

## PUESTA AL DÍA

### Genética y biología molecular en cardiología (X)

# Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco

Diego Franco, Jorge Domínguez, María del Pilar de Castro y Amelia Aránega

Departamento de Biología Experimental. Área de Biología Celular. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

El corazón es un órgano con una especial significación en medicina, en biología del desarrollo y desde el punto de vista evolutivo. La formación del corazón y sus vasos durante la embriogénesis es el resultado de numerosos y complicados procesos. Nuestro conocimiento actual de cómo estos procesos se llevan a cabo está basado en décadas de minuciosos estudios anatómicos. Sin embargo, el espectacular avance de la biología molecular del desarrollo ha marcado el inicio de una nueva era en la embriología, y las bases moleculares de la cardiogénesis están comenzando a emerger. En los últimos años se han identificado varias familias de genes con un patrón específico de expresión en el corazón. Entre ellos se engloban proteínas contráctiles, canales iónicos y factores de transcripción que dictan la expresión de genes específicos de tejido. Así mismo, el análisis de elementos reguladores de la expresión génica constituye, en la actualidad, la clave para la futura aplicación de la terapia génica. Este artículo recoge los últimos datos de patrones de expresión de genes específicos de miocardio durante el desarrollo cardíaco, y también datos recientes derivados del análisis funcional de zonas de regulación génica (transgénicos). Los distintos patrones de expresión revelan una amplia heterogeneidad molecular en el miocardio, y su conocimiento abre las puertas a importantes aplicaciones clínicas en el futuro.

**Palabras clave:** *Expresión génica. Cardiogénesis. Regulación transcripcional.*

### Regulation of Myocardial Gene Expression during Heart Development

The heart is an organ with special significance in medicine and developmental biology. The development of the heart and its vessels during embryogenesis is the result of numerous and complex processes. At present, our understanding is based on decades of meticulous anatomical studies. However, the spectacular progress of modern molecular biology and developmental biology has marked the beginning of a new era in embryology. The molecular bases for cardiogenesis are just emerging. Several families of genes with restricted expression to the heart have been identified in the last years, including genes encoding for contractile proteins, ion channels as well as transcription factors involved in tissue specific gene expression. Likewise, the analyses of regulatory elements have increased our understanding of the molecular mechanisms directing gene expression. In this review, we illustrate the different patterns of gene and transgene expression in the developing myocardium. These data demonstrate that the wide molecular heterogeneity observed in the developing myocardium is not restricted to embryogenesis but it also remains in the adulthood. Therefore, such molecular diversity should be taken into account on the design of future gene therapy approaches, having thus direct clinical implications.

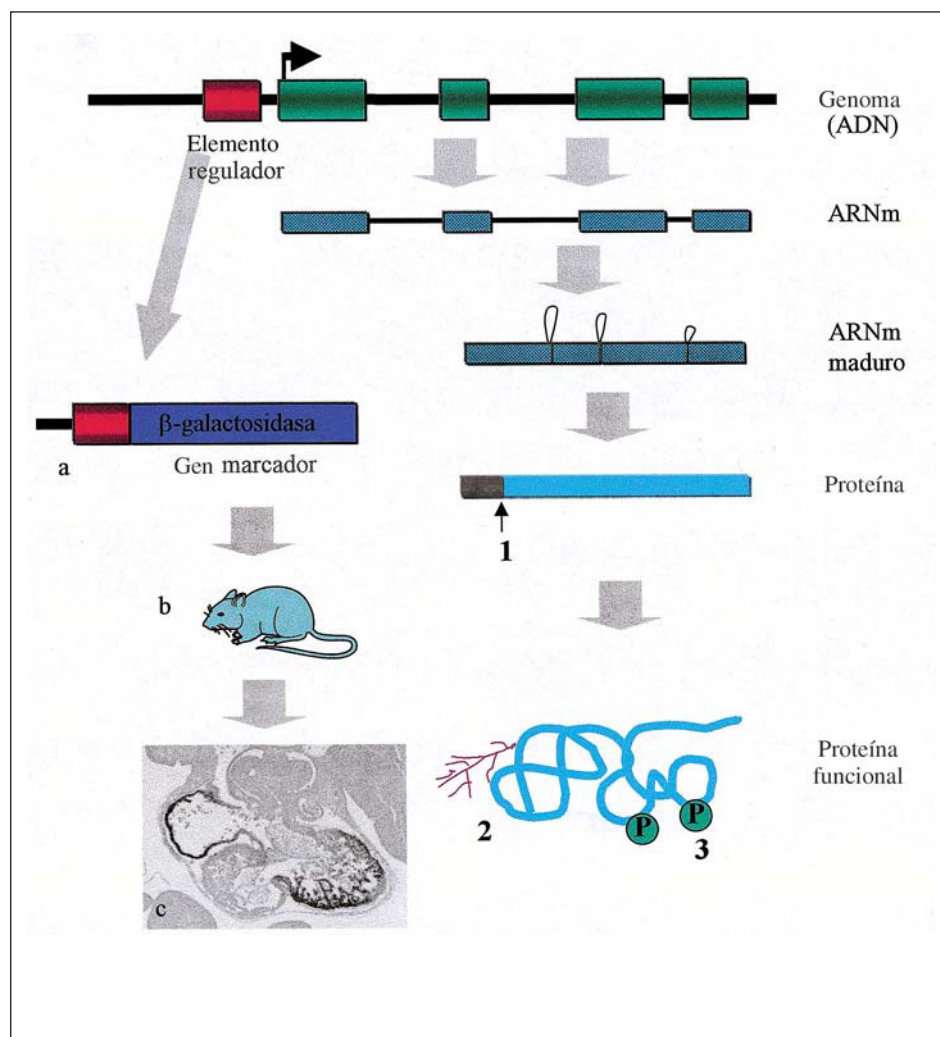
**Key words:** *Gene expression. Cardiogenesis. Transcriptional regulation.*

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

Correspondencia: Dr. D. Franco.  
Departamento de Biología Experimental.  
Facultad de Ciencias Experimentales.  
Edificio B-3, 313. Universidad de Jaén. 23071 Jaén.  
Correo electrónico: dfranco@ujaen.es

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha producido un avance importante en el conocimiento de la expresión específica de tejido y de los mecanismos moleculares de su regulación. Se ha puesto de manifiesto reiteradamente que distintos genes (y sus productos proteicos) experimentan cambios en su distribución espaciotemporal y en el nivel de expresión durante la ontogénesis; estos cambios son especialmente dinámicos durante el desarrollo cardíaco. La formación del corazón en vertebrados



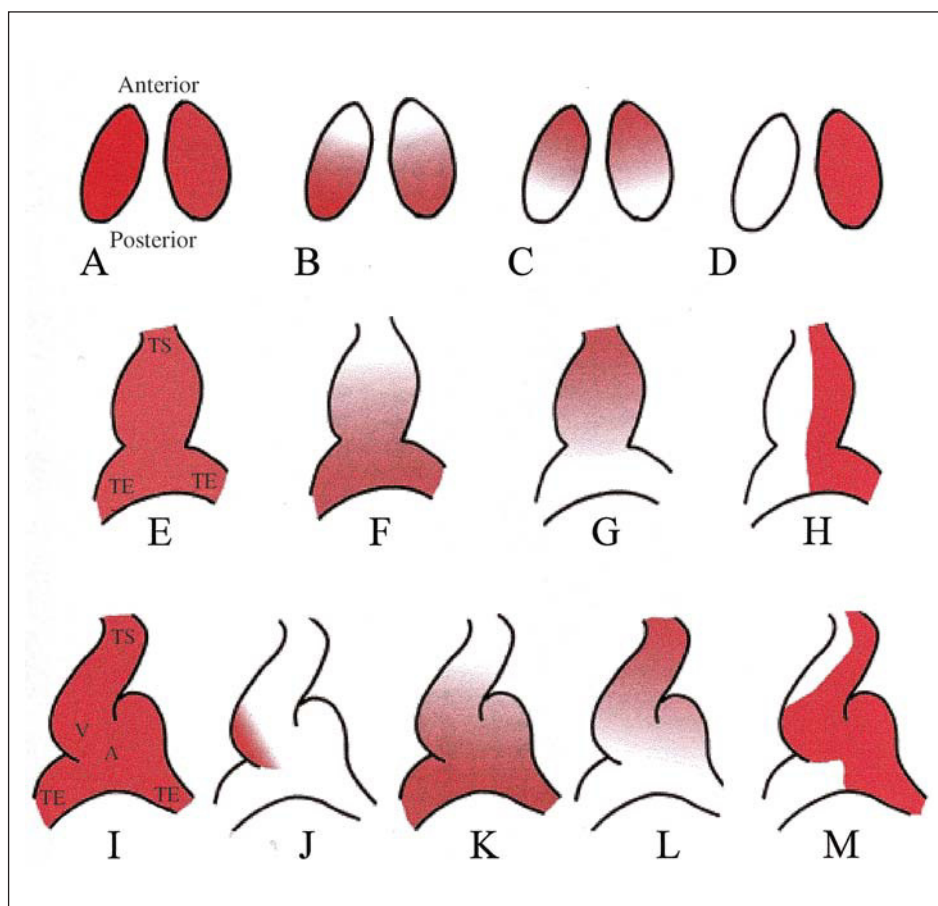
**Fig. 1.** Representación esquemática de los procesos de regulación génica y de las metodologías de análisis transgénico. El genoma se transcribe en zonas discretas (genes) dando lugar a ARN mensajeros (transcritos), que sufren distintos procesos de maduración y finalmente se traducen a proteína. El estudio de la expresión génica se realiza mediante varias técnicas (PCR, RPA, Northern blot, etc.), entre las cuales la hibridación *in situ* permite visualizar la distribución local de transcritos dentro del contexto morfológico. De modo semejante las diferentes técnicas inmunohistoquímicas permiten localizar la distribución de las proteínas. Sin embargo, ni la presencia de ARN mensajero ni de proteína nativa asegura que esta proteína sea funcional, dado que hay diversos mecanismos de control posttranscripcional, como la escisión de una región de la preproteína (1), la glucosilación (2) o la fosforilación (3). El mecanismo de regulación de la expresión génica está controlado por elementos discretos de ADN genómico, localizados principalmente en regiones anteriores al inicio de la transcripción. La identificación de estas regiones permite realizar una construcción génica (a) donde se insertan los elementos reguladores y un gen marcador. Este gen produce una proteína que es fácilmente detectable usando métodos histoenzimáticos. Dicha construcción se inserta en el genoma del ratón (b) y de este modo se puede analizar la distribución del gen marcador (c), lo que constituye un indicador de potencial de transcripción que tienen estos elementos reguladores.

dos requiere la coordinación de varios procesos complejos que abarcan desde la diferenciación de las crestas precordíacas hasta la formación de un corazón adulto con cuatro cámaras y sus correspondientes válvulas. En este artículo nos proponemos dar una visión actualizada de la embriología cardíaca, incluyendo los recientes avances de la biología molecular sobre la complejidad de los procesos moleculares que controlan la expresión específica de tejido.

## MECANISMOS MOLECULARES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los mecanismos que controlan la expresión génica vienen determinados principalmente por la transcripción de ARN mensajero (ARNm) a partir de ADN genómico (fig. 1). El conocimiento detallado de las regiones promotoras de los genes, esenciales para la transcripción, y de los diferentes factores de transcripción implicados en la activación del promotor constituye, en la actualidad, un prerrequisito para conocer los mecanismos de regulación génica. Sin embargo,

éste es sólo el primer acontecimiento que se produce antes de que dicho gen dé origen a una proteína funcional. La transcripción de ADN en ARNm mediante la ARN polimerasa II comporta la generación de un ARNm primario (regulación transcripcional) que posteriormente da lugar a un ARNm maduro mediante un proceso de corte y empalme de exones e intrones (fig. 1). El ARN maduro es traducido a proteína por los ribosomas, y en determinados casos dicha proteína ha de ser modificada con posterioridad (regulación postranscripcional) para que sea funcional; por ejemplo, por procesamiento catalítico (paso de preproteína a proteína), por fosforilación (unión de grupos fosfato) o por glicosilación (unión de complejos de azúcares). En la mayoría de los casos, el mecanismo principal de control es el transcripcional, lo que permite asumir que la presencia de ARNm codificante es un buen indicador de la presencia de dicha proteína en un determinado tejido. Sin embargo, este paradigma, aunque generalmente cierto, no implica que la proteína sea funcional. Por ejemplo, factores de crecimiento tales como los TGF (*transforming growth factor*) requieren



**Fig. 2.** Representación esquemática de los diversos patrones de expresión génica en los estadios de crestas cardíacas (A-D), tubo cardíaco lineal (E-H) y asa cardíaca (I-M). En todos los estadios se observan genes distribuidos homogéneamente (p. ej., *Nkx2.5*) (paneles A, E e I), en gradientes anteroposterior o posteroanterior (p. ej., *MHC*) (paneles B, C, F, G, K y L) y diferencialmente entre derecha e izquierda (p. ej., *Pitx2*) (paneles D y H). Con la torsión cardíaca, existe una remodelación de la expresión derecha/izquierda (*Pitx2*; paneles H y M) y se originan nuevos patrones que demarcan las diferencias dorsoventrales (p. ej., *ANF*; panel J). TE: tracto de entrada; TS: tracto de salida; a: primordio auricular; V: primordio ventricular.

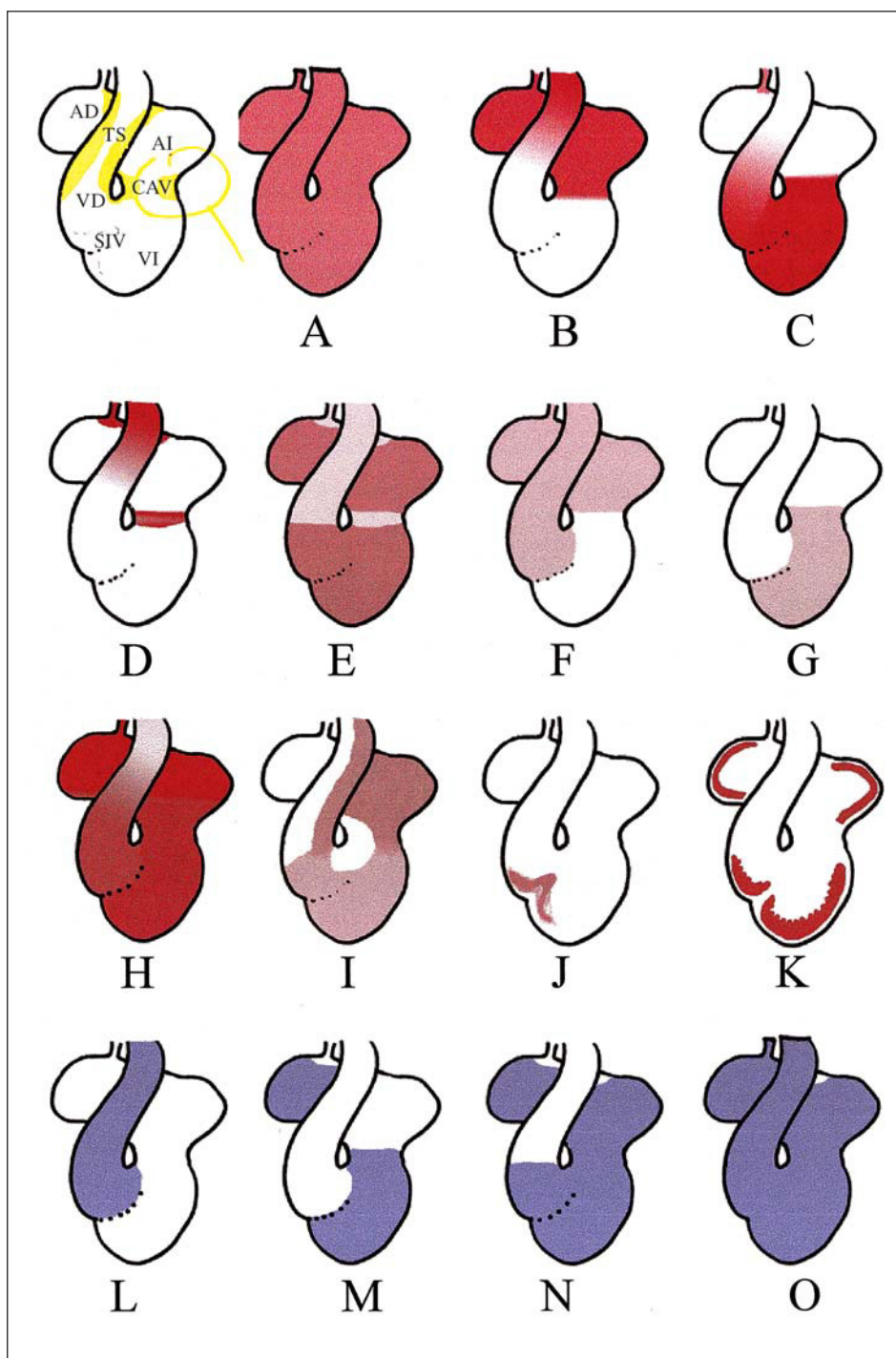
ser activados mediante catálisis de la preproteína para poder desempeñar su función<sup>1</sup>. Así pues, la presencia de ARNm ha de tomarse con cautela a la hora de hacer extrapolaciones funcionales. En esta revisión nos hemos centrado principalmente en el estudio de la regulación transcripcional y hemos resaltado sólo aquellos casos en los que existen evidencias de control pos-transcripcional.

El objetivo de esta revisión es ilustrar los distintos patrones de expresión de las principales familias génicas que presentan expresión específica de miocardio, tales como proteínas estructurales (proteínas contráctiles; miosinas, actinas y el complejo de la troponina), canales iónicos (canales de sodio y de potasio) y de factores de transcripción, en las distintas fases de la cardiogénesis (figs. 2-4). Estas observaciones se enmarcan en el contexto del análisis funcional de determinadas zonas reguladoras del ADN (modelos animales de transgénesis) (fig. 1). Los datos reflejados corresponden en su mayoría al ratón, pues actualmente es uno de los modelos animales más utilizados en biología molecular y constituye, a su vez, una base sólida para la extrapolación al contexto humano. A continuación se hace una breve introducción a la embriología cardíaca y posteriormente detallamos los patrones de

expresión de genes endógenos y transgenes.

## EMBRIOLOGÍA CARDÍACA

Durante el desarrollo embrionario, el corazón pasa de ser una estructura tubular sencilla a convertirse en un órgano multicameral con un alto grado de complejidad. Este proceso requiere la diferenciación y el crecimiento de distintas estructuras embrionarias. Durante la cardiogénesis podemos distinguir 6 fases prototípicas. Las células destinadas a la formación del tubo cardíaco se disponen simétricamente en dos crestas, las crestas precardíacas (primer estadio), donde reciben señales del ectodermo y del endodermo para configurarse en futuros miocardiocitos<sup>2,3</sup> (fig. 2); posteriormente las crestas cardíacas se unen en la línea media embrionaria dando lugar al tubo cardíaco inicial (segundo estadio) (fig. 2). En este estadio, el corazón está formado únicamente por dos capas celulares, miocardio y endocardio, separadas por una matriz acelular llamada gelatina cardíaca<sup>4</sup>. A continuación, el tubo cardíaco sufre una torsión hacia la derecha constituyendo así el primer signo morfológico de asimetría corporal durante el desarrollo embrionario (tercer esta-



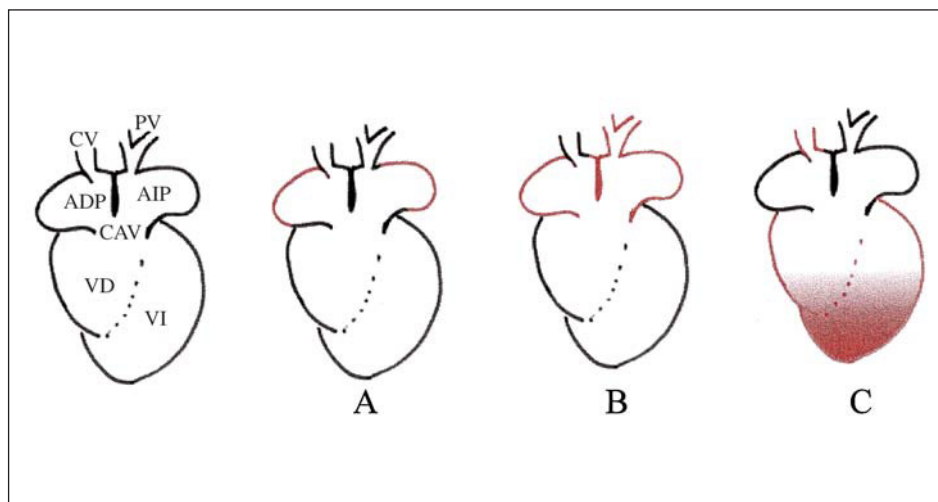
**Fig. 3.** Representación esquemática de los diversos patrones de expresión génica (A-K) y de transgenes (L-O) en el estado embrionario. Aparte de los patrones observados en estadios anteriores (A-C), en este estadio se genera una amplia gama de nuevos patrones de expresión (D-K). Entre ellos cabe destacar los que delimitan 5 dominios de expresión (p. ej., SERCA2a, PLB; paneles D y E), diferencias sistémica y pulmonar (dHAND y eHAND; paneles F y G), gradientes anteroposterior constitutivo (troponina cardíaca I; panel H), diferencias derecha e izquierda (Pitx2, panel I), diferenciación del sistema de conducción (Irx1 e Irx2; panel J) o el miocardio trabeculado (ANF; panel K). Los paneles L-O ilustran los distintos patrones de expresión observados con diversos elementos reguladores en ratones transgénicos. AD: atrio derecho; AI: atrio izquierdo; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; SIV: septo interventricular; TS: tracto de salida. CAV: canal atrioventricular.

dio)<sup>5</sup> (fig. 2). Dicha torsión culmina con la formación de un corazón embrionario en el cual se comienzan a distinguir diferentes regiones miocárdicas. Se puede decir que el corazón embrionario está formado por el tracto de entrada, el atrio embrionario, el canal atrioventricular, el ventrículo embrionario y el tracto de salida (cuarto estadio) (fig. 3)<sup>6</sup>. Cada una de estas regiones miocárdicas presenta un patrón de expresión diferencial, así como unas características funcionales

distintas<sup>6,7</sup>. El tracto de entrada, el canal atrioventricular y el tracto de salida presentan en su superficie interior cojines endocárdicos, mientras que las cámaras atriales y ventriculares están trabeculadas y carecen de estructuras mesenquimáticas<sup>8</sup>.

Durante el estadio fetal estas 5 estructuras han de ser tabicadas para obtener de esa forma un corazón con doble circuito, sistémico (sangre oxigenada) y pulmonar (sangre venosa) (fig. 4). La septación de ventrículo pri-

**Fig. 4.** Representación esquemática de los patrones de expresión génica en el estadio fetal. La expresión de distintos genes permite establecer que las aurículas con músculos pectíneos presentan un patrón de expresión exclusivo como, por ejemplo, ANF (panel A). La expresión de MLC3F permite discernir que la musculatura de las venas cavas es distinta de las de las venas pulmonares (incluyendo el septo interatrial) (panel B), mientras que MLC2v establece que las venas cavas son distintas del resto del miocardio auricular (panel C). ADP: atrio derecho con músculos pectíneos; AIP: atrio izquierdo con músculos pectíneos; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo; CV: venas cavas; PV: venas pulmonares; SIA: septo interatrial.



mitivo genera los ventrículos derecho e izquierdo mediante el crecimiento del septo interventricular. El atrio primitivo se divide en derecho e izquierdo mediante la formación del complejo de los septos interatriales primario y secundario (quinto estadio). Es interesante destacar que la separación de los tractos de entrada y de salida, así como del canal atrioventricular, se produce por la fusión de los cojines endocárdicos y su posterior reemplazamiento por miocardiocitos mediante un proceso denominado «miocardialización»<sup>9</sup>. A su vez, se produce una reestructuración de las distintas regiones embrionarias para dar lugar, en el corazón adulto, a dos cámaras atriales y dos ventriculares, todas con un tracto de entrada y de salida propios<sup>10</sup>. Básicamente ésta es la misma configuración del corazón adulto, y únicamente

destaca que las separación de las cuatro cámaras se completa (sexto estadio)<sup>11</sup>.

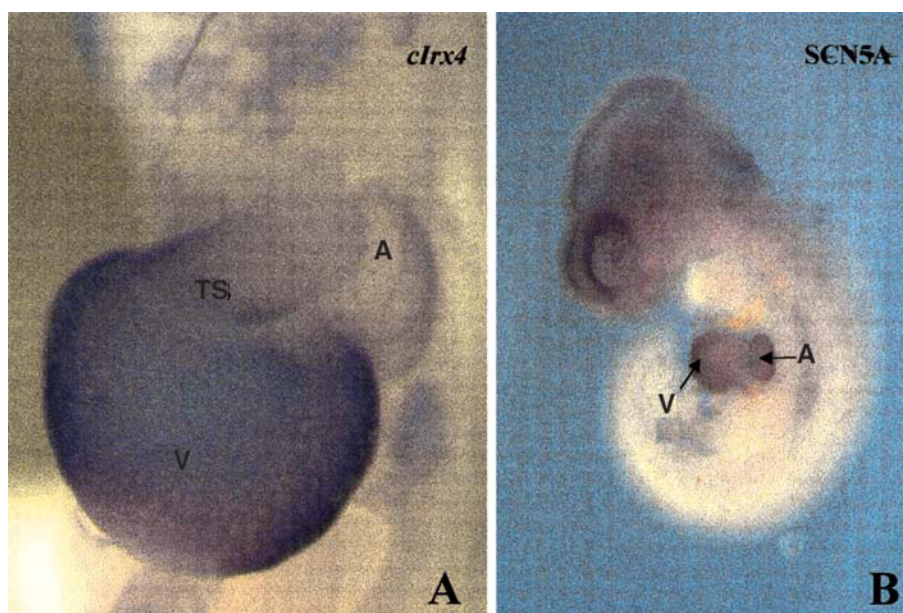
### PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CRESTA CARDÍACA (E7.5 RATÓN)

La cresta cardíaca se configura durante la gastrulación como una región mesodérmica derivada de la línea primitiva<sup>12</sup>. Esta porción anterior del mesodermo responde a un juego de señales del ectodermo y del endodermo adyacente provocando la expresión de distintos genes específicos de los futuros miocardiocitos<sup>2,3</sup>. Con la posible excepción de los ARNm que codifican para proteínas del metabolismo del calcio (SERCA2 y PLB)<sup>13,14</sup>, se ha observado sólo expresión

**TABLA 1. Patrones de expresión en estadios iniciales del desarrollo cardíaco**

		Homogénea	Eje D/I	Eje A/P	Eje dorso/ventral
Cresta cardíaca (estadio I)	Genes estructurales			SERCA2 (A), PLB (P)	
	Factores de transcripción	Nkx, GATA4-6, MEF2C, HANDs SRF, CARP, pCMF1, <i>Midori</i> cCLP-1, Mesp1, Tbx5	Pitx2 (I)	HTR1 (P), HTR2 (A) Irx4 (A)	
Tubo cardíaco (estadio II)	Genes estructurales	MLC, troponina C/T, tropomiosina, tropomodulina		αMHC, MLC2a, actina-c, βMHC (A), SERCA2 (P), PLB (A)	
	Factores de transcripción	Nkx, GATA4-6, MEF2C, HTR3 SRF, CARP, pCMF1, <i>Midori</i> dHAND	Pitx2 (I)	Irx4 (A) HTR1 (P), HTR2 (A)	eHAND (V)
	Genes estructurales	MLC, troponina C/T, tropomiosina, tropomodulina		αMHC, MLCa, actina-c, βMHC (A), SERCA2 (P), PLB (A)	
Asa cardíaca (estadio III)	Factores de transcripción	Nkx, GATA4, MEF2, HTR3 SRF, CARP, pCMF1, <i>Midori</i>	Pitx2 (I)	HTR1 (P), HTR2 (A) GATA5, GATA6	Irx4, eHAND (V)

(I): izquierda; (A): anterior; (P): posterior; actina-c: actina cardíaca.



**Fig. 5.** Hibridación *in situ* en corazones embrionarios de pollo (estadio HH 20; panel A) y de ratón (E10.5; panel B) con sondas contra el factor de transcripción *Irx4* (A) y *SCN5A* (B). *Irx4* se expresa tanto en el ventrículo como en el tracto de salida, pero no en los atrios. *SCN5A* se distribuye homogéneamente a lo largo de todo el corazón. A: atrios; V: ventrículos; TS: tracto de salida.

de distintos factores de transcripción en este estadio<sup>15</sup> (tabla 1).

### Genes que codifican para proteínas del metabolismo del calcio

La expresión de SERCA2 (bomba de calcio del retículo endoplásmico) y PLB (fosfolambán) en estadios tan tempranos es interesante pues, aunque la contracción miocárdica aún no se ha iniciado, ya existe una polaridad en la expresión génica. SERCA2 es más abundante en la región anterior de las crestas cardíacas y disminuye hacia las regiones posteriores, mientras que PLB presenta una distribución complementaria<sup>13,14</sup>.

### Factores de transcripción

Existen varias familias de factores de transcripción que presentan expresión de alguno de sus miembros en estadios tan tempranos como en el promiocardio. Las principales familias son genes homeóticos, GATA, bHLH y MEF2, como se detalla a continuación.

Dentro de los genes homeóticos, la expresión de *Nkx2.5* es homogénea a lo largo de las crestas precardiácas<sup>16</sup>. Es interesante resaltar que en *Xenopus*, la expresión de *Nkx2.5* parece estar restringida a la banda lateral interna de las crestas precardiácas (región medial)<sup>17</sup>. Esto podría interpretarse como el primer signo de diferenciación dorsoventral, si bien dicha regionalización no se ha descrito en otros modelos. El factor de transcripción *Pitx2* evidencia ya en estos estadios una clara regionalización en su patrón de expresión<sup>18-20</sup>. *Pitx2* se expresa en la cresta precardiáca izquierda, pero no en la derecha, configurándose así como el primer signo de

asimetría molecular durante el desarrollo cardíaco. Recientemente se ha descrito un nuevo factor homeótico, *Irx4*, que tiene una expresión restringida a la región anterior de las crestas<sup>21</sup>. Estos autores han postulado que las células que expresan *Irx4* constituyen, a esta temprana edad, el primordio del miocardio ventricular.

Varios miembros de la familia GATA de factores de transcripción se expresan ya en las crestas precardiácas y desempeñan un papel primordial en la especificación miocárdica<sup>22-24</sup>. La expresión de GATA4, GATA5 y GATA6 se produce desde los estadios más tempranos de la formación miocárdica<sup>25-27</sup>, y al menos GATA4 es imprescindible en los primeros estadios de gestación<sup>23</sup> dado que su ausencia revierte en la formación de cardia bífida. La expresión de GATA4, GATA5 y GATA6 es homogénea a lo largo de las crestas precardiácas. Esta distribución induce a pensar que los factores GATA actúan como cofactores en la especificación miocárdica pero no en la adquisición de heterogeneidad celular<sup>28</sup>.

En los primeros estadios del desarrollo cardíaco, uno de los componentes de la familia de factores de transcripción MEF (*myocyte enhancer factor*), MEF2C, se expresa en la cresta precardiáca de forma homogénea<sup>29</sup>. Estudios de supresión génica en ratones han demostrado que la carencia de este factor genera cardia bífida, así como la supresión de distintos marcadores moleculares cardíacos. Al igual que GATA4, MEF2 parece ser un cofactor esencial, si bien el mecanismo molecular de actuación sigue sin conocerse<sup>30</sup>.

La familia de factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*) incluye, por ejemplo, a numerosos factores de transcripción específicos de musculatura estriada. MyoD, Myf5 y Mrf-4 cumplen un papel importante en la regulación de la expresión en la musculatura esque-

TABLA 2. Patrones de expresión en el corazón embrionario y fetal

		Tracto de entrada	Atrios	Canal AV	Ventrículos	Tracto de salida
Corazón embrionario (estadio IV)	Proteínas contráctiles	$\alpha$ y $\beta$ MHC, MLC1a/v, MLC2a/v. Troponina I MLC2a. Troponina I	$\alpha$ MHC, MLC1a, MLC2a/v	$\alpha$ y $\beta$ MHC, MLC1a/v MLC2v	$\beta$ MHC, MLC1v MLC2a/v	$\alpha$ y $\beta$ MHC, MLC1a/v
	Metabolismo del calcio	SERCA2	SERCA2	PLB	PLB	PLB
	Discos intercalares	Cx45	Cx40, Cx45	Cx45	Cx40, Cx43, Cx45	Cx45
	Canales iónicos	SCN5A, KCNH2, KCNE2/E3	SCN5A, KCNH2, KCNE2/E3	SCN5A, KCNH2, KCNE3	SCN5A, KCNH2 KCNE1/E3	SCN5A, KCNH2 KCNE1/E3
	Factores de transcripción	Pitx2 (I), Tbx5, Tbx2, HRT1,	eHAND, Pitx2 (I), Tbx5, HTR1, Irx3	Pitx2 (I), Tbx5 e/dHAND	Tbx5 (I), Pitx2 (V), Irx1,2, 3, 4, HTR2 dHAND	Pitx2 (I), HTR2, Irx4
Corazón fetal (estadio V)	Proteínas contráctiles	$\alpha$ MHC, MLC1a, MLC2a. Troponina I	$\alpha$ MHC, MLC1a, MLC2a. Troponina I	$\beta$ MHC, MLC1v MLC2v	$\beta$ MHC, MLC1v MLC2v	$\beta$ MHC, MLC1v MLC2v
	Metabolismo del calcio		SERCA2		PLB	
	Discos intercalares		Cx40		Cx43	
	Canales iónicos	SCN5A, KCNH2, KCNE2/E3	SCN5A, KCNH2, KCNE2/E3	KCNH2, KCNQ1	KCNH2 KCNQ1, KCNE1	KCNH2 KCNQ1, KCNE1

Los datos del tracto de entrada y salida, y del canal atrioventricular del corazón fetal se refieren a la expresión que se observan en los derivados miocárdicos correspondientes. (I): izquierda; (V): ventral.

lética<sup>31</sup>, pero ninguno de ellos se expresa en el miocardio en condiciones normales<sup>32</sup>. En los últimos años, se han descubierto dos nuevos miembros de la familia bHLH (dHAND y eHAND) que se expresan en el corazón embrionario<sup>33-35</sup> y desempeñan un papel importante en la morfogénesis cardíaca<sup>35,36</sup>. En los primeros estadios del desarrollo dHAND y eHAND se expresan de forma homogénea, aunque posteriormente se expresan de forma asimétrica en las cámaras ventriculares.

Recientemente se ha descrito que distintos miembros de la familia de los factores de transcripción relacionados con el gen *hairy* (*hairy-related transcription factors*; HRT) presentan una regionalización en el eje anteroposterior incluso en estadios tan tempranos como en las crestas precordíacas<sup>37</sup>. HRT1 se expresa en la región más posterior, mientras que HRT2 lo hace en la región más anterior. Dado que el sistema Notch-Delta regula la expresión de *hairy* y desempeña un papel fundamental en el establecimiento de barreras celulares y tisulares en la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*<sup>38</sup>), Nakagawa et al<sup>37</sup> han postulado que los HRT pueden tener una función semejante en el corazón, por ejemplo, delimitando las regiones atriales y ventriculares, aunque actualmente no existen datos experimentales que refuerzan dicha hipótesis.

Otros factores de transcripción que se expresan homogéneamente en las crestas precordíacas son *Tbx5*, SRF (*serum response factor*), CARP (*cardiac ankyrin repeat protein*), pCMF1, *Midori*, c-CLP-1 y *Mesp1*<sup>39-45</sup>. La función precisa de estas proteínas es desconocida,

con la excepción de SRF y *Tbx5*, que parecen actuar como cofactores junto con otros factores de transcripción (*GATA4* y *Nkx2.5*)<sup>28,46,47</sup>.

En resumen, durante la formación de las crestas precordíacas existe ya una regionalización de la expresión génica que aporta nuevas evidencias sobre la complejidad de la cardiogénesis. Es importante resaltar que hay genes que se expresan diferencialmente en el eje anteroposterior, ya sea bien en gradientes de expresión (SERCA y PLB) o en regiones discretas (*Irx4*; HRT), y hay genes que se expresan diferencialmente en eje derecha e izquierda (*Pitx2*). Con estas premisas se han elaborado varios modelos de transcripción génica<sup>7,48</sup> que explican la obtención de gradientes y su posterior desarrollo, pero se carece de explicaciones para las diferencias derecha/izquierda.

## Transgénesis

El análisis de los elementos reguladores de distintos genes específicos cardíacos ha sido impresionante durante la última década<sup>49</sup>. El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la expresión específica de tejido, es decir, los factores reguladores y sus interacciones, por un lado, y de los elementos esenciales que permiten la expresión dirigida a un determinado compartimento tisular, por otro, constituye la base para futuras aplicaciones clínicas en el marco de la terapia génica.

Los patrones de expresión de transgenes que se han

observado actualmente se pueden clasificar en dos tipos en este estadio. Algunos autores señalan que el transgén presenta una expresión restringida a una porción de la cresta cardíaca, que posteriormente se configuraría en una cámara cardíaca<sup>50,51</sup>. Sin embargo, otros transgénicos presentan un patrón de expresión semejante en ambas crestas cardíacas<sup>49,52</sup>. La interpretación de estas observaciones es divergente. Por un lado, la regionalización temprana de los transgénicos apunta hacia el hecho de que la especificación de las cámaras cardíacas (auricular/ventricular) acontece en el promiocardio. Esta hipótesis es difícil de conciliar con los datos de marcaje celular que demuestran la contribución de la cresta cardíaca en pollo tan sólo al ventrículo derecho<sup>52,54</sup> en pollo y al ventrículo izquierdo en ratones<sup>55</sup>. Por otro lado, la interpretación de un promiocardio no especificado contrasta con la observación de genes endógenos regionalizados<sup>37</sup>, si bien estos miocardiocitos poseen una amplia plasticidad en su fenotipo<sup>56,57</sup>. Ambas hipótesis dejan abiertas futuras experimentaciones que demuestren o refuten una de las teorías, aunque desde nuestro punto de vista parece más plausible apoyar la segunda hipótesis<sup>7</sup>.

### PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN EL TUBO CARDÍACO INICIAL (E8 RATÓN)

El tubo cardíaco inicial está compuesto por dos capas celulares, miocardio y endocardio, separadas por una matriz acelular denominada gelatina cardíaca<sup>4</sup>. El miocardio que compone el tubo cardíaco es morfológicamente homogéneo. En este estadio se mantienen básicamente los tres tipos de patrones de expresión que se observan en el estadio anterior, expresión homogénea y regionalización en los ejes anteroposterior y derecha-izquierda. A continuación tan sólo se presentan los genes que poseen una heterogeneidad en su patrón de expresión, ya sea porque cambian su patrón original o bien porque su expresión se inicia a partir de este estadio (tabla 1).

### Genes que codifican para proteínas contráctiles

La contracción cardíaca está mediada por el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los filamentos de actina. La modulación de la contracción se realiza por la unión, y posterior liberación, de iones de calcio en el complejo de la troponina-tropomiosina. Existe una gran variedad de isoformas que codifican para distintos componentes del sarcómero<sup>58</sup>. La mayoría de los genes que codifican para proteínas contráctiles, como la miosina de cadena pesada (MHC), la miosina de cadena ligera (MLC), la actina y el complejo troponina-tropomiosina, presenta un patrón de expresión característico en este estadio del desarrollo<sup>7</sup>. Por ejemplo,  $\alpha$ MHC, MLC2a, la actina cardíaca y la tro-

ponina I cardíaca tienen una expresión más alta en la región caudal que en la craneal, mientras que  $\beta$ MHC presenta el patrón complementario. Curiosamente, la expresión de las isoformas MHC homólogas en el pollo poseen una mayor variabilidad en cuanto a la regionalización de la expresión. Así, en el embrión de pollo, Yutzey et al<sup>59,60</sup> demostraron que la expresión de AMHC1 está restringida al polo venoso en el tubo cardíaco, mientras que VMHC1 está principalmente en el polo arterial y sólo de forma basal en el polo venoso. Las restantes isoformas de MLC, actina y troponina, así como de tropomiosina y tropomodulina, presentan por el contrario una distribución homogénea a lo largo del miocardio en este estadio.

### Genes que codifican para proteínas del metabolismo del calcio

La contracción cardíaca está regulada por cambios en la concentración intracelular de iones de calcio. La célula miocárdica tiene, por tanto, un mecanismo exhaustivo de control de la homeostasis de calcio en el cual intervienen distintas proteínas de membrana. La bomba SERCA secuestra  $\text{Ca}^{++}$  desde el citosol al interior del retículo endoplásmico (RE). SERCA es controlado por fosfolambán (PLB). La salida de  $\text{Ca}^{++}$  al citosol desde el RE está mediada por el receptor de rianodina (RyR), mientras que el balance iónico entre el medio extracelular y el citosol está regulado por las bombas de sodio-potasio (NaK-ATPasa) y el intercambiador de sodio-calcio (NCX). Existen varias isoformas específicas de tejido para varios de estos componentes. En el corazón embrionario, la isoforma SERCA2a es la más representada y posee un gradiente de expresión en el eje anteroposterior, siendo más abundante en la región caudal que en la craneal. La expresión de PLB, regulador de SERCA2a, es opuesta a la que se observa para SERCA2a, es decir, presenta un gradiente de expresión con mayor expresión en la zona craneal y decrece hacia la zona caudal. Curiosamente, la expresión de la isoforma RyR2, el NCX y las distintas isoformas del NaK-ATPasa cardíacas se distribuyen de forma homogénea en el tubo cardíaco y permanecen así durante el posterior desarrollo embrionario del corazón<sup>14</sup>. Así pues, el mecanismo de control de la homeostasis del calcio viene determinado por el sistema SERCA-PLB, mientras que los otros translocadores parecen no influir de forma decisiva.

### Factores de transcripción

El factor de transcripción *Pitx2* mantiene en este estadio la regionalización en su patrón de expresión. *Pitx2* tan sólo evidencia expresión en el margen izquierdo del tubo cardíaco<sup>18-20</sup>. Por otro lado, el factor homeótico *Irx4* presenta un patrón de expresión restringido al futuro miocardio ventricular<sup>21,61</sup>. La primera



evidencia de regionalización en el eje dorsoventral se origina con la expresión del factor de transcripción eHAND en el tubo cardíaco inicial<sup>48,62</sup>. eHAND muestra una mayor expresión en la región ventral del tubo cardíaco que en la dorsal<sup>48</sup>. Christoffels et al postulan que dicha expresión constituye la primera evidencia molecular del miocardio ventricular trabeculado. Esto implica, por tanto, que el ventrículo se especifica a lo largo del eje dorsoventral y no como clásicamente se ha establecido<sup>63</sup> en el eje anteroposterior.

Los genes HRT mantienen la regionalización anteroposterior (craneocaudal) en el tubo cardíaco inicial que ya presentaban en estadios anteriores; HRT1 se expresa en la región caudal mientras que HRT2 lo hace en la región cefálica<sup>37</sup>.

### Transgénesis

La expresión de los distintos transgénicos en el estadio de tubo cardíaco varía de forma similar al estadio anterior. Determinadas zonas reguladoras, tanto de genes estructurales como de factores de transcripción, presentan una expresión del gen marcador a lo largo de todo el tubo cardíaco<sup>52,64-67</sup>. Por otra parte, determinados transgénicos tienen una expresión restringida a la región caudal o a la craneal<sup>51,58,68</sup>. En ningún caso se ha observado actualmente la existencia de gradientes de expresión del transgén a lo largo del miocardio del tubo cardíaco, de modo semejante a lo que se observa para genes como SERCA, PLB o  $\alpha$ MHC. Esto puede deberse a que dicho gradientes se establece por otras secuencias reguladoras que no están contenidas en la región estudiada, o bien a la saturación del gen marcador (p. ej.,  $\beta$ -galactosidasa y GFP [*green fluorescent protein*] son muy estables, por lo que quizá no permite distinguir pequeños cambios de expresión). El uso de genes marcadores con señales que permiten la rápida degradación de la proteína (p. ej., GFP desestabilizado) permitirá, en el futuro, avanzar en este sentido.

### PATRONES DE EXPRESIÓN EN EL ASA CARDÍACA (E8.5 RATÓN)

El primer signo de asimetría morfológica que se manifiesta en el embrión es la torsión hacia la derecha del tubo cardíaco inicial. El embrión obtiene así identidad derecha-izquierda, y presenta siempre la misma pauta, condición denominada *situs solitus* (véase, por ejemplo, la invariable torsión del corazón hacia la derecha). En determinados casos patológicos se produce una alteración en el control del eje derecho-izquierdo que resulta en una inversión total de dicho eje (*situs inversus*), o en otros casos se produce una aleatoriedad en la distribución a lo largo del eje derecho-izquierdo (*situs ambiguus*). Actualmente existen algunas pistas sobre los mecanismos moleculares que controlan la torsión del tubo cardíaco, aunque aún se desconocen sus

principales protagonistas<sup>69</sup>.

Sin embargo, este proceso es de vital importancia para el futuro desarrollo cardíaco, pues fallos en la correcta torsión del tubo cardíaco subyacen a distintos tipos de cardiopatías congénitas<sup>20</sup>. La mayoría de los genes no sufren cambios significativos en su patrón de expresión con la torsión cardíaca, excepto determinados factores de transcripción cuya expresión es importante destacar (tabla 1).

### Factores de transcripción

El factor de transcripción *Pitx2*, último eslabón conocido actualmente de la vía de señalización del eje derecho-izquierdo, presenta un patrón de expresión muy interesante durante la torsión cardíaca. El movimiento hacia la derecha del futuro ventrículo embrionario comporta el desplazamiento del patrón de expresión de *Pitx2* desde una posición izquierda hasta una posición ventral en esta región cardíaca<sup>20</sup>. Sin embargo, la expresión de *Pitx2* se mantiene exclusivamente en las regiones izquierdas de los extremos del tubo cardíaco. De modo semejante, el factor de transcripción eHAND, que en el estadio de tubo cardíaco inicial se localiza principalmente en la región ventral, muestra un desplazamiento de su expresión hacia la zona prospectiva de diferenciación del ventrículo embrionario con la torsión.

Otros factores de transcripción, como GATA5 y GATA6, presentan expresión preferencial en los extremos del tubo cardíaco. GATA5 y GATA6 desaparecen gradualmente de las regiones más mediales y su expresión queda localizada esencialmente en los polos arterial y venoso<sup>26,27</sup>. Este patrón de expresión permite postular que estos factores cumplen un papel primordial en la especificación miocárdica, pero no son necesarios para el mantenimiento del fenotipo muscular cardíaco.

### PATRONES DE EXPRESIÓN EN EL CORAZÓN EMBRIONARIO (E10.5 RATÓN)

El corazón embrionario está formado por 5 regiones distintas, tres de las cuales (tracto de entrada, canal atrioventricular y tracto de salida) son continuas a lo largo de la curvatura interna (fig. 3)<sup>48</sup>. Desde el polo venoso al arterial se distinguen las siguientes regiones: tracto de entrada, atrio común (con regiones derecha e izquierda), canal atrioventricular, ventrículo (con regiones derecha e izquierda) y tracto de salida. El tracto de entrada, el canal atrioventricular y el tracto de salida presentan en su superficie interior cojines endocárdicos, mientras que las cámaras atriales y ventriculares carecen de estructuras mesenquimáticas. La formación de dichas regiones genera una compartimentalización de la expresión para muchos de los genes específicos cardíacos, como se verá a continuación, mos-

trando evidencias de la heterogeneidad funcional del miocardio en estos estadios del desarrollo (tabla 2). En este contexto, Christoffels et al<sup>48</sup> han elaborado recientemente un modelo de desarrollo cardíaco que integra los datos moleculares actuales con las bases morfológicas de la cardiogénesis.

### Genes que codifican para proteínas contráctiles

Con la formación del corazón embrionario, las distintas isoformas de MHC y MLC presentan un patrón regionalizado de expresión.  $\alpha$ MHC, MLC1a y MLC2a presentan una expresión restringida principalmente al polo venoso, incluyendo aquí el tracto de entrada, el atrio y el canal atrioventricular.  $\beta$ MHC, MLC1v y MLC2v, por el contrario, evidencian una expresión principalmente restringida al polo arterial, es decir, al canal atrioventricular, el ventrículo y el tracto de salida<sup>6,70,71</sup>. Curiosamente, tanto  $\alpha$ MHC como MLC2a muestran una expresión residual en el tracto de salida según se va produciendo su regresión hacia el polo auricular, mientras que  $\beta$ MHC y MLC2v tienen una expresión residual en el tracto de entrada<sup>71</sup>. Esta dinámica en la expresión de MHC y MLC obedece a la existencia de factores inhibidores específicos de expresión auricular y ventricular como plantean Franco et al<sup>7</sup>. De hecho, recientemente se ha descrito que el factor de transcripción *cIrx4* cumple esta función en embriones de pollo<sup>61</sup>, aunque parece no estar conservada en ratones<sup>21</sup>.

Es importante resaltar que el patrón de expresión de la isoforma MLC3F es similar al de aquellas isoformas netamente atriales. Sin embargo, sólo se ha podido constatar claramente la presencia de ARNm codificante, pero no de proteína MLC3F, en el corazón embrionario de ratón<sup>72</sup>. En la actualidad carecemos de explicaciones funcionales para este comportamiento, y tan sólo se plantean conjeturas en términos evolutivos<sup>73</sup>.

Las distintas isoformas del complejo de la troponina-tropomiosina que se expresan en el corazón presentan un patrón de expresión homogéneo en el corazón embrionario<sup>7</sup>, con la excepción de la isoforma cardíaca de la troponina I (cTnI), que posee un gradiente de expresión anteroposterior<sup>7,74</sup>. La cTnI muestra mayor expresión en el tracto de entrada y atrio común, disminuye en el canal atrioventricular y es más baja en el ventrículo y el tracto de salida, teniendo este último una expresión basal en su región más craneal.

### Genes que codifican para proteínas del metabolismo del calcio

En el corazón embrionario, la isoforma SERCA2a es la más abundante y presenta una regionalización de la expresión reminiscente de su gradiente anteroposterior en el tubo cardíaco inicial. SERCA2a es más abundante en el tracto de entrada y el atrio que en el

ventrículo y el tracto de salida. Curiosamente, la expresión de SERCA2a en el canal atrioventricular es más baja que en el miocardio auricular y ventricular<sup>13,14</sup>. Por el contrario, la expresión de PLB es opuesta a la que se observa para SERCA2a, es decir, presenta una expresión mayor en el canal atrioventricular, el ventrículo y el tracto de salida, y menor en el tracto de entrada y el atrio<sup>13,14</sup>. Es interesante mencionar que, en ambos casos, la expresión en regiones intermedias, es decir, el tracto de salida, el canal atrioventricular y el tracto de entrada, es siempre más baja que las cámaras cardíacas (atrio y ventrículo). Este patrón de expresión refuerza el modelo de cardiogénesis planteado por De Jong et al<sup>8</sup>, más recientemente apoyado con otras evidencias moleculares<sup>48</sup>.

### Genes que codifican para componentes de los discos intercalares

La propagación del impulso cardíaco está determinada principalmente por la capacidad de transmitir rápidamente cambios en el potencial de membrana. Las uniones intercelulares (*gap junctions*) que median la propagación del impulso cardíaco están formadas por proteínas de membrana denominadas conexinas<sup>75</sup>. En el corazón de los mamíferos, la principal conexina es la 43 (Cx43), que se localiza principalmente en el miocardio ventricular y en menor medida en el auricular. La Cx43 se detecta por primera vez en el estadio embrionario<sup>76</sup>. La Cx40 posee un patrón de expresión semejante al de la Cx43 en este estadio, aunque su expresión es más reducida<sup>77,78</sup>. Recientemente, se ha descrito una tercera conexina en el corazón embrionario (Cx45). La Cx45 posee un patrón de expresión homogéneo en el corazón embrionario, aunque sus valores de expresión son muy bajos, llegando incluso a plantear controversias<sup>79-81</sup>. Las diferencias de expresión de las conexinas están en consonancia con un modelo embrionario funcional en el cual el miocardio de trabajo (auricular y ventricular) tiene la capacidad de transmitir el impulso cardíaco más rápidamente que el miocardio adyacente, tracto de entrada, canal atrioventricular y tracto de salida. De este modo se garantiza una contracción sincrónica sin la necesidad de un sistema especializado de conducción<sup>6</sup>.

### Genes que codifican para canales iónicos

La regulación del potencial de acción está determinada por una amplia variedad de corrientes iónicas. La despolarización de la célula miocárdica se produce por la entrada masiva de iones de sodio en el citoplasma, mientras que la repolarización de la célula miocárdica está determinada por un fino balance de distintas corrientes iónicas de entrada y de salida, entre las cuales las corrientes de potasio cumplen un papel primordial<sup>82</sup>.

El principal poro que regula el paso de sodio a tra-

vés de la membrana miocárdica está codificado por el gen *SCN5A*<sup>83</sup>. La permeabilidad de este canal está modulada por una subunidad auxiliar, *SCN1B*. El papel modulador de la subunidad *SNC1B* está bien establecido en células neuronales, pero existe cierta controversia en su función en el músculo cardíaco<sup>83</sup>. En cambio, existe gran variedad de corrientes iónicas de potasio, entre las cuales sólo se ha estudiado la distribución de los componentes de las corrientes  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$ . La corriente  $I_{Ks}$  (rectificadora de entrada lenta) está mediada por el poro de membrana *KCNQ1* (*KvLQT1*) y modulada por la subunidad auxiliar, *KCNE1* (*minK/IsK*)<sup>84,85</sup>. La corriente  $I_{Kr}$  (rectificadora de entrada rápida) está mediada por el poro de membrana *KCNH2* (*HERG*) y modulada por las subunidades *KCNE1* y *KCNE2* (*MiRP1*)<sup>86,87</sup>. Recientemente se ha descubierto una nueva isoforma, *KCNE3* (*MiRP2*), cuya función moduladora en el miocardio no está esclarecida<sup>88,89</sup>.

La distribución de los distintos componentes de los canales de sodio en estadios embrionarios no se ha estudiado hasta la actualidad. Los únicos datos existentes corresponden a datos preliminares en nuestro laboratorio que indican que *SCN5A* se distribuye homogéneamente a lo largo del corazón embrionario (Franco y Bezzina, datos no publicados; fig. 5). Por otro lado, la expresión de los canales de potasio *KCNQ1*, *KCNH2* y *KCNE3* es homogénea en el miocardio embrionario. Es interesante resaltar, sin embargo, que *KCNE1* presenta un gradiente anteroposterior, es decir, mayor expresión en la región arterial que en la venosa, mientras que *KCNE2* presenta ya en estos estadios una clara regionalización en su expresión, estando confinada al miocardio atrial<sup>90</sup>.

## Factores de transcripción

El factor de transcripción *Pitx2* acentúa en este estadio el patrón de expresión que se intuía de forma inicial en el estadio de asa cardíaca. *Pitx2* se expresa en la región ventral del ventrículo, pero no en la dorsal, mientras que su expresión en el tracto de entrada, el atrio, el canal atrioventricular y el tracto de salida está restringida a la porción izquierda<sup>20</sup>. Estas observaciones apuntan a que los primordios ventriculares obtienen una contribución semejante de las crestas cardíacas derecha e izquierda. La peculiaridad de este hallazgo es que las células derivadas de la cresta izquierda se sitúan en la región ventral y las derivadas de la cresta derecha en posición dorsal. Es decir, existe una relocalización de las contribuciones derecha e izquierda respecto al eje embrionario derecha/izquierda que afecta solamente a los ventrículos.

En el estadio embrionario, tres nuevos miembros de la familia *Iroquois* se expresan en el miocardio, *Irx1* e *Irx2*, cuyo patrón de expresión es netamente similar; se expresan exclusivamente en la cresta del septo in-

terventricular desde el inicio de su formación<sup>91</sup>. Esta distribución relaciona estos factores de transcripción con la formación y/o especificación del sistema de conducción ventricular, aunque no existen evidencias directas. El tercer factor *Iroquois*, *Irx3*, posee una expresión restringida al miocardio de trabajo (auricular y ventricular)<sup>91</sup>. El factor homeótico, *Irx4*, mantiene su expresión principalmente restringida al miocardio ventricular<sup>21</sup>; sin embargo, trasciende en forma decreciente hacia el tracto de salida y el canal atrioventricular (D. Franco, datos no publicados; fig. 5).

*Tbx5* tiene un patrón de expresión restringido al ventrículo izquierdo, el canal atrioventricular, el atrio (derecho e izquierdo) y el tracto de entrada del corazón embrionario<sup>92</sup>. Curiosamente, la expresión de *Tbx5* en el septo interventricular está localizada principalmente en la región izquierda, lo que permite aseverar que el septo interventricular tiene componentes derecho e izquierdo distintos. *Tbx2*, otro miembro de la familia T-box, inicia su expresión de forma clara en el canal atrioventricular y tracto de entrada en este estadio (D. Franco y M. Campione, datos no publicados). *Tbx2* ejerce una función inhibitoria de la expresión en otros tejidos, y parece ser que su función durante la cardiogénesis está relacionada con la inhibición del programa de expresión génica característica del miocardio de trabajo (auricular y ventricular) en aquellas zonas donde se expresa (canal atrioventricular y tracto de salida). Esta hipótesis está de acuerdo con las evidencias moleculares y actualmente se está investigando.

Miembros de la familia bHLH adquieren en este estadio una regionalización singular en su patrón de expresión. eHAND muestra una restricción en su expresión al ventrículo izquierdo, tracto de salida y atrio común, mientras que dHAND presenta un patrón de expresión principalmente restringido al ventrículo derecho y tracto de salida<sup>35,93</sup>. Es interesante destacar que la expresión asimétrica se observa en roedores pero no en otros modelos experimentales como el pollo<sup>34</sup>.

Los miembros de la familia HRT mantienen en el corazón embrionario la misma regionalización en su expresión que en estadios anteriores: HRT1 se expresa en el tracto de entrada y en el miocardio auricular, mientras que HRT2 lo hace en el miocardio ventricular y en el tracto de salida<sup>37</sup>.

## Miscelánea

La expresión de ANF (factor natriurético auricular) está restringida en este estadio al componente trabeculado del ventrículo y al atrio común. Es importante resaltar que no hay expresión de ANF en el tracto de entrada en este estadio, si bien el componente miocárdico de las futuras venas cavas ya está diferenciado. Así pues, la expresión de ANF permite distinguir molecularmente el componente auricular del componente

venoso del atrio embrionario, es decir, el miocardio de las venas cavas<sup>94</sup>.

## Transgénesis

En el estadio embrionario, la expresión de los distintos transgénicos es muy diversa. Se han documentado hasta la actualidad transgénicos que se expresan en todo el corazón (cTnI), en el tracto de salida y ventrículo derecho (MLC2v; SM22 $\alpha$ ), en el ventrículo izquierdo y atrio derecho (MLC3F), en el ventrículo derecho (GATA), en el canal atrioventricular (cTnI, cGATA), en ambos ventrículos (MLC2v) y en ambos ventrículos y atrios, excluyendo el tracto de entrada y tracto de salida (MLC3F)<sup>7,50,51</sup>. La heterogeneidad en los patrones de transgénicos en el estadio embrionario pone de manifiesto el alto grado de complejidad tanto de la regulación de la expresión génica específica del miocardio como de la diversidad estructural y morfológica del músculo cardíaco.

Es interesante destacar la asociación entre expresión en el ventrículo izquierdo y atrio derecho que se observa en varios modelos de transgénicos (MLC3F y cTnI)<sup>52,95</sup>. En otros modelos la expresión es complementaria (MLC2v)<sup>68</sup> o englobadora ( $\alpha$ MHC y  $\beta$ MHC)<sup>96,97</sup>. Estas observaciones hacen pensar que el patrón «ventrículo izquierdo-atrio derecho» representa el «corazón unicameral» primitivo de los peces y que, en el curso de la evolución, se han ido añadiendo nuevos compartimientos (atrio izquierdo y ventrículo derecho) con la finalidad de adecuar el corazón a una circulación doble. Esta hipótesis hace pensar que la adquisición de nuevas cámaras cardíacas necesitaría también de la adición de nuevos «elementos reguladores». Esta idea está en consonancia con el modelo planteado por Franco et al<sup>52</sup> y Olson y Srivastava<sup>98</sup>, en el que la regulación de la expresión cardíaca es de tipo modular; elementos discretos de ADN dirigen la expresión a determinados compartimientos cardíacos.

Recientemente se han descrito dos modelos transgénicos (ambos resultan de la inserción espontánea en un *locus* desconocido *a priori*; *gene-trap/enhancer trap*) que divergen de esta pauta general. Renstchler et al<sup>99</sup> han descrito un transgénico cuyo patrón está principalmente localizado en las regiones prospectivas del sistema de conducción. La expresión del transgén En2-lacZ está localizada en el miocardio trabeculado (sistema de Purkinje y ramas derecha e izquierda), el anillo atrioventricular (nódulo atrioventricular), septo interventricular (fascículo de His) y unión sinoatrial de la vena cava derecha (nódulo sinoatrial). Estudios del mapeo de actividad eléctrica demuestran que las células ventriculares que expresan el transgén también transmiten el impulso cardíaco de forma más rápida que las células que no lo expresan. Actualmente no conocemos cuáles son los elementos reguladores que promueven la expresión de este transgén.

Kelly et al<sup>100</sup> han presentado un modelo transgénico

cuyo patrón es dinámico durante el desarrollo cardíaco. La expresión inicial se localiza en células externas al tubo cardíaco que expresan FGF10 y, progresivamente con el desarrollo, la región arterial del tubo cardíaco adquiere expresión del transgén, lo que apunta a que esta región miocárdica no está presente en el tubo cardíaco inicial. Experimentos de marcaje celular han demostrado esta hipótesis<sup>100</sup>.

## PATRONES DE EXPRESIÓN EN EL CORAZÓN FETAL (E16.5 RATÓN)

El corazón fetal presenta una arquitectura morfológica semejante al corazón adulto. Las cámaras cardíacas atriales y ventriculares se encuentran claramente divididas en derecha e izquierda, y la tabicación del tubo cardíaco inicial en dos circuitos es casi completa. De este modo al atrio derecho llega sangre procedente de las venas cavas, mientras que al atrio izquierdo le llega sangre procedente de las venas pulmonares. Ambas estructuras, venas cavas y venas pulmonares, presentan un recubrimiento de musculatura cardíaca, que varía según las distintas especies, y por tanto se consideran parte íntegra del corazón fetal<sup>101</sup>. Cada atrio conecta con su correspondiente ventrículo por una unión atrioventricular<sup>102</sup>. Dentro del miocardio ventricular podemos distinguir en este estadio dos componentes claramente delimitados, tanto en el ámbito morfológico como molecular, es decir, la capa compacta y la capa trabeculada<sup>70</sup>. Finalmente cada ventrículo adquiere una salida independiente debido a la tabicación del tracto de salida en el tracto aórtico y tracto pulmonar<sup>103</sup>. Obtenida esta configuración, el miocardio muestra una heterogeneidad en la expresión génica que es reminiscente de los patrones de expresión del estadio embrionario, lo cual ha permitido dilucidar la contribución de determinadas regiones miocárdicas embrionarias en el corazón adulto (tabla 2)<sup>7,73</sup>.

La generación de distintas cámaras atriales y ventriculares con circuitos independientes requiere, a su vez, de la adquisición de un sistema especializado de conducción del impulso cardíaco para asegurar la contracción sincrónica del miocardio fetal y, sobre todo, del establecimiento de una pauta de contracción desde el ápex a la base del corazón. El sistema de conducción cardíaco está formado por el nódulo sinoatrial, el nódulo atrioventricular (AVN), el fascículo de His (o atrioventricular), las ramas derecha e izquierda, y el sistema periférico de células de Purkinje. Cada uno de estos componentes tiene una fisiología distinta y, en consonancia con ello, posee un patrón de expresión diferencial. En esta revisión queremos tratar de modo sucinto el patrón de expresión diferencial de los componentes del sistema de conducción, pues existen excelentes revisiones al respecto en la bibliografía actual<sup>104-106</sup>.

## Genes que codifican para proteínas contráctiles

Las distintas isoformas de MHC y MLC mantienen un patrón regionalizado de expresión en el estadio fetal, presentando una tendencia a la adquisición de dicha regionalización. Las isoformas  $\alpha$ MHC, MLC1a y MLC2a progresivamente manifiestan una expresión restringida al miocardio auricular, incluyendo las venas cavas y pulmonares, y las zonas derivadas del canal atrioventricular. De modo peculiar las isoformas «atriales» presentan una expresión diferencial transitoria entre las distintas capas del miocardio ventricular. La capa trabeculada mantiene niveles de expresión más altos que la capa compacta<sup>7</sup>. A su vez, la desaparición de la expresión de estas isoformas del miocardio ventricular provoca que el ventrículo derecho y el izquierdo evidencien diferencias transitorias en su expresión<sup>93</sup>, lo que indica la existencia de distintos programas transcripcionales entre los ventrículos derecho e izquierdo. Por el contrario, las isoformas «ventriculares»  $\beta$ MHC, MLC1v y MLC2v mantienen una expresión principalmente restringida al polo arterial, es decir, al canal atrioventricular, el ventrículo y el tracto de salida, si bien no manifiestan diferencias sustanciales entre las capas trabeculadas y compacta del miocardio ventricular, como tampoco en las cámaras derecha e izquierda. Al igual que ocurría en el estadio anterior (embrionario), curiosamente la isoforma MLC2a presenta una expresión residual en el tracto de salida a medida que se produce su regresión hacia el polo auricular, mientras que MLC2v mantiene su expresión diferencial en el tracto de entrada.

La isoforma cardíaca de la troponina I (cTnI) conserva un gradiente anteroposterior de expresión<sup>7,74</sup>. La cTnI muestra mayor expresión en el tracto de entrada y atrio común, disminuye en el canal atrioventricular y es más baja en el ventrículo y el tracto de salida, teniendo este último una expresión basal en su región más craneal. La presencia de ARNm que codifica para la cTnI se detecta en todo el corazón embrionario; sin embargo, la proteína de cTnI sólo se detecta en el atrio común y en el tracto de entrada en estadios fetales avanzados (E18.5)<sup>74</sup>. Las consecuencias funcionales de este control postranscripcional no se conocen actualmente.

La expresión de las distintas isoformas de MHC y MLC también varía dentro de las distintas estructuras que componen el sistema de conducción cardíaco. El nódulo sinoatrial, al ser eminentemente una región auricular, muestra expresión de las isoformas «atriales», pero no de las «ventriculares», con la posible excepción de  $\beta$ MHC<sup>107</sup>. Las isoformas del complejo de la troponina-tropomiosina, por su lado, presentan una expresión similar en el nódulo sinoatrial que en el resto de miocardio auricular. El nódulo atrioventricular, por su parte, posee un patrón de expresión am-

biguo debido, posiblemente, tanto a su localización morfológica como a su origen embrionario. El AVN muestra coexpresión de las isoformas atriales y ventriculares, siendo de especial importancia el hecho de que la expresión de isoformas ventriculares sea más reducida si se compara con la expresión de dichas isoformas en el miocardio ventricular de trabajo<sup>105</sup>. Respecto a la expresión de las otras isoformas del complejo sarcomérico, es importante destacar que la expresión de la isoforma de musculatura esquelética lenta de la troponina I (ssTnI) es sustancialmente menor en todo el sistema ventricular de conducción (AVN, His y ramas derecha e izquierda) que en el miocardio ventricular de trabajo. El fascículo de His (fascículo atrioventricular) presenta una expresión de transición entre el nódulo atrioventricular y las ramas derecha e izquierda. El fascículo de His evidencia una expresión más tenue de las isoformas ventriculares mientras que, por otro lado, no muestra expresión de las isoformas atriales. Las ramas derecha e izquierda presentan un patrón de expresión semejante al acaecido en el fascículo de His. No se conocen, por el contrario, marcadores génicos específicos que delimiten el sistema periférico de Purkinje en roedores, aunque sí existen en otras especies<sup>106</sup>.

## Genes que codifican para proteínas del metabolismo del calcio

En el corazón fetal, SERCA2a muestra mayor expresión en el miocardio auricular que en el ventricular. La expresión de PLB es por el contrario la complementaria, mayor expresión en el miocardio ventricular que en el auricular. De forma similar al patrón que se observa para las isoformas de MHC y MLC, tanto SERCA2a como PLB presentan una expresión homogénea en los distintos componentes venosos, es decir, en las aurículas y en el miocardio de las venas cavas y pulmonares. A su vez, tanto SERCA2a como PLB presentan una expresión diferencial entre las capas trabeculada y compacta del miocardio ventricular<sup>7,13</sup>. Por el contrario, la expresión de SERCA2a y PLB es muy tenue en distintos componentes del sistema cardíaco de conducción, nódulo atrioventricular y fascículo de His, en consonancia con el origen morfológico de estas estructuras a partir del miocardio del canal atrioventricular<sup>6,107</sup>. La expresión de SERCA2a y PLB en las ramas derecha e izquierda del sistema cardíaco de conducción es similar al miocardio ventricular.

La expresión de las principales isoformas cardíacas de los demás componentes del metabolismo del calcio, es decir, la isoforma RyR2, la del NCX y las distintas isoformas del NaK-ATPasa que se expresan en el corazón, se distribuyen de forma homogénea en las distintas regiones del corazón fetal, incluyendo el sistema de conducción.

## Genes que codifican para componentes de los discos intercalares

El patrón de expresión de la principal conexina del corazón en los mamíferos, la conexina 43 (Cx43), se restringe al miocardio ventricular y sólo se aprecia de forma basal en el miocardio auricular. Es interesante resaltar que no se ha detectado expresión de Cx43 en determinados componentes del sistema de conducción ventricular, es decir, el nódulo atrioventricular y el fascículo de His, lo que apoya la hipótesis de que dichas estructuras vienen derivadas del canal atrioventricular embrionario<sup>6,105</sup>. Por otro lado, la expresión de los transcritos de Cx43 es distinta en la capa trabeculada (más baja) que en la capa compacta (más elevada). Sin embargo, la expresión proteica es más elevada en la capa trabeculada que en la compacta, y se aduce que existe un mecanismo de control postranscripcional<sup>76</sup>. Estas observaciones inducen a pensar que la transmisión del impulso cardíaco se produce preferentemente a través de las trabéculas en este estadio<sup>108</sup>.

La expresión de la Cx40 en este estadio presenta un patrón más o menos complementario al de la Cx43. La Cx40 se expresa principalmente en las cámaras atriales y muestra una expresión diferencial transitoria entre derecha e izquierda en los ventrículos<sup>78</sup>. A su vez, la expresión de la Cx40 es sustancialmente mayor en las ramas derecha e izquierda, si bien su expresión en el nódulo atrioventricular y en el fascículo de His es semejante a la del miocardio ventricular de trabajo<sup>78</sup>. La tercera conexina descrita en el corazón de los mamíferos (Cx45) presenta un patrón homogéneo de expresión, si bien existen investigadores que aducen la presencia de una expresión diferencial entre el sistema de conducción cardíaco y el miocardio de trabajo<sup>79-81</sup>.

## Genes que codifican para canales iónicos

SCN5A se expresa principalmente en el tracto de entrada, es decir, en el miocardio de las venas cavas, mientras que la expresión en el ventrículo es más basal (Franco y Bezzina, datos no publicados). Actualmente, no existen datos sobre la distribución de SCN1B en el corazón fetal, y tampoco sobre la distribución de estos canales en el sistema de conducción cardíaco.

La expresión de KCNQ1, KCNH2 y KCNE3 es homogénea en el miocardio fetal. Sin embargo, las subunidades auxiliares presentan un patrón de expresión dinámico. KCNE1 se queda restringido al miocardio ventricular, mientras que KCNE2 y KCNE3 están confinados al miocardio atrial<sup>90</sup>. La expresión de ciertas subunidades en el sistema de conducción cardíaco es interesante. Los transcritos de KCNQ1 presentan niveles de expresión semejantes en el sistema de conducción cardíaco y en el miocardio de trabajo, pero existe un claro incremento en la cantidad de proteína de

KCNQ1 en el sistema de conducción (nódulo AV, fascículo de His y ramas derecha e izquierda)<sup>90</sup>. Dichas diferencias permiten postular que existe un mecanismo de control postranscripcional específico de tejido en el sistema de conducción. La expresión de KCNH2 es semejante tanto en el ARNm como en la proteína en el miocardio<sup>90</sup>.

## Factores de transcripción

Recientemente se ha documentado que mutaciones puntuales en el factor de transcripción *Nkx2.5* están asociadas con malformaciones congénitas del septo interatrial y también con disfunciones del sistema de conducción<sup>109-111</sup>. El estudio detallado del patrón de expresión de *Nkx2.5* en las citadas regiones ha demostrado que no existen diferencias de expresión en el septo interatrial durante su formación. Sin embargo, el nódulo atrioventricular y el fascículo de His presentan una menor expresión de ARNm codificante para el *Nkx2.5*<sup>112</sup> en comparación con el miocardio de trabajo. Curiosamente existe un incremento diferencial de expresión de la proteína *Nkx2.5* en estas mismas estructuras, y debido a un mecanismo de control postranscripcional específico del sistema de conducción (D. Franco, datos no publicados). En conjunto, estas observaciones permiten postular que el factor de transcripción *Nkx2.5* cumple un papel importante en la diferenciación funcional del sistema de conducción.

El factor de transcripción *Pitx2* presenta una variación gradual de su patrón de expresión en el estadio fetal del desarrollo cardíaco. *Pitx2* se expresa principalmente en la región ventral del ventrículo derecho, pero no en la dorsal. *Pitx2* también se expresa en la región ventral e izquierda del tracto de entrada, así como en todos los componentes del atrio izquierdo, incluyendo aquí la región atrioventricular de la válvula mitral, el miocardio que compone las venas pulmonares y el complejo del septo interatrial (septos primario y secundario)<sup>20,94</sup>. En estadios fetales avanzados y adultos no se observa expresión de *Pitx2* en el tejido de miocardio.

## Miscelánea

La expresión de ANF en este estadio es de elevada importancia para el conocimiento de la heterogeneidad molecular en el polo venoso del corazón fetal. ANF presenta una expresión restringida al miocardio auricular y ventricular trabeculado. Es importante destacar que la expresión en las cámaras atriales es peculiarmente interesante, pues delimita la contribución del miocardio del canal atrioventricular (no expresa ANF) a los atrios fetales, mientras que por otro lado demuestra la heterogeneidad en el miocardio que forma las venas cavas y las venas pulmonares, respecto al miocardio auricular trabeculado<sup>94</sup>.

Curiosamente, el gen que codifica para la isoforma muscular de la creatinina mitocondrial (MCK) se detecta por primera vez en el estadio fetal (E14.5) del desarrollo embrionario y su expresión en el miocardio se restringe al ventrículo izquierdo. Posteriormente durante el desarrollo, la expresión se complementa en el ventrículo derecho y en las cámaras atriales<sup>112</sup>. La existencia de esta expresión diferencial en el miocardio ventricular (derecha/izquierda) refuerza la hipótesis de que existen programas de transcripción independientes entre los ventrículos derecho e izquierdo.

### Transgénesis

Aparte de los patrones de expresión de los distintos transgénicos que se observan en el miocardio embrionario, todos los cuales se conservan en el estadio fetal, en este período se establecen nuevos patrones de expresión. En especial se han de destacar los transgénicos que contienen elementos reguladores discretos del locus MLC1F/3F (3F-nlacZ<sup>94</sup>); la combinación de distintos elementos genera diferentes patrones.

El análisis conjunto de patrones de expresión en transgénicos y genes endógenos nos ha permitido definir cuatro dominios de expresión en el polo venoso del corazón: canal atrioventricular embrionario, apéndices trabeculados, miocardio de las venas cavas y miocardio de las venas pulmonares (incluyendo este último el septo interatrial)<sup>94</sup>. La ausencia de expresión ANF en el canal atrioventricular<sup>94</sup> y el análisis del promotor de la troponina cardíaca I<sup>95</sup> han permitido demostrar la contribución de esta región embrionaria a la base de las aurículas. La expresión diferencial del transgénico 3F-nlacZ-9 y de ANF ha demostrado diferencias entre el miocardio auricular y el componente del tracto de salida (venas cavas y pulmonares). El patrón de expresión de los transgénicos 3F-nlacZ-9E y MLC3F endógeno demuestra que el miocardio de las venas cavas es diferente del de las venas pulmonares<sup>94</sup>.

Por otro lado, es importante resaltar la expresión del transgén En2-lacZ descrito por Renthler et al<sup>99</sup>. En el estadio fetal, En2-lacZ está localizado casi exclusivamente en los distintos componentes del sistema de conducción, es decir, nódulo sinoatrial, nódulo atrioventricular, fascículo de His y ramas derecha e izquierda. Además, se observa expresión en regiones discretas del miocardio auricular derecho que enlaza los nódulos sinoatrial y atrioventricular, así como en una amplia extensión del miocardio trabeculado ventricular. Las regiones de miocardio auricular que presentan expresión del transgén pueden ser vías preferenciales de conducción del impulso cardíaco entre los nódulos atrioventricular y sinoatrial, pero actualmente no existen evidencias electrofisiológicas que sostengan esta hipótesis. Por otro lado, la expresión en el miocardio ventricular trabeculado parece corresponder con el sistema periférico de fibras de Purkinje. Este patrón único de expresi

sión parece representar un fiel marcador del sistema de conducción durante el desarrollo cardíaco<sup>99</sup>.

### PATRONES DE EXPRESIÓN EN EL CORAZÓN ADULTO

En el corazón adulto se mantienen básicamente los patrones de expresión observados en el corazón fetal. Encontramos 5 regiones claras, cuatro de las cuales están comprendidas en el miocardio auricular. Estas 5 poblaciones celulares son el ventrículo adulto (incluye el tracto de salida embrionario), el miocardio derivado del canal atrioventricular, los apéndices atriales trabeculados, el miocardio de las venas cavas y el miocardio de las venas pulmonares, que vienen definidas por su particular patrón de expresión génica (p. ej., ANF) y potencial transcripcional (transgenes MLC3F)<sup>94</sup>. Curiosamente, una de las alteraciones más significativas que se producen en la transición de fetal a adulto la experimenta la isoforma  $\alpha$ MHC en el ratón, pero no en humanos.  $\alpha$ MHC pasa de tener una expresión auricular en el corazón fetal a constituir la isoforma predominante en el corazón adulto, tanto en el atrio como en el ventrículo, desplazando así la expresión de  $\beta$ MHC en ventrículos<sup>113</sup>.

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Como se puede deducir de los apartados anteriores, el músculo cardíaco es una estructura altamente dinámica y con un grado elevado de heterogeneidad en la expresión génica. Dicha heterogeneidad no sólo constituye una característica del miocardio en formación, sino que perdura en el corazón plenamente formado, lo que tiene por tanto implicaciones clínicas.

La heterogeneidad molecular en el miocardio está estrechamente relacionada con la práctica quirúrgica. Un ejemplo ilustrativo lo constituye la variabilidad en los resultados obtenidos por ablación puntual de determinadas regiones atriales en pacientes afectados de fibrilación auricular paroxística. Quizá el motivo de la variación en los resultados no dependa tanto de la eficacia del procedimiento (aunque sí en parte) como de la heterogeneidad del miocardio subyacente. El miocardio auricular es bastante homogéneo durante el desarrollo, pero esto contrasta con la situación en el adulto, dado su alto grado de heterogeneidad. Ello significa que quizá no todas las regiones son susceptibles de ablación, de acuerdo con las características moleculares subyacentes, y por tanto sería necesario establecer una clara correlación entre las zonas del miocardio «auricular» con fibrilación paroxística, por ejemplo, y los límites de las distintas regiones miocárdicas (a nivel molecular) para interpretar adecuadamente el éxito en este tipo de intervenciones.

Por otro lado, actualmente se están realizando esfuerzos importantes con el objetivo de tratar mediante terapia génica distintas disfunciones del miocardio. En

modelos experimentales se han conseguido avances importantes, pero en pacientes humanos el éxito es reducido. Para ello se interponen ciertos obstáculos técnicos que es importante mencionar. Por un lado, nuestro conocimiento del sistema de regulación génica específico del miocardio está aún en fase embrionaria, pues sólo conocemos determinados elementos pero no los pilares («elementos básicos») de dicha regulación. Por otra parte, estamos obviando la amplia heterogeneidad muscular del miocardio adulto, lo cual limita nuestras posibilidades de éxito de cara a la aplicación de una terapia génica dirigida al músculo cardíaco afectado. En resumen, la composición del corazón adulto dista bastante de su clasificación conceptual clásica de miocardio auricular y ventricular. Existen múltiples dominios de expresión génica, principalmente localizados en los tractos de entrada al corazón, que permiten explorar nuevas explicaciones (moleculares) a determinadas paradojas de la práctica clínica.

Debemos profundizar en el conocimiento de los módulos esenciales de la regulación génica, desarrollar y optimizar nuevas estrategias de suministro hacia el paciente afectado y tener en cuenta la heterogeneidad molecular. Nuestros esfuerzos en la investigación básica han de estar encaminados a conocer los mecanismos moleculares que controlan dicha heterogeneidad celular para, de este modo, aportar las bases de una futura, y no muy lejana, aplicación clínica. La clave del éxito de este *modus operandi* estará en la disponibilidad y voluntad de ambos especialistas (básica y clínica) en integrar sus conocimientos y aunar esfuerzos y perspectivas de trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Massage J, Chen Y-G. Controlling TGF- $\beta$  signalling. *Gen Dev* 2000;14:627-44.
2. Schultheiss TM, Burch JBE, Lassar AB. A role of bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Gen Dev* 1997;11:451-62.
3. Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S. BMP signalling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol* 2000;224:226-37.
4. Manasek FJ. Embryonic development of the heart: I. Electron microscopic study of myocardial development in the early chicken embryo. *J Morphol* 1968;125:329-66.
5. Brown NA, Anderson RH. Symmetry and Laterality in the human heart: developmental implications. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development 1999*. Academic Press NY.
6. Moorman AFM, Lamers WH. Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med* 1994;4:257-64.
7. Franco D, Lamers WH, Moorman AFM. Patterns of gene expression in the developing myocardium: towards a morphologically integrated transcriptional model. *Cardiovasc Res* 1998;38:25-53.
8. De Jong F, Viragh SZ, Moorman AFM. Cardiac Development: a morphologically integrated molecular approach. *Cardiol Young* 1997;7:131-46.
9. Van den Hoff MJB, Moorman AFM, Ruijter JM, Lamers WH, Bennington RS, Markwald RR, et al. Myocardialization of the cardiac outflow tract. *Dev Biol* 1999;212:477-90.
10. Webb S, Brown NA, Anderson RH. The structure of the mouse heart in late fetal stages. *Anat Embryol* 1996;194:37-47.
11. Becker AE, Anderson RH. *Cardiac pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1983.
12. García Martínez V, Schoenwolf GC. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* 1993;159:706-19.
13. Moorman AFM, Vermeulen JML, Koban MU, Schwartz K, Lamers WH, Boheler KR. Patterns of expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and phospholamban mRNAs during rat heart development. *Circ Res* 1995;76:616-25.
14. Moorman AFM, Schumacher CA, de Boer PAJ, Hagoort J, Bezstarosti K, van den Hoff MJB, et al. Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Dev Biol* 2000;223:279-90.
15. Fishman MC, Chien KR. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 1997;124:2099-117.
16. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993;119:419-31.
17. Raffin M, Leong LM, Ronnes MS, Sparrow D, Mohun T, Mercola M. Subdivision of the cardiac Nkx2.5 expression domain into myogenic and nonmyogenic compartments. *Dev Biol* 2000;218:326-40.
18. Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodríguez-Rey JC, Ros MA. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 1998;94:319-24.
19. Campione M, Steinbeisser H, Schweickert A, Deissler K, van Bebber F, Lowe LA, et al. The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signalling in vertebrate heart and gut looping. *Development* 1999;126:1225-34.
20. Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, et al. Pitx-2 expression defines a left cardiac lineage and provides evidence for the existence of ventricular isomerism in *iv* mice. *Dev Biol* 2001;231:252-69.
21. Bruneau BG, Bao Z-Z, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, et al. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by Nkx2.5 and dHAND. *Dev Biol* 2000;217:266-77.
22. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061-72.
23. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997;11:1048-60.
24. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosfeld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 1999;126:723-32.
25. Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 1994;164:361-73.
26. Morrissey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS. GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 1996;177:309-22.
27. Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. GATA-5: A transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* 1997;183:21-36.
28. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz R, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2.5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 1997;16:5687-96.
29. Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 1994;120:1251-63.
30. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 1997;276:1404-7.
31. Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11:440-8.



32. Kern MJ, Argao EA, Potter SS. Homeobox genes and heart development. *Trends Cardiovasc Med* 1995;5:47-54.
33. Cserjesi P, Brown D, Lyons GE, Olson EN. Expression of the novel basic Helix-loop-Helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev Biol* 1995;170:664-78.
34. Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science* 1995;270:1995-9.
35. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nature Genetics* 1997;16:154-60.
36. Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placenta and cardiac morphogenesis. *Nature Genetics* 1998;18:271-5.
37. Nakagawa O, Nakagawa M, Richardson JA, Olson EN, Srivastava D. HRT1, HRT2 and HTR3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic and pharyngeal arch segments. *Dev Biol* 1999;216:72-84.
38. McGrew MJ, Pourquie O. Somitogenesis: segmenting a vertebrate. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:487-93.
39. Croissant JD, Kim JH, Eichele G, Goering L, Lough J, Prywes R, et al. Avian serum response factor expression restricted primarily to muscle cell lineages is required for  $\alpha$ -actin gene transcription. *Dev Biol* 1996;177:250-64.
40. Saga Y, Hata N, Kobayashi S, Magnuson T, Seldin MF, Taketo MM. MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development* 1996;122:2769-78.
41. Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki J, Inoue T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 1999;126:3437-47.
42. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2.5 homeobox gene pathway. *Development* 1997;124:793-804.
43. Ghatpande S, Goswami S, Mathew S, Rong G, Cai L, Shafiq S, et al. Identification of a novel cardiac lineage-associated protein (cCLP-1): A candidate regulator of cardiogenesis. *Dev Biol* 1999;208:210-21.
44. Wei Y, Bader D, Litvin J. Identification of a novel cardiac-specific transcript critical for cardiac myocyte differentiation. *Development* 1996;122:2779-89.
45. Hosoda T, Monzen K, Hiroi Y, Oka T, Takimoto E, Yazaki Y, et al. A novel myocyte-specific gene Midori promotes differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2001;276:35978-89.
46. Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol* 1999;19:4355-65.
47. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, et al. Tbx5 associates with Nkx2.5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nature Genet* 2001;28:276-80.
48. Christoffels VM, Habets PEMH, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 2000;223:266-78.
49. Kelly R, Franco D, Moorman AFM, Buckingham M. Regionalization of transcriptional potential in the myocardium. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development*. New York: Academic Press, 1999.
50. Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits W, et al. A retinoic acid-inducible transgenic marker of the sino-atrial development in the mouse heart. *Development* 1999;126:2677-87.
51. He C-Z, Burch JBE. The chicken GATA-6 locus contains multiple control regions that confer distinct patterns of heart region-specific expression in transgenic mouse embryos. *J Biol Chem* 1997;272:28550-6.
52. Franco D, Kelly R, Lamers WH, Buckingham M, Moorman AFM. Compartment-specific myosin light chain 3F transgene expression in the embryonic mouse heart. *Dev Biol* 1997;188:17-33.
53. De la Cruz MV, Sánchez-Gómez C, Palomino M. The primitive cardiac regions in the straight tube heart (stage 9) and their anatomical expression in the mature heart: an experimental study in the chick embryo. *J Anat* 1989;165:121-31.
54. De la Cruz MV, Markwald RR. *Living morphogenesis of the heart*. Birkhauser, 1999.
55. Franco D, Kelly R, Moorman AFM, Lamers WH, Buckingham M, Brown NA. MLC3F transgene expression in iv mutant mice reveals the importance of left-right signalling pathway for the acquisition of atrial but not ventricular compartment identity. *Dev Dyn* 2001;221:206-15.
56. Satin J, Fujii S, de Haan RL. Development of the cardiac heartbeat in early chick embryos is regulated by regional cues. *Dev Biol* 1988;129:103-33.
57. De Haan RL, Fujii S, Satin J. Cell interactions in cardiac development. *Dev Growth Differ* 1990;32:233-41.
58. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996;76:371-423.
59. Yutzey KE, Bader D. Diversification of cardiomyocytes cell lineages during early heart development. *Circ Res* 1995;77:216-9.
60. Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of antero-posterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 1994;120:871-83.
61. Bao Z-Z, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science* 1999;283:1161-4.
62. Biben C, Harvey RP. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev* 1997;11:1357-69.
63. Moore KL. *The Developing Human: Clinically oriented Embryology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1982.
64. Zou Y, Chien KR. EFIA/YB-1 is a component of cardiac HF-1A binding activity and positively regulates transcription of the myosin light-chain 2v gene. *Mol Cell Biol* 1995;15:2972-82.
65. Li Z, Marchard P, Humbert J, Babinet C, Paulin D. Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Development* 1993;117:947-59.
66. Li L, Miano JM, Mercer B, Olson EN. Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1996;132:849-59.
67. Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol* 1995;192:383-96.
68. Ross RS, Navankasattusas S, Harvey RP, Chien KR. An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and establishes an anterior-posterior gradient of expression. *Development* 1996;122:1799-809.
69. Wright CVE. Mechanisms of left-right asymmetry: what's right and what's left? *Dev Cell* 2001;1:179-86.
70. Franco D, Kelly R, Zammit P, Buckingham M, Moorman AFM. The transcriptional building blocks of the heart. In: Doevenans P, Reneman RS, Van Bilsen M, editors. *Cardiovascular specific gene expression*. Dordrecht: Kluwer Academic Publish, 1999.
71. Franco D, Markman MWM, Wagenaar GTM, Ya J, Lamers WH, Moorman AFM. Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart. *Anat Rec* 1999;254:135-46.
72. Kelly R, Zammit P, Mouly V, Butler-Browne G, Buckingham M. Dynamic left/right regionalization of endogenous myosin light chain 3F transcripts in the developing mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1067-81.

73. Kelly RG, Zammit PS, Buckingham ME. Cardiosensor mice and transcriptional subdomains of the vertebrate heart. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:3-10.
74. Ausoni S, de Nardi C, Moretti P, Gorza L, Schiaffino S. Developmental expression of rat cardiac troponin I mRNA. *Development* 1991;112:1041-51.
75. Gros DB, Jongsma HJ. Connexions in mammalian heart function. *Bioessays* 1996;18:719-30.
76. van Kempen MJA, Fromaget C, Gros D, Moorman AFM, Lamers WH. Spatial distribution of connexin-43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res* 1991;68:1638-51.
77. van Kempen MJA, Vermeulen JLM, Moorman AFM, Gross DB, Paul DL, Lamers WH. Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA-distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1996;32:886-900.
78. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Marics I, Briand JP, Willecke K, et al. Developmental regulation of connexin40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn* 1995;204:358-71.
79. Coppen SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res* 1998;82:232-43.
80. Coppen SR, Severs NJ, Gourdie RG. Connexin45 ( $\alpha 6$ ) expression delineates and extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet* 1999;24:82-90.
81. Alcoléa S, Théveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, et al. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res* 1999;84:1365-79.
82. Antzelevitch C, Sicouri S, Lukas A, Nesterenko VV, Liu DW, Di Diego JM. Regional differences in the electrophysiology of ventricular cells: physiological and clinical implications. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*. Philadelphia: W.B. Sanders Co, 1994: p. 22845.
83. Bezzina CR, Rook MB, Wilde AAM. Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2001;49:257-71.
84. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millohland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KvQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 1996;12:17-23.
85. Barharin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 1996;284:78-80.
86. McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, et al. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current IKr. *Nature* 1997;388:289-92.
87. Abbot GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehman MH, Timothy KW, et al. MiRP forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;97:175-87.
88. Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, et al. A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 2000;403:196-99.
89. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M, Barharin J. KCNE2 confers background current characteristics to cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J* 2000;19:6326-30.
90. Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Domínguez J, Roden D, et al. Divergent expression of delayed rectifier K<sup>+</sup> channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res* 2001;52:65-75.
91. Christoffels VM, Keijsers AGM, Houweling AC, Clout DEW, Moorman AFM. Patterning the embryonic heart: identification of five Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol* 2000;224:263-74.
92. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, et al. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 1999;211:100-8.
93. Zammit PS, Kelly RG, Franco D, Brown N, Moorman AFM, Buckingham ME. Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart. *Dev Dyn* 2000;217:75-85.
94. Franco D, Campione M, Kelly R, Zammit PS, Buckingham M, Lamers WH, et al. Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. *Circ Res* 2000;87:984-91.
95. Di Lisi, R, Sandri C, Franco D, Ausoni S, Moorman AFM, Schiaffino S. An atrioventricular canal domain defined by cardiac troponin I transgene expression in the embryonic myocardium. *Anat Embryol* 2000;202:95-101.
96. Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert SE, Neumann J, Robbins J. Tissue-specific regulation of the  $\alpha$ -myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 1991;266:24613-20.
97. Knotts S, Sánchez A, Rindt H, Robbins J. Developmental modulation of a  $\beta$ -myosin heavy chain promoter-driven transgene. *Dev Dyn* 1996;206:182-92.
98. Olson EN, Srivastava D. Molecular Pathways Controlling Heart Development. *Science* 1996;272:671-6.
99. Renstchler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, et al. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development* 2001;128:1785-92.
100. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from FGF10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 2001;1:435-40.
101. Endo H, Mifune H, Kurohmaru M, Hayashi Y. Cardiac musculature of the cranial vena cava in the rat. *Acta Anat* 1994;151:107-11.
102. Kim JS, Viragh S, Moorman AFM, Anderson RH, Lamers WH. Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart. *Circ Res* 2001;88:395-402.
103. Pexieder T. The conotruncus and its septation at the advent of the molecular biology era. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A, editors. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. p 249-54, 1995.
104. Moorman AFM, Lamers WH. Development of the conduction system of the vertebrate heart. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development*. Academic Press, 1999.
105. Franco D, Icardo JM. Molecular characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart: topographical correlation in normal and congenitally malformed hearts. *Cardiovasc Res* 2001;49:417-29.
106. Moorman AFM, de Jong F, Denyn MMFJ, Lamers WH. Development of the conduction system. *Circ Res* 1998;82:629-44.
107. Wessels A, Vermeulen JLM, Virág S, Kálmán F, Lamers WH, Moorman AFM. Spatial distribution of "tissue specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle: II. An immunohistochemical analysis of myosin heavy chain isoform expression patterns in the embryonic heart. *Anat Rec* 1991;229:355-68.
108. Scott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach M, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor Nkx2.5. *Science* 1998;281:108-11.
109. Benson DW, Silberbach GM, Kavanagh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, et al. Mutations in the cardiac transcription factor Nkx2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999;104:1567-73.
110. Biben C, Weber R, Kesteven S, Stanley E, McDonald L, Elliot DA, et al. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2.5. *Circ Res* 2000;87:888-95.
111. Thomas PS, Kasahara H, Edmonson AM, Izumo S, Yacoub MH, Barton PJ, et al. Elevated expression of Nkx2.5 in developing myocardial conduction cells. *Anat Rec* 2001;263:307-13.
112. Lyons, G. In situ analysis of the cardiac muscle gene program during embryogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1994;4(2):70-7.
113. Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alpha and beta myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Bio Chem* 1984;259:6437-46.