BRUNO DE OLIVEIRA

ESTUDO DO POTENCIAL VASCULAR DE PRECURSORES DE VASOS CORONÁRIOS EM SÍTIO ADULTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Xavier Neto

RESUMO

Oliveira B. Estudo do potencial vascular de precursores de vasos coronários em sítio adulto. [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

O Proepicárdio (PE) é uma estrutura transitória que dá origem a todos os componentes dos vasos coronários. Para avaliar o potencial vasculogênico do PE em sítio adulto, nós transplantamos um coração neonatal para o pavilhão auricular de um animal adulto. Duas semanas depois, dois PEs de embriões GFP+ foram transferidos para a superfície deste coração (Grupo A). Em outro grupo, nós transferimos os PEs diretamente para o pavilhão auricular (Grupo B). Para avaliar a incorporação de células GFP derivadas dos PEs, e investigar sua possível diferenciação nós realizamos ensaios de imunofluorescência (IF) para GFP em combinação com outros marcadores: Troponina Cardíaca-1 (cTn-1), Alfa Actina de Músculo Liso (SMαA), PECAM e Óxido Nítrico Sintase Endotelial (eNOS / NOS III). No grupo que recebeu o transplante do coração seguido dos PEs a dupla marcação para GFP e c-Tn1 mostrou extensa incorporação de células GFP+ na periferia do enxerto cardíaco. No mesmo grupo, imunomarcação dupla GFP-SMαA revelou que as células GFP+ foram encontradas entre a camada de células musculares lisas e o lúmen vascular, sugerindo a incorporação das células dos PEs no endotélio vascular. A contribuição endotelial por sua vez foi confirmada nos dois grupos através de IF dupla com GFP e PECAM, marcador precoce de diferenciação endotelial. Imunomarcação dupla para GFP e eNOS, marcador terminal de células endoteliais, foi positiva apenas para o grupo A. Dupla IF PECAM/GFP revelou a presença de agregados celulares semelhantes a ilhotas sanguíneas, compatível com a diferenciação dos precursores coronários antes da diferenciação em endotélio. Portanto, as células do PE diferenciam-se e, provavelmente, participam do processo de neovascularização quando transplantadas para sítios adultos. Estes resultados demonstram que o potencial vasculogênico das células PE é conservado em sítio adulto e que nosso modelo é adequado para estudar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e regeneração vascular.

Palavras-chave: Proepicárdio. Vasculogênese. Angiogênese. Endotélio.

ABSTRACT

Oliveira B. Study of the vascular potential of coronary vessel precursors in adult site [Masters Thesis (Cellular and Tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

The Proepicardium (PE) is a transient extracardiac structure giving rise to all components of the coronary vessels. To evaluate the vasculogenic potential of the PE in an adult site, we transplanted a neonatal heart into the subcutaneous of an adult ear. Later, two PE from GFP-transgenic mice were transferred to the surface of this heart (group A). In another group, we transferred the PEs directly into the ear pinna (group B). To evaluate the incorporation of GFP cells derived from the PE, and to investigate their possible differentiation, we performed immunofluorescence (IF) for GFP in combination with other markers: Cardiac Troponin-1 (cTn-1), Smooth Muscle alpha Actin (SMαA), PECAM and endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS/NOSIII). In the group that received the heart and the PE transplantations, double IF against GFP and cTn-1 showed extensive incorporation of GFP+ cells in the periphery of the grafted heart. In the same group, the double labeling with anti-SMαA revealed that GFP+ cells are found internal to the medial smooth muscle layer and into the lumen, suggesting the incorporation of PE cells in the endothelial layer. The endothelial contribution of PE cells was confirmed in the two groups by double staining with GFP and PECAM, which is an early marker of endothelial and blood differentiation. Double staining with GFP and eNOS, a terminal endothelial marker, was present only in the group that received heart transplantation with PE (group A). Double GFP/PECAM IF revealed colocalization in intraluminal cells, consistent with the blood differentiation that is observed in coronary vessels precursors before overt endothelial differentiation. Therefore PE cells can differentiate and likely participate in the process of neovascularization when transplanted to adult sites. These findings demonstrate that the vasculogenic potential of the PE cells is conserved in an adult site and our model is adequate to study the mechanisms involved in the development and regeneration of vasculature.

Key Words: Proepicardium. Vasculogenesis. Angiogenesis. Endothelium.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O sistema cardiovascular é o primeiro a ser estabelecido durante o desenvolvimento embrionário (Manner et al., 2001; Brade et al., 2006). Nas últimas décadas grandes avanços foram conquistados no que diz respeito à compreensão dos mecanismos envolvidos na embriogenia deste sistema, levando a um melhor entendimento dos diferentes mecanismos moleculares e morfogenéticos atuantes em etapas precoces da diferenciação vascular e cardíaca. Além disso, novas descobertas também foram realizadas com relação aos tipos celulares e vias sinalização envolvidas em etapas chave destes processos (Tomanek e Zheng, 2002; Ishii et al., 2007; Lavine et al., 2008; Zhou et al., 2008; Azambuja et al., 2010).

Tendo em vista tais avanços, novas perspectivas de intervenção e prevenção de diversos tipos de doenças cardiovasculares vêm surgindo.

Nos últimos anos abriram-se perspectivas para um uso amplo das células pluripotentes em medicina. Hoje, além dos transplantes de células da medula óssea, diversos modelos terapêuticos têm sido propostos para doenças dos sistemas cardiovascular, endócrino e neuro muscular.

As doenças cardiovasculares apresentam características que as tornam alvos atraentes para a terapia celular (TC), porque em resposta a agressões variadas este sistema apresenta reações estereotipadas destinadas a preservar sua função. Embora eficientes no curto prazo, essas reações regulatórias se tornarão os principais agentes de destruição do órgão ao longo prazo (Orlic et al., 2001). Portanto, a existência de danos semelhantes em agressões heterogêneas fornece uma base racional para o uso de estratégias comuns de preservação da função cardíaca.

Em muitos tipos de doença cardíaca, como em cardiopatias isquêmicas, o objetivo terapêutico é a recuperação da contratilidade do órgão através da ampliação da malha circulatória. Contudo, em casos especiais, como em cardiomiopatia dilatada ou em infartos muito extensos, a reconstituição da contratilidade cardíaca também demanda a adição de miócitos sadios (Orlic et al., 2001; Dimmeler et al., 2005). Para a maioria dessas doenças a ampliação da malha circulatória significa a recuperação de grande parte da função perdida. Assim, novas descobertas que contribuam para o entendimento do processo de diferenciação

vascular poderiam ser aplicadas para dirigir a diferenciação de células multipotentes ao fenótipo vascular desejado antes da sua inserção no sítio lesado, tornando a TC muito mais segura e eficiente a médio e longo prazos.

Embora a capacidade de diferenciação das células tronco hematopoiéticas em cardiomiócitos tenha sido colocada em dúvida, (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004; Dimmeler et al., 2005) é aparente que todas as modalidades de células-tronco de medula óssea apresentem uma elevada capacidade de diferenciação em células endoteliais, contribuindo de forma marcante para a neo-vascularização pós isquemia ou neo-endotelização pós injúria (Murry et al., 2004; Urbich e Dimmeler, 2004; Dimmeler et al., 2005).

Hoje, diversos tipos de células-tronco, como as embrionárias, germinativas, do cordão umbilical e da medula óssea adulta têm sido cogitadas como fonte para TC (Asahara et al., 1997; Orlic et al., 2001; Dimmeler et al., 2005). Problemas práticos e éticos têm consolidado uma preferência pelas células pluripotentes da medula óssea adulta e graus variados de sucesso têm sido registrados tanto em protocolos clínicos, quanto experimentais, indicando que a TC pode se tornar uma realidade (Dimmeler et al., 2005).

Atualmente, uma nova janela de oportunidade se abriu com a descoberta da indução do fenótipo de células tronco a partir de células terminalmente diferenciadas por transdução viral de alguns genes chave (Takahashi e Yamanaka, 2006). Contudo, ainda há muito que se aprimorar na TC cardíaca, tanto do ponto de vista do conhecimento básico, quanto do ponto de vista operacional a fim de tornar a TC um procedimento de rotina.

Para que o potencial da TC cardíaca possa ser explorado eficazmente é necessário um maior conhecimento da diferenciação dos diversos tipos de células pluripotentes, assim como acesso a sistemas de referência adequados. Para isso, a exploração da embriogenia cardíaca e desenvolvimento dos vasos coronários se tornam alvos interessantes para o melhor entendimento no processo de formação deste sistema, possibilitando identificar desta forma possíveis modelos e vias de diferenciação a serem usados em TC.

Portanto, com o advento das terapias celulares a busca por alternativas que tornem o transplante autólogo mais seguro e eficiente está cada vez mais presente em nosso cotidiano. Encontrar uma célula que em sítio adulto recupere o fenótipo de seus precursores embrionários e contribua de fato para a reparação de tecidos e órgãos lesados é um grande desafio para os pesquisadores.

O primeiro grupo de precursores da circulação coronária é identificado no proepicárdio (PE), um aglomerado de células derivadas do mesotélio do pericárdio que surge no septo transverso, entre o coração e o broto hepático (Manner, 2000; Brade, 2006). Este grupo de células é formado por diversas vilosidades epiteliais repletas de células multipotentes precursoras de pelo menos quatro tipos celulares: (1) o endotélio coronário, (2) as células musculares lisas coronárias, os (3) fibroblastos coronários e o (4) epicárdio (Manner et al., 2001; Brade et al., 2006). A partir do PE, células precursoras migram para o coração suprajacente e, através de interações adesivas com o miocárdio mediadas por VCAM (molécula de adesão celular vascular-1) e α4 integrina, iniciam um processo de migração e proliferação sobre este órgão (Reese et al., 2002).

O PE, portanto, nos fornece excelentes oportunidades para a identificação dos mecanismos que dirigem uma célula precursora ao destino coronário. Entender melhor a biologia da diferenciação de um grupo de células tão ímpar quanto às do PE, conhecer sua capacidade de diferenciação vascular em sítio adulto e programar sua diferenciação, permitiria o uso dos conhecimentos para o aprimoramento das técnicas de terapia celular já existentes, contribuindo para elucidar as vias de sinalização que dirigem a diferenciação de células multipotentes para os fenótipos encontrados no leito vascular.

1.1 Desenvolvimento vascular

O sistema cardiovascular é o primeiro a se estabelecer durante o desenvolvimento dos vertebrados. O sucesso neste processo permite ao organismo em formação o transporte adequado de nutrientes para diferentes tecidos e descarte de metabólitos; para tanto é necessário o estabelecimento de uma malha vascular que dê suporte a este complexo sistema de transporte. Nesta seção abordaremos o processo de desenvolvimento vascular desde o desenvolvimento de um plexo vascular primitivo, até a formação de um vaso sanguíneo maduro durante o desenvolvimento embrionário.

1.1.1 Precursores mesodérmicos

Durante o processo de gastrulação (Figura 1) os três folhetos germinativos, endoderme, ectoderme e mesoderme, são estabelecidos (Risau, 1997). A indução da mesoderme por morfógenos da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) tem papel essencial na indução da mesoderme lateral e paraxial e na formação dos angioblastos e células hematopoiéticas (Risau e Flamme, 1995). Além dos fatores da família dos FGFs, membros de outra grande família; a dos fatores de crescimento e transformação (TGF-β); foram encontrados induzindo mesoderme, incluindo notocorda e somitos, o que sugere uma atuação sinérgica desses morfógenos durante a formação da mesoderme [revisado por (Risau e Flamme, 1995)].

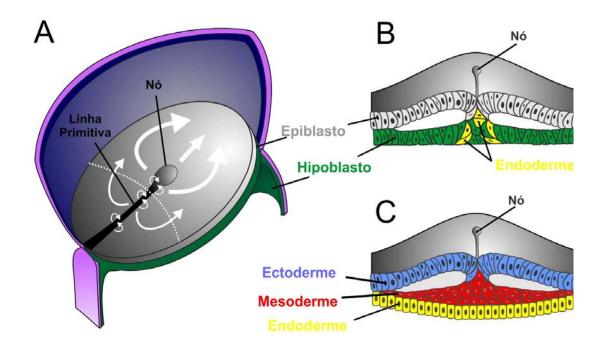


Figura 1. Estrutura e movimentos do processo de gastrulação. (A) Esquema de embrião de humano em estágio de implantação uterina durante a fase de gastrulação, na qual são estabelecidos os três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme). Células epiblasticas migram através do nó e sulco primitivo para o espaço entre o epi e hipoblasto (setas brancas). (B e C) Corte transversal do embrião no terço posterior. (B) A entrada de células do epiblasto pelo sulco primitivo e nó aos poucos vai substituindo as células do hipoblasto (que mais tarde farão parte do saco vitelínico), formando a endoderme. (C) Movimento de células do epiblasto; após a formação da endoderme formam agora a camada mesodérmica.

Em mamíferos, os primeiros sinais do desenvolvimento de um plexo vascular primitivo são observados na formação da mesoderme lateral do saco vitelínico. Células hematopoiéticas e endoteliais possuem um precursor comum; o hemangioblasto, induzido na mesoderme pela sinalização de FGF (Risau e Flamme, 1995). No saco vitelínico esses hemangioblastos formam agregados celulares – as ilhotas sanguíneas

Estas ilhotas sanguíneas são aglomerados sólidos de células formados a partir do mesoderma esplâncnico (Figura 2). Na periferia desses agregados celulares encontram se os angioblastos, enquanto o centro das ilhotas é constituído por precursores hematopoiéticos (Risau, 1997; Carmeliet, 2000b). Podemos definir os angioblastos como um tipo celular que expressa alguns marcadores de células endoteliais – marcadores precoces de diferenciação, tais como PECAM (molécula

de adesão a célula), CD 45, VEGFR-2/ Flk-1 (fator de crescimento endotelial vascular) e vWF (fator de *von Willerbrand*) – mas que ainda não possuem um lúmen [revisado por (Risau e Flamme, 1995)].

Como mencionado anteriormente, a vasculogênese tem início na mesoderme extra-embrionária do saco vitelínico, onde surgem as primeiras ilhotas sanguíneas. Logo em seguida, surgem os primeiros angioblastos intra-embrionários observados nas laterais do portal intestinal anterior e ventrais ao primeiro par de somitos. Já no estágio de dois pares de somitos ocorre a ligação entre os primórdios vasculares extra e intra-embrionários (Risau e Flamme, 1995).

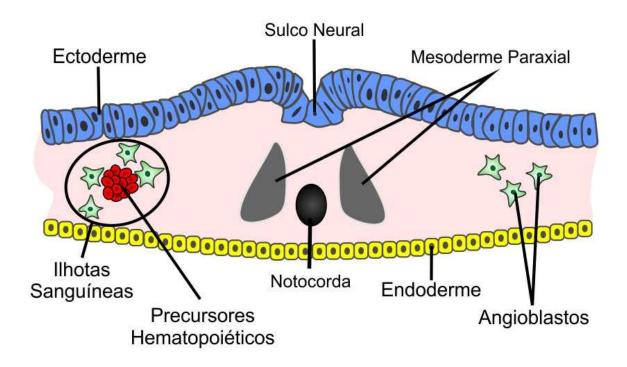


Figura 2. Início do processo de vasculogênese. Corte transversal de embrião de mamífero representando a diferenciação de células mesodérmicas durante o início do processo de vasculogênese. As células mesodérmicas diferenciadas formam as ilhotas sanguíneas que são aglomerados sólidos de células. Na periferia desses agregados celulares encontram se os angioblastos, enquanto o centro das ilhotas é constituído por precursores hematopoiéticos

1.1.2 Da formação do plexo vascular primitivo ao estabelecimento do vaso maduro

Durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos os primeiros vasos sanguíneos são formados no meio extra embrionário, já no estágio pós-implantação uterina, a partir dos angioblastos, derivadas das células primordiais, os hemangioblastos (Figura 3A) (Risau e Flamme, 1995; Carmeliet, 2000a).

O primeiro passo na formação dos vasos sanguíneos é a diferenciação dos precursores endoteliais em células endoteliais vasculares, que mais tarde irão constituir a superfície interna de revestimento dos vasos maduros. Este processo é denominado vasculogênese e ocorre através da diferenciação *in situ* dos hemangioblastos em angioblastos (Figura 3B) [revisado por (Ratajska et al., 2006)].

Dentro do embrião, as células endoteliais se diferenciam a partir da mesoderme como angioblastos isolados, sem a concomitante diferenciação de células hematopoiéticas, exceto por uma pequena região na aorta (grupos para-aórticos) onde ocorre a formação das ilhotas sanguíneas como observado no saco vitelínico. Os angioblastos então migram e fundem-se a outros angioblastos formando uma estrutura semelhante a um labirinto vascular (Figura 3C) (Risau e Flamme, 1995; Ratajska et al., 2006).

Em seguida, esta malha vascular primitiva é expandida e passa por um processo de remodelamento e expansão no qual o tecido endotelial existente se ramifica originando novos vasos num processo denominado angiogênese (Figura 3D) (Risau, 1997). Diferente da vasculogênese, na qual vasos sanguíneos são formados pela agregação *in situ* de angioblastos e subseqüente diferenciação destes em canais vasculares, o processo de angiogênese compreende o desenvolvimento de vasos a partir de estruturas vasculares preexistentes (Carmeliet, 2000b). Dessa forma, a angiogênese é o mecanismo predominante de formação e/ou neo-formação vascular em fases tardias do desenvolvimento e durante a vida pós natal (Risau e Flamme, 1995).

Alguns fatores são fundamentais para o desenvolvimento vascular. Dentre eles destacam se o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) que atua no

recrutamento de pericitos e células musculares lisas; angiopoitina-1 (Ang-1) e o fator de crescimento e transformação beta-1 (TGF-β1) na estabilização do vaso nascente e finalmente o fator crucial em todas as etapas do desenvolvimento vascular: o VEGF; morfógeno associado desde a diferenciação das células precursoras endoteliais até fases finais do remodelamento vascular.

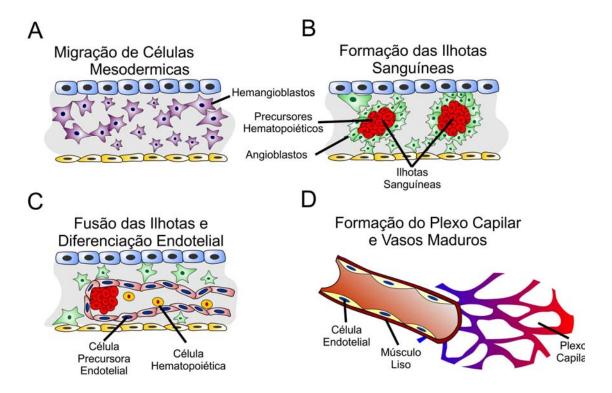


Figura 3. Processo de formação vascular. (A) Induzidos por morfógenos da família dos FGFs as células mesodérmicas se diferenciam dando origem aos hemangioblastos. (B). Esses hemangioblastos formam agregados celulares constituídos internamente por células precursoras hematopoiéticas e revestidos externamente pelos angioblastos (C). A agregação in situ destes angioblastos formam um plexo vascular (primórdios dos vasos sanguíneos). (D) Em seguida, este plexo vascular capilar é expandido e passa por um processo de remodelamento e expansão no qual o tecido endotelial existente se ramifica originando novos vasos num processo denominado angiogênese. Aqui vemos a estrutura simples de um vaso sanguíneo maduro constituído por uma camada de músculo liso e revestido internamente por células endoteliais.

Nos organismos adultos, crescimento e neo-formação vascular ocorrem através dos processos de vasculogênese (desta vez com mobilização de precursores endoteliais da medula óssea) e principalmente angiogênese e arteriogênese (que corresponde ao remodelamento da malha pré-existente) de formas fisiológica e patológica (Risau, 1997; Carmeliet, 2000b). Diversos indutores e inibidores afetam a formação vascular no adulto, entretanto as vias que regulam

estes processos ainda permanecem pouco compreendidas. Bem estabelecido está o papel de células mediadoras inflamatórias tais como, monócitos/macrófagos, plaquetas e outros leucócitos além dos fatores angiogênicos como VEGF na angiogênese patológica (Risau, 1997; Carmeliet, 2000b; Smart et al., 2009; Kirton e Xu, 2010).

1.1.3 O papel das células musculares lisas

Embora as células endoteliais tenham atraído muita atenção nos últimos anos, elas sozinhas podem iniciar, mas nunca concluir o processo de angiogênese; as células periendoteliais são essenciais para isso. Durante a miogênese vascular células de músculo liso estabilizam o vaso nascente controlando a proliferação e migração de células endoteliais e estimulando a produção de uma matriz extracelular. Nos vasos maduros, as células musculares lisas são importantes porque fornecem proteção ao endotélio contra ruptura, além de permitir o controle hemostático através de alterações no diâmetro do lúmen vascular [revisado por (Carmeliet, 2000b)].

O recrutamento dos precursores de células musculares lisas pelas células endoteliais ainda não foi completamente elucidado. Contudo sabe-se da participação de fatores como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e VEGF, o primeiro atuando como quimioatrativo e o segundo provocando o acúmulo de células murais. Ang-1 e seu receptor tirosina quinase — Tie-2 participam também deste processo, atuando no crescimento e manutenção dos vasos recém formados, no brotamento e finalmente o remodelamento vascular (Davis et al., 1996; Risau, 1997; Carmeliet, 2000b).

1.2 Desenvolvimento cardíaco

Uma vez estabelecida a malha vascular, tem início a formação do coração; este por sua vez ao completar seu desenvolvimento irá se conectar ao vasos previamente formados. O desenvolvimento cardíaco é um processo complexo controlado por uma cascata de genes reguladores e moléculas sinalizadoras que coordenam diferentes tipos celulares em eventos morfogenéticos contínuos. Portanto, a cardiogênese é um intrincado processo e altamente susceptível a problemas que resultam em defeitos congênitos. Nesta seção iremos abordar aspectos relacionados ao estabelecimento de uma zona cardiogênica, à formação do coração tubular simples, sua integração à circulação embrionária e finalmente os eventos morfogenéticos e mecanismos moleculares que o convertem uma estrutura tubular simples a um órgão multicameral em mamíferos.

1.2.1 Preparando a zona cardiogênica: o crescente cardíaco e o papel dos morfógenos e fatores de transcrição

Podemos afirmar que o estabelecimento de uma zona cardiogênica tem início durante a gastrulação. Os progenitores cardíacos movem se através do nó e linha primitiva migrando para as regiões cranial e latero-cranial do embrião, formando desta forma o crescente cardíaco (Figura 4A) (Harvey, 2002; Brade et al., 2006).

O comprometimento de células da linhagem cardíaca é progressivo, espacialmente complexo e altamente dependente dos processos e movimentos celulares, isso porque durante este processo as células em migração vão chegando à região do crescente cardíaco e passam a receber estímulos – ora de indução, ora de repressão – da endoderme, ectoderme adjacente e tecidos extra embrionários (Harvey, 2002).

É importante ressaltar que já nesses estágios precoces da cardiogênese ocorre a separação dos precursores cardíacos em precursores musculares e precursores endocárdicos através da expressão gênica diferencial (Harvey, 2002).

Os principais morfógenos indutores da mesoderme são: o ácido retinóico (AR), membros da família das proteínas morfogenéticas do ósseas (BMPs) e o fator de crescimento de fibroblasto 8 (Fgf8). Contudo não são apenas estímulos positivos que estabelecem o crescente cardíaco; morfógenos que influenciam negativamente essa região são principalmente moléculas da via de sinalização Wnt e inibidores de BMPs [revisado por (Harvey, 2002)].

Em resposta a estes sinais o crescente cardíaco ativa diversos fatores transcricionais do programa cardíaco dentre eles, Gata4, Nkx2-5, e Tbx5/Tbx20 (Brand, 2003; Hatcher et al., 2004).

1.2.2 Formação do tubo cardíaco

Duas ondas de migração celular participam do processo de formação do tubo cardíaco. A primeira onda mobiliza células do mesoderma anterior a partir do nó e da linha primitiva para a porção cefálica do embrião onde está se estabelecendo o crescente cardíaco. A segunda onda de migração celular por sua vez acontece na porção mais ventral do embrião, levando de fato a formação do tubo cardíaco (Figura 4A e B) (Harvey, 2002; Hochgreb et al., 2003).

Nesta fase de formação do tubo cardíaco o embrião está passando por um processo de dobramento lateral, o que possibilita a fusão antero-posterior dos tubos endocárdicos laterais e formação do coração tubular (Figura 4B) (Lie-Venema et al., 2007).

Anterior a este processo de formação dos tubos endocárdicos ocorre a padronização dos precursores cardíacos em relação aos eixos do embrião. Desta vez entra em cena o ácido retinóico (AR) no estabelecimento do eixo anteroposterior (Xavier-Neto et al., 2000).

Duas fases de sinalização pelo AR no estabelecimento deste eixo são marcadas pela expressão da RALDH2. Esta enzima atua na segunda fase da cadeia de reações de oxidação da vitamina A à AR convertendo o retinaldeído à AR [revisado por (Hochgreb et al., 2003)]. A primeira fase é caracterizada pelo aumento da expressão dessa enzima no mesoderme lateral que contém os precursores sino atriais. A segunda fase é marcada por uma onda caudo rostral da RALDH2 que vai da região mais posterior da área cardiogênica até a porção mais anterior, chegando aos precursores ventriculares e do conotronco (Xavier-Neto et al., 2000; Hochgreb et al., 2003).

Paralelo ao processo de padronização dos eixos embrionários e seguido ao estabelecimento do crescente cardíaco e ondas de migração celular, inicia-se o processo de transformação epitélio mesênquimal do mesoderma da área cardiogênica (Kaufman e Navaratnam, 1981; Harvey, 2002). Este processo, que permite o deslocamento dessas células, leva a formação de um tubo endocárdico interno revestido pelo manto miocárdico externamente (Kaufman e Navaratnam, 1981).

Em fases mais tardias do desenvolvimento cardíaco, a expressão da RALDH2 surge no epicárdio da região sino atrial, participando do espessamento do miocárdio ventricular e no desenvolvimento da circulação coronária (Xavier-Neto et al., 2000; Perez-Pomares et al., 2002b), assunto este que será abordado em maiores detalhes na próxima seção.

1.2.3 Do coração tubular a um órgão multicameral

O processo de dobramento lateral inverte a orientação do coração em relação as estruturas neurais e intestino primitivo. Inicialmente o crescente cardíaco era inferior em relação a futura cavidade pericárdica, seguido a este processo os tubos endocárdicos ja fundidos começam a ocupar o espaço pericárdico (Moorman et al., 2003).

Nesta fase, o tubo cardíaco recém formado ja exibe função contrátil e funciona como uma bomba peristáltica (Buckingham et al., 2005). Neste momento outras alterações importantes começam a ocorrer, células que migram do mesoderme subfaríngeo são adicionadas a porção cranial do tubo cardíaco o que porduz um acentuado alongamento do tubo principal (Buckingham et al., 2005; Lie-Venema et al., 2007). A principal contribuição desta frente de migração celular para a morfogênese cardíaca é na formação ventrículo direito e trato de saída (Buckingham et al., 2005; Black, 2007).

As células desta última frente de migração caracterizam se pela expressão de alguns marcadores gênicos como: o fator de transcrição LIM homeodomínio – Islet-1 (Isl-1), Fgf-10, o fator de transcrição Mef-2c, dentre outros (Brade et al., 2006).

Associado ao processo de alongamento, o tubo cardíaco se inclina para a direita dando início a um processo conhecido como *looping* (curvatura) cardíaco (Figura 4B e C). Seguido a isso, inicia se o processo de convergência, no qual o seio venoso e o átrio comum "abraçam" os ventrículos (Figura 4C). Após a convergência, ocorre o encaixamento em cunha, marcado pelo posicionamento dos coxins do tronco arterial entre as válvulas do canal átrio-ventricular (Figura 4D) (Manner et al., 2001; Buckingham et al., 2005).

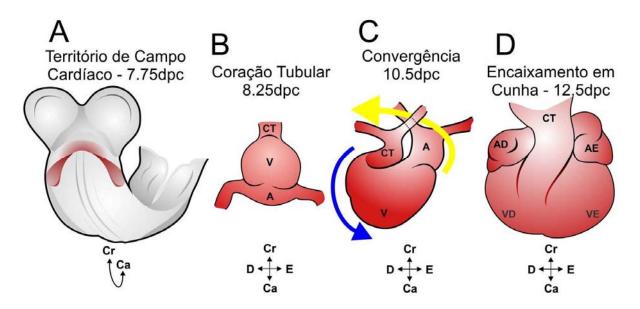


Figura 4. Eventos morfogenéticos do desenvolvimento cardíaco. A) Os progenitores cardíacos são primeiro reconhecidos no território de campo cardíaco, região que se extende cranialmente e lateralmente até próximo aos limites extra embrionários (B) Após fusão dos

tubos endocárdicos, o crescimento é acompanhado pela contorção do coração tubular onde os precursores ventriculares e conotronco ficam posicionados à direita (seta azul - C). (C) Associado ao processo de alongamento, ocorre aqui a migração da região atrial e seio venoso (influxo) sobre o a região de efluxo, em um movimento de convergência (seta amarela). (D) Após isso temos o processo de encaixamento e remodelamento cardíaco no qual ocorre o posicionamento do tronco cardíaco entre os primórdios das válvulas mitral e tricuspide. dpc, dias pós coito; CT, conotronco; A, átrio; V, ventrículo; AD, átrio direito; AE, átrio esquerdo; VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; Cr, cranial; Ca, caudal; D, direita e E, esquerda.

Chegando a este ponto deixamos um tubo peristáltico primitivo para trás e nos encontramos com um órgão mais complexo. A formação de um coração com as quatro câmaras cardíacas é acompanhado pela expressão gênica diferencial em cada parte do coração aliada a outros eventos que levam a um aumento acentuado na complexidade deste órgão. A partir daqui tem início o estabelecimento da circulação coronária, formação de válvulas, septação e surgimento do sistema de condução e finalmente a formação do coração completamente funcional.

1.3 Desenvolvimento coronário

Como vimos em seções anteriores, o estabelecimento de um sistema vascular sanguíneo ocorre relativamente cedo durante o desenvolvimento embrionário. Durante a cardiogênese os vasos responsáveis pela nutrição do miocárdio – coronárias – surgem em um momento em que a difusão não consegue mais suprir a necessidade deste órgão por nutrientes e oxigênio; fazendo se então necessário o surgimento um sistema de vasos capaz de garantir seu funcionamento.

Antes de começarmos a discutir estrutura e desenvolvimento dos vasos coronários, é importante notar que nem todos os animais possuem este sistema de vasos. Nenhum dos invertebrados possui coronárias e entre os vertebrados apenas mamíferos, aves e répteis (amniotas) tem este sistema completo, com irrigação arterial e retorno venoso. A maioria dos anfíbios não possui vasos coronários e em peixes sua presença é variável [revisado por (Reese et al., 2002)].

Nesta seção iremos apresentar a origem da circulação coronária, os aspectos morfogenéticos que levam a formação dos vasos coronários, a formação do epicárdio e finalmente o seu estabelecimento.

1.3.1 A origem da circulação coronária – o Proepicárdio

A formação dos vasos coronários é uma etapa crítica para o correto desenvolvimento do coração e envolve diversos processos como vasculogênese, angiogênese e remodelamento vascular, todos já abordados em seções anteriores.

O desenvolvimento coronário tem início com o surgimento de uma estrutura transitória formada por dobras mesoteliais da parede do celoma. O proepicárdio (PE) surge aos 9.5 dias pós coito (dpc) em embriões de camundongo (Figura 5A) e 24 dias em humanos, no septo transverso entre broto hepático e canal atrioventricular (Manner et al., 2001; Tomanek, 2005).

Nas últimas duas décadas diversos trabalhos demonstraram a importância do PE para a correta morfogênese cardíaca. Essa estrutura concentra os precursores das coronárias – endotélio, músculo liso e fibroblastos intersticiais – e do epicárdio, a membrana mais externa do coração (Manner, 1993; Perez-Pomares et al., 1998; Tomanek, 2005).

Contudo não é apenas celular a contribuição do PE para a cardiogênese, diversos experimentos demonstraram que quando o contato dessa estrutura com o miocárdio é impedido, seja por ablação ou mesmo quando este é retirado, não ocorre a formação do epicárdio e leva formação de uma estrutura ventricular hipoplásica. Dessa forma ficou demonstrado um importante papel regulatório no desenvolvimento do miocárdio e morfogênese cardíaca (Manner, 2004). Nas próximas seções explicaremos melhor as vias e sinais epicárdicos no desenvolvimento miocárdico.

1.3.2 A formação do epicárdio e a transformação epitélio mesênquimal

Em mamíferos, o epicárdio é formado a partir de agregados celulares que são liberados do PE em direção a cavidade pericárdica. Em linhas gerais esses agregados são então carregados através do fluido da cavidade pericárdica até a superfície miocárdica onde aderem em diferentes pontos e começam um processo de espalhamento, que termina com o revestimento total deste e formação do epicárdio (Viragh e Challice, 1981; Watanabe et al., 2006).

Em camundongos o número máximo dessas vesículas na cavidade pericárdica ocorre por volta dos 9.5-10 dpc, sendo o período de maior atividade de translocação dessas vesículas observado entre 9-9.5 dpc (Rodgers et al., 2008). A expansão do epicárdio ocorre através da proliferação do PE e de células mesoteliais seguindo um padrão espaço-temporal para o espalhamento dessas células sobre o miocárdio nu (Figura 5B). Inicialmente as células da superfície apical do PE descolam e aderem à parede dorsal do sulco átrio-ventricular. Em seguida, o epicárdio cobre quase que a totalidade da superfície dorsal do ventrículo e se expande para o átrio, região do conotronco e superfície ventral. Ao final do décimo primeiro dia pós coito em camundongos, o coração já está completamente revestido pelo epicárdio (Manner et al., 2001; Ratajska et al., 2006).

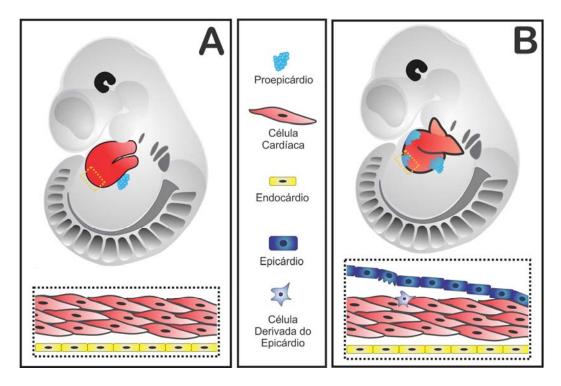


Figura 5. Formação do epicárdio. A vasculogênese coronária inicia se com a formação do proepicárdio (PE) representado em azul. (A) Esquema de um embrião de camundongo aos 9.5dcp, momento em que surge o PE. Notar que ainda nesse estágio o miocárdio representa uma camada muscular fina revestida internamente pelo endocárdio (quadro pontilhado). (B) Após o surgimento do PE, algumas vesículas se destacam e começam a revestir o miocárdio, formando o epicárdio. Notar a presença de células que se destacam da monocamada epicárdica e se transformam em células mesenquimais (azul claro – quadro pontilhado).

Durante estágios iniciais da formação do epicárdio esta monocamada de células encontra se aderida a superfície do miocárdio. Posteriormente, devido provavelmente ao acúmulo de fatores de crescimento produzidos pelo miocárdio, cria se um espaço entre miocárdio e epicárdio; o espaço subepicárdico o qual é também constituído por uma sub-população de células epicárdicas (Kalman et al., 1995; Ratajska et al., 2008).

Durante este processo a expressão de fatores de transcrição Slug e Snail por células epicárdicas, associada à produção de fatores de crescimento como TGF-β1 e 2 provocam em algumas destas células a perda de suas características epiteliais e sua transformação em células mesenquimais "indiferenciadas" (Figura 5B). A este fenômeno da se o nome de transformação epitélio mesênquimal (TEM) [revisado por (Ratajska et al., 2008).

Eritrócitos e angioblastos são encontrados neste espaço recém formado constituindo vesículas vasculares primitivas (Tomanek, 2005; Ratajska et al., 2006). Essas vesículas são estruturas muito semelhantes às ilhotas sanguíneas observadas durante o processo de vasculogênese, discutido anteriormente.

A partir daqui, sempre que falarmos das células mesenquimais derivadas do epicárdio nos referiremos a elas como EPDCs (*Epicardial Derived Cells*).

1.3.3 O estabelecimento da circulação coronária

Os vasos coronários se formam a partir de ilhotas sanguíneas, que são agregados de células precursoras endoteliais e hematopoiéticas que durante o processo de TEM penetraram no miocárdio [revisado por (Ratajska et al., 2008)]. Em aves e mamíferos, essas estruturas vasculares primitivas podem ser observadas na região do seio venoso e na porção dorsal do sulco átrio-ventricular, região onde tem inicio o processo de formação do epicárdio (Ratajska et al., 2008).

Nesta região algumas EPDCs se fundem e formam tubos endoteliais, posteriormente outras células mesenquimais – também derivadas do epicárdio – se posicionam em torno desses tubos e se diferenciam em células musculares lisas (Figura 6) (Reese et al., 2002).

Como dito anteriormente, para a gênese dos vasos coronários, as EPDCs contribuem fisicamente se diferenciando em endotélio, músculo liso e fibroblastos sob estímulo de diferentes fatores de crescimento, como por exemplo, PDGF e VEGF na diferenciação endotelial ou o fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF) na diferenciação das células musculares lisas (Ratajska et al., 2008).

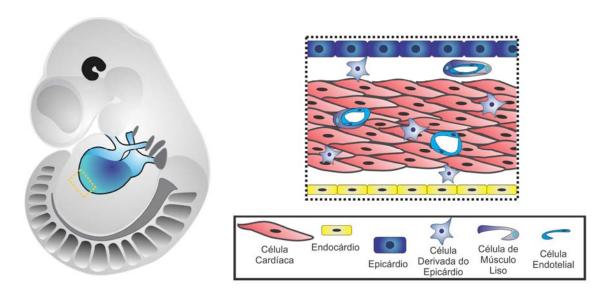


Figura 6. Formação das coronárias. Esquema de um embrião de camundongo aos 11dpc. Neste estágio o coração já está totalmente revestido pelo epicárdico e as células que sofreram TEM (derivadas do epicárdio) diferenciam se nos constituintes dos vasos coronários – endotélio, células musculares lisas e fibroblastos (não representados).

Em resumo, o desenvolvimento coronário se dá através do processo de vasculogênese, caracterizado pela diferenciação *in situ* de precursores vasculares localizados nas ilhotas sanguíneas, fato comprovado por Guadix e colaboradores (2006) quando estes transplantaram o explante do PE de embriões de codorna para diferentes locais, tais como broto dos membros, e broto hepático no embrião de galinha e observaram uma grande incidência de vasos derivados do PE de codorna, demonstrando assim seu alto poder de formação vascular (Guadix et al., 2006).

O desenvolvimento coronário envolve uma série de etapas reguladas por múltiplos mecanismos. Por exemplo, o processo de adesão e migração das células proepicárdicas e epicárdicas é regulado por VCAM (proteína de adesão celular vascular)/integrinas; já a sinalização de GATA-4 nos cardiomiócitos, Slug e Snail garantem a TEM (Crispino et al., 2001; Ratajska et al., 2008). Além disso, durante a TEM e formação dos canais vasculares o miocárdio secreta diversos fatores angiogênicos como FGF-1, 2 e 7, VEGF e angiopoitina-1 (Tomanek et al., 1999; Lavine et al., 2006; Watanabe et al., 2006).

Além da regução miocárdica, o epicárdio atua como centro sinalizador durante o estabelecimento da circulação coronária. As vias de sinalização de Hedgehog (Hh), VEGF, Ang-2 são essenciais para o desenvolvimento deste sistema

(Lavine et al., 2008). A sinalização de FGF pelo miocárdio, associada a expressão dos receptores de FGF (Fgfr-1 e 2) nas células epicárdicas provoca uma onda de sinalização por Hh desde o sulco átrio ventricular até o ápice dos ventículos induzindo a expreção de VEGF-A, B e C e Ang-2 pelas células miocárdicas, resultando na formação do plexo vascular coronário (Lavine et al., 2006).

Ao final deste processo ocorre a conexão do plexo coronário ao tronco da aorta e endocárdio atrial, conectando a circulação coronária à circulação embrionária pré-existente. (Reese et al., 2002; Ratajska et al., 2008).

1.3.4 O papel do epicárdio no desenvolvimento miocárdico

Como citado anteriormente, a formação do epicárdio é necessária para o completo desenvolvimento do miocárdio e para a correta vascularização da parede cardíaca. Durante o desenvolvimento cardíaco, o epicárdio tem uma contribuição essencial na secreção de fatores que contribuem com: (1) a formação dos vasos coronários, (2) a proliferação dos cardiomiócitos, (3) o desenvolvimento ventricular, (4) no processo de compactação do miocárdio (Li et al., 2009; Sucov et al., 2009; Brade et al., 2011) e ainda (5) com a diferenciação de progeniores epicárdicos em cardiomiócitos (Zhou et al., 2008).

As células epicárdicas contribuem não só fisicamente para a cardiogênese, mas também proporcionam sinais tróficos que levam à proliferação do miocárdio via sinalização por AR, eritropoitina (Epo), TGFβ, Hh, Fgfs, dentre outras vias (Lavine et al., 2006; Li et al., 2009; Sucov et al., 2009; Brade et al., 2011). O papel de Hh e dos Fgfs foram discutimos anteriormente durante o estabelecimento da circulação coronária (Lavine et al., 2008), a partir de agora vamos apresentar o papel das outras vias para o final do desenvolvimento miocárdico.

O papel do AR para a morfogênese cardíaca foi apresentado anteriormente quando tratamos do desenvolvimento cardíaco, sendo este fundamental na indução da mesoderme (Xavier-Neto et al., 2000; Hochgreb et al., 2003) e para o

recrutamento de células do mesoderma esplâncnico na formação do trato de saída (Li et al., 2009). Durante e após a formação do epicárdio este morfógeno atua em conjunto com outras vias em processo como diferenciação de células do trato de saída, proliferação e compactação do miocárdio ventricular e septação do trato de saída (Li et al., 2009; Lin et al., 2010; Brade et al., 2011).

Li et al. (2009) e Brade et al. (2011) utilizando embriões de camundongo *knockouts* para a raldh2 (raldh2-/-) e para receptores de AR (Rxr-/-) demonstraram a influência da sinalização pelo AR nos processo apresentados anteriormente. No caso da expansão e compactação miocárdica ventricular o AR não atua diretamente, mas utiliza como alvo o gene da Epo responsável pela por induzir, via sinalização por IGF-2 *(insulin growth factor 2)* secretado pelo epicárdio, a expansão e compactação do miocárdio ventricular (Li et al., 2009; Brade et al., 2011). Já os processos de diferenciação do trato de saída e septação deste ocorrem sob influencia da via AR – TGF-β (Li et al., 2009).

Além do papel regulatório do epicárdio nos processos apresentados acima, não podemos deixar de mencionar a importância das EPDCs na diferenciação de cardiomiócitos em células especializadas na condução do impulso nervoso — as fibras de Purkinje (Gittenberger-de Groot et al., 2003) além da formação das válvulas cardíacas, esqueleto fibroso do coração ou diferenciação em fibroblastos intersticiais, responsáveis pela síntese de matriz extracelular (Winter e Gittenberger-de Groot, 2007).

1.4 Células derivadas do epicárdio e regeneração cardiovascular

As doenças vasculares, em especial problemas nas artérias coronárias são a principal causa de morte atualmente e a manutenção da integridade funcional da camada endotelial vascular é fundamental para evitar o desenvolvimento destes processos (Kirton e Xu, 2010).

Uma série de trabalhos com PE e EPDCs tem enfocado suas análises nos mecanismos que controlam a conversão de células epicárdicas em células

mesoteliais, via TEM e a consequente geração das EPDCs (Wada et al., 2003; van Tuyn et al., 2007); enquanto outros buscam por diferentes formas de dirigir a diferenciação do PE e das EPDCs (Manner, 1999; Perez-Pomares et al., 2002b; Azambuja et al., 2010). Elucidar as vias que controlam a diferenciação epicárdica e que alterem os processos de diferenciação destas células ajudaria não somente no entendimento da cardiogênese normal, mas também forneceria uma nova visão sobre a etiologia de algumas doenças cardíacas congênitas.

Nos últimos anos uma quantidade considerável de informações sobre o PE e seus derivados tem sido acumulada. Sabe se que após a formação do epicárdio, TEM e diferenciação em vários tipos celulares, algumas EPDCs permanecem em estado de latência, indiferenciadas, funcionando como células-tronco cardíacas (Wessels e Perez-Pomares, 2004).

As EPDCs são células multipotentes e verdadeiras células-tronco cardíacas tendo a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos cardíacos, células musculares lisas e células endoteliais (Manner, 1999; Perez-Pomares et al., 2002b; Wada et al., 2003; Wessels e Perez-Pomares, 2004; van Tuyn et al., 2007).

Pouco se sabe sobre a regulação espaço-temporal das EPDCs, contudo na última década alguns candidatos tem sido levantados como possíveis reguladores da sua diferenciação. Pérez-Pomares et al. em 2002 associaram que uma redução na expressão de WT-1 (Wilms Tumor Protein-1) é necessária para a diferenciação das EPDCs em endotélio vascular e músculo liso (Perez-Pomares et al., 2002b). Por outro lado, O ácido retinóico, através da sua enzima conversora a RALDH2, atua mantendo as células do PE em seu estado indiferenciado (Azambuja et al., 2010). Provavelmente essa interação entre WT-1 e AR tem um papel fundamental na manutenção destas células em um estado indiferenciado.

Portanto, a compreensão dos mecanismos embrionários nos processos de vasculogênese e angiogênese se torna inestimável no desenvolvimento de novas estratégias para terapias de regeneração cardiovascular (Smart et al., 2009). Com base nisso, neste trabalho buscamos estabelecer um modelo de diferenciação vascular *in vivo* dos precursores dos vasos coronários, concentrados no PE, em um

sítio adulto, utilizando um modelo murino, visando, desta forma, entender melhor a biologia de diferenciação do PE.



- O modelo de transplante do PE para o pavilhão auricular é uma abordagem válida no estudo da diferenciação dos precursores dos vasos coronários em sítio adulto.
- O transplante do coração neonatal para o sítio auricular de um camundongo adulto provavelmente fornece os fatores de crescimento necessários para processos de vascularização e neovascularização iniciado pelo PE.
- Quando transplantado para sítio adulto o PE diferencia-se e participa dos processos de vasculogênese, iniciando a formação de novos vasos sanguíneos via formação de ilhotas sanguíneas e de um processo angiogênico, diferenciando-se em células endoteliais que se incorporaram ao endotélio dos vasos já existentes.
- Com as metodologias utilizadas é difícil determinar os fatores de crescimento que estiveram atuantes em nossos grupos experimentais durante os dias que se seguiram ao transplante do coração neonatal e PEs no grupo A e dos explantes proepicárdicos no grupo B, portanto difícil estabelecer o papel de um ou outro fator na diferenciação do PE em endotélio e a não diferenciação em músculo liso e cardiomiócito, portanto, novos experimentos utilizando a mesma abordagem e novas metodologias serão necessários a fim de estabelecer as vias moleculares atuantes nestes processos de formação e neo-formação vascular.
- Em resumo, a adição do PE em um contexto diferente do qual ele estaria condicionado à formação vascular e tendo como resultado a participação deste nos processos apresentados neste trabalho nos permite afirmar que estas células possuem também um potencial vasculogênico/angiogênico em sítio adulto, podendo ser exploradas como potencial modelo para revascularização cardíaca e recuperação de tecidos vasculares.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS1

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997;275(5302):964-7.

Azambuja AP, Portillo-Sanchez V, Rodrigues MV, Omae SV, Schechtman D, Strauss BE et al. Retinoic acid and VEGF delay smooth muscle relative to endothelial differentiation to coordinate inner and outer coronary vessel wall morphogenesis. Circ Res. 2010;107(2):204-16.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. Nature. 2004;428(6983):668-73.

Black BL. Transcriptional pathways in second heart field development. Semin Cell Dev Biol. 2007;18(1):67-76.

Brade T, Kumar S, Cunningham TJ, Chatzi C, Zhao X, Cavallero S et al. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2. Development. 2011;138(1):139-48.

Brade T, Manner J, Kuhl M. The role of Wnt signalling in cardiac development and tissue remodelling in the mature heart. Cardiovasc Res. 2006;72(2):198-209.

Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. Dev Biol. 2003;258(1):1-19.

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. Nat Rev Genet. 2005;6(11):826-35.

Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. Nature. 2008;454(7200):104-8.

Carmeliet P. Developmental biology. One cell, two fates. Nature. 2000a;408(6808):43-5.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med. 2000b;6(4):389-95.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from:

http://www.icmje.org [2007 May 22].

74

Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. Genes Dev. 2001;15(7):839-44.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell. 1996;87(7):1161-9.

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. J Clin Invest. 2005;115(3):572-83.

Fey TA, Krause RA, Hsieh GC, Andrews JM, Bretheim PT, Morgan SJ et al. Improved methods for transplanting split-heart neonatal cardiac grafts into the ear pinna of mice and rats. J Pharmacol Toxicol Methods. 1998;39(1):9-17.

Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. J Cell Physiol. 1997;173(2):206-10.

Fulmer RI, Cramer AT, Liebelt RA, Liebelt AG. Transplantation of Cardiac Tissue into the Mouse Ear. Am J Anat. 1963;113:273-85.

Gittenberger-de Groot AC, Blom NM, Aoyama N, Sucov H, Wenink AC, Poelmann RE. The role of neural crest and epicardium-derived cells in conduction system formation. Novartis Found Symp. 2003;250:125-34.

Guadix JA, Carmona R, Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM. In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. Dev Dyn. 2006;235(4):1014-26.

Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. Nat Rev Genet. 2002;3(7):544-56.

Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM et al. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. Physiol Genomics. 2004;18(2):129-40.

Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. Development. 2003;130(22):5363-74.

Ishii Y, Langberg JD, Hurtado R, Lee S, Mikawa T. Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. Development. 2007;134(20):3627-37.

Kalman F, Viragh S, Modis L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. Anat Embryol (Berl). 1995;191(5):451-64.

Kaufman MH, Navaratnam V. Early differentiation of the heart in mouse embryos. J Anat. 1981;133(Pt 2):235-46.

Kirton JP, Xu Q. Endothelial precursors in vascular repair. Microvasc Res. 2010;79(3):193-9.

Lavine KJ, Long F, Choi K, Smith C, Ornitz DM. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. Development. 2008;135(18):3161-71.

Lavine KJ, White AC, Park C, Smith CS, Choi K, Long F et al. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. Genes Dev. 2006;20(12):1651-66.

Li P, Pashmforoush M, Sucov HM. Retinoic acid regulates differentiation of the secondary heart field and TGFbeta-mediated outflow tract septation. Dev Cell. 2009;18(3):480-5.

Lie-Venema H, van den Akker NM, Bax NA, Winter EM, Maas S, Kekarainen T et al. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. ScientificWorldJournal. 2007;7:1777-98.

Lin SC, Dolle P, Ryckebusch L, Noseda M, Zaffran S, Schneider MD et al. Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(20):9234-9.

Manner J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. Anat Embryol (Berl). 1993;187(3):281-9.

Manner J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. Anat Rec. 1999;255(2):212-26.

Manner J. On rotation, torsion, lateralization, and handedness of the embryonic heart loop: new insights from a simulation model for the heart loop of chick embryos. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004;278(1):481-92.

Manner J, Perez-Pomares JM, Macias D, Munoz-Chapuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. Cells Tissues Organs. 2001;169(2):89-103.

Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. Heart. 2003;89(7):806-14.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. Nature. 2004;428(6983):664-8.

Olivey HE, Svensson EC. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. Circ Res. 2010;106(5):818-32.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature. 2001;410(6829):701-5.

Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Munoz-Chapuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. Int J Dev Biol. 2002a;46(8):1005-13.

Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. Dev Dyn. 1997;210(2):96-105.

Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. Dev Biol. 1998;200(1):57-68.

Perez-Pomares JM, Mironov V, Guadix JA, Macias D, Markwald RR, Munoz-Chapuli R. In vitro self-assembly of proepicardial cell aggregates: an embryonic vasculogenic model for vascular tissue engineering. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(7):700-13.

Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Munoz-Chapuli R et al. Experimental studies on the spatiotemporal expression of

WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). Dev Biol. 2002b;247(2):307-26.

Ratajska A, Czarnowska E, Ciszek B. Embryonic development of the proepicardium and coronary vessels. Int J Dev Biol. 2008;52(2-3):229-36.

Ratajska A, Czarnowska E, Kolodzinska A, Kluzek W, Lesniak W. Vasculogenesis of the embryonic heart: origin of blood island-like structures. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(3):223-32.

Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, Krasnow MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. Nature. 2010;464(7288):549-53.

Reese DE, Mikawa T, Bader DM. Development of the coronary vessel system. Circ Res. 2002;91(9):761-8.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386(6626):671-4.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995;11:73-91.

Rodgers LS, Lalani S, Runyan RB, Camenisch TD. Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. Dev Dyn. 2008;237(1):145-52.

Rongish BJ, Hinchman G, Doty MK, Baldwin HS, Tomanek RJ. Relationship of the extracellular matrix to coronary neovascularization during development. J Mol Cell Cardiol. 1996;28(10):2203-15.

Semenza GL. Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia-inducible factor 1. Exp Physiol. 2007;92(6):988-91.

Smart N, Dube KN, Riley PR. Coronary vessel development and insight towards neovascular therapy. Int J Exp Pathol. 2009;90(3):262-83.

Sucov HM, Gu Y, Thomas S, Li P, Pashmforoush M. Epicardial control of myocardial proliferation and morphogenesis. Pediatr Cardiol. 2009;30(5):617-25.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76.

Tomanek RJ. Formation of the coronary vasculature during development. Angiogenesis. 2005;8(3):273-84.

Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, Yue X, Sandra A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. Dev Dyn. 1999;215(1):54-61.

Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Holifield JS. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. Circ Res. 2001;88(11):1135-41.

Tomanek RJ, Zheng W. Role of growth factors in coronary morphogenesis. Tex Heart Inst J. 2002;29(4):250-4.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ Res. 2004;95(4):343-53.

van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, van der Velde-van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NA et al. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. Stem Cells. 2007;25(2):271-8.

Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. Anat Rec. 1981;201(1):157-68.

Viragh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kalman F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. Anat Embryol (Berl). 1993;188(4):381-93.

Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM. Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. Circ Res. 2003;92(5):525-31.

Watanabe N, Nakagawa M, Hanato T, Takeuchi Y, Hara M, Yoshida T et al. In vitro model for mouse coronary vasculogenesis. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2006;288(7):714-22.

Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004;276(1):43-57.

Winter EM, Gittenberger-de Groot AC. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. Cell Mol Life Sci. 2007;64(6):692-703.

Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. Dev Biol. 2000;219(1):129-41.

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. Nature. 2008;454(7200):109-13.