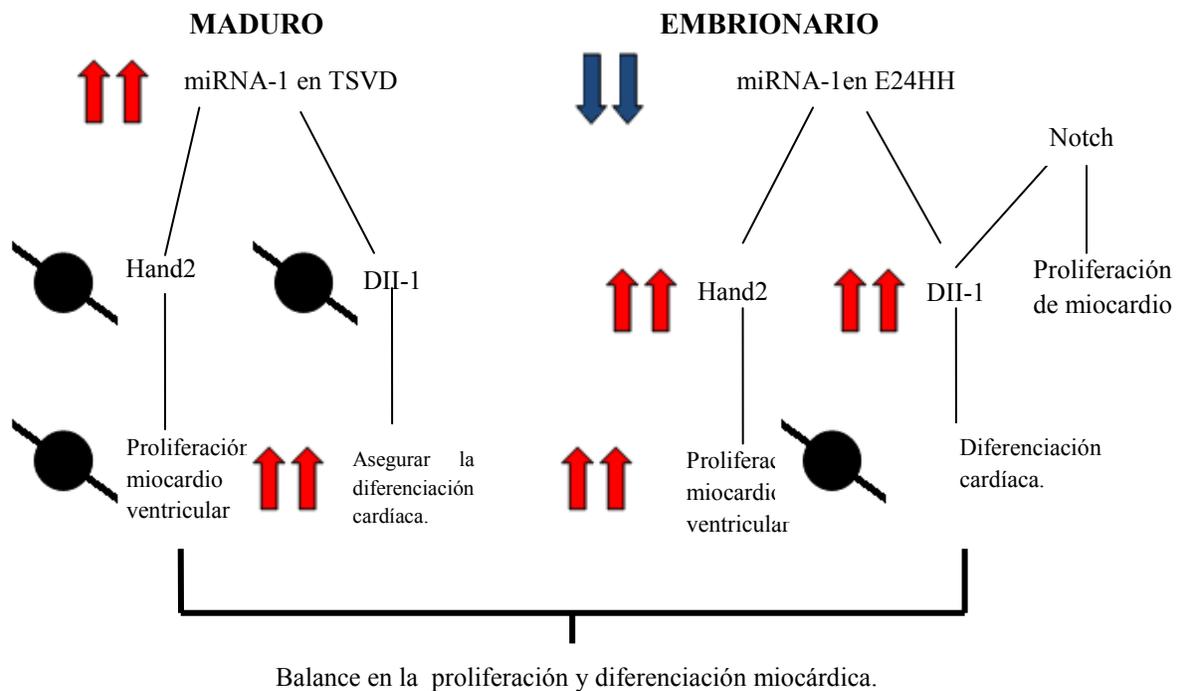
miRNA-1 se ha caracterizado como un miRNA miogénico descrito en músculo esquelético y cardíaco (Townley-Tilson et al., 2010). En el músculo cardíaco participa en la proliferación y diferenciación celular. Por un lado mediante estudios *in vivo*, en ratones transgénicos deletando al miRNA-1 e *in vitro*, con células COS-1, se ha reportado que su blanco es Hand2. La expresión de miRNA-1 y ausencia de Hand2 en la etapa embrionaria, inhibe la proliferación del miocardio ventricular, evaluada por un menor grosor de las paredes y menor expansión ventricular (Zhao et al., 2005).

Mientras que Ivey y colaboradores (2008), mediante la transfección de miRNA-1 a células madres embrionarias humanas, observaron que las células se diferenciaban a células cardíacas y expresan el marcador cardíaco NKX2.5. Encontraron que el miRNA-1, tiene como blanco al ligando de Notch Delta 1 (Dll-1), *in vitro*, la inhibición de Dll-1 provoca que las células se diferencien a células cardíacas, mientras que al estar presente Dll-1, las células se diferencian a otros linajes celulares.

A pesar de esta información, aún no se ha evaluado el papel de miRNA-1 en el desarrollo del tracto de salida. En este trabajo, se encontró un alto grado de expresión del miRNA-1 en el tejido maduro del TSVD, lo que hace pensar que en esta etapa está disminuida la proliferación, manteniéndose la diferenciación celular. Con respecto a este punto, en la literatura se ha descrito que poco después del nacimiento del embrión, el miocardio incrementa de tamaño y permanecerá en arresto de proliferación celular (Walsh et al., 2010; Sedmera y Thompson 2011).

En contraste, en el tejido embrionario de la etapa E24HH, la expresión del miRNA-1 fue menor que la observada en la estructura madura (Compare figura 11 con figura 10A). Esto puede suponer que tiene que ver, con una mayor proliferación del miocardio en proceso de diferenciación. Esto concuerda con lo reportado por Martinsen 2005 y Sánchez-Gómez 2005, que señalan que en el embrión de E24HH es alta la tasa de proliferación y menor la diferenciación celular; de esta etapa en adelante aumenta la proliferación miocárdica del cono para formar: el septum interventricular, pared libre ventricular y cresta supraventricular.

Otra función reportada para el ligando de Notch, Delta 1 (Dll-1), además de la ya descrita con anterioridad, es que la activación de Notch por su ligando Dll-1 en el endocardio, activa la expresión de BMP10 en el miocardio, requerido en la proliferación ventricular (Evans et al., 2010). Esto permite suponer que al estar disminuido el miRNA-1 en el estadio E24HH, aumenta la expresión de Dll-1, promoviendo la proliferación miocárdica.

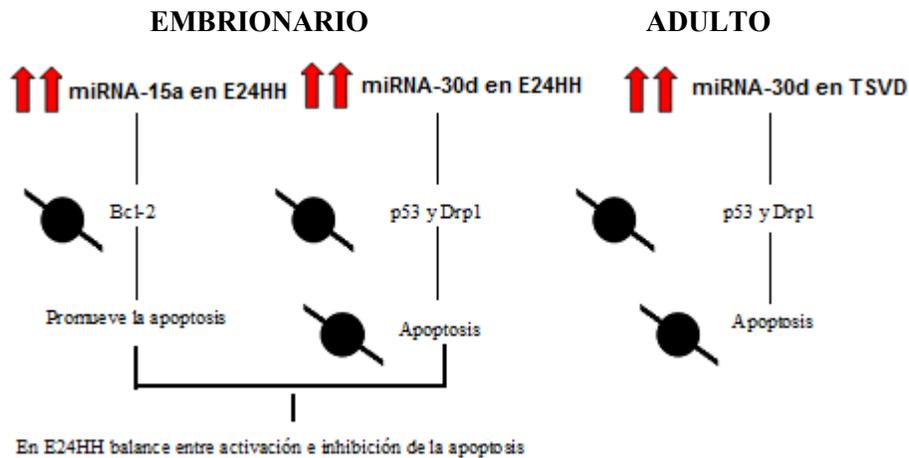


**Fig.14. Acción de miRNA-1 en E24HH y en el tracto de salida ventrículo derecho (TSVD).** A la izquierda se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-1 en el tejido maduro del TSVD inhibiendo la proliferación y promoviendo la diferenciación miocárdica. A la derecha se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-1 en el tejido embrionario E24HH promoviendo la proliferación e inhibiendo la diferenciación miocárdica. Flechas en rojo: sobre expresión; flechas azul: sub expresión; círculos negro: inhibición.

Se ha determinado que miRNA-15a, tiene un papel importante en evitar la proliferación de miocardiocitos posnatales, proceso conocido como arresto celular (Porrello *et al.*, 2011). En contraste en cultivos celulares de megacariocitos humanos, el miRNA-15a inhibe el ARNm de Bcl-2, promoviendo la apoptosis (Cimmino *et al.*, 2005). Por otro lado, a diferencia de miRNA-15a, la expresión de miRNA-30d se encuentra relacionada con la inhibición de la apoptosis a través de p53. Este hallazgo se logró en cultivos *in vitro* de fibroblastos cardíacos, donde la expresión inducida de miRNA-30d es capaz de inhibir la fisión mitocondrial y apoptosis. El miRNA-30d tiene como blanco a p53, al encontrarse disminuido p53 inhibe a una GTPasa llamada Proteína-1 relacionada a la Dinamina (Drp1). Esta proteína provoca la escisión de la membrana externa mitocondrial, liberando al citocromo C e induciendo apoptosis (Li *et al.*, 2010). Se sabe que en la cardiogénesis, la apoptosis, es un proceso genéticamente controlado en la remodelación del tracto de salida durante la formación del corazón maduro (Waldo *et al.*, 1998; Sedmera y Thompson 2011; Lazarini 2011). En la zona de interés miRNA-15a y miRNA-30d, se encuentran expresados en la etapa E24HH en la misma proporción (Figura 11). Estos hechos sugieren que en la cardiogénesis intermedia (E24HH), miRNA-15a y miRNA-30d mantienen un equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis del tejido cardíaco en desarrollo.

Mientras que en el TSVD el miRNA-30d es el segundo miRNA más expresado (Figura 10A). Se sabe que en el tejido maduro cardíaco, se mantiene en arresto mitótico y apoptótico durante la vida

del individuo, y solo en caso de ciertas patologías este tejido muere, lo que podría explicar la mayor expresión del miRNA-30d inhibiendo la apoptosis en el TSVD (Sedmera y Thompson 2011).

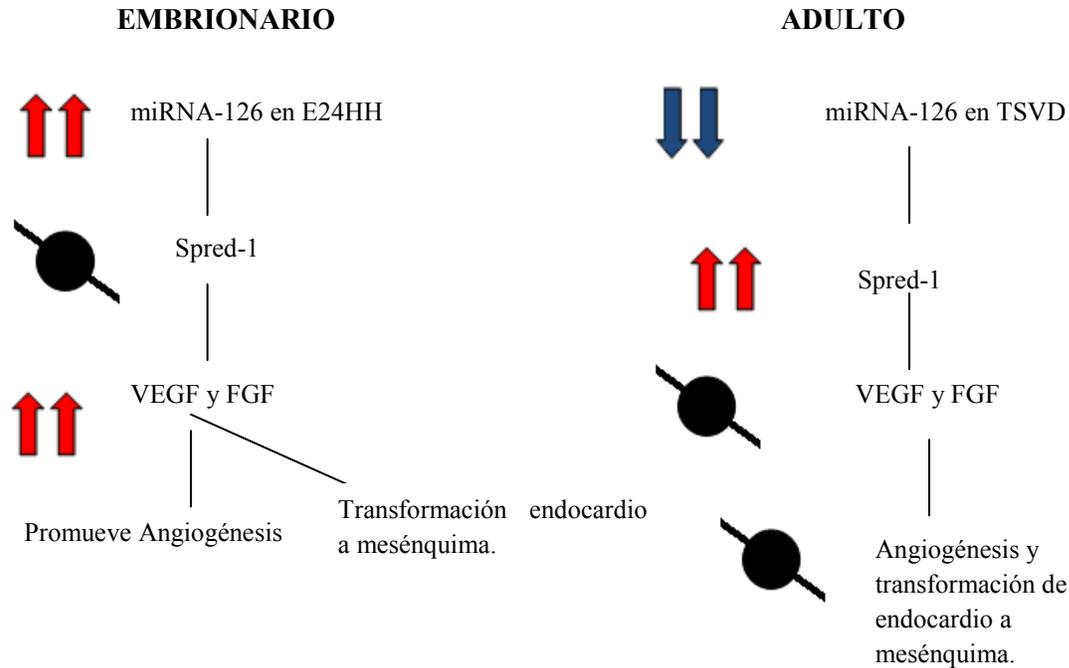


**Fig.15. Acción de miRNA-15a y miRNA-30d en E24HH y tracto de salida ventrículo derecho (TSVD).** A la izquierda se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-15a y miRNA-30d en el tejido embrionario E24HH manteniendo un balance en la activación e inhibición de la apoptosis. A la derecha se muestra la manera hipotética de acción del miRNA-30d en el tejido maduro del TSVD inhibiendo la apoptosis. Este miRNA se encuentra mayormente expresado en TSVD y en menor cantidad el miRNA-15a. Flechas en rojo: sobre expresión; flechas azul: sub expresión; círculos negro: inhibición.

Se tiene poca información del papel que juega miRNA-126 durante la cardiogénesis, pero se sabe que su función principal es angiogénica. *In vivo* usando la técnica de invasión de células endoteliales (CE) a una matriz sintética de matrigel, implantada subcutáneamente en ratones normales, las CE migran al tapón de matrigel y se ensamblan en una malla primitiva vascular. En contraste, en ratones nulos miRNA126 (-/-) se observa una disminución dramática de la respuesta angiogénica comparada con el control. Se encontró que el miRNA-126 tiene como blanco Spred-1 un regulador negativo de los factores de crecimiento angiogénico VEGF y FGF (Wang *et al.*, 2008). En la zona de interés en el estadio E24HH, se encontró la expresión de miRNA-126, lo que posiblemente se relacione con la repuesta angiogénica, reportada en la remodelación del saco aórtico en este período. Waldo y colaboradores 1998 describieron que la división del saco aórtico por el septum aortopulmonar resulta en la formación de los dos canales vasculares, aorta y pulmonar; mientras que el mesénquima que forma al saco aórtico, originará las paredes de la base de la aorta ascendente y tronco de la pulmonar. Sin embargo aún falta una descripción más detallada de las redes moleculares que regulan este proceso.

La expresión de VEGF no solo está relacionada con la modulación de la angiogénesis, se ha reportado indispensable en la transformación terminal de las células endocardiales a células mesenquimatosas y posterior a la TEM para la formación de las crestas del cono y tronco y los cojines del canal AV (Stankunas *et al.*, 2010). Ya se ha descrito con anterioridad que el E24HH marca el fin de la TEM, por lo que supone que en este caso la expresión del miRNA-126 podría estar relacionada con la transformación de las células mesenquimales y su maduración.

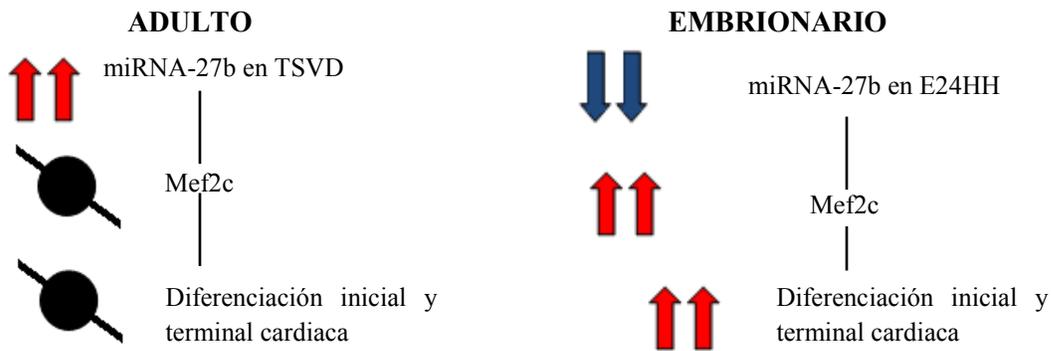
En contraste en el TSVD el nivel de expresión de miRNA-126 es bajo a comparación de otros miRNAs, posiblemente esté relacionado con la inhibición de VEGF y FGF y el término de la angiogénesis.



**Fig.16. Acción de miRNA126 en E24HH y tracto de salida ventrículo derecho (TSVD).** A la izquierda se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-126 en el estadio E24HH promoviendo la angiogénesis y la diferenciación terminal endocardio a mesénquima. A la derecha se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-126 en el TSVD inhibiendo la angiogénesis y la diferenciación terminal endocardio a mesénquima. Flechas en rojo: sobre expresión; flechas azul: sub expresión; círculos negro: inhibición.

Se ha determinado que el RNAm de Mef2c es uno de los blancos de miRNA-27b. Esto se ha comprobado al transfectar el miRNA-27b en células miocárdicas atriales y cultivo primario de cardiomiocitos fetales. El resultado fue una disminución de aproximadamente 40% de la expresión de Mef2c. En contraste, la inhibición de miRNA-27b lleva al incremento de cuatro veces el transcrito de Mef2c. Por otro lado, se sabe que Mef2c es un factor de transcripción miogénico, implicado en el desarrollo del corazón, como regulador de la diferenciación inicial y terminal cardíaca, incluyendo la especificación del segundo campo cardiogénico durante la morfogénesis del tracto de salida embrionario (Dodou *et al.*, 2004; Villavicencio-Guzmán *et al.*, 2010). Estudios en el desarrollo cardíaco de pollo en etapa E28HH-E46HH y después del nacimiento por inmunohistoquímica, se encontró que Mef2c se encuentra principalmente expresado en el miocardio del cojín del canal AV y crestas del cono; así como en el mesénquima y endocardio. Sin embargo se encontró que Mef2c, se encuentra mayormente expresado en el desarrollo embrionario y disminuye su expresión después del nacimiento (Villavicencio-Guzmán *et al.*, 2010). En los resultados de este estudio, se encontró expresado al miRNA-27b tanto en la etapa embrionaria como adulta del TSVD, sin embargo la expresión es mayor en el tejido adulto (Figura 10A y 11). Lo que sugiere que el miRNA-27b en el estadio embrionario, es regulador importante en el control de la

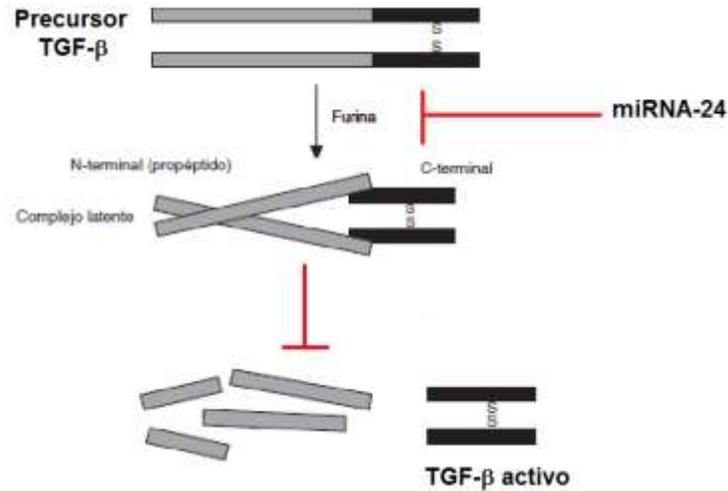
especificación del miocardio y en la transformación de las crestas conales (mesenquimatosas) para formar la cresta supraventricular (miocardio). En el tejido maduro, suponemos que al encontrar aumentada la expresión del miRNA-27b, indica el término de la diferenciación y proliferación miocárdica; y sin embargo el miocardio aumentara su volumen y se mantendrá en un estado de pausa mitótica y apoptótica.



**Fig.17. Acción de miRNA-27b en el tracto de salida ventrículo derecho (TSVD) y E24HH.** A la izquierda se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-126 en el TSVD inhibiendo la diferenciación miocárdica. A la derecha se muestran la manera hipotética de acción del miRNA-126 en el estadio E24HH promoviendo la diferenciación inicial y terminal miocárdica. Flechas en rojo: sobre expresión; flechas azul: sub expresión; círculos negro: inhibición.

Con base en la búsqueda de posibles blancos y procesos morfogénicos regulados por los miRNAs, se agruparon a los miRNA-24, miRNA-23b, miRNA-206 y Let7a como importantes en la transformación epitelio-mesénquima regulando a TGFβ o modificando la matriz extracelular por lo que se decidió analizar su patrón de expresión del estadio E24HH al E36HH.

Respecto al miRNA-24, mediante estudios en la malla ocular humana encontraron que el miRNA-24 tiene como blanco a la enzima furina (Luna y colaboradores 2011). Esta enzima es la encargada de la maduración del TGF-β (Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004). Estos hechos indican que el miRNA-24, está relacionado con la regulación negativa de la enzima furina y a su vez, la regulación negativa de la vía de señalización de TGF-β, al detener su maduración.



**Fig.18.- Acción del miRNA-24 en la regulación negativa de la enzima furina encargada de la activación del TGF-β maduro. Símbolo: —| inhibición.** Tomado Sosa-Garrocho y Macías-Silva 2004.

Está bien documentado que la TEM es el proceso morfogénico más importante del desarrollo de los cojines y crestas del corazón embrionario de aves, durante los estadios E18HH-E23HH y que la TEM es dependiente del TGF-β (van den Hoffman *et al.*, 1999; Waldo *et al.*, 2001; Barnett y Desgrosellier 2003). En concordancia con este hecho Pelton y colaboradores (1991) en ratones de 12.5pc (una vez formados los cojines) encontraron un descenso de la proteína del TGF-β en canal AV que correlaciona con el fin de la TEM.

En este trabajo en los embriones de aves de E24HH se encontró la expresión de miRNA-24, lo que posiblemente se relacione con un descenso del TGFβ y concuerde con lo reportado como una etapa de transición de la TEM, para dar paso a otros procesos como la proliferación, la miocardización y maduración del miocardio. Sin embargo la actividad del miRNA-24 en E24HH puede referirse no solo a la TEM, sino también a la diferenciación miocardio. En aves, en estadios E22HH-E24HH el miocardio, aun se mantiene indiferenciado, no posee características histológicas propias del tejido maduro y las capas miocárdicas son delgadas en comparación con estadios más avanzados (Sánchez-Gómez *et al.*, 2005). La posible inhibición de TGF-β en E24HH por la acción del miRNA-24, podría estar relacionada con la necesidad de evitar la diferenciación prematura del miocardio, que recubre al cono y tronco, que aun no han completado su morfogénesis. Esta idea se basa en lo descrito por Monzen y colaboradores (1999) al adicionar TGF-β a cultivos *in vitro* de miocardiocitos inmaduros y encontrar que este factor es indispensable para su diferenciación terminal.

También se observó que la expresión de este miRNA-24 cambió a lo largo del desarrollo embrionario. En el estadio E24HH y E26HH fue la más alta; hacia el estadio E28HH-E36HH se observó una menor expresión del miRNA-24. Estos resultados sugieren que entre E28HH-E36HH al disminuir miRNA-24 hay una liberación de la represión del ARNm de la enzima furina que posiblemente lleve a la maduración del TGF-β, pues se sabe que durante este periodo de cardiogénesis tardía, se encuentra presente TGF-β y actúa en la fusión de cojines cardíacos,

desarrollo del septum primum, valvas atrio-ventriculares y semilunares (Pelton *et al.*, 1991; Heine *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1999).

Por otro lado se ha encontrado ARNm de TGF $\beta$ 1 en edad adulta (Engelmann *et al.*, 1992) y se sabe que en aves en el periodo postnatal temprano hay proliferación miocárdica, sin embargo, va disminuyendo hasta desaparecer en la etapa adulta (Martinsen 2005). Cabe mencionar que en la estructura madura del TSVD, se observó exacerbada la expresión del miRNA-24 lo que posiblemente esté relacionado con la fisiología del tejido, ya que se sabe que el TSVD abarca el septum interventricular, infundíbulo, cresta supraventricular y pared libre del VD que es preponderantemente tejido muscular miocárdico. La expresión excesiva de miRNA-24 en el corazón juvenil de pollo puede provocar la represión de la furina y por ende del TFG- $\beta$  llevando a una disminución de la proliferación de miocardiocitos ya diferenciados, lo que correlacionaría con lo descrito previamente en la literatura. Algunos blancos de miRNA-24 descritos en las bases bioinformáticas, son la Proteína-11 relacionada Bcl2 (facilitador de la apoptosis) y con un menor score Mef2A (potenciador específico de miocitos 2A).

miRNA-206 así como el miRNA-23b se expresan en estadio E24HH y entre el estadio E26HH al E36HH dejan de expresarse. Estos dos miRNAs se encuentran relacionados con la MEC, por una parte según las bases bioinformáticas miRNA-206 tiene como posible blanco a la endotelina (Horstmeyer *et al.*, 2005). En la literatura, se ha reportado que fibroblastos humanos, al ser estimulados con endotelina en cultivos primarios, aumenta la síntesis de colágena 1. Este efecto aumenta de manera aditiva al adicionar TGF- $\beta$ ; por otro lado, se ha reportado que la transfección de miRNA-23b en explantes de cojines endocárdicos provoca una reducción y pérdida de la expresión de la enzima Has2, efecto que se acompaña de reducción de HA en la MEC.

En la formación de los cojines cardíacos, varios autores han documentado que el HA y colágena son de suma importancia. En explantes de cojines endocárdicos de ratones Has2 $^{-/-}$  cuando se le adiciona HA se favorece la TEM. En contraste cuando se le adiciona al explante hialuronidasa (enzima degradante del HA), se inhibe la transformación de células endoteliales a mesénquima y la consecuente invasión de las células mesenquimales a la matriz de colágena (Camenisch *et al.*, 2002). Además se ha encontrado una relación positiva de la actividad de TGF $\beta$ 2, con la síntesis del HA. En ratones TGF $\beta$ 2  $^{-/-}$  se ve afectada la producción del HA y por ende las características de la MEC alterando la formación de los cojines endocárdicos (Azhar *et al.*, 2011). También se sabe que una vez concluida la TEM en los cojines y crestas cardíacas, el HA y la colágena ya no son componentes esenciales de la matriz extracelular, por lo que disminuye su producción (Camenisch *et al.*, 2002; Azhar *et al.*, 2011). Por otra parte, en el embrión de pollo, el E24HH marca el fin TEM y da paso a la maduración de los cojines y crestas cardíacas que culmina con la formación de las válvulas y tabiques característicos de un corazón tetracameral.

Todos estos antecedentes, sumados al patrón de expresión del miRNA-206 y miRNA-23b en la etapa E24HH sugieren que estas dos moléculas, pueden jugar un papel en la modificación de la constitución química, organización e inhibición de los componentes de la MEC, facilitando el cambio del programa morfogénético de la TEM a proliferación y diferenciación del tejido

mesenquimatoso. Mientras que en las bases bioinformáticas otro blanco reportado para miRNA-23b es el receptor 3 de TGF- $\beta$ .

Está bien caracterizado que los receptores 1 de TGF- $\beta$ , son necesarios en la transducción y activación de cascadas de señalización importantes en diversos mecanismos celulares, involucrados en la cardiogénesis como es el caso del desarrollo de los cojines endocárdicos del canal AV y crestas del cono y el tronco, la migración de las células de la cresta neural, proliferación y diferenciación del miocardio. En embriones *TgfbR1* nulos mueren a los 13pc por defectos cardíacos severos (Nakajima *et al.*, 2000; Arthur y Bamforth 2011). En las bases bioinformáticas, se ha reportado que *Let7a* tiene como blanco al receptor 1 de TGF- $\beta$ . En el estudio al evaluar a lo largo del desarrollo (E24HH-36HH), no se encontró expresado *Let7a*, ni tampoco en el tejido maduro. Estos hallazgos sugieren que en el corazón embrionario de pollo, el *TgfbR1* no está regulado por *Let7a* o quizá haya un nivel de regulación no evaluado o que el receptor se encuentra expresado de manera constitutiva en todo el desarrollo embrionario.

Con base en las funciones descritas anteriormente y al patrón de expresión durante la transformación del cono en el TSVD, supuesto para miRNA-206, miRNA-24 y miRNA-23b, se plantea un modelo hipotético de acción de estos miRNAs en la TEM y en el desarrollo de las crestas conales (Figura 19).

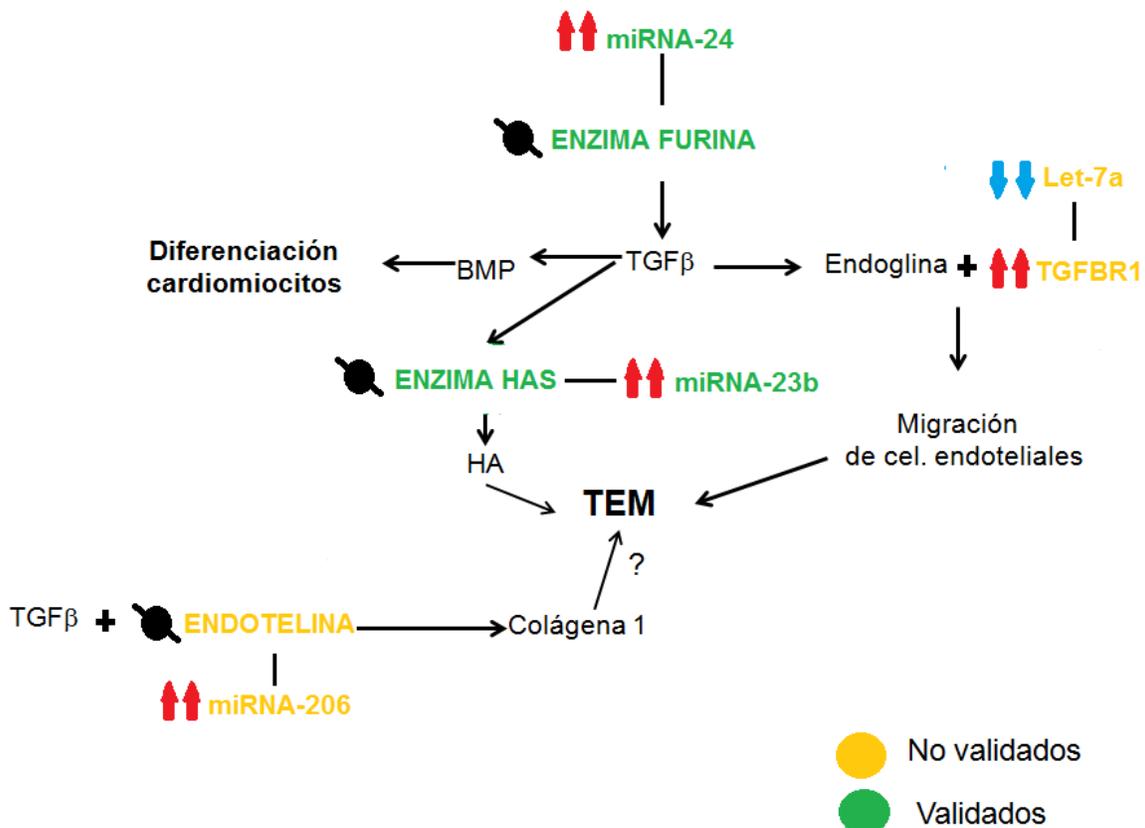


Fig. 19.- Modelo Hipotético de acción de los miRNAs relacionados con TGF $\beta$  y desarrollo de las crestas conales en E24HH. En círculos amarillos se encierran los blancos no validados según la base bioinformática miRBASE con score

arriba de 60% de posibilidad y en círculos verdes se encierran los blancos validados encontrados en la literatura. Flechas en rojo: sobre expresión; flechas azul: sub expresión; círculos negro: inhibición.

## **XII.- CONCLUSIONES**

La correlación del patrón de expresión de los miRNAs analizados y la función que se ha descrito en la literatura permite sugerir:

1.- En el tejido embrionario la subexpresión de miRNA-1 promueve la proliferación del miocardio ventricular e inhibe de la diferenciación cardiaca. La sobreexpresión de miRNA-1 en el TSVD está relacionada con la inhibición de la proliferación de miocardio ventricular y mantenimiento de la diferenciación miocárdica.

2.-En el tejido embrionario la expresión de miRNA-15a correlaciona con la apoptosis, mientras que la expresión de miRNA-30d, con la inhibición de la apoptosis, manteniendo un balance de este proceso. Sin embargo en la estructura madura TSVD la expresión del miRNA-30d y la subexpresión de miRNA-15a inhibiría la apoptosis.

3.-miRNA-126 al encontrarse expresado en el tejido embrionario promueve la angiogénesis y la TEM; mientras que en el adulto al encontrarse subexpresado miRNA-126 puede inhibir la angiogénesis y la TEM.

4.- miRNA-27b al encontrarse subexpresado en el tejido embrionario activa la diferenciación inicial y terminal cardiaca; mientras que en el adulto al encontrarse expresado mantiene diferenciación miocárdica.

5.- El patrón de expresión de miR206, miR23b, miR24 desde E24HH al E36HH, indica que estos miRNAs pudieran facilitar un cambio en el programa genético, modificando las características de la MEC y/o asegurando la transición del proceso de TEM hacia la proliferación y maduración del mesénquima de las crestas conales.

6.- Al no encontrarse expresado el Let-7a en el tejido embrionario, ni adulto, quizá el receptor 1 de TGF- $\beta$  no se encuentre regulado por este miRNA o el receptor se expresa constitutivamente en el tejido.

### **XIII.- PERSPECTIVAS**

Validar en nuestra zona de interés y modelo animal los blancos señalados en la literatura y en las bases bioinformáticas del miRNA-206, miRNA-24 y miRNA-23b.

Inyectar en estadio E22HH los miRNAs miRNA-206, miRNA-24 y miRNA-23b y por otro lado los antagomiRs y observar si hay algún impacto en el desarrollo del cono hacia la estructura madura del TSVD.

## XIV.- Literatura citada

1. **Akhurst R. J, Lehnert S.A, et al., (1990).** TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* 108: 645-656.
2. **Álvarez-García I, Miska E.A. (2005).** MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132(21): 4653-4662.
3. **Anderson R.H, Shirali G. (2009).** Sequential segmental analysis. Clinico-Morphological correlations. *Ann Pediatr Card* 2(1): 24-35.
4. **Anderson RH, Becker AE.** Cardiac Anatomy. An Integrated. Text and Colour Atlas. London: Gower Medical Publ. 1980.
5. **Anderson RH, Chaudhry B, et al., (2012).** Normal and abnormal development of the intrapericardial arterial trunks in humans and mice. *Cardiovasc Res.* 1;95(1):108-15.
6. **Anderson RH, Wilkinson JL, et al., (1974).** Morphogenesis of bulboventricular malformations. I. Consideration of embryogenesis in the normal heart. *Br Heart J.* 36(3):242-55.
7. **Anselmi G, de la Cruz MV. (1998).** Embryological development of the atria. Septation and viscerio-atrial situs. In: De la Cruz MV and Markwald R, editors. *Living morphogenesis of the heart.* Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser 169-186.
8. **Argüello C, de la Cruz MV, et al., (1978).** Ultrastructural and experimental evidence of myocardial cell differentiation into connective tissue cells in embryonic chick heart. *J Mol Cell Cardiol* 10:307-315.
9. **Arteaga M, García Peláez I. (2013).** Desarrollo del sistema cardiovascular En: *Embriología Humana y Biología del Desarrollo.* Ed. Arteaga Martínez M, García Peláez I. Editorial Médica Panamericana. 22:11-20.
10. **Arteaga M, García-Peláez I, Quero M.** Contribution of the truncal and conal ridges to the formation of the definitive ventricular septum of the chicken embryo. En: Quero M. y Arteaga M. Editores. *Pedriatic Cardiology. Atrioventricular Septal Defects.* Madrid: Editorial Norma, 1987; 104-119.
11. **Arteaga M, Maitre Azcárate MJ, García-Peláez I, González de la Vega C y Quero-Jiménez M.** Anatomía y fisiología normal del corazón: En: *CARDIOLOGÍA PEDIÁTRICA,* editado por Julio Ardura Fernández. Ediciones CEA, S.A. (Grupo Jarpyo). Madrid, España, 1987. pp. 1-39.
12. **Arthur H. M. Bamforth S. D. (2011).** TGFb Signaling and Congenital Heart Disease: Insights from Mouse Studies. *Birth Defects Research (Part A)* 91:423-434.
13. **Azhar M, Brown K, Gard C, et al., (2011).** Transforming growth factor *Beta2* is required for valve remodeling during heart development. *Dev Dyn* 240(9): 2127-2141.

14. **Azhar M, Runyan R.B, et al., (2009).** Ligand-Specific Function of Transforming Growth Factor Beta in Epithelial-Mesenchymal Transition in Heart Development. *Dev Dyn.* 238(2): 431–442.
15. **Baño-Rodrigo M, Quero-Jiménez M, Antúnez-Jiménez MA.** Anatomía cardíaca. Sánchez PA. En cardiología pediátrica. Madrid. Editorial Salvat. 1986. 4:32-56.
16. **Barnett J. V, Desgrosellier J.S. (2003).** Birth Defects Research (Part C) Early Events in Valvulogenesis: A Signaling Perspective. 69:58–72.
17. **Bernake H.D, Markwald R. R. (1979).** Effects of hyaluronic acid on cardiac cushion tissue cells in collagen matrix cultures. *Texas Reports on Biology and Medicine* 39:271-285.
18. **Bernanke DH, Marwald RR. (1982).** Migratory Behavior of Cardiac Cushion Tissue Cells in a Collagen-Lattice Culture System. *Developmental Biology* 91:285-245.
19. **Biyashev D, Veliceasa D, et al., (2012).** miR-27b controls venous specification and tip cell fate. *Blood* 119(11): 2679–2687.
20. **Bour B.A, O'Brien M.A, et al., (1995).** Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* 9, 730-741.
21. **Bourdeau A, Dumont D.J, Letarte M. (1999).** A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.* 104:1343–1351.
22. **Boyer A.S, Ayerinkas I.I, et al., (1999).** TGFb2 and TGFb3 Have Separate and Sequential Activities during Epithelial–Mesenchymal Cell Transformation in the Embryonic Heart. *Developmental Biology* 208: 530–545.
23. **Brand T. (2003).** Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology* 258: 1–19.
24. **Brown CB, Boyer AS, et al., (1999).** Requirement of Type III TGF-b Receptor for Endocardial Cell Transformation in the Heart. *Science* 283: 2080.
25. **Bruneau B. G. (2008).** The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 451: 21.
26. **Butcher JT, Markwald RR. (2007).** Valvulogenesis: the moving target. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 362: 1489–1503.
27. **Calderón-Colmenero J, Cervantes-Salazar J.L, et al., (2010).** Problemática de las cardiopatías congénitas en México. Propuesta de regionalización. *Arch Cardiol Mex* 80(2):133-140.
28. **Camenisch T.D, Molin D. G. M, et al., (2002).** Temporal and Distinct TGF Ligand Requirements during Mouse and Avian Endocardial Cushion Morphogenesis *Developmental Biology* 248, 170–181.
29. **Cao L, Kong LP, et al., (2012).** microRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int J Mol Med.* 30(5):1095-104.

30. **Carver E. A, Jiang R, et al., (2001).** The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular and Cellular Biology* 21(23): 8184–8188.
31. **Cayré RO, Civetta JD, Gálvez JL.** Anatomía cardíaca. Díaz-Góngora G., Sandoval-Reyes N., Vélez-Moreno JF., Carrillo-Ángel G. En *Cardiología Pediátrica*. Bogotá. Editorial Mc Graw Hill. 2003. 4: 41-51.
32. **Chan MC, Hilyard AC, et al., (2010).** Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFb family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *The EMBO Journal* 29: 559–573.
33. **Chen J, Yin H, et al., (2011).** Induction of MicroRNA-1 by Myocardin in Smooth Muscle Cells Inhibits Cell Proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(2):368-375.
34. **Chen J, Zhou SH. (2011).** Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway. *Cardiology Journal* 18(6):675–681.
35. **Chen J.N, Fishman M.C. (2000).** Genetics of heart development. *Trends Genet.* 16:383–388.
36. **Chinchilla A, Lozano E, Daimi H, et al., (2011).** MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovasc Res* 89: 98–108.
37. **Choudhary B, Ito Y, et al., (2006).** Cardiovascular malformations with normal smooth muscle differentiation in neural crest-specific type II TGFb receptor (Tgfbr2) mutant mice. *Developmental Biology* 289:420 – 429.
38. **Cimmino A, Calin G. A, et al., (2005).** miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS* 102 (39): 13944–13949.
39. **Ciruna B., Rossant, J. (2001).** FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev. Cell* 1, 37–49.
40. **Crist CG, Montarras D, et al., (2009).** Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *PNAS* 32: 13383–13387.
41. **Darnell D. K, Kaur S, et al., (2006).** MicroRNA Expression During Chick Embryo. *Developmental Dynamics* 235:3156–3165.
42. **Davis CL. (1927).** Development of the human heart from its first appearance to the stage found in embryos of twenty paired somites. *Contribution Embryology.* 19:245-284.
43. **De la Cruz MV, Quero-Jiménez M, et al., (1982).** Morphogénese du septum interventriculaire. *Coeur* 13:443-8.
44. **De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, et al., (1977).** Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *Journal of Anatomy.* 123, 3: 661-686.

45. **De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino M. A. (1989).** The primitive cardiac regions in the straight tube heart (Stage 9) and their anatomical expression in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *J. Anat.* 165, 121-131.
46. **De Lange FJ, Moorman AFM, et al., (2004).** Lineage and morphogenetic analysis of the cardiac valves. *Cir Res* 95:645–654.
47. **De Vries PA, Saunders JB. (1962).** Development of the ventricles and spiral outflow tract in the human heart. A contribution to development of the human heart from age group IX to age XV. *Contrib Embryol.* 256:89-114.
48. **Dodou E, Verzi P. M, et al., (2004).** Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development* 131, 3931.
49. **Duisters R.F, Tijssen A. J, et al., (2009).** miR-133 and miR-30 Regulate Connective Tissue Growth Factor. Implications for a Role of MicroRNAs in Myocardial Matrix Remodeling. *Circ Res* 104:170-178.
50. **Engelmann L.G, Boehm D.K, et al., (1992).** Transforming growth factor-beta in heart development. *Mechanisms of development*, 38:85-98.
51. **Evans M.S, Yelon D, et al., (2010).** Myocardial Lineage Development. *Circ Res.*107:1428-1444.
52. **Fiedler J, Jazbutyte V, et al., (2011).** MicroRNA-24 Regulates Vascularity After Myocardial Infarction. *Circulation* 124: 720-730.
53. **Fiedler J, Stöhr A, et al., (2013).** Functional MicroRNA library screening identifies the hypoxaMiR MiR-24 as a potent regulator of smooth muscle cell proliferation and vascularization. *Antioxid Redox Signal*.
54. **Fish JE, Santoro MM, et al., (2008).** miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity In zebrafish embryos. *Dev Cell* 15(2):272–284.
55. **Fu JD, Rushing SN, et al., (2011).** Distinct Roles of MicroRNA-1 and -499 in Ventricular Specification and Functional Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *PLoS ONE* 6(11).
56. **Gajewski K, Fossett N, et al., (1999).** The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in Drosophila. *Development* 126, 5679–5688.
57. **García-Peláez I, y Arteaga M. (1993).** Experimental study of the development of the truncus arteriosus of the chick embryo heart. *Anat Rec* 237:378-384
58. **García-Peláez I, Díaz-Góngora G, Arteaga M. (1984).** Contribution of the superior atrioventricular cushion to the left ventricular infundibulum. Experimental study on the chick embryo. *Acta Anat* 118:224-30.

59. **Guadalajara Boo J.F.** Cardiología. Méndez Editores. Impreso México 1985. pp3-1299
60. **Hamburger V., Hamilton H.L. (1951).** A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 42-92.
61. **Heidersbach A, Saxby C, et al., (2013).** microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife* 19;2:1-22.
62. **Heine I. U, Muñoz E. E, et al., (1987).** Role of Transforming Growth Factor-1 in the Development of the Mouse Embryo. *The Journal of Cell Biology*, 105.
63. **Horiguchi M, Ota M, Rifkin D. B. (2012).** Matrix control of transforming growth factor- $\beta$  function. *J. Biochem* 152(4):321–329.
64. **Horstmeyer A, Licht C, et al., (2005).** Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF- $\beta$ 1. *FEBS Journal* 272: 6297–6309.
65. **Hou N, Wabg J, et al., (2012).** Cardiomyocyte overexpression of miR-27b resulted in cardiac fibrosis and mitochondria injury in mice. *Yi Chuan.* 34(3):326-34.
66. **Hullinger TG, Montgomery RL, et al., (2012).** Inhibition of miR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury. *Circ Res* 110(1): 71–81.
67. **Hurle JM, Kitten GT, et al., (1994).** Elastic Extracellular Matrix of the Embryonic Chick Heart: An Immunohistological Study Using Laser Confocal Microscopy. *Developmental Dynamics* 200: 321-332.
68. **Inui M, Martello G, Piccolo S. (2010).** MicroRNA control of signal transduction. *Molecular cell Biology* 11: 253-263.
69. **Ivey KN, Muth A, et al., (2008).** MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2:219 –229.
70. **Jalali S, Ramanathan GK, et al., (2012).** Mir-206 Regulates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Differentiation. *PLoS ONE* 7(10).
71. **Jentsch C, Leierseder S, et al., (2012).** A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *Journal Mol Cell Cardiol* 52 (1): 13-20.
72. **Jian Y, Yin H, Zheng XL. (2010).** MicroRNA-1 Inhibits Myocardin-Induced Contractility of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal Cell Physiol.* 225: 506–511.
73. **Jiang Q, Lagos-Quintana M, et al., (2013).** miR-30a regulates endothelial tip cell formation and arteriolar branching. *Hypertension.* 62(3):592-8.
74. **Jiang X, Rowitch D. H, et al., (2000).** Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.

75. **Johnson SM, Grosshans H, et al., (2005).** RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* 120:635–647.
76. **Jun Z, Wen-Qing L, et al., (2011).** Two Functional MicroRNA-126s Repress a Novel Target Gene p21-Activated Kinase 1 to Regulate Vascular Integrity in Zebrafish *Circ Res* 108:201-209.
77. **Katherine E. Y, Kirby L. M. (2002).** Wherefore Heart Thou? Embryonic Origins of Cardiogenic Mesoderm. *Developmental Dynamics* 223:307–320.
78. **Kim V. N. (2005).** MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicing. *Molecular Cell Biology* 6: 370-385.
79. **Kitajima S, Takagi A, et al., (2000).** MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 127:3215–3226.
80. **Kloosterman W. P, Plasterk R. H. A. (2006).** The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell* 11: 441–450.
81. **Komuro I, Izumo S. (1993).** Csx: A murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Developmental Biology* 90:8145-8149.
82. **Kramer TC. (1942).** The partitioning of the truncus and conus and the formation of the interventricular septum in the human heart. *Am J Anat.* 71:343-370.
83. **Kuhnert F, Mancuso MR, et al., (2008).** Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development* 135:3989-3993.
84. **Kuo C.T, Morrissey E.E, et al., (1997).** GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11, 1048–1060.
85. **Legendijk AK, Goumans MJ, et al., (2011).** MicroRNA-23 Restricts Cardiac Valve Formation by Inhibiting *Has2* and Extracellular Hyaluronic Acid Production. *Circ Res* 109:649-657.
86. **Lagos-Quintana M, Rauhut R, et al., (2002).** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12(9):735-9.
87. **Lamers WH, Viragh S, et al., (1995).** Formation of the tricuspid valve in the human heart. *Circulation* 91:111–121.
88. **Lazzarini L. R. (2012).** *Determinación del Destino Prospectivo de las Paredes del Cono y el Significado de la Proliferación y Apoptosis del Miocardio. Estudio Experimental en Embrión de Pollo*, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, México: Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Iztapalapa. Citado 18-09-2011.

89. **Leight J.L, Wozniak M. A, et al., (2012).** Matrix rigidity regulates a switch between TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Biology of the Cell* 23: 781-791.
90. **Li C, Hampson I. N, et al., (1999).** CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor b1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 14, 55-64
91. **Li J, Donath S, et al., (2010).** miR-30 Regulates Mitochondrial Fission through Targeting p53 and the Dynamin-Related Protein-1 Pathway. *PLoS Genet* 6(1): e1000795.
92. **Liberatore C.M, Searcy-Schrick R. D, et al., (2002).** *Nkx-2.5* Gene Induction in Mice Is Mediated by a Smad Consensus Regulatory Region. *Developmental Biology* 244, 243-256.
93. **Limana F, Esposito G, et al., (2011).** HMGB1 Attenuates Cardiac Remodelling in the Failing Heart via Enhanced Cardiac regeneration and miR-206-Mediated Inhibition of TIMP-3. *PLoS ONE* 6(6).
94. **Lin CC, Liu LZ, et al., (2011).** A KLF4-miRNA-206 Autoregulatory Feedback Loop Can Promote or Inhibit Protein Translation Depending upon Cell Context. *Molecular and cellular biology* 2513-2527.
95. **Lina Z, Murtazaa I, et al., (2009).** miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *PNAS* 106(29):12103-12108.
96. **Lints T.J, Parsons L.M, et al., (1993).** *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-431.
97. **Liu N, Williams AH, et al., (2007).** An intragenic *mef2*-dependent enhancer directs muscle-specific expression of micro-RNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci* 104(52):20844-9.
98. **Long G, Wang F, et al., (2012).** Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b Associated with Acute Myocardial Infarction. *PLoS One* 7(12)
99. **Loohuis N. F. M. O, Kos A, et al., (2012).** MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:89-102.
100. **Lough J. and Sugi Y. (2000).** Endoderm and heart development. *Dev. Dynamics* 217: 27-342.
101. **Luna C, Li G, et al., (2011).** MicroRNA-24 Regulates the Processing of Latent TGF $\beta$ 1 During Cyclic Mechanical Stress in Human Trabecular Meshwork Cells Through Direct Targeting of *FURIN*. *Cell Physiol* 226(5):1407-1414.
102. **Manasek FJ. (1968).** Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *Journal of Morphology.* 125(3):329-65.
103. **Marín-García J. (2004).** Cardiología pediátrica en la era de la genómica. *Rev Esp Cardiol* 57(4):331-46.

104. **Markwald R.R, Butcher J.T. (2007).** The next frontier in cardiovascular developmental biology—an integrated approach to adult disease?. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. 4(2): 60-61.
105. **Martinsen B.J. (2005).** Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology. *Developmental Dynamics* 233:1217–1237.
106. **Massagué J, Chen Y.G. (2000).** Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes Dev*. 14: 627-644.
107. **Meister J, Schmidt M H.H. (2010).** miR-126 and miR-126: New Players in Cancer. *The Scientific World Journal* 10: 2090–2100.
108. **Meloni M, Marchetti M, et al., (2013).** Local inhibition of microRNA-24 improves reparative angiogenesis and left ventricle remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Mol Ther* 21(7):1390-402.
109. **Mercado-Pimentel M. E, Hubbard A. D, Runyan R. B. (2007).** Endoglin and Alk5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Dev Biol*. 304(1): 420–432.
110. **Mishra PK, Metreveli N, Tyagi SC. (2010).** MMP-9 Gene Ablation and TIMP-4 Mitigate PAR-1-Mediated Cardiomyocyte Dysfunction: A Plausible Role of Dicer and miRNA. *Cell Biochem Biophys* 57(2-3): 67–76.
111. **Molin DG.M, Bartram U, et al., (2003).** Expression Patterns of *Tgfb1–3* Associate With Myocardialisation of the Outflow Tract and the Development of the Epicardium and the Fibrous Heart Skeleton. *Developmental Dynamics* 227:431–444.
112. **Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. (1997).** Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11:1061–1072.
113. **Mondol V, Pasquinelli AE. (2012).** Let’s Make It Happen: The Role of let-7 MicroRNA in Development. *Current Topics in Developmental Biology* 99: 2-22.
114. **Monzen K, Hiroi Y, et al., (2001).** Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol* 153:687–698.
115. **Monzen K, Shiojima I, et al., (1999).** Bone morphogenetic protein induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* 19:7096–7105.
116. **Nadal-Ginard B, Kajstura J, et al., (2003).** Myocyte Death, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circulation Reserch*.92:139-150.
117. **Nakajima Y, Yamagishi T, et al., (2000).** Mechanisms Involved in Valvuloseptal Endocardial Cushion Formation in Early Cardiogenesis: Roles of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  and Bone Morphogenetic Protein (BMP). *The Anatomical Record* 258:119–127.
118. **Nascone N. Mercola M. (1995).** An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development* 121:515-523.

119. **Netter FH, Van Mierop LHS. (1969).** *Embryology*. In Netter FH Editor. CIBA Collection of Medical Illustrations. Ardsley, New Jersey. CIBA Pharmaceutical Co. 5:119-125.
120. **Ortega-Espinosa AP. (2011).** *Análisis de las características histológicas y actividad apoptótica en el cono durante su transformación en el tracto de salida del ventrículo derecho. Estudio en el corazón de embrión de pollo*, Tesis para obtener el título de Ingeniero en biotecnología, México. Universidad Tecnológica de Tecámac. Citado 18- 09-2011.
121. **Pan W, Zhong Y, et al., (2013).** MiR-30-Regulated Autophagy Mediates Angiotensin II-Induced Myocardial Hypertrophy. *PLoS ONE* 8(1).
122. **Li J, Donath S, et al., (2010).** miR-30 Regulates Mitochondrial Fission through Targeting p53 and the Dynamin-Related Protein-1. *PLoS Genet* 6(1).
123. **Porrello E.R, Johnson B.A, et al., (2011).** The miR-15 Family Regulates Postnatal Mitotic Arrest of Cardiomyocytes. *Circ Res* 109:670-679.
124. **Potts J.D, Vincent E.B, et al., (1992).** Sense and Antisense TGFP3 mRNA Levels Correlate With Cardiac Valve Induction. *Developmental Dynamics* 193:340-345.
125. **Qayyum S. R, Webb S, et al., (2001).** Septation and Valvar Formation in the Outflow Tract of the Embryonic Chick Heart. *The Anatomical Record* 264:273–283.
126. **Qian L, Van Laake LW, et al., (2011).** miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes. *Journal Exp. Med.* 208 (3): 549-560.
127. **Ramsdell A. F, Markwald R.R. (1997).** Induction of Endocardial Cushion Tissue in the Avian Heart is Regulated, in Part, by TGFb-3-Mediated Autocrine Signaling. *Developmental Biology* 188: 64–74.
128. **Rana M. S, Horsten N.C.A, et al., (2007).** Trabeculated Right Ventricular Free Wall in the Chicken Heart Forms by Ventricularization of the Myocardium Initially Forming the Outflow Tract. *Circulation Research* 100:1000-1007.
129. **Sánchez-Gómez C, Pliego PL, et al., (2005).** Histological study of the proximal and distal segments of the embryonic outflow tract and great arteries. *Anat Rec part. A* 283: 202-211.
130. **Sánchez-Gómez C, Díaz Góngora GF, Márquez García A. (2005).** Embriología Cardíaca. En: Tratado de cardiología. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular eds. Capítulo 1, pp 40-51. Medilegis Ltda. Bogotá Colombia.
131. **Sanford L. P, Ormsby I, et al., (1997).** TGFb2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGFb knockout phenotypes. *Development* 124, 2659-2670.
132. **Sano Y, Harada J, et al., (1999).** ATF- 2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-b signaling. *J Biol Chem* 274:8949–8957.

133. **Schlange T, Andre B, et al., (2000).** Expression analysis of the chicken homologue of CITED2 during early stages of embryonic development. *Mech. Dev.* 98, 157–160.
134. **Schuhheiss M.T, Burch B.E.J, Lassar B.A. (1997).** A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 11, 451-462.
135. **Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB. (1995).** Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* 121: 4203– 4214.
136. **Sedmera D, Thompson R. P. (2011).** Myocyte Proliferation in the Developing Heart. *Developmental Dynamics* 240:1322–1334.
137. **Shan ZX, Lin QX, et al., (2009).** Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction *Biochem Biophys Res Commun* 381(4):597-601.
138. **Shi H, Chen L, et al., (2013).** Synergistic induction of miR-126 by hypoxia and HDAC inhibitors in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 430(2): 827–832.
139. **Song G, Zhang Y, Wang L. (2009).** MicroRNA-206 Targets *notch3*, Activates Apoptosis, and Inhibits Tumor Cell Migration and Focus Formation. *The Journal of Biological Chemistry* 284(46): 31921–31927.
140. **Sosa-Garrocho M, Macias-Silva M. (2004).** El factor de crecimiento transformante beta (TGF-b): Funciones y vías de transducción. *REB* 23 (1): 3-11.
141. **Stalberg H, De Haan RL. (1969).** The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo. *Dev Biol* 19: 128-159.
142. **Stankunas K, Ma KG, et al., (2010).** Signaling has Distinct Spatiotemporal Roles During Heart Valve Development *Dev Biol.* 347(2): 325–336.
143. **Steding G, Seidl W. (1980).** Contribution to the development of the heart. Part 1: normal development. *Thorac Cardiovasc Surg.* 28(6):386-409.
144. **Streeter GL. (1942).** Development horizon in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites and age group XII, 21 to 29 somites. *Carnegie Contrib Embryol.* 30:211-230.
145. **Sun Q, Zhang Y, et al., (2008).** Transforming growth factor-b-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Research* 3.6(8): 2690–2699.
146. **Sweetman D, Rathjen T, et al., (2006).** FGF-4 Signaling Is Involved in mir-206 Expression in Developing Somites of Chicken Embryos. *Developmental Dynamics* 235:2185–2191.
147. **Takada S, Berezikov E, et al., (2006).** Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Research*, 34(17): 3-8.

148. **Takaya T, Ono K, et al., (2009).** MicroRNA-1 and microRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. *Circulation Journal* 73:1492–1497.
149. **Thompson RP, Fitzharris TP. (1979).** Morphogenesis of the truncus arteriosus of the chick embryo heart: tissue reorganization during septation. *Am J Anat.* 156(2):251-64.
150. **Todorovic V, Friendewey D, et al., (2007).** Long form of latent TGF- binding protein 1 (Ltbp1L) is essential for cardiac outflow tract septation and remodeling. *Development* 134, 3723-3732.
151. **Townley-Tilson W.H. D, Callis T. E, Wang DZ. (2010).** MicroRNAs 1, 133, and 206: Critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(8): 1252–1255.
152. **Van den Hoff M.J, Moorman A.F, et al., (1999).** Myocardialization of the cardiac outflow tract. *Dev Biol* 212:477–490.
153. **van Rooij E, Sutherland L.B, et al., (2006).** A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *PNAS* 103(48): 18255–18260.
154. **Van Wijk B, Moorman A.F.M, van den Hoff M.J.B. (2007).** Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovascular Research* 74: 244–255.
155. **Vincent E. B, Runyan R. B, Weeks D. L. (1998).** Production of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Binding Protein Endoglin Is Regulated During Chick Heart Development. *Developmental Dynamics* 213:237–247.
156. **Wagner M, Siddiqui M.A.Q. (2007).** Signal Transduction in Early Heart Development (I): Cardiogenic Induction and Heart Tube Formation. *Experimental Biology and Medicine* 232:852-865.
157. **Waldo K, Miyagawa-Tomita S, et al., (1998).** Cardiac Neural Crest Cells Provide New Insight into Septation of the Cardiac Outflow Tract: Aortic Sac to Ventricular Septal Closure. *Developmental Biology* 196, 129–144.
158. **Waldo L. K, Kumiski H. D, et al., (2001).** Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128, 3179-3188.
159. **Wang J, Huang W, et al., (2012).** MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Journal Cell Mol Med* 16(9):2150-60.
160. **Wang J, Song Y, et al., (2012).** Cardiomyocyte overexpression of miR-27b induces cardiac hypertrophy and dysfunction in mice. *Cell Research* 22:516-527.
161. **Wang K, Lin ZQ, et al., (2012).** Cardiac Hypertrophy Is Positively Regulated by MicroRNA miR-23a. *Journal Biol Chem* 287(1): 589–599.

162. **Wang L, Qian L. (2014).** miR-24 Regulates Intrinsic Apoptosis Pathway in Mouse Cardiomyocytes. *PLoSOne* 9(1).
163. **Wang S, Aurora AB, et al., (2008).** An Endothelial-specific microRNA Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell* 15(2): 261–271.
164. **Watanabe M, Jafri A, Fisher SA. (2001).** Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. *Dev Biol.* 240:274–288.
165. **Walsh S, Ponte´n A, Fleischmann K B, Jovinge S. (2010).** Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovascular Research* 86: 365–373
166. **Webb S, Qayyum S. R, et al., (2003).** Septation and separation within the outflow tract of the developing heart. *J. Anat.* 202:327–342.
167. **Wei Y, Mikawa T. (2000).** Fate diversity of primitive streak cells during heart field formation in ovo. *Dev Dyn* 219:505–513.
168. **Winbanks CE, Wang B, et al., (2011).** TGF- $\beta$  Regulates miR-206 and miR-29 to Control Myogenic Differentiation through Regulation of HDAC4. *The Journal of Biological Chemistry* 286(16):13805–13814.
169. **Wystub K, Besser J, et al., (2013).** miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development. *Plos Gen* 9(9).
170. **Xie C, Huang H, et al., (2011).** MicroRNA-1 Regulates Smooth Muscle Cell Differentiation by Repressing Kruppel-Like Factor 4. *Stem Cells and Development* 20(2):205-10.
171. **Xu H, Wang X, Du Z, Li N. (2006).** Identification of microRNAs from different tissues of chicken embryo and adult chicken. *FEBS Letters* 580(15): 3610–3616.
172. **Xua H, Wang X, Dua Z, Lia N. (2006).** Identification of microRNAs from different tissues of chicken embryo and adult chicken. *FEBS Letters* 580: 3610–3616.
173. **Yatskievych TA, Ladd AN, Antin PB. (1997).** Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of hypoblast and activin. *Development* **124**:2561–2570.
174. **Yin X, Peng C, Ning W, et al., (2013).** miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem.* 379(1-2):1-6.
175. **Ylä-Herttuala S, Lipton BA, et al., (1991).** Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci* 88(12):5252-6.
176. **Yoshimatsu Y, Watabe T. (2011).** Roles of TGF- $\beta$  Signals in Endothelial-Mesenchymal Transition during Cardiac Fibrosis. *International Journal of Inflammation* 1-8.

177. **Zhao Y, Ransom JF, et al., (2007).** Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129(2):303-17.
178. **Zhao Y, Samal E, Srivastava D. (2005).** Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436:214 –220.
179. **Zhu X, Sasse J, McAllister D, Lough J. (1996).** Evidence that fibroblast growth factors 1 and 4 participate in regulation of cardiogenesis. *Dev Dyn* 207:429–438.

## XV.- ANEXO

### SOLUCIONES

#### 1.-Solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x)

Hidróxido de sodio (NaCl)	8 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 g
Fosfato de Hidrógeno disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	1.44 g
Fosfato de hidrógeno dipotasio ( $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ )	0.24 g
Agua bidestilada	800 mL
Ajustar pH a 7.4 con Acido clorhídrico (HCl)	
Aforar a 1 L	

#### 2.- Solución de Ringer

Para preparar 1litro:

Cloruro de sodio	10 g
Cloruro de potasio	0.416 g
Cloruro de calcio	0.24 g

#### 3.- TAE 50x

Para preparar 1litro:

Tris Base	242g
Acido acético glacial	57.1ml
EDTA	100ml
Aforar a un litro con agua inyectable.	