



universidad  
de león

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**PAPEL DE LA EPIGENÉTICA EN EL  
DESARROLLO CARDIACO. EFECTO DE LOS  
TÓXICOS AMBIENTALES**

**ROLE OF EPIGENETICS IN CARDIAC  
DEVELOPMENT. EFFECTS OF  
ENVIRONMENTAL TOXICANTS**

**Autor: Laura Barcenilla Valcárcel**

Tutores: María Paz Herráez Ortega y Marta Lombó

Alonso

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Julio, 2022**

## Índice de contenidos

1. Cardiogénesis .....	1
1.1. Desarrollo cardiaco en humanos.....	1
1.1.1. Anatomía, fisiología e histología del corazón en humanos.....	1
1.1.2. Diferenciación y migración de los precursores cardiacos .....	4
1.1.3. Formación y crecimiento del tubo cardiaco lineal .....	6
1.1.4. Plegamiento del tubo cardiaco.....	7
1.1.5. Formación de las cuatro cámaras.....	7
1.1.6. Tabicación y desarrollo de las válvulas.....	8
1.1.7. Formación del epicardio y del sistema de conducción .....	8
1.2. Especies modelo: desarrollo cardiaco en pez cebra .....	9
1.2.1. Anatomía, fisiología e histología del corazón en pez cebra .....	9
1.2.2. Diferenciación y migración de los precursores cardiacos .....	11
1.2.3. Formación del tubo cardiaco lineal .....	12
1.2.4. Enrollamiento del tubo cardiaco y formación de las cámaras .....	13
1.2.5. Desarrollo de las válvulas .....	14
1.2.6. Formación del epicardio y del sistema de conducción .....	14
2. Cambios epigenéticos implicados en la cardiogénesis.....	15
2.1. ¿Qué es la epigenética?.....	15
2.2. Tipos de marcas epigenéticas: metilación ADN, cambios post-traduccionales en histonas y ARN no codificantes. ....	15
2.2.1. Metilación del ADN.....	15
2.2.2. Modificaciones de histonas.....	17
2.2.1. ARN no codificantes .....	19
2.3. Modificaciones epigenéticas implicadas en desarrollo cardiaco .....	20
2.3.1. Metilación del ADN.....	20
2.3.2. Modificaciones de histonas.....	20
2.3.3. ARN no codificantes .....	22
3. Implicación de la epigenética en los fallos en el desarrollo cardiaco .....	23
3.1. Consecuencias de la exposición a tóxicos ambientales durante la gestación (exposición embrionaria).....	23
4. Conclusiones.....	25
5. Referencias bibliográficas.....	26

## **Resumen**

Los defectos durante el desarrollo cardiaco pueden dar lugar a malformaciones y enfermedades cardiovasculares. Para su estudio y posible prevención, se ha descrito el proceso de desarrollo en humanos y en otras especies modelo. Es el caso del pez cebra, que presenta una estructura cardiaca distinta a los humanos, pero unos mecanismo celulares y moleculares subyacentes al proceso de desarrollo cardiaco altamente conservados entre ambas especies. Otra ventaja de esta especie es la transparencia de los embriones y larvas y su capacidad para obtener nutrientes y oxígeno por difusión pasiva, que permiten la observación de los defectos cardiacos durante el desarrollo. La diferenciación de las células cardiacas se produce por cambios en la expresión de diversos genes y factores de transcripción que influirán en la proliferación y especificación de los distintos tipos celulares que dan lugar a un corazón completo. Estas modificaciones están reguladas, en parte, por factores epigenéticos como son la metilación del ADN, modificaciones post-transcripcionales en histonas y ARN no codificantes. Las alteraciones de estas modificaciones epigenéticas pueden conducir a fallos en el desarrollo cardiaco y, por tanto, a malformaciones y enfermedades. Recientemente, se ha descrito cómo el efecto de algunos tóxicos ambientales, como el bisfenol A (BPA) sobre la epigenética, pueden alterar la expresión de genes implicados en el desarrollo cardiaco y, por tanto, el desarrollo del corazón.

**Palabras clave:** contaminantes ambientales, desarrollo cardiaco, epigenética, pez cebra.

## **Abstract**

The disruption of the mechanisms controlling cardiac development can lead to malformations and cardiovascular disease. So as to have a deeper insight into the developmental process in humans, some model species have been used. This is the case of the zebrafish, whose cellular and molecular mechanisms involved in cardiogenesis are highly conserved with humans, despite having a different heart structure. Moreover, the embryo transparency and the ability of the larva to survive, meet the nutrients and oxygen supply by passive diffusion during development, allows the observation of cardiac malformations. Cardiac cells differentiation is triggered by changes in gene expression that influence the cell proliferation and specification to form a complete heart. These modifications are regulated, to a certain extent, by epigenetic factors such as DNA methylation, post-transcriptional modifications in histones and non-coding RNA. Alterations in these epigenetic modifications lead to failures in cardiac development and thus to malformations and diseases. Recently, the effects of some environmental toxicants, such as bisphenol A (BPA), on epigenetics have been described, which may alter the cardiac development.

**Keywords:** cardiac development, environmental pollutants, epigenetics, zebrafish.



## **1. Cardiogénesis**

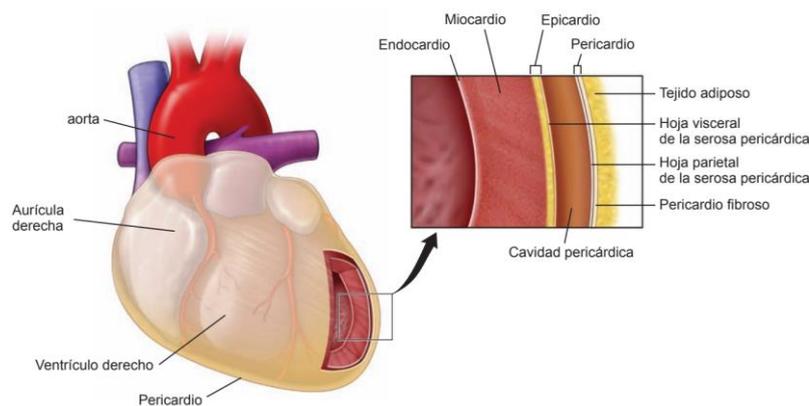
### **1.1.Desarrollo cardiaco en humanos**

#### **1.1.1. Anatomía, fisiología e histología del corazón en humanos**

El corazón adulto humano está formado por cuatro cámaras. Existen dos cámaras superiores o aurículas, que reciben la sangre proveniente de otras partes del cuerpo y dos compartimentos inferiores denominados ventrículos, cuya función es bombear la sangre a otras zonas corporales. Las cámaras superiores están separadas por un tabique auricular y las inferiores por un tabique ventricular (Iazzo, 2005). La sangre rica en oxígeno procedente de los pulmones entra en la aurícula izquierda vía venas pulmonares y es bombeada por el ventrículo izquierdo hacia la arteria aorta, consiguiendo así su entrada a la circulación sistémica y su propagación al resto del cuerpo. Por otro lado, la sangre carente de oxígeno procedente del resto del organismo entra en la aurícula derecha vía venas cava inferior y superior (Ross y Pawlina, 2016) y es impulsada hacia la arteria pulmonar a través del ventrículo derecho, llegando así a los pulmones (Iazzo, 2005; Buijtendijk *et al.*, 2020). Sin embargo, aunque en el corazón tengan lugar dos flujos de sangre distintos, existe una única dirección de flujo que es mantenida gracias a la existencia de válvulas cardíacas a la salida de las cámaras (Ross y Pawlina, 2016). Las válvulas auriculoventriculares permiten el paso de la sangre desde las aurículas a los ventrículos y evitan que el flujo sanguíneo retroceda cuando estos últimos se contraen para impulsar la sangre fuera del corazón. Estas válvulas son las denominadas válvula tricúspide y válvula bicúspide o mitral y se localizan entre las cavidades derechas e izquierdas, respectivamente. Por otro lado, en la estructura cardíaca se distinguen también las válvulas semilunares, que incluyen la válvula pulmonar y la válvula aórtica, que permiten la salida del flujo sanguíneo hacia la arteria pulmonar y la arteria aorta desde los ventrículos derecho e izquierdo, respectivamente (Iazzo, 2005).

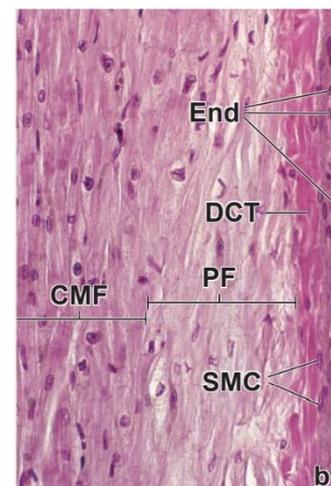
En términos histológicos, el corazón está compuesto por tres capas tisulares que, de la parte más externa hasta la más interna son pericardio, miocardio y endocardio (Figura 1). El pericardio se divide en dos capas que delimitan la cavidad pericárdica. La hoja externa es el pericardio fibroso o parietal, constituido por tejido conectivo fibroso y una lámina interna de células mesoteliales en contacto con la cavidad pericárdica (Rodríguez and Tan, 2017). La capa interna, el pericardio seroso o visceral, también denominada epicardio, está compuesto, de fuera hacia adentro, por una capa de células mesoteliales que lubrican y facilitan los movimientos,

una capa de tejido conectivo fibroelástico y otra de tejido adiposo. (Iazzo, 2005).



**Figura 1.** Capas del corazón humano. Se pueden observar las 3 capas que componen el corazón: endocardio, miocardio y epicardio o pericardio, que incluye la hoja visceral y la hoja serosa. (Ross y Pawlina, 2016)

Las arterias y venas coronarias, los nervios y los vasos linfáticos circulan por debajo del epicardio (Arackal y Alsayouri, 2022). Los vasos coronarios incluyen las dos arterias coronarias y las venas cardiacas. Las arterias coronarias derecha e izquierda llevan sangre arterial al corazón. Se originan en la aorta y emiten ramas que alcanzan la punta del órgano. En cuanto a las venas coronarias, la mayoría desembocan en el seno coronario, situado en la superficie dorsal del corazón y que drena en la aurícula derecha (Ross y Pawlina, 2016). El miocardio está compuesto tejido muscular cardíaco estriado en que conforma la pared del corazón y representa el tejido contráctil (Iazzo, 2005; Ross y Pawlina, 2016). Las células de este tejido se denominan cardiomiocitos y presentan una forma rectangular, normalmente con un núcleo situado en la región central. Pueden estar ramificados y están conectados por complejos de unión especializados denominados discos intercalares. Estos discos intercalares representan zonas en las que dos células se unen estrechamente a través de uniones gap y desmosomas, permitiendo la transmisión del impulso eléctrico entre ellas (Buetow y Laflamme, 2018). El miocardio de los ventrículos es más grueso que el de las aurículas, ya que se requiere una mayor presión para impulsar la sangre a través de las circulaciones pulmonar y sistémica (Ross y Pawlina, 2016). El endocardio, está compuesto, de adentro a



**Figura 2.** Estructura histológica del endocardio humano. Se representa la capa endotelial interna (End), la capa de tejido conjuntivo denso (DCT) que contiene células musculares (SMC) y la capa subendocárdica de tejido conectivo donde se localizan las fibras de Purkinje (PF). A la izquierda de la imagen también se puede observar el miocardio formado por células musculares cardiacas (CMF).

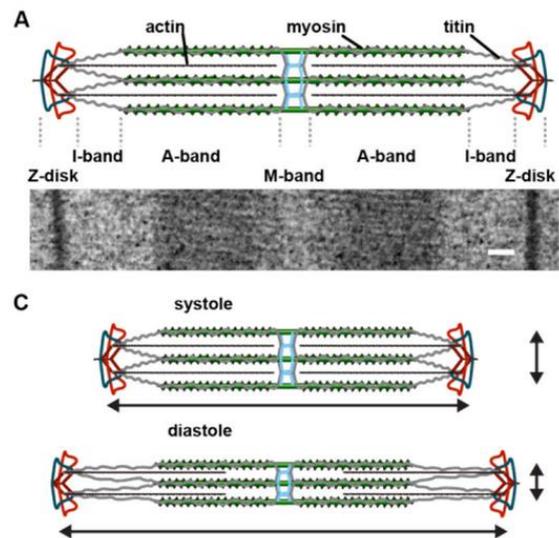
(Ross y Pawlina, 2016)

fuera, por una capa interna escamosa endotelial, tejido conjuntivo denso que contiene células musculares lisas y otra capa de tejido conectivo o capa subendocárdica que contiene las fibras de Purkinje (Iazzo, 2005; Berridge *et al.*, 2013; Ross y Pawlina, 2016) (Figura 2).

La contracción de los cardiomiocitos viene desencadenada por el flujo de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) al interior de la célula, facilitado por la existencia de canales y bombas iónicas en la membrana.

Además, el movimiento libre de iones entre células a través de uniones gap permite la transmisión de un impulso eléctrico a través de la red de células musculares cardíacas. El espacio intracelular de los miocitos cardíacos está ocupado por un entramado citoesquelético de miofilamentos organizados en sarcómeros, las unidades contráctiles funcionales (Iazzo, 2005). En los sarcómeros pueden distinguirse filamentos gruesos, compuestos principalmente por miosina, la cual está constituida por un par de cadenas pesadas (MYH/MHC) y cuatro cadenas ligeras (MLC) (Figura 2A). Los filamentos de miosina contienen un dominio motor con dos cabezas globulares, que se une a la actina, y un dominio helicoidal que puede dimerizar y formar filamentos gruesos bipolares

(England and Loughna, 2013; Braithwaite and Al Khalili, 2020; Crocini and Gotthardt, 2021). Por otro lado, los filamentos finos están compuestos por actina, que es una proteína globular que polimeriza constituyendo un filamento helicoidal. Además, estos filamentos incluyen el complejo tropomiosina (Tm)-troponina (Tn). La primera se encuentra en los huecos que forman las subunidades de actina y la segunda está compuesta por tres subunidades (TnT, TnI y TnC) (Figura 2A). TnT une la troponina a la tropomiosina, TnC tiene capacidad de unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y TnI puede inhibir la interacción actina-miosina (Matiuzzi *et al.*, 2013). Los filamentos gruesos y finos pueden deslizarse entre sí provocando el acortamiento del sarcómero (Figura 2C) (Crocini and Gotthardt, 2021). En este acortamiento participa el calcio que ha entrado al interior celular, que tras unirse a TnC, provoca un cambio conformacional en el complejo Tm-Tn que rota, exponiendo así los lugares de unión a miosina presentes en la actina (Matiuzzi *et al.*, 2013;



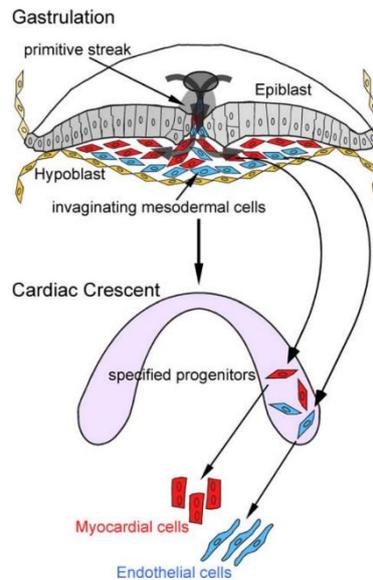
**Figura 3.** Organización de un sarcómero de un miocito cardíaco. A Estructura esquemática (arriba) y observada con microscopía electrónica (abajo) de un sarcómero. C Relación entre las longitudes de un sarcómero en el proceso de contracción (arriba) y de relajación (abajo).

(Crocini and Gotthardt, 2021)

Braithwaite and Al Khalili, 2020). De esta manera, la cabeza de la miosina interactúa con dos monómeros de actina adyacentes y como consecuencia, se produce la contracción del cardiomiocito (Crocini and Gotthardt, 2021). Además, para que la contracción tenga lugar, se requiere energía procedente de ATP unido a miosina (Braithwaite and Al Khalili, 2020).

### 1.1.2. Diferenciación y migración de los precursores cardíacos

En los humanos, el desarrollo cardíaco se inicia en la segunda semana de desarrollo durante la etapa de gastrulación, en la cual una blástula formada por dos capas embrionarias se convertirá en un embrión con tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (Buijtendijk *et al.*, 2020). Los precursores cardíacos se originan en el surco primitivo temprano y migrarán hasta la zona ventral del embrión durante la segunda semana (Tan and Lewandowski, 2020) hasta formar dos grupos celulares que forman el denominado mesodermo cardiogénico (Gilbert, 2000) en el mesodermo anterior lateral (LPA; del inglés *Lateral Plate Mesoderm*) (Harris and Black, 2010). Estas células progenitoras, que son las que darán lugar al futuro tubo cardíaco lineal, se conocen como células del área cardíaca primaria (FHF; del inglés *first heart field*). A continuación, estos campos bilaterales migran hacia la línea media del embrión durante la tercera semana, donde se unirán para formar la cresta cardíaca (Figura 4) (Sylva *et al.*, 2013; Tan and Lewandowski, 2020). Durante la migración, estas células se vuelven competentes para su diferenciación hacia un linaje cardíaco, dando lugar finalmente a los cardiomiocitos (Buijtendijk *et al.*, 2020). Varias evidencias sugieren que el origen del endocardio y del miocardio es común, siendo importante su localización para su especificación, ya que esta dependerá de la actuación de distintos mediadores en cada caso (Dye y Lincoln, 2020). Mientras migran, algunas células que comienzan a expresar N-cadherina darán lugar al miocardio (Linask *et al.*, 1997; Gilbert, 2000). Esta molécula participa en las uniones gap intercelulares y se ha demostrado que los contactos mediados por N-cadherina se requieren para la expansión y supervivencia de las células musculares lisas cardíacas. Además, se ha descrito un posible papel de esta cadherina en la regulación de la señalización Wnt, implicada en la proliferación de los precursores cardíacos (Soh *et al.*, 2014). Una proporción de estas células, por el contrario, disminuirán su expresión de N-cadherina y se separarán de aquellas que van a formar el miocardio, para dar lugar a otra capa de tejido, el endocardio (Linask *et al.*, 1997; Gilbert, 2000).



**Figura 4.** Migración y especificación de los precursores cardíacos. Las células mesodérmicas originados en el surco primitivo del embrión migran hacia la línea media formando la cresta cardíaca. En ese lugar, tiene lugar la especificación a células miocárdicas o endocárdicas, dependiendo de su localización. (Harris and Black, 2010)

En los precursores cardíacos tiene lugar la expresión de dos factores de transcripción principales. Por un lado, el factor de respuesta al suero (SRF) se expresa en las células mesodérmicas y regula la formación del mesodermo y de la cresta cardíaca (Deshpande *et al.*, 2022). Por otro lado, *MESPI* se expresa en las células precursoras que darán lugar al tubo cardíaco y es requerido para que las células mesodérmicas migren desde el surco primitivo para formar el tubo cardíaco (Tabla 1) (Saga *et al.*, 1999; Lescroart *et al.*, 2014). A continuación, las células del mesodermo darán lugar a las células endocárdicas y miocárdicas. La especificación del endocardio parece ser inducida por la liberación de mediadores por parte de las células endodérmicas, incluyendo proteínas morfogenéticas óseas (BMP; del inglés *bone morphogenetic proteins*) e inhibidores de la vía de señalización Wnt (Dye y Lincoln, 2020). Por el contrario, la diferenciación de las células mesodérmicas migratorias a cardiomiocitos tiene lugar en presencia del factor de transcripción NKX2.5 (Gilbert, 2000). Este factor es crítico para regular la diferenciación tisular y para determinar los patrones temporales y espaciales del desarrollo (Kim *et al.*, 2021). NKX2.5 activa la síntesis de otros factores que también participan en la diferenciación cardiogénica, como son los de la familia Gata y Mef2. Estos factores de transcripción activan la expresión de genes que codifican proteínas específicas del músculo cardíaco (Gilbert, 2000). NKX2.5 interacciona físicamente y de forma sinérgica con Gata4, actuando como reguladores transcripcionales clave de numerosos genes cardíacos (Kinnunen *et al.*, 2018). Además, la expresión de GATA4 durante la diferenciación podría estar controlada por otro miembro de la misma familia, GATA6 (Pikkarainen *et al.*, 2004). La familia

de factores Gata parece ser necesaria en la activación de genes sarcoméricos como los codificantes para MYH6, MYH7, TnC, F-actina y otros genes como los que codifican el péptido natriurético auricular (Nppa), receptores o canales iónicos (Pikkarainen *et al.*, 2004). Por otro lado, uno de los miembros de la familia Mef2, MEF2c, también parece tener un papel importante en la expresión de los genes de *NPPA*, *MYH6*, *MYH7* y *F-actina* y está implicado en la morfogénesis cardíaca, miogénesis y desarrollo vascular (Lin *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2021). HAND2 es un factor de transcripción que también actúa promoviendo la expresión de múltiples genes diana, entre ellos *NPPA*, en el corazón durante la embriogénesis. Puede actuar solo o en sinergia con otros factores como GATA4, NKX2.5 y MEF2c (Tabla 1) (Lu *et al.*, 2016). La diferenciación a cardiomiocitos ocurre de forma gradual, de forma que primero tendrá lugar la especificación de las células ventriculares y más tarde, la de las células que formarán las aurículas (Gilbert, 2000).

**Tabla 1.** Principales factores de transcripción implicados en el desarrollo cardíaco en humanos y sus respectivas funciones.

Factor de transcripción	Función
<b>SRF</b>	Formación del mesodermo y de la cresta cardíaca
<b>MESP1</b>	Migración de células mesodérmicas desde el surco primitivo
<b>NKX2.5</b>	Diferenciación cardiogénica y activación de otros factores
<b>GATA4</b>	Diferenciación cardiogénica y activación de otros genes ( <i>MYH6/α-MHC</i> , <i>MYH7/β-MHC</i> , <i>TnC</i> )
<b>HAND2</b>	Miogénesis y expresión de genes diana ( <i>NPPA</i> , <i>MYH6/α-MHC</i> )
<b>MEF2c</b>	Morfogénesis cardíaca, miogénesis y desarrollo vascular. Activación de genes diana ( <i>MYH6</i> , <i>MYH7</i> , <i>NPPA</i> )
<b>ISL1</b>	Expansión de progenitores cardíacos del SHF

### 1.1.3. Formación y crecimiento del tubo cardíaco lineal

El proceso de desarrollo continúa y el embrión plano adquiere una forma más tridimensional como consecuencia de un plegamiento al final de la tercera semana (Buijtenlijk *et al.*, 2020; Sylva *et al.*, 2013). La parte craneal del embrión se pliega en dirección ventro-caudal y de esta manera, las porciones laterales del mesodermo se aproximan dando lugar a la zona ventral del tubo cardíaco. La curvatura interna de la cresta cardíaca forma el lado dorsal del tubo y esta zona será contigua al mesocardio dorsal, que es la unión de la pared cardíaca con la pared corporal (Sylva *et al.*, 2013). Como consecuencia de este plegamiento, el corazón adopta una forma de Y invertida con dos entradas caudolaterales (polo venoso) y una salida craneomedial (polo arterial o tracto de salida) (Figura 5A). El tubo cardíaco estará organizado en una capa

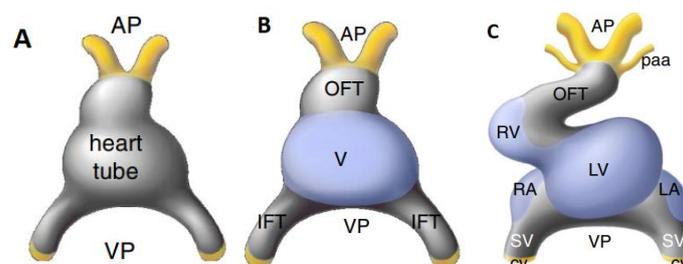
externa de cardiomiocitos y una capa interna de células endocárdicas. Estas dos capas celulares estarán separadas por una matriz extracelular conocida como gelatina cardiaca (Buijtendijk *et al.*, 2020).

#### 1.1.4. Plegamiento del tubo cardiaco

Al inicio de la cuarta semana, el tubo recto es sometido a la formación de un bucle, proceso en el que el mesocardio dorsal se rompe a lo largo de su línea media y desaparece. El tubo cambia su configuración espacial, dejando de ser recto y doblándose hacia la derecha (Buijtendijk *et al.*, 2020; Tan and Lewandowski, 2020). Además, su longitud durante el plegamiento aumenta debido a la adición de nuevos cardiomiocitos diferenciados, que derivan de células mesodérmicas procedentes de una región localizada por encima del polo venoso. A estas células progenitoras se les conoce como células del área cardiaca secundaria (SHF; del inglés *second heart field*) (Buijtendijk *et al.*, 2020) y su expansión requiere la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y la expresión del factor de transcripción ISL1 (Tabla 1) (Buckingham *et al.*, 2005; Van Weerd *et al.*, 2011; Buijtendijk *et al.*, 2020).

#### 1.1.5. Formación de las cuatro cámaras

Tras la formación del bucle, en la curvatura externa se reinicia la división y diferenciación celular de los cardiomiocitos, dando lugar a los ventrículos (Sylva *et al.*, 2013) (Figura 5B). En esa localización, la gelatina cardiaca localizada entre el miocardio y el endocardio desaparece y se forman unas protusiones denominadas trábeculas en el lado luminal/endocárdico, que son proyecciones de células miocárdicas envueltas por una capa endocárdica (Sylva *et al.*, 2013; Buijtendijk *et al.*, 2020; Tan and Lewandowski, 2020). Estas irán disminuyendo en longitud y aumentando de grosor en un proceso denominado compactación, que tendrá lugar alrededor de la octava semana. En paralelo al desarrollo del ventrículo y a la elongación del tubo cardiaco, las aurículas comienzan a diferenciarse en la región de entrada de flujo (Buijtendijk *et al.*, 2020) (Figura 5C).



**Figura 5.** Representación esquemática de la formación de las cuatro cámaras cardíacas en un corazón humano. Al inicio de su formación, el tubo cardíaco (HT) presenta forma de Y invertida, con el polo arterial (AP) en la parte superior y el polo venoso (VP) en la parte inferior (Imagen A). A continuación, se observa el abombamiento de la primera cámara ventricular (V) en la curvatura externa del corazón (Imagen B). Cuando el tubo cardíaco presenta forma de S, se empiezan a distinguir los dos ventrículos (LV y RV) y las aurículas (LA y RA) (Imagen C). (Buijtendijk *et al.*, 2020)

#### 1.1.6. Tabicación y desarrollo de las válvulas

El flujo sanguíneo es separado en un flujo pulmonar y en un flujo sistémico en un proceso denominado tabicación que se desarrolla entre la cuarta y sexta semana del desarrollo. La gelatina cardíaca comienza a expandirse entre las capas endocárdicas y miocárdicas en el canal auriculoventricular (AV), que es el compartimento situado entre las aurículas y ventrículos en formación, y en el tracto de salida (OFT; del inglés *outflow tract*), que es un tubo miocárdico que recorre la zona entre los ventrículos en desarrollo hasta el saco aórtico (Sylva *et al.*, 2013; Buijtendijk *et al.*, 2020). Estos depósitos de matriz extracelular forman 4 cojines cardíacos principales: cojines AV posterior y anterior y cojines OFT parietal y septal que se extienden por el lumen, se encuentran y se fusionan (Buijtendijk *et al.*, 2020). Antes de la tabicación comienzan a ser colonizados por células mesenquimales derivadas del endocardio y los cojines del OFT, además, por células derivadas de la cresta neural (Sylva *et al.*, 2013; Buijtendijk *et al.*, 2020).

Las válvulas situadas entre las cámaras cardíacas se forman a partir de los 4 cojines principales. Además, tanto en el canal AV como en el OFT se forman cojines menores, los llamados cojines AV laterales y las crestas OFT intercaladas, que también contribuyen a la formación de las válvulas. Tras su formación las válvulas madurarán debido a una remodelación de la matriz extracelular. (Sylva *et al.*, 2013; Buijtendijk *et al.*, 2020).

#### 1.1.7. Formación del epicardio y del sistema de conducción

El epicardio deriva del pro-epicardio, una estructura localizada en el polo venoso del corazón lineal en la cuarta semana de desarrollo (Sylva *et al.*, 2013; Buijtendijk *et al.*, 2020). Mientras se produce el enrollamiento del corazón, las vellosidades del pro-epicardio comienzan a entrar en contacto superficie dorsal externa del canal AV y las células comienzan a extenderse y a cubrir el corazón entero con el epicardio (Sylva *et al.*, 2013). Este proceso se completa en la sexta semana de desarrollo (Buijtendijk *et al.*, 2020).

El sistema de conducción de impulsos eléctricos se desarrolla en paralelo a la formación de las

cámaras cardiacas y comprende el nódulo sinoauricular (SA), el nódulo auriculoventricular (AV), haz auriculoventricular, las ramas del haz y el sistema de conducción periférico (fibras de Purkinje) (Buijtendijk *et al.*, 2020). Al final de la segunda semana, los cardiomiocitos en diferenciación comienzan a ser eléctricamente competentes como resultado de la expresión de genes sarcoméricos y de bombas y canales iónicos (Hcn4) en la membrana celular. Al inicio de la tercera semana, una vez que el tubo cardiaco lineal se acaba de formar, se producen contracciones peristálticas iniciadas en el polo venoso (Buijtendijk *et al.*, 2020). El nódulo SA, localizado en la entrada de la aurícula derecha, se desarrolla a partir del miocardio del polo venoso (Christoffels and Moorman, 2009). El nódulo AV, ubicado en el suelo de la aurícula derecha, y las fibras del haz de His, se desarrollan en el miocardio del canal AV (Moorman *et al.*, 1998; Christoffels and Moorman, 2009). Las ramas de este haz se ramifican hasta llegar a las fibras de Purkinje, que propagan el impulso eléctrico a cardiomiocitos individuales (Buijtendijk *et al.*, 2020).

## **1.2.Especies modelo: desarrollo cardiaco en pez cebra**

Los embriones de pez cebra constituyen un modelo esencial en el estudio de los genes relacionados con el desarrollo del sistema circulatorio. Teniendo en cuenta que, tanto los embriones como las larvas, no son completamente dependientes de la circulación sanguínea para sobrevivir, sino que también pueden tomar oxígeno y nutrientes por difusión pasiva, los embriones con mutaciones son capaces de continuar con el desarrollo durante varios días, permitiendo un análisis detallado de sus fenotipos (Bakkers, 2011; Liu and Stainier, 2012). Además, son transparentes, lo que facilita la observación durante la primera semana (Bakkers, 2011).

### **1.2.1. Anatomía, fisiología e histología del corazón en pez cebra**

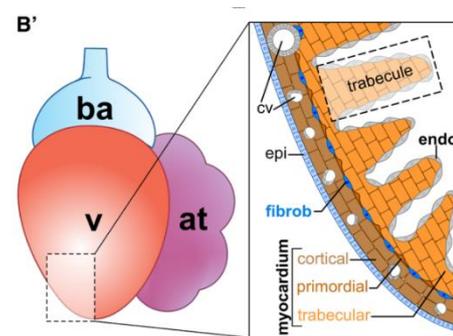
Aunque el proceso de cardiogénesis es similar al proceso de desarrollo cardiaco humano, la estructura final de ambos órganos es distinta. El corazón del pez cebra está compuesto por cuatro cámaras en serie: el seno venoso, la aurícula y el ventrículo (estas dos son las cámaras más prominentes) y el bulbo arterioso, continuo con la aorta ventral (Stainier *et al.*, 1993) y que

es una estructura en forma de cámara altamente distensible (Poon and Brand, 2012). La sangre venosa desoxigenada del cuerpo entra en el seno venoso y pasa, a continuación, a la aurícula a través de la válvula sinoauricular (SA). La contracción de esta cámara y la dilatación del ventrículo fuerza la circulación de la sangre hacia la cámara ventricular a través de la válvula auriculoventricular (AV). La contracción del ventrículo genera de nuevo una alta presión, siendo la sangre bombeada al bulbo arterioso a través de la válvula bulboventricular (BV) (Menke *et al.*, 2011). Finalmente, el corazón bombea la sangre venosa a través de la aorta ventral, llegando así hasta los arcos branquiales donde se produce su oxigenación y desde donde será distribuida al resto del cuerpo (Hu *et al.*, 2000).

En cuanto a su organización histológica, el corazón del pez cebra está compuesto por tres capas, que de afuera hacia adentro son el epicardio, miocardio y endocardio (Figura 6). (Stainier, 2001) El epicardio es la capa visceral del pericardio y está compuesto por células mesoteliales que cubren la superficie externa del corazón, lo protegen y estabilizan su posición

anatómica (Weinberger *et al.*, 2020; Lowe *et al.*, 2021). Las células epicárdicas derivan de una población denominada por-epicardio (Bakkers, 2011). El miocardio es la capa muscular, es un sincito funcional compuesta por cardiomiocitos que se contraen en respuesta a potenciales de acción inducidos por células que actúan como marcapasos (Stainier, 2001; Lowe *et al.*, 2021). Esta capa

presenta a su vez 3 subcapas: la capa trabecular interna, capa primordial fina y capa cortical externa (Sánchez-Iranzo *et al.*, 2018). El músculo predominante y de aspecto esponjoso está compuesto por trabéculas proyectadas radialmente hacia el lumen de las cámaras. La capa primordial, formada por cardiomiocitos aplastados, separa las otras dos y contiene abundantes fibroblastos y matriz extracelular. La capa cortical tiene un grosor de 2 a 4 células y rodea el músculo trabecular (Figura 6) (González-Rosa, 2022). Finalmente, el endocardio es la capa endotelial interna, que contribuye a la formación de las válvulas cardiacas (Stainier, 2001; Lowe *et al.*, 2021). El corazón adulto está altamente innervado y vascularizado con un árbol de vasos coronarios que proporciona oxígeno y nutrientes a la capa cortical (González-Rosa, 2022).



**Figura 6.** Representación de las 3 cámaras principales del corazón del pez cebra: bulbo arterioso (ba), ventrículo (v) y aurícula (at). A la derecha se puede ver una ampliación de la pared ventricular, en la que se observan las tres capas cardíacas: endocardio (endo), miocardio y epicardio (epi). A su vez, se pueden distinguir las tres subcapas del miocardio (cortical, primordial y trabecular) y los fibroblastos de la capa primordial que separan las otras dos.

(González-Rosa, 2022)

### 1.2.2. Diferenciación y migración de los precursores cardiacos

Antes de que comience la gastrulación, a las 5 hpf (horas post-fecundación), existen dos poblaciones de células progenitoras miocárdicas situadas en la región marginal lateral a los lados del embrión (Stainier, 2001). Estos dos conjuntos de células se corresponden con los progenitores miocárdicos ventriculares y auriculares, localizándose éstas últimas más ventralmente que las anteriores (Figura 7A). Por su parte, las células endocárdicas ventriculares y auriculares se distribuyen también a lo largo de la zona marginal del embrión, pero en este caso, sin una distribución aparente (Bakkers, 2011). Durante la gastrulación y los estados tempranos de somita, las células progenitoras se mueven hacia la línea media, donde recibirán señales para su diferenciación y finalmente alcanzarán la placa del mesodermo anterolateral (ALPM) (Figura 7B). El receptor *Agtr1b* y su ligando *Apelin* son requeridos en este desplazamiento hacia la línea medial, así como el factor de transcripción *Hand2*, que actúa regulando los niveles de fibronectina, *Sdc2* y el receptor *s1p* (Zeng *et al.*, 2007; Bakkers, 2011). La diferenciación cardiogénica se inicia a las 16 hpf en las futuras células ventriculares, localizadas más cerca de la línea media (Figura 7B). A continuación, a las 22 hpf se diferenciarán los precursores que darán lugar a las células auriculares (polo venoso), localizadas más lateralmente. En la diferenciación cardiogénica tiene un papel clave el factor *Nkx2.5*, que comienza a expresarse al final de la gastrulación, en los estadios de somita 1-2 (Stainier, 2001; Bakkers, 2011). Este factor activa parte del programa miocárdico y participará en la formación de las cámaras cardiacas (Stainier, 2001; Sun *et al.*, 2010; Bakkers, 2011).. A su vez, *Nkx2.5* tiene la capacidad de promover la expresión de otros factores de transcripción como *Hand2*, aunque también pueden actuar en paralelo (Bakkers, 2011). Otro factor de transcripción clave en el desarrollo del corazón en pez cebra es *Gata5*, que parece tener una función similar al factor *Gata4* en los humanos. *Gata5* puede potenciar la expresión de otros genes como *nkx2.5* y otros genes miocárdicos, participa en la producción de una cantidad normal de precursores miocárdicos y más adelante en el desarrollo, está implicado en la diferenciación de la cámara ventricular. Además, parece regular positivamente la expresión de *gata4* (Reiter *et al.*, 1999). En la morfogénesis del corazón también participan otros factores como *Mef2c*, que juega un papel importante en la diferenciación miocárdica y en el desarrollo ventricular (Tabla 2) (Sun *et al.*, 2010; Hinitz *et al.*, 2012). En este proceso de diferenciación, también se ha notificado la expresión de genes sarcoméricos de miosina, en el estado de somita 14, como el polipéptido 7 de la cadena ligera de la miosina (*My17*) que, aunque al principio está restringido a unas pocas células, su expresión acaba por darse en muchas más. Por otro lado,

también se observa la expresión de la cadena pesada de la miosina ventricular (Vmhc) en la zona media del corazón y de la cadena pesada de la miosina auricular (Myh6/Amhc) en la zona lateral. Vmhc comienza a expresarse antes que Amhc, lo que indica que la diferenciación de estas células tiene lugar a distintos tiempos (Bakkers, 2011).

**Tabla 2.** Principales factores de transcripción implicados en el desarrollo cardíaco en pez cebra y sus respectivas funciones.

Factor de transcripción	Función
<b>Nkx2.5</b>	Diferenciación miocárdica y formación de cámaras cardíacas
<b>Gata5</b>	Expresión de genes miocárdicos ( <i>nkx2.5</i> ), regulación de la cantidad de precursores miocárdicos y desarrollo ventricular.
<b>Hand2</b>	Migración de precursores cardíacos y diferenciación miocárdica
<b>Mef2c</b>	Desarrollo ventricular y diferenciación miocárdica
<b>Isl1</b>	Diferenciación del polo venoso (nódulo SA)
<b>Tbx5</b>	Especificación del epicardio
<b>Tbx1</b>	Proliferación del SHF

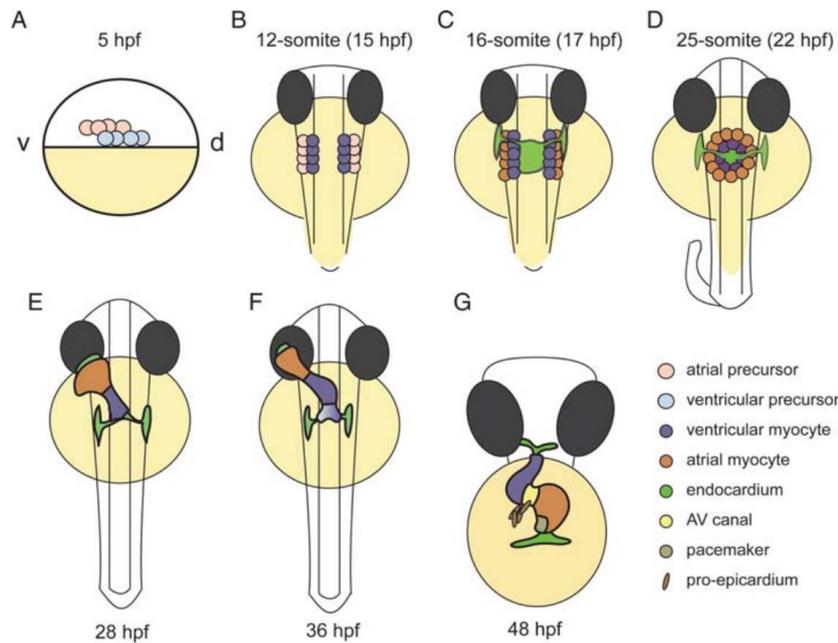
### 1.2.3. Formación del tubo cardíaco lineal

Tras su migración, los progenitores se dividen en el eje embrionario y forman los dos primordios tubulares en la placa lateral del mesodermo (Stainier *et al.*, 1993). Las células del endocardio migran hacia la zona medial antes que las del miocardio, situándose entre los dos primordios (Figura 7C) (Stainier *et al.*, 1993; Bakkers, 2011). A continuación, los dos campos bilaterales se fusionan y se formará el disco cardíaco, con las células endocárdicas en el centro, los miocitos ventriculares en la circunferencia y los miocitos auriculares en la periferia (Figura 7D) (Bakkers, 2011). Hasta este momento, el proceso morfogénico cardíaco podía ser considerado simétrico. Sin embargo, una vez tiene lugar la formación del disco, el tejido miocárdico procedente del campo derecho se mueve hacia la zona anterior/izquierda, mientras que las células endocárdicas que estaban localizadas en la zona central del disco se dispondrán en el lumen del tubo cardíaco. Esta morfogénesis asimétrica del corazón depende de la expresión de Bmp y Nodal en la ALPM. La vía de Nodal parece estar implicada en la regulación de la morfogénesis del corazón, mientras que la señalización Bmp parece mediar el movimiento hacia la izquierda y la rotación del tejido del miocardio (Bakkers, 2011). Como consecuencia de estos movimientos, el disco cardíaco se transforma en el cono cardíaco, que expresa marcadores de diferenciación cardíaca como genes sarcoméricos. Este cono se extiende

anteriormente y es remodelado gradualmente para dar lugar al corazón tubular primitivo, que tendrá situado el polo venoso o auricular en la izquierda y el polo arterial o ventricular en la línea media (Stainier *et al.*, 1993; Bakkers, 2011; Poon and Brand, 2012). A las 24 hpf, el tubo cardiaco primitivo estará conformado por una capa de miocardio externa y una capa de endocardio interna, ambas separadas por la matriz extracelular o gelatina cardiaca (Figura 7E) (Poon and Brand, 2012). En el caso de humanos, se hacía referencia al crecimiento del tubo cardiaco por adición de cardiomiocitos procedentes del SHF. Aunque en el pez cebra no está muy claro si el SHF está presente como tal, sí que hay evidencias de la existencia de cardiomiocitos que se diferencian más tarde que los que forman el disco cardiaco y que son añadidos a los polos del tubo cardiaco. Los precursores de estos nuevos cardiomiocitos diferenciados parecen residir en una localización craneal con respecto al FHF y migran al polo arterial a las 48 hpf, una vez que el tubo cardiaco ya ha sido formado (Figura 7F) (Knight and Yelon, 2016). La proliferación de estas células se mantiene con la expresión del factor de transcripción Tbx1 (Tabla 2) (Nevis *et al.*, 2014).

#### 1.2.4. Enrollamiento del tubo cardiaco y formación de las cámaras

Una vez formado el tubo cardiaco lineal, a las 33 hpf este se doblará hacia la derecha, adquiriendo una configuración en forma de S (Poon and Brand, 2012). Este cambio en la conformación cardiaca se debe al desplazamiento del futuro ventrículo hacia la derecha de la línea media, mientras que la futura aurícula se mantendrá a la izquierda (Bakkers, 2011). En la formación de este bucle también parece tener importancia la vía de señalización Nodal (Stainier, 2001). Es en este momento cuando se comienzan a diferenciar morfológicamente las dos cámaras, en un proceso denominado abombamiento de las cámaras, presentando forma de alubia con una curvatura exterior e interior diferentes (Figura 7G) (Bakkers, 2011). La diferenciación morfológica comienza en la región arterial o ventricular, alrededor de los 2 dpf (días post-fecundación), donde el ventrículo comienza su fase de abombamiento con una curvatura externa que dará lugar al futuro ápice del corazón maduro y una curvatura interna que formará la futura base (Poon and Brand, 2012). En la zona venosa o auricular este proceso tiene lugar más tarde. (Stainier *et al.*, 1993; Bakkers, 2011). El flujo sanguíneo a través del ventrículo juega un papel importante, ya que en este momento la circulación es más fuerte, promoviendo la elongación de los cardiomiocitos y fomentando el establecimiento de esta curvatura (Bakkers, 2011).



**Figura 7.** Representación esquemática de las etapas del desarrollo cardíaca en el pez cebra. A las 5 hpf, los precursores miocárdicos ventriculares y auriculares se localizan en la zona marginal del embrión, situándose los primeros más ventralmente (A). Los precursores migran hacia la línea media para alcanzar su destino en la ALPM y se comienzan a diferenciar los miocitos ventriculares (B). Un poco más adelante, se diferencian los miocitos auriculares. Los precursores forman los primordios tubulares y las células endocárdicas, que habían migrado a la ALPM previamente, se localizan entre ellos (C). Los primordios se unen formando el disco cardíaco (D). A las 28 hpf, el disco cardíaco forma el tubo cardíaco, con el polo venoso en la izquierda y el polo arterial en la línea media (E). Alrededor de las 36 hpf, tiene lugar la adición de cardiomiocitos a los polos del tubo y el tubo comienza a plegarse (Imagen F). El tubo continuará plegándose hasta adquirir forma de S (G). (Bakkers, 2011)

### 1.2.5. Desarrollo de las válvulas

La formación de las válvulas se inicia a las 37 hpf, con la expresión endocárdica de Notch1b, Has2 y neuroregulina (Poon and Brand, 2012). A diferencia de lo que ocurre en amniotas, los cojines endocárdicos del canal AV se forman por invaginación de las células del endocardio, no por una transición epitelio-mesenquimal (Gunawan *et al.*, 2019). Estos cojines se alargan, se diferencian a valvas AV y se extienden por el lumen ventricular. El flujo de sangre proporciona un estrés endotelial e induce la expresión de Klf2, que regula cambios en la forma celular y el proceso de invaginación (Bakkers, 2011). Aunque en humanos se forme un septo entre las dos cámaras, este proceso no ocurre en el pez cebra (Stainier, 2001).

### 1.2.6. Formación del epicardio y del sistema de conducción

El epicardio deriva del pro-epicardio, un grupo de células esféricas que emerge a las 55 hpf localizadas muy próximas a la pared ventral del corazón, una vez que el tubo ya ha sido plegado. Entre las 55 y 72 hpf, las células pro-epicárdicas se desplazan hacia el ventrículo mediante

movimientos del fluido pericárdico y darán lugar a una capa continua (Weinberger *et al.*, 2020). La especificación de este tejido viene regulada por el ligando Bmp y por la expresión de Tbx5 en la placa lateral del mesodermo en las etapas del desarrollo temprano (Tabla 2) (Bakkers, 2011; Poon and Brand, 2012).

El corazón del pez cebra no presenta una estructura de nódulo AV ni un sistema de conducción ventricular sofisticados como ocurre en los humanos. Sin embargo, existen cardiomiocitos con actividad de marcapasos como los existentes en el nódulo SA, un canal AV que permite la conducción del impulso y que es equivalente a los cardiomiocitos del nódulo AV de los mamíferos y cardiomiocitos trabeculares que actúan como las fibras de Purkinje (Gao and Ren, 2021). Los cardiomiocitos que imitan la acción del SA, que se desarrollan a las 24 hpf, se localizan en la curvatura interna del polo venoso de la aurícula cardíaca y expresan *Isl1* (Tabla 2) (Bakkers, 2011; Gao and Ren, 2021; Martin and Waxman, 2021). Por otro lado, los cardiomiocitos del canal AV se localizan en la frontera entre la aurícula y el ventrículo a las 48 hpf (Gao and Ren, 2021).

## **2. Cambios epigenéticos implicados en la cardiogénesis**

### **2.1.¿Qué es la epigenética?**

La epigenética implica el estudio de los cambios en la expresión génica, que no se deben a alteraciones en la secuencia de ADN, y que pueden heredarse vía mitótica o meiótica (Lim *et al.*, 2021; Lombó and Herráez, 2021). Aunque el genotipo de la mayoría de las células de un organismo es el mismo (excepto en las células del sistema inmune y en los gametos), la existencia de una gran diversidad de tipos y funciones celulares se debe a la actividad génica altamente regulada a nivel transcripcional. Uno de los tipos de regulación transcripcional más estudiados recientemente son las modificaciones epigenéticas.

### **2.2.Tipos de marcas epigenéticas: metilación ADN, cambios post-traduccionales en histonas y ARN no codificantes.**

#### **2.2.1. Metilación del ADN**

La metilación es la única modificación covalente directamente ligada al ADN (Lombó and Herráez, 2021). Esta modificación se refiere a la adición covalente de un grupo metilo de un donador de grupos metilos, la S-adenosilmetionina (SAM), al carbono situado en posición 5' del nucleótido citosina en el ADN (Figura 8A) (Lim *et al.*, 2021; Moore-Morris *et al.*, 2018).

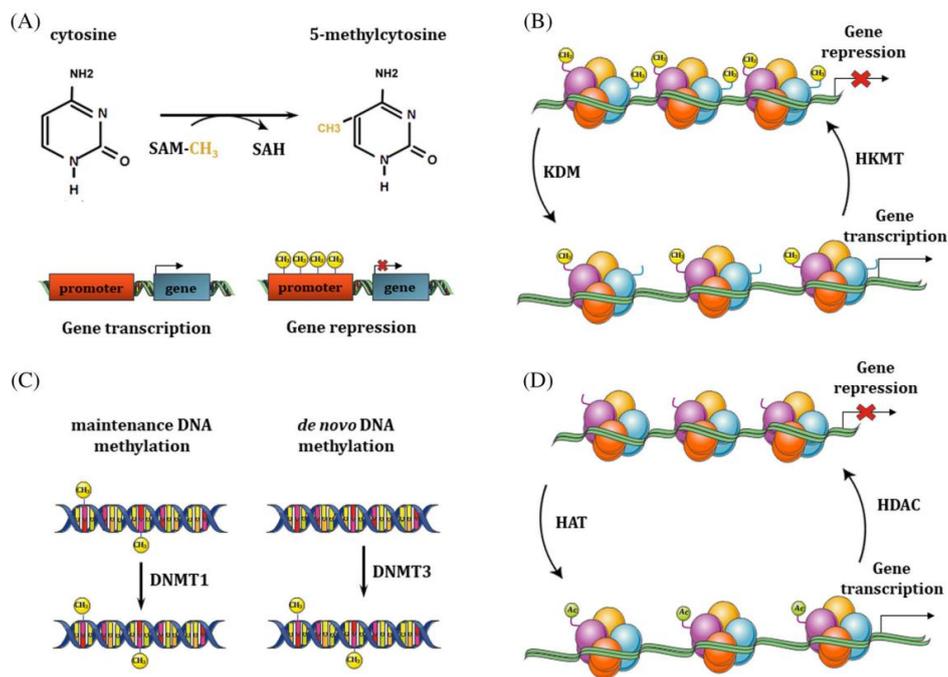
En el genoma de los mamíferos, la metilación está restringida a sitios CpG, es decir, citosinas unidas a guaninas por residuos de fosfato, los cuales abundan en unas zonas genómicas denominadas islas CpG (CGIs). Dependiendo del porcentaje de metilación de estas zonas y del lugar del genoma en el que se encuentren, pueden inducir distintas respuestas (Lombó and Herráez, 2021). Normalmente, residen en regiones promotoras y tienden a estar desmetiladas (Lim *et al.*, 2021). Muchos sitios de unión de los factores de transcripción son ricos en CG, por lo que es probable que las CGIs potencien su unión a los lugares de inicio de la transcripción (Moore *et al.*, 2013). Por tanto, cuando estas regiones están desmetiladas, la transcripción génica estará activa. Sin embargo, si hay un elevado porcentaje de grupos metilo, tendrá lugar el silenciamiento del gen (Lombó and Herráez, 2021). La disminución de la expresión génica como consecuencia de una metilación del ADN se puede deber a la interferencia de los grupos metilo con la unión de activadores de la transcripción y/o al reclutamiento de proteínas con dominios de unión a CpG metilados que inhiben la unión de factores de transcripción por remodelación de la cromatina (Moore *et al.*, 2013; Moore-Morris *et al.*, 2018). Por el contrario, si las CGIs se encuentran lejos de las regiones de inicio de la transcripción, una alta proporción de grupos metilo en los cuerpos de los genes se asocia con altos niveles de expresión en células en división (Poon and Brand, 2012; Lombó and Herráez, 2021). Las reacciones de metilación están catalizadas por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) (Lombó and Herráez, 2021). En mamíferos, los patrones de metilación del ADN se borran durante la gametogénesis y en el desarrollo temprano, con olas de metilación que tienen lugar post-implantación (Moore-Morris *et al.*, 2018). La metilación *de novo* es llevada a cabo por la DNMT3A y DNMT3B que son esenciales para la diferenciación y el desarrollo embrionario. La DNMT1 se considera la principal enzima responsable del mantenimiento de la metilación después de cada división, es decir, de la transferencia de los patrones de metilación a las células hijas. Reconoce las zonas hemimetiladas y metila la nueva hebra siguiendo el patrón epigenético original (Figura 8C). La alteración de DNMT1 resulta en una pérdida de proliferación celular y en muerte celular (Moore-Morris *et al.*, 2018; Lombó and Herráez, 2021). El proceso inverso, la desmetilación, puede tener lugar a través de dos mecanismos diferentes. La desmetilación pasiva de ADN implica inactividad de DNMT1 durante la replicación del genoma, determinándose así los niveles generales de metilación del ADN en cada división celular. Por el contrario, la desmetilación activa está regulada por las enzimas TET (del inglés *ten-eleven translocation enzymes*) que median la restauración de los niveles de citosina (Lombó and Herráez, 2021). TET1 ha mostrado conducir a la desmetilación del ADN mediante la conversión de 5-metil citosina en el intermediario 5-hidroxi metil citosina (Moore-Morris *et al.*, 2018; Lim *et al.*,

2021).

### 2.2.2. Modificaciones de histonas

Los genes codificantes están estrechamente empaquetados dentro de un ensamblado de cromatina que no solo asegura un ambiente protector, sino que también regula su expresión en una manera específica del tiempo y del linaje celular (Moore-Morris *et al.*, 2018). Los nucleosomas son las unidades estructurales repetitivas del cromosoma eucariota y están compuestos por una secuencia de ADN de unas 147 pares de bases que envuelven un núcleo de proteínas, denominadas histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Lim *et al.*, 2021; Lombó and Herráez, 2021). Los nucleosomas comprenden octámeros de histonas con dos unidades de cada una de ellas y están organizados en estructuras de orden superior para condensar aún más el ADN. Las modificaciones de las histonas confieren una propiedad reguladora de genes al nucleosoma (Moore-Morris *et al.*, 2018). Normalmente, tienen lugar modificaciones post-traduccionales las colas de las histonas H3 y H4 que sobresalen del nucleosoma (Lim *et al.*, 2021). Estas alteraciones pueden cambiar la carga eléctrica y la estructura de las colas y están implicadas en la regulación de la estructura de la cromatina y el reclutamiento de otras proteínas que se unen a la cromatina, pudiendo alterar por tanto la expresión génica (Chai *et al.*, 2021; Lombó and Herráez, 2021). Las modificaciones que se han identificado son acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilación, ADP ribosilaciones, propionilaciones y butirilaciones (Lombó and Herráez, 2021). Las histonas metiltransferasas, demetilinasas, acetiltransferasas y deacetilinasas son proteínas multi dominio que incluyen dominios de actividad enzimática, unión al ADN, asociación con otras proteínas en la transcripción y dominios lectores que tienen como diana nucleosoma e histonas específicas (Moore-Morris *et al.*, 2018). Una de las alteraciones post-transcripcionales más importantes es la metilación de histonas. La reacción está catalizada por la enzima histona metiltransferasa (HMT), que emplea S-adenosil metionina (SAM) como sustrato para transferir grupos metil a los residuos de las histonas (Chai *et al.*, 2021). Los residuos comúnmente metilados son los residuos de lisina de H3 y H4, aunque también pueden ser metilados los residuos de arginina (Chai *et al.*, 2021; Lombó and Herráez, 2021). En el caso de la lisina, las enzimas que catalizan la metilación se denominan histona lisina metiltransferasa (HKMTs), mientras que las que catalizan la desmetilación se denominan lisina demetilinasas (KDMs) (Figura 8B). La metilación de estos residuos puede estar relacionada con la activación o la represión de la transcripción de los genes, dependiendo del número de grupos metilo y la localización de estos (Lombó and Herráez, 2021). En general, las metilaciones en H3K4, H3K36, and H3K79 se consideran marcas de

regiones génicas transcripcionalmente activas; mientras que en H3K9, H3K27, and H4K20 han mostrado cierta actividad represiva, normalmente asociadas con expresión génica silenciada y cromatina condensada (Chai *et al.*, 2021). Por su parte, las demetilinas establecen nuevos ambientes de cromatina en las regiones reguladoras de los genes. La eliminación de marcas represivas lleva a cromatina transcripcionalmente permisiva (Moore-Morris *et al.*, 2018). Las modificaciones activadoras y silenciadoras pueden coexistir en un mismo promotor, generando los dominios bivalentes (Lombó and Herráez, 2021).



**Figura 8.** Metilación del ADN y modificaciones post-transcripcionales en histonas. La reacción de metilación ocurre gracias al donador de grupos metilo SAM, convirtiendo una citosina en una 5-metilcitosina (A). DNMT1 y de la DNMT3 desempeñan acciones diferentes (C). La dinámica de metilación (B) y de acetilación (D) de histonas implica enzimas diferentes y provoca efectos distintos. HKMT: metilasas; KDM: demetilinas; HAT: acetil transferasas; HDAC: deacetilasas. (Lombó and Herráez, 2021)

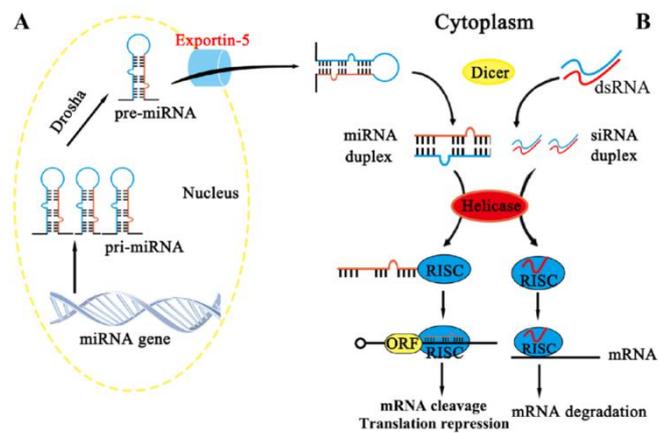
Otro tipo de alteración post-transcripcional es la acetilación de histonas. La acetilación de las histonas neutraliza las cargas positivas de los residuos de lisina, disminuyendo la afinidad de las histonas por el ADN cargado negativamente, por lo que se asocia a un estado transcripcionalmente activo (Chai *et al.*, 2021; Lombó and Herráez, 2021). La acetilación está catalizada por las histona-acetiltransferasas (HATs) y la reacción opuesta, por histona-desacetilasas (HDACs) (Figura 8D) (Lombó and Herráez, 2021). Las enzimas HDACs comprenden tanto las desacetilasas de histonas dependientes de  $Zn^{2+}$  (clases I, II y IV) como desacetilasas sirtuinas (clase III) dependientes de  $NAD^+$ . Las sirtuinas se localizan en el núcleo,

citoplasma y mitocondrias de la célula, mientras que las desacetilasas de histonas dependientes de  $Zn^{2+}$  están ausentes en la mitocondria (Park and Kim, 2020; Lombó and Herráez, 2021). Sin embargo, aunque las diferentes modificaciones histónicas tienen efectos individuales, cabe destacar que estas marcas no son excluyentes, existiendo loci genómicos en los que coexisten dos o tres marcas histónicas, los denominados dominios bivalentes y trivalentes, respectivamente (Chai *et al.*, 2021).

### 2.2.1. ARN no codificantes

Además del control directo por parte de proteínas, las modificaciones histónicas están también reguladas por los ARN no codificantes (Chai *et al.*, 2021). Son moléculas de ARN que no codifican proteínas funcionales, pero constituyen un mecanismo esencial para la expresión génica y la regulación de la estructura de la cromatina. Pueden agruparse conforme a su longitud, dividiéndose en ARNlnc (ARN largos no codificantes) o ARNsnc (ARN pequeños no codificantes). Los ARNsnc incluyen los ARNmi (ARN micro) y los ARNpi (ARN piwi) (Lombó and Herráez, 2021). Principalmente, los ARNmi y ARNlnc han mostrado tener un papel en la epigenética y además pueden verse afectados por ciertos factores medioambientales (Toranó *et al.*, 2016).

Los ARNmi son una moléculas de ARN de una sola hebra, que contienen alrededor de 21-22 nucleótidos y que son en parte complementarios a varias moléculas de ARN (Toranó *et al.*, 2016). Tienen la habilidad de inhibir la expresión de los genes diana uniéndose a su mRNA en la región 3'UTR. Su formación es un proceso que implica un ARNmi primario (pri-ARNmi) que es escindido por la endonucleasa Droscha y transportado al exterior nuclear para ser de nuevo procesado por



**Figura 9.** Formación y acción de un ARNmi. El transcrito primario (pri-miARN) es escindido por la endonucleasa Droscha para dar lugar al pre-ARNmi, que será exportado al citoplasma (A). Este ARN es procesado por Dicer, formándose un dúplex de ARN. A continuación, una de las cadenas será degradada. La otra cadena queda unida a un conjunto proteico formando el complejo RISC. Este complejo reconoce ARNm dianas, escindiéndolos y reprimiendo su traducción (parte izquierda de B).

(Wei *et al.*, 2017)

otra endonucleasa, Dicer (Figura 9A). De esta forma, surge el ARNmi dúplex que será cargado

en la proteína Argonauta. En este momento, una de las cadenas se degrada, quedando así el complejo RISC, constituido por Argonauta y el ARNm maduro. Este complejo de silenciamiento actúa reconociendo dianas mediante la complementariedad entre el extremo 5' del ARNm y el extremo 3'UTR del ARNm diana (Figura 9B) (Ouyang and Wei, 2021). Los ARNinc, por su parte, presentan alrededor de 200 nucleótidos y tienen la habilidad de reclutar histonas y proteínas relacionadas con la cromatina a sitios específicos del genoma, pudiendo así llevar a cabo modificaciones como la acetilación y metilación y regulando por tanto el estado de la cromatina (Toranó *et al.*, 2016; Chai *et al.*, 2021).

### **2.3.Modificaciones epigenéticas implicadas en desarrollo cardiaco**

Como se ha indicado previamente, las estructuras cardiacas se forman a partir de varios linajes celulares y las decisiones de destino celular están influenciadas por procesos tanto genéticos como epigenéticos. (Moore-Morris *et al.*, 2018).

#### **2.3.1. Metilación del ADN**

El estudio de los metilomas del ADN de cardiomiocitos de corazones neonatales y adultos reveló que el desarrollo de estos tipos celulares implicaba un cambio en el estado de metilación del ADN. Se producen olas de desmetilaciones a lo largo de los cuerpos de los genes cardiacos, lo que lleva a una metilación *de novo* del ADN durante el desarrollo embrionario. Estos procesos dan forma al epigenoma durante el desarrollo y el estado prenatal previos a la maduración de cardiomiocitos (Moore-Morris *et al.*, 2018). Se sabe que existe una interacción dinámica entre la metilación del ADN y las marcas de histonas y que la estructura tridimensional de la cromatina también influye en la desmetilación del ADN (Moore-Morris *et al.*, 2018). Por otro lado, la hidroximetilación del ADN también se ha descrito recientemente como un regulador importante en el desarrollo y en el curso de las enfermedades cardiacas. El ADN hidroximetilado se presentaba en genes con una expresión elevada y en regiones reguladoras distales de los genes cardiacos. Sin embargo, en el avance en el desarrollo del corazón, la marca 5-hmC se va perdiendo y acumulando principalmente en los cuerpos de los genes. Por su parte, el aumento de 5-hmC en los promotores de los genes se ha asociado con una leve represión de la expresión génica en cardiomiocitos embrionarios y neonatales, aunque no tiene efecto en las células adultas (Moore-Morris *et al.*, 2018).

#### **2.3.2. Modificaciones de histonas**

Otro aspecto de la regulación epigenética del desarrollo cardiaco se relaciona con las

modificaciones de histonas. Una de las HAT mejor caracterizada es p300 (Moore-Morris *et al.*, 2018). Esta enzima se expresa en el miocardio embrionario, se requiere en el desarrollo cardiaco y es una proteína conservada en mamíferos y en peces (Ghosh, 2020; Kim *et al.*, 2021). Su actividad promueve la expresión de la cadena pesada de la miosina ( $\alpha$ MHC) y la actina  $\alpha$ -sarcomérica ( $\alpha$ SA), lo que lleva a una contractilidad débil del músculo cardiaco (Ghosh, 2020; Kim *et al.*, 2021). Además, p300 puede interactuar con algunos factores de transcripción críticos en el desarrollo cardiaco, llevando a cabo la acetilación de la histona H3 en los promotores de genes cardiacos específicos (Sun *et al.*, 2010). Es el caso de *Gata4*, que puede ser acetilado por p300, promoviendo así su actividad de unión al ADN (Kawamura *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha evidenciado que *Mef2* es acetilado por p300 durante la diferenciación miogénica, permitiendo esta acetilación una mayor afinidad de este factor de transcripción por el ADN y un aumento de su actividad transcripcional (Ma *et al.*, 2005). Además, esta HAT también puede interactuar con *Nkx2.5*, promoviendo también su expresión (Sun *et al.*, 2010). La supresión de la actividad de esa enzima lleva a fallos en el desarrollo cardiaco, como una pared ventricular más fina y defectos en la formación del septo ventricular, septo AV y válvula AV y un corazón de tamaño disminuido (Ghosh, 2020). Por otro lado, la actuación de las HDACs también es importante en la regulación del desarrollo cardiaco. HDAC2 puede interaccionar con *Gata4* en una unión estabilizada por HOPX (factor de transcripción restringido a los precursores directos de cardiomiocitos), desacetilándolo y limitando de esta forma la proliferación de los cardiomiocitos y disminuyendo la actividad transcripcional de este factor de transcripción (Trivedi *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2015). La ausencia de esta enzima en ratones puede llevar a la muerte en las primeras 24 horas del nacimiento debido a malformaciones cardiacas, como la reducción del lumen ventricular derecho debido a la proliferación excesiva de los cardiomiocitos (Haberland *et al.*, 2009). Sin embargo, el pez cebra carece de esta HDAC, pero HDAC1 ha demostrado participar en la regulación de la proliferación de los cardiomiocitos, llevando la inhibición de la enzima a una disminución en el número de cardiomiocitos (Bühler *et al.*, 2021).

En relación con otro tipo de modificación histónica, las HMTs también influyen en el programa transcripcional cardiogénico (Moore-Morris *et al.*, 2018). El activador transcripcional SMYD1 tiene actividad metil transferasa y su función en el músculo cardiaco se ha conservado durante la evolución, manteniéndose en peces y humanos. Desempeña un papel importante en la organización sarcomérica de las células musculares cardiacas y en la expresión de la proteína MHC. Sin embargo, el mecanismo de regulación no ha sido totalmente elucidado, pero

posiblemente tenga que ver con la metilación de MHC y con la interacción que tiene lugar entre SMYD1 y las chaperonas implicadas en el proceso de plegamiento de la miosina (Jiao *et al.*, 2021). Además, en el caso de los mamíferos, ha demostrado tener otras funciones adicionales. Puede unirse al promotor de *Isl1* y trimetilar el residuo H3K4, promoviendo su activación. Por el contrario, también puede asociarse con HDACs e inhibir la expresión de *Nppa* (Wang *et al.*, 2021). En sentido inverso, la desmetilación de histonas también constituye una forma importante de regulación génica. Una de las KDMs principales en el desarrollo cardíaco es KDM6A. Esta enzima, también conocida como UTX, es una demetilasa que tiene como diana la marca represiva H3K27me3 y recluta genes comunes en humanos y peces cebra (Sen *et al.*, 2020; Davis *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021). Es reclutada a los genes cardíacos mediante la asociación con importantes factores de transcripción específicos del corazón como NKX2.5, TBX5, GATA4 y SRF. De esta forma, permite la activación de los genes cardíacos a través de la desmetilación del residuo H3K27me3 (Davis *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021). Por otro lado, KDM6B, también denominada JMJD3, es reclutada en mamíferos por ISL1 a loci específicos durante la diferenciación de los progenitores cardíacos (Davis *et al.*, 2021). En estos lugares, puede eliminar marcas represivas, como H3K27me2/3, desmetilándolas y llevando a una cromatina transcripcionalmente permisiva (Kim *et al.*, 2021). En peces cebra que, aunque, como se ha mencionado previamente, no poseen un SHF como tal, esta enzima tampoco participa en la cardiogénesis inicial, sino en la maduración del ventricular, aumentando la proliferación de cardiomiocitos en esta etapa (Akerberg *et al.*, 2018).

### 2.3.3. ARN no codificantes

Los ARN codificantes pueden actuar como factores epigenéticos y también participan en el desarrollo cardíaco y su regulación génica (Kim *et al.*, 2021). El cluster miR-17/92, que colectivamente codifica 15 ARNmi, es conocido por su importancia en el desarrollo cardíaco y se ha descubierto que induce la proliferación de cardiomiocitos en corazones embrionarios, post natales y adultos (Ouyang and Wei, 2021). Una pérdida de función de dicho cluster lleva a una diferenciación defectuosa a cardiomiocitos en los mamíferos, ya que reprime la función del gen *Isl1* en el proceso de desarrollo cardíaco (Gu *et al.*, 2017). Esto permite determinar que *Isl1* es una diana de miR-17-92 y su represión promueve la diferenciación del miocardio en el polo arterial del tubo cardíaco (Pozzo *et al.*, 2020). Uno de los miembros de este cluster, miR-19a/b, es el ARNmi más potente en la inducción de la proliferación de los cardiomiocitos (Ouyang and Wei, 2021). De hecho, la sobreexpresión en pez cebra de un miembro de la familia, miR-19b, actúa agotando los niveles de *Tbx5*, provocando defectos en el plegamiento, contracción

del ventrículo y bilobación auricular (Chiavacci *et al.*, 2015). Además, esta sobreexpresión induce la inhibición de la vía Wnt, implicada en la proliferación de los progenitores cardiacos (Gu *et al.*, 2017). Los ARN reguladores implicados en la regulación y migración de los precursores cardiacos y los factores de transcripción que promueven estos procesos pueden también la especie. En mamíferos, los niveles de GATA4 pueden verse disminuidos en presencia de miR-200c e incrementados en respuesta a la actividad de ARNlnc CARMEN (Ounzain *et al.*, 2015; Pozzo *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021). Sin embargo, miR-99/100 y Let-7a/c son uno de los ARNmi que tienen la capacidad de silenciar la expresión de Gata4 en el pez cebra (Hodgkinson and Dzau, 2015). Por otro lado, miR-218 ejerce una regulación negativa sobre *tbx5* en pez cebra (Chiavacci *et al.*, 2012). En los mamíferos, el papel de este ARNmi en el desarrollo del corazón es aún desconocido, aunque en ratones ha mostrado ejercer una regulación negativa en la diferenciación de los cardiomiocitos. En el pez cebra, está implicado en la migración de los precursores cardiacos y en el plegamiento del tubo cardiaco (Ouyang and Wei, 2021).

### **3. Implicación de la epigenética en los fallos en el desarrollo cardiaco**

Las marcas epigenéticas cambian constantemente a lo largo de la vida. Algunos de estos cambios están programados y los factores genéticos e intrínsecos pueden regular las modificaciones epigenéticas. Pero, además, algunos de estos cambios pueden ser debidos a la influencia de factores externos, como la alimentación, la exposición a tóxicos u otros factores medioambientales (Toranó *et al.*, 2016). Los procesos biológicos requeridos para el desarrollo normal pueden por tanto ser influidos por agentes exógenos (Diamante and Schlenk, 2018). Los químicos disruptores endocrinos (EDCs) son un grupo de químicos que incluyen fármacos, pesticidas, plastificantes y retardantes de llama, que pueden alterar las vías endocrinas imitando hormonas endógenas y uniéndose a sus receptores específicos (Alavian-Ghavanini and Rüegg, 2018; Diamante and Schlenk, 2018). Los seres humanos están expuestos a estos compuestos a diario y pueden ser detectados en varios fluidos corporales (Alavian-Ghavanini and Rüegg, 2018). Además de alterar el funcionamiento endocrino, los EDCs también pueden influir sobre las modificaciones epigenéticas.

#### **3.1. Consecuencias de la exposición a tóxicos ambientales durante la gestación (exposición embrionaria)**

El desarrollo embrionario es un proceso muy susceptible a cualquier influencia externa, debido al alto número de eventos de división celular y a los cambios epigenéticos críticos que tienen

lugar durante la diferenciación celular (Toranó *et al.*, 2016). Cada vez existen más evidencias que sugieren que la exposición a EDC durante la vida temprana, en particular durante el desarrollo fetal, puede llevar a cambios persistentes que luego darán lugar a la manifestación de enfermedades. El papel de estos químicos sobre los mecanismos epigenéticos puede tener un papel fundamental en la aparición de estos efectos (Alavian-Ghavanini and Rüegg, 2018).

Un ejemplo de EDC es el bisfenol A (BPA), cuya ubicua presencia en el ambiente supone una exposición continua para los humanos (Rasdi *et al.*, 2020). Se emplea en la fabricación de plásticos policarbonados y resinas epoxi y se encuentra en envases de alimentos y en el revestimiento de latas de bebida y comida. Debido a su uso tan extendido, se ha convertido en un químico ambiental ubicuamente distribuido (Gao and Wang, 2014). El BPA puede alterar la diferenciación de las células cardíacas, modificando la expresión de algunos factores de transcripción implicados en la cardiogénesis (Escarda-Castro *et al.*, 2021). La exposición embrionaria a este tóxico aumenta el porcentaje de malformaciones cardíacas generando en pez cebra edemas cardíacos, defectos en el plegamiento y el abombamiento de las cámaras (Lombó *et al.*, 2019). Estos defectos se relacionaron con la sobreexpresión del factor de transcripción *hand2* que provoca una proliferación excesiva de progenitores cardíacos, llevando a un alargamiento anormal del tubo cardíaco. A su vez, la sobreexpresión de *hand2* es debida a modificaciones epigenéticas de su promotor. En pez cebra, la exposición a BPA durante los primeros días del desarrollo aumenta el nivel de acetilación de H3K9, H3K14 y H4K12 (Lombó *et al.*, 2019). Por el contrario, en cardiomioblastos de rata tratados *in vitro*, el BPA altera la diferenciación celular hacia cardiomiocitos disminuyendo la expresión de algunos de los factores de transcripción implicados en la cardiogénesis. Este silenciamiento podría estar relacionado con la disminución de la acetilación H3K9 y H3K27 que se observa tras tratar las células con BPA (Escarda-Castro *et al.*, 2021). Por último, el BPA ha mostrado alterar el perfil de expresión de ARNm relacionados con el desarrollo, la regeneración y las funciones del corazón. Entre ellos, la expresión de miR-208a-3p, implicado en la diferenciación y desarrollo de cardiomiocitos se eleva en fetos de ratas preñadas expuestas al tóxico (Rasdi *et al.*, 2020).

Otro ejemplo de alteración de la cardiogénesis mediada por alteraciones epigenéticas está relacionado con la regulación de la hormona triyodotironina (T3), una de las hormonas producidas por la glándula tiroides, capaz de unirse a receptores (TRs) que actúan como factores de transcripción en el núcleo. Estos receptores se unen a elementos de respuesta (TRE) en los promotores de genes diana, regulando su transcripción (Haddad *et al.*, 2010; Diamante and

Schlenk, 2018). En ratas los niveles de T3 regulan la expresión de los genes que codifican  $\alpha$ -MHC y  $\beta$ -MHC. El gen  $\alpha$ -Mhc es regulado positivamente por T3 y esta regulación se debe a la presencia de TREs en su promotor y en las regiones intergénicas. La desacetilación de los residuos de lisina de H3 y H4 cercanos a los TREs da lugar a una cromatina no permisiva. La adición de la hormona produce una liberación de los represores unidos a los TR y promueve la unión de activadores como p300 u otros activadores con activador HAT. En el caso de  $\beta$ -Mhc, en presencia de T3 y de un ARNnc, se reclutan HDACs al promotor, reprimiendo así la transcripción de este gen (Haddad *et al.*, 2010). Por otro lado, esta hormona también parece tener un papel epigenético en la regulación de la expresión de *ssTnI* (*slow skeletal TnI*), una de las isoformas de TnI presentes en el corazón de mamíferos. Los niveles de acetilación en H3K9 en la región reguladora de este gen van disminuyendo gradualmente a lo largo del desarrollo cardíaco, correspondiendo con una menor expresión del gen *ssTnI* en el corazón. Por el contrario, la trimetilación en H3K9 se ve aumentada (Zhao *et al.*, 2015). La hormona T3 podría regular este mecanismo, ya que estudios previos han demostrado que el hipertiroidismo promueve una inactivación del gen *ssTnI* temprana (Huang *et al.*, 2000).

#### **4. Conclusiones**

El conocimiento detallado del proceso de desarrollo cardíaco en los humanos ofrece la posibilidad de determinar las causas de distintas malformaciones y enfermedades cardíacas, prevenirlas o desarrollar un posible tratamiento. Además de la transparencia de los embriones y larvas y su capacidad de sobrevivir sin sistema circulatorio durante las primeras etapas del desarrollo, el pez cebra ofrece importantes ventajas para considerarse una especie modelo en el estudio del desarrollo del corazón, a destacar, la similitud entre los mecanismos moleculares y celulares que regulan el desarrollo cardíaco en esta especie y aquellos presentes en los humanos. El estudio de las modificaciones epigenéticas involucradas en estos procesos de desarrollo y las consecuencias que suponen sus alteraciones, permitirán avanzar en la determinación de las causas de ciertas malformaciones. Además, conocer el efecto que tienen sobre estas modificaciones ciertos tóxicos ambientales que se encuentran de forma ubicua en el ambiente y a los que, por tanto, estamos continuamente expuestos, nos ofrece la posibilidad de prevenir fallos en el desarrollo cardíaco, y como consecuencia, malformaciones y enfermedades.

## 5. Referencias bibliográficas

- Akerberg, A. A., Henner, A., Stewart, S. and Stankunas, K. (2018) "Histone demethylases Kdm6ba and Kdm6bb redundantly promote cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart ventricle maturation", *Dev. Biology*, 426(1), pp. 84–96. doi:10.1016/j.ydbio.2017.03.030.
- Alavian-Ghavanini, A. and Rüegg, J. (2018) "Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods", *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 122(1), pp. 38–45. doi:10.1111/bcpt.12878.
- Bakkers, J. (2011) "Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease", *Cardiovascular Research*, 91(2), pp. 279–288. doi:10.1093/cvr/cvr098.
- Braithwaite, J. P. and Al Khalili, Y. (2020) "Physiology, Muscle Myocyte", *StatPearls*.
- Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S. (2005) "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells", *Nature Reviews Genetics*, 6(11), pp. 826–835. doi:10.1038/nrg1710.
- Bühler, A., Gahr, B. M., Park, D. D., Bertozzi, A. *et al.* (2021) "Histone deacetylase 1 controls cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development and cardiac regeneration in zebrafish", *PLoS Genetics*, 17(11). doi: 10.1371/journal.pgen.1009890.
- Buetow, By Laflamme, M.A (2018) "Cardiovascular", en Treuting, P.M (ed.) *Comparative Anatomy and Histology*. 2.a ed. Academic Press, pp. 163-189
- Buijtendijk, M. F. J., Barnett, P. and van den Hoff, M. J. B. (2020) "Development of the human heart", *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, 184(1), pp. 7–22. doi:10.1002/ajmg.c.31778.
- Chiavacci, E., Daurizio, R., Guzzolino, E., Russo, F. *et al.* (2015) "MicroRNA 19a replacement partially rescues fin and cardiac defects in zebrafish model of Holt Oram syndrome", *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 5(1), pp. 1–12. doi:10.1038/srep18240.
- Chiavacci, E., Dolfi, L., Verduci, L., Meghini, F. *et al.* (2012) "MicroRNA 218 Mediates the Effects of Tbx5a Over-Expression on Zebrafish Heart Development", *PLoS ONE*, 7(11). doi:10.1371/journal.pone.0050536.
- Christoffels, V. M. and Moorman, A. F. M. (2009) "Development of the cardiac conduction system why are some regions of the heart more arrhythmogenic than others?", *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2(2), pp. 195–207. doi:10.1161/CIRCEP.108.829341.
- Crocini, C. and Gotthardt, M. (2021) "Cardiac sarcomere mechanics in health and disease", *Biophysical Reviews*, 13(5), pp. 637–652. doi:10.1007/s12551-021-00840-7.
- Davis, K., Azarcon, P., Hickenlooper, S., Bia, R. *et al.* (2021) "The role of demethylases in cardiac development and disease", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Elsevier Ltd, 158, pp. 89–100. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.05.018.
- Deshpande, A., Manohar, P., Shetty, V., Frey, N. and Rangrez, A. Y. (2022) "SRF: a seriously responsible factor in cardiac development and disease", *Journal of Biomedical Science*, 29(1) pp. 1–21. doi:10.1186/s12929-022-00820-3.
- Diamante, G. and Schlenk, D. (2018) "Challenges of endocrine disruption and cardiac development", en Burggren, W., Dubansky, B. (eds.), *Development and Environment*. 1a ed, Cham: Springer, pp. 19-35. doi:10.1007/978-3-319-75935-7\_13.
- Dye, B., y Lincoln, J. (2020) "The endocardium and heart valves", *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(12).
- England, J. and Loughna, S. (2013) "Heavy and light roles: Myosin in the morphogenesis of the heart", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(7), pp. 1221–1239. doi:10.1007/s00018-012-1131-1.
- Escarda-Castro, E., Herráez, M. P. and Lombó, M. (2021) "Effects of bisphenol A exposure during cardiac cell differentiation", *Environmental Pollution*, 286(May). doi: 10.1016/j.envpol.2021.117567.
- Gao, R. and Ren, J. (2021) "Zebrafish Models in Therapeutic Research of Cardiac Conduction Disease", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, pp. 1–10. doi:10.3389/fcell.2021.731402.
- Gao, X. and Wang, H. S. (2014) "Impact of bisphenol A on the cardiovascular system - Epidemiological and

- experimental evidence and molecular mechanisms", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), pp. 8399–8413. doi:10.3390/ijerph110808399.
- Ghosh, A. K. (2020) "P300 in Cardiac Development and Accelerated Cardiac Aging", *Aging and Disease*, 11(4), pp. 916–926. doi:10.14336/AD.2020.0401.
- Gilbert, S.F. (2000) "Lateral plate mesoderm and endoderm", en *Developmental Biology*. 6a ed. Sunderland: Sinauer associates.
- González-Rosa, J. M. (2022) "Zebrafish Models of Cardiac Disease: From Fortuitous Mutants to Precision Medicine", *Circulation Research*, 130(12) pp. 1803–1826. doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.320396.
- Gu, H., Liu, Z. and Zhou, L. (2017) "Roles of MIR-17-92 Cluster in Cardiovascular Development and Common Diseases", *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2017. doi:10.1155/2017/9102909.
- Gunawan, F., Gentile, A., Fukuda, R., Tseke, A. T. *et al.* (2019) "Focal adhesions are essential to drive zebrafish heart valve morphogenesis", *Journal of Cell Biology*, 218(3), pp. 1039–1054. doi:10.1083/jcb.201807175.
- Haberland, M., Montgomery, R. L. and Olson, E. N. (2009) "The many roles of histone deacetylases in development and physiology: Implications for disease and therapy", *Nature Reviews Genetics*, 10(1), pp. 32–42. doi:10.1038/nrg2485.
- Haddad, F., Jiang, W., Bodell, P. W., Qin, A. X. and Baldwin, K. M. (2010) "Cardiac myosin heavy chain gene regulation by thyroid hormone involves altered histone modifications", *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(6), pp. 1968–1980. doi:10.1152/ajpheart.00644.2010.
- Harris, I. S. and Black, B. L. (2010) "Development of the endocardium", *Pediatric Cardiology*, 31(3), pp. 391–399. doi:10.1007/s00246-010-9642-8.
- Himits, Y., Pan, L., Walker, C., Dowd, J. *et al.* (2012) "Zebrafish Mef2ca and Mef2cb are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation", *Developmental Biology*. Elsevier, 369(2), pp. 199–210. doi:10.1016/j.ydbio.2012.06.019.
- Hodgkinson, C. P. and Dzau, V. J. (2015) "Conserved MicroRNA program as key to mammalian cardiac regeneration: Insights from zebrafish", *Circulation Research*, 116(7), pp. 1109–1111. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305852.
- Hu, N., Sedmera, D., Yost, H. J. and Clark, E. B. (2000) "Structure and Function of the Developing Zebrafish Heart", *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 260(2), pp. 148–157.
- Huang, X., Lee, K. J., Riedel, B., Zhang, C. *et al.* (2000) "Thyroid hormone regulates slow skeletal troponin I gene inactivation in cardiac troponin I null mouse hearts", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(12), pp. 2221–2228. doi:10.1006/jmcc.2000.1249.
- Iazzo, P. A. (2005) *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*. 1a ed. New Jersey: Humana Press.
- Jiao, S., Xu, R. and Du, S. (2021) "Smyd1 is essential for myosin expression and sarcomere organization in craniofacial, extraocular, and cardiac muscles", *Journal of Genetics and Genomics*. Elsevier Limited and Science Press, 48(3), pp. 208–218. doi:10.1016/j.jgg.2021.03.004.
- Kawamura, T., Ono, K., Morimoto, T., Wada, H. *et al.* (2005) "Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes", *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), pp. 19682–19688. doi:10.1074/jbc.M412428200.
- Kim, Y. J., Tamadon, A., Kim, Y. Y., Kang, B. C. and Ku, S. Y. (2021) "Epigenetic regulation of cardiomyocyte differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells", *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). doi:10.3390/ijms22168599.
- Kinnunen, S. M., Tölli, M., Välimäki, M. J., Gao, E. *et al.* (2018) "Cardiac actions of a small molecular inhibitor targeting GATA4-NKX2-5 interaction", *Scientific reports*, 8(1), pp. 1–14. doi:10.1038/s41598-018-22830-8.
- Knight, H. G. and Yelon, D. (2016) "Utilizing Zebrafish to Understand Second Heart Field Development", *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*, pp. 193–199. doi:10.1007/978-4-431-54628-3.
- Lescroart, F., Chabab, S., Lin, X., Rulands, S. *et al.* (2014) "Early lineage restriction and regional segregation during mammalian heart development", *Nature cell biology*, 16(9), pp. 829–840. doi:10.1038/ncb3024.Early.

- Lim, T. B., Foo, S. Y. R. and Chen, C. K. (2021) "The role of epigenetics in congenital heart disease", *Genes*, 12(3). doi:10.3390/genes12030390.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., y N. Olson, E. (1997). "Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C". *Science*, 276(5317), 1404-1407.
- Linask, K. K., Knudsen, K. A. and Gui, Y. H. (1997) "N-Cadherin-catenin interaction: Necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development", *Developmental Biology*, 185(2), pp. 148–164. doi:10.1006/dbio.1997.8570.
- Liu, J. and Stainier, D. Y. R. (2012) "Zebrafish in the Study of Early Cardiac Development", *Circulation Research*, 110(6) pp. 870–874. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246504.
- Lombó, M., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C. and Herráez, M. P. (2019) "Cardiogenesis impairment promoted by bisphenol A exposure is successfully counteracted by epigallocatechin gallate", *Environmental Pollution*, 246, pp. 1008–1019. doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.004.
- Lombó, M. and Herráez, P. (2021) "The effects of endocrine disruptors on the male germline: an intergenerational health risk", *Biological Reviews*, 96(4), pp. 1243–1262. doi:10.1111/brv.12701.
- Lowe, V., Wisniewski, L. and Pellet-Many, C. (2021) "The zebrafish cardiac endothelial cell—roles in development and regeneration", *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 8(5). doi:10.3390/jcdd8050049.
- Lu, C. X., Gong, H. R., Liu, X. Y., Wang, J. *et al.* (2016) "A novel HAND2 loss-of-function mutation responsible for tetralogy of Fallot", *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2), pp. 445–451. doi:10.3892/ijmm.2015.2436.
- Ma, K., Chan, J. K. L., Zhu, G. and Wu, Z. (2005) "Myocyte Enhancer Factor 2 Acetylation by p300 Enhances Its DNA Binding Activity, Transcriptional Activity, and Myogenic Differentiation", *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), pp. 3575–3582. doi:10.1128/mcb.25.9.3575-3582.2005.
- Martin, K. E. and Waxman, J. S. (2021) "Atrial and sinoatrial node development in the zebrafish heart", *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 8(2), pp. 1–17. doi:10.3390/JCDD8020015.
- Mattiazzi, A., Petroff, V. and Martin, G. (2013) "Fisiología del miocito cardiaco", en Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. Buenos Aires: Inter-medica, pp.176 – 182.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M. and Woutersen, R. A. (2011) "Normal anatomy and histology of the adult zebrafish", *Toxicologic Pathology*, 39(5), pp. 759–775. doi:10.1177/0192623311409597.
- Moore-Morris, T., van Vliet, P. P., Andelfinger, G. and Puceat, M. (2018) "Role of epigenetics in cardiac development and congenital diseases", *Physiological Reviews*, 98(4), pp. 2453–2475. doi:10.1152/physrev.00048.2017.
- Moore, L. D., Le, T. and Fan, G. (2013) "DNA methylation and its basic function", *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 38(1), pp. 23–38. doi:10.1038/npp.2012.112.
- Moorman, A. F. M., De Jong, F., Denyn, M. M. F. J. and Lamers, W. H. (1998) "Development of the cardiac conduction system", *Circulation Research*, 82(6), pp. 629–644. doi: 10.1161/01.RES.82.6.629.
- Nevis, K., Obregón, P., Walsh, C., Guner-Ataman. *Et al.* (2012) "Tbx1 is required for second heart field proliferation in zebrafish", *Dev. Dyn*, 242(5), pp. 550-559.
- Ounzain, S., Micheletti, R., Arnan, C., Plaisance, I. *et al.* (2015) "CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 89, pp. 98–112. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.016.
- Ouyang, Z. and Wei, K. (2021) "miRNA in cardiac development and regeneration", *Cell Regeneration*. Cell Regeneration, 10(1), pp. 1–21. doi:10.1186/s13619-021-00077-5.
- Park, S. Y. and Kim, J. S. (2020) "A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes", *Experimental and Molecular Medicine*. Springer US, 52(2), pp. 204–212. doi:10.1038/s12276-020-0382-4.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R. and Ruskoaho, H. (2004) "GATA transcription factors in the developing and adult heart", *Cardiovascular Research*, 63(2), pp. 196–207. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.025.

- Poon, K. L. and Brand, T. (2012) "The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects", *Global Cardiology Science and Practice*, 2013(1), p. 4. doi:10.5339/qfarf.2012.BMP116.
- Pozzo, E., Chai Y.C., Sampaolesi, M. (2020) "Comprehensive Overview of Noncoding RNAs in Cardiac Development", en Xiao, J (ed.) *Non-coding RNAs in Cardiovascular Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapur: Springer, pp. 197 -211.
- Rasdi, Z., Kamaludin, R., Ab. Rahim, S., Syed Ahmad Fuad, S. B. *et al.* (2020) "The impacts of intrauterine Bisphenol A exposure on pregnancy and expression of miRNAs related to heart development and diseases in animal model", *Scientific Reports*. Springer US, 10(1), pp. 1–13. doi:10.1038/s41598-020-62420-1.
- Reiter, J. F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D. *et al.* (1999) "Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish", *Genes and Development*, 13(22), pp. 2983–2995. doi:10.1101/gad.13.22.2983.
- Rodriguez, E. R. and Tan, C. D. (2017) "Structure and Anatomy of the Human Pericardium", *Progress in Cardiovascular Diseases*. Elsevier Inc., 59(4), pp. 327–340. doi: 10.1016/j.pcad.2016.12.010.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. (2016) "Sistema cardiovascular", en Mendoza, C (ed.) *Histología: Texto y atlas. Correlación con biología celular y molecular*. 7a. ed. Barcelona: Walters Kluwer.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S. *et al.* (1999) "MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube", *Development*, 126(15), pp. 3437–3447. doi:10.1242/dev.126.15.3437.
- Sánchez-Iranzo, H., Galardi-Castilla, M., Minguillón, C., Sanz-Morejón, A. *et al.* (2018) "Tbx5a lineage tracing shows cardiomyocyte plasticity during zebrafish heart regeneration", *Nature Communications*, 9(1), pp. 1-13. doi:10.1038/s41467-017-02650-6.
- Schneider, M. D., Baker, A. H. and Riley, P. (2015) "Hopx and the Cardiomyocyte Parentage", *Molecular Therapy*, 23(9), pp. 1420–1422. doi:10.1038/mt.2015.140.
- Sen, E.L., Geiger, E.A., Jones, K.L., Shaikh, T.H. and Artinger, B.A. (2020) "The role of KMT2D and KDM6A in cardiac development: A cross-species análisis in humans, mice and zebrafish", BioRxiv.
- Soh, B. S., Buac, K., Xu, H., Li, E. *et al.* (2014) "N-cadherin prevents the premature differentiation of anterior heart field progenitors in the pharyngeal mesodermal microenvironment", *Cell Research. Nature Publishing Group*, 24(12), pp. 1420–1432. doi:10.1038/cr.2014.142.
- Stainier, D. Y. R. (2001) "Zebrafish genetics and vertebrate heart formation", *Nature Reviews Genetics*, 2(1), pp. 39–48. doi:10.1038/35047564.
- Stainier, D. Y. R., Lee, R. K. and Fishman, M. C. (1993) "Cardiovascular development in the zebrafish: I. Myocardial fate map and heart tube formation", *Development*, 119(1), pp. 31–40. doi:10.1242/dev.119.1.31.
- Sun, H., Yang, X., Zhu, J., Lv, T. *et al.* (2010) "Inhibition of p300-HAT results in a reduced histone acetylation and down-regulation of gene expression in cardiac myocytes", *Life Sciences*, 87(23–26), pp. 707–714. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.009.
- Sylva, M., Hoff, M. J. B. Van Den and Moorman, A. F. M. (2013) "Development of the Human Heart", (April). doi:10.1002/ajmg.a.35896.
- Tan, C. M. J. and Lewandowski, A. J. (2020) "The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life", *Fetal Diagnosis and Therapy*, 47(5), pp. 373–386. doi:10.1159/000501906.
- Toranõ, E. G., Garcíá, M. G., Fernández-Morera, J. L., Ninõ-García, P. and Fernández, A. F. (2016) "The Impact of External Factors on the Epigenome: In Utero and over Lifetime", *BioMed Research International*, 2016. doi:10.1155/2016/2568635.
- Trivedi, C.M., Zhu, W., Wang, Q., Jia, C. *et al.* (2010) "Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation", *Dev. Cell*, 19(3), pp. 450–459.
- Wang, Z., Schwartz, R. J., Liu, J., Sun, F. *et al.* (2021) "Smyd1 Orchestrates Early Heart Development Through Positive and Negative Gene Regulation", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(April), pp. 1–11. doi:10.3389/fcell.2021.654682.
- Van Weerd, J. H., Koshiba-Takeuchi, K., Kwon, C. and Takeuchi, J. K. (2011) "Epigenetic factors and cardiac development", *Cardiovascular Research*, 91(2), pp. 203–211. doi:10.1093/cvr/cvr138.

Wei, J. W., Huang, K., Yang, C. and Kang, C. S. (2017) "Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review)", *Oncology Reports*, 37(1), pp. 3–9. doi:10.3892/or.2016.5236.

Weinberger, M., Simões, F. C., Patient, R., Sauka-Spengler, T. and Riley, P. R. (2020) "Functional Heterogeneity within the Developing Zebrafish Epicardium", *Developmental Cell*, 52(5), pp. 574-590.e6. doi:10.1016/j.devcel.2020.01.023.

Zeng, X. X. I., Wilm, T. P., Sepich, D. S. and Solnica-Krezel, L. (2007) "Apelin and Its Receptor Control Heart Field Formation during Zebrafish Gastrulation", *Developmental Cell*, 12(3), pp. 391–402. doi:10.1016/j.devcel.2007.01.011.

Zhao, W., Liu, L., Pan, B., Xu, Y. *et al.* (2015) "Epigenetic Regulation of Cardiac Myofibril Gene Expression During Heart Development", *Cardiovascular Toxicology*, 15(3), pp. 203–209. doi:10.1007/s12012-014-9278-7.