

El conocimiento del desarrollo embrionario del corazón como una herramienta para la terapia celular cardíaca

C. Soler-Botija^a, R. Pilar Cervera^a, I. Oishi^b, R. Marina Raya^b, I. Dubova^b, C. Rodríguez-Esteban^a y J.C. Izpisúa Belmonte^a

^aGene Expression Laboratory, The Salk Institute, La Jolla, CA 92186.

^bCentre de Medicina Regenerativa de Barcelona.

RESUMEN

La regeneración del corazón dañado ha sido objeto de intensa investigación durante la década pasada. Las diferentes estrategias que han sido desarrolladas (como por ejemplo la terapia celular basada en células madre (ES)), esclarecen la información acerca de las moléculas y los factores de transcripción involucrados en las cardiomiogénesis. Sin embargo, todavía no es posible programar eficientemente las ES para que se desarrollen a cardiomiocitos. Los mecanismos celulares y moleculares inherentes en el desarrollo embrionario del corazón, así como las interconexiones entre ellos, pueden aportar datos acerca de las rutas bioquímicas necesarias para la diferenciación de las ES embrionarias a células cardíacas. Nosotros proponemos que un modelo cuantitativo que puede servir para descifrar las elaboradas rutas involucradas en la cardiomiogénesis. Esta aproximación podría revelar la etiología de los defectos cardíacos y permitiría producir cardiomiocitos con propósitos clínicos en la regeneración y la toxicología entre otros.

Palabras clave:

Señalización por calcio. Cardiomiogénesis. Células madre embrionarias. Regeneración.

INTRODUCCIÓN

El esclarecimiento de los programas genéticos y celulares que producen la diferenciación de las células madre embrionarias (abreviado "ESCs" por "*embryonic stem cells*" en inglés) en células precursoras cardíacas y el subsecuente desarrollo en células cardíacas ha sido objeto de intensa investigación durante la última década. Los esfuerzos por regenerar el corazón dañado, en los cuales se han utilizado una gran variedad de métodos que van desde la incorporación de ESCs hasta la introducción de proteínas específicas y pequeñas moléculas, no han tenido éxito y no han conducido a avances significativos. Una acertada deducción de estos experimentos ha sido la identificación de un número de moléculas y factores de transcripción particulares que participan directa o indirectamente en varias de las etapas de la cardiomiogénesis. A pesar de estos progresos, no es posible todavía programar eficientemente las ESCs, para que se desarrollen en cardiomiocitos, con el uso de proteínas conocidas. Esto sucede probablemente porque nuestro conocimiento de los factores involucrados es incompleto. Otra limitación crítica es que no somos todavía capaces de manipular los factores y las rutas de señalización, muchas de las cuales deben ser añadidas o activadas dentro de intervalos de tiempo particulares para que sean efectivas.

Correspondencia: Dr. Juan Carlos Izpisúa Belmonte
Gene Expression Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, 10010 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA
Correo electrónico: belmonte@salk.edu

C.S.B. ha sido financiado por una beca posdoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia (Fullbright), España. R.P.C. está financiado parcialmente por una beca posdoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia, España. I.O., R.M.R., e I.D. están parcialmente financiados por el CMRB. Este trabajo ha sido financiado por ayudas a proyectos de investigación de la G. Harold and Leila Y. Mathers Charitable Foundation, y el NIH.

Una hipótesis primaria que está ampliamente aceptada en el campo de la cardiología es que las numerosas señales, que se requieren para una eficiente cardiogénesis de las células madre, no provienen de las células cardiomiogénicas ni del el corazón inmaduro sino que se originan en otros tipos celulares que podían estar presentes únicamente en el desarrollo. La pérdida de suficientes y apropiadas señales es probablemente parte de la razón por la que el corazón dañado no se regenera eficientemente y explica rotundamente porqué las células madre directamente transplantadas (por ejemplo ESCs indiferenciadas) no se diferencian eficientemente en células del miocardio. Esta hipótesis hace que el problema a investigar sea un problema ejemplar dentro del campo de la "biología de sistemas" y obliga a que el conocimiento de la cardiogénesis sea enfocado mediante el conocimiento de las rutas bioquímicas al nivel sistémico responsable de la diferenciación.

Los experimentos clásicos de la biología del desarrollo durante las últimas décadas han mostrado que los progenitores cardíacos emergen del epiblasto (ectodermo primitivo) en una región que se transforma específicamente en el mesodermo anterior bajo la influencia de señales que difunden desde el endodermo adyacente (el endodermo visceral anterior en el ratón). A continuación, el primordio cardíaco bilateral, localizado en el mesodermo anterior a cada lado de la línea dorsal, recibe señales desde el endodermo y se convierte en el mesodermo cardíaco, el cual luego progresa para desarrollar los múltiples linajes cardíacos, que incluyen a los cardiomiocitos. Entre las moléculas que difunden, involucradas en las diversas etapas de la cardiogénesis, están los miembros de la superfamilia del TGF β , en particular a Nodal y su co-receptor Cripto, Wnts y los antagonistas de Wnt, así como FGFs. Las cascadas de transducción de señales estimuladas por estos elementos han sido bien caracterizadas y conducen a un grupo conocido de factores de transcripción cardiogénicos, que incluyen a Nkx2.5, GATA4, SRF y MEF2. En la medida que el desarrollo procede, estas rutas de señalización y factores de transcripción activan un programa genético que resulta en la expresión de genes que codifican para las proteínas asociadas con la fisiología del cardiomiocito maduro, que agrupa a las proteínas contráctiles, la señalización por calcio y los canales activados por voltaje. La presencia de estas proteínas, así como con la propagación de las ondas de calcio y los potenciales de acción, son usados en la caracterización del cardiomiocito diferenciado.

A pesar que tenemos un conocimiento preciso de los diversos componentes de las cascadas de transducción de señales que son estimulados por los factores inductores del corazón, existe solamente información dispersa acerca de cómo las numerosas rutas de señalización son moduladas coordinadamente mediante el ajuste sutil de

la acción combinatoria de estos inductores durante la cardiogénesis del embrión o de las ESCs. Además, los componentes de señalización han sido descritos en su mayoría mediante la manipulación de proteínas únicas en las células cardiogénicas, por lo que no certifican que una cascada putativa opera realmente como ha sido descrita. Así, los ensayos con información contextualmente apropiada y completa en las ESCs activadas específicamente a través de la cardiogénesis y a las diferentes etapas de la diferenciación ayudarán a la reconstrucción detallada de las redes involucradas en la cardiogénesis. Este es el componente experimental más importante del proyecto. Los registros obtenidos a partir de estos ensayos proveen abundantes datos que necesitan ser asimilados e integrados dentro de un modelo cuantitativo con el fin de descifrar los detalles de las rutas involucradas. Esto constituirá el primer objetivo a calcular. Los agentes desconocidos con funciones específicas, serán deducidos en algunos casos a partir de los cambios de expresión génica (especialmente los factores de transcripción y sus genes diana), mientras que los nuevos agentes identificados serán el blanco para experimentación adicional. La expresión de proteínas y la señalización por calcio sirve como registro excelente de los cardiomiocitos que puede proveer la precisión necesaria para un detallado desarrollo de modelos matemáticos y cuantitativos. Las redes de señalización, deducidas como anteriormente, contendrán las redes de calcio detalladas de manera excepcional y los cálculos de éstas proporcionarán el comportamiento de estímulos y respuestas en cada etapa de la diferenciación celular.

Nuestro modelo experimental principal para este proyecto han sido las ESCs de ratón (mESCs). Presentaremos ensayos que nos ayudarán a identificar la diferenciación por medio de la medición de los marcadores que se han establecido anteriormente como identificadores únicos de la diferentes etapas de la cardiogénesis^{1,2}. Un resumen de nuestra presentación se muestra en un esquema a continuación (fig. 1).

En un futuro próximo, esperamos los siguientes resultados del proyecto de investigación propuesto. Primero, conseguiremos acercarnos en el conocimiento de la complejidad de los módulos de señalización que operan en las células mientras progresan a través del programa cardiogénico. Esto nos proporcionará información vital acerca de los generadores específicos y las activaciones necesarias para diferenciar eficientemente las mESCs en cardiomiocitos. Segundo, desarrollaremos una lista de las partes así como un mapa detallado de las redes de eventos en cada etapa de la diferenciación para construir una perspectiva de la biología de sistemas en la diferenciación. Tercero y más importante, proporcionaremos el cuadro cuantitativo para localizar las respuestas y los estímulos, como por ejemplo fenotipos en la cardiogénesis. Finalmente,

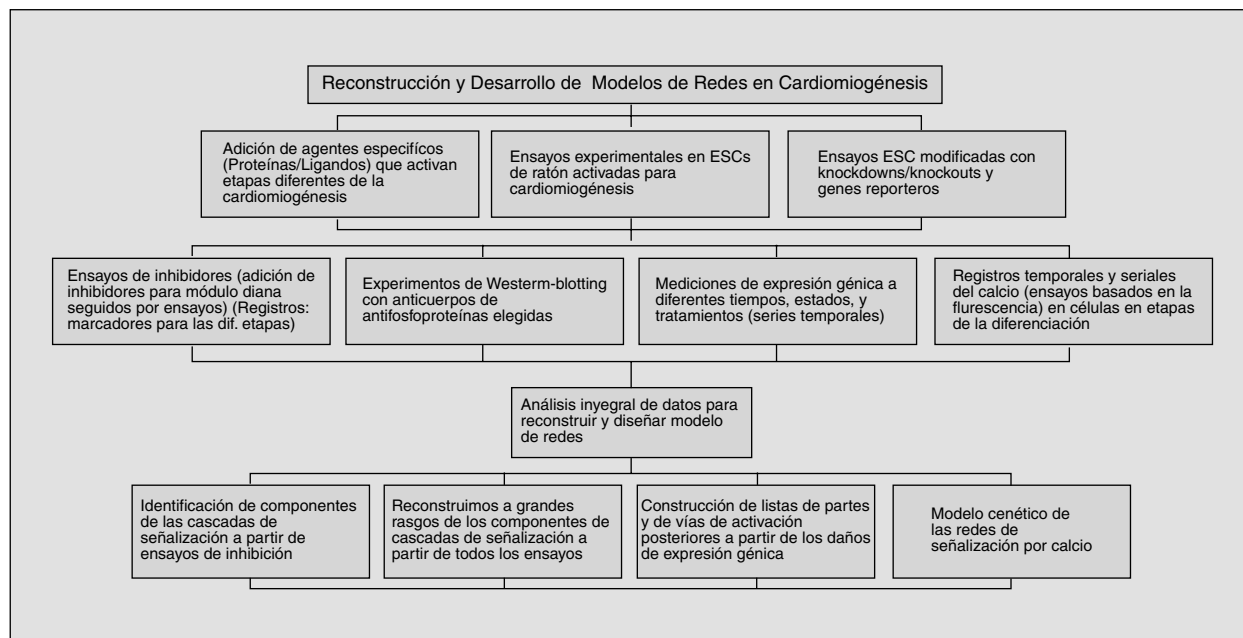


Figura 1. Reconstrucción y desarrollo de modelos de redes en cardiogénesis

la identificación de los ligandos y moléculas asociadas con nuestros experimentos proporcionarían atractivas dianas terapéuticas.

IDEA GENERAL DE LA CARDIOGÉNESIS

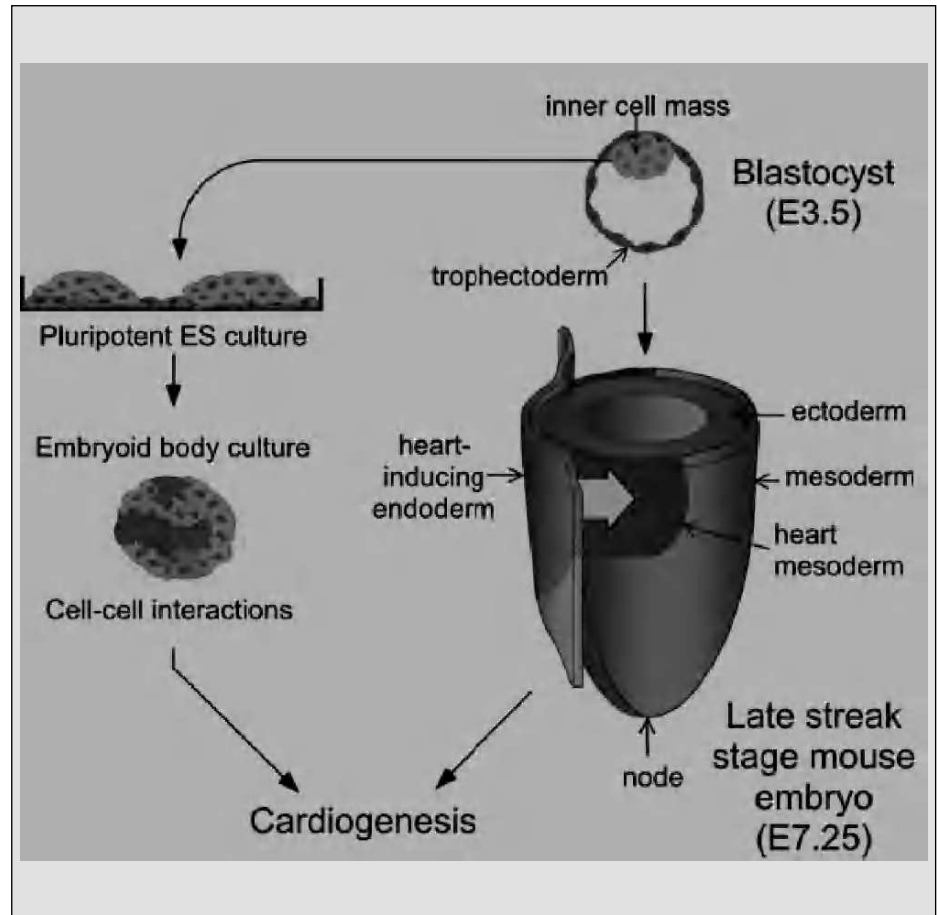
Los experimentos clásicos que comenzaron en la década de 1920 utilizando anfibios, pollos, y posteriormente ratones, localizaron las regiones del mesodermo que dan origen al corazón. Las regiones propuestas como formadoras del corazón, no forman tejido cardíaco cuando se remueven del embrión y se colocan en cultivo, a menos que se transplante junto con otros tejidos que le confieran los estímulos inductivos necesarios. A partir de éstos ensayos de combinación usando primordios cardíacos de corazón de anfibio se consiguió la eventual identificación de la línea central del mesodermo, que da origen a la notocorda y mesodermo de la cabeza^{3,4}, así como al endodermo anterior^{3,5,6}, como potentes fuentes de sustancias inductoras de la formación del corazón. La línea dorsal del mesodermo de los anfibios es conocida como el Organizador de Spemann, que comparte la habilidad de inducir un eje ectópico con el nodo de Hensen en el pollo, el nodo en el ratón y la cubierta embrionaria en el pez cebra. En pollos, las células extraembrionarias del hipoblasto anterior⁷ y el endodermo definitivo anterior^{8,9} inducen la formación del corazón. Las señales iniciadoras en ratón se originan desde el endodermo anterior visceral y definitivo, el cual es extraembrionario y tiene señales de señalización en común con el hipoblasto en pollos y el endodermo profundo en *Xenopus*¹⁰ (fig. 2). De esta manera, los tejidos inductores residen la proximidad del

corazón en desarrollo pero varían entre las especies dependiendo de la anatomía de cada organismo. Las ESCs forman cardiomiocitos espontáneamente cuando se inducen a diferenciarse por agregación. Estos cultivos, denominados cuerpos embrioides (EBs) condensan la diferenciación de los tejidos correspondientes a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) (fig. 2; para revisión, ver referencias^{1,11}). La agregación probablemente reúne las interacciones entre las capas celulares que ocurren durante la embriogénesis normal dando origen a los cardiomiocitos.

VÍAS CELULARES ASOCIADAS CON LA CARDIOGÉNESIS

Las moléculas capaces de inducir la formación de tejido cardíaco han sido revisadas^{1,2}. El patrón temporal es complejo y algunos de estos factores actúan en etapas tempranas, teniendo que ser reprimidas posteriormente, y reactivadas todavía más tarde. A partir del legado de datos se pueden llegar a algunas conclusiones generales. Comenzando en el embrión en fase de pre-gástrula, la elaboración normal del mesodermo (tejido estriado en el ratón) a lo largo del eje del cuerpo anteroposterior, requiere de señales como el FGF y las vías Nodales (ver ejemplo¹²⁻¹⁸). Los antagonistas Wnt, en particular Dkk1 participan en modelaje del mesodermo a través de la activación del GSK3 β y de la inhibición de la señalización por la Wnt/ β -catenina canónica y de la activación de la proteína del homeodominio Hex¹⁹⁻²¹. Además de estas vías, la cardiogénesis se acentúa por la activación de las vías de señalización Wnt no canónicas. La primera de estas

Figura 2. Comparación de la inducción cardíaca en embriones de ratón y las mESC. Las mESC se derivan de la masa celular interna de embriones preimplantados (~E3.5, arriba). En condiciones de diferenciación, agregados de mESCs, conocidos como cuerpos embrioides (EBs), forman espontáneamente derivados de las tres capas germinales incluyendo un pequeño número de cardiomiocitos. La inducción cardíaca en EBs reitera el proceso de el estadio E7.25 del embrión en el cual el endotelio visceral anterior y el endodermo definitivo inicia la cardiogénesis dentro del mesodermo adyacente a partir del cual se formará el corazón. La mayoría del endodermo en este diagrama se muestra separado; La región inductora del corazón se compone del endodermo anteriovisceral extraembriónico así como del endodermo anterior definitivo^{1,10}.



vías activa la kinasa terminal Jun-N (JNK) y la GTPasa de bajo peso molecular RhoA mientras que la segunda requiere de la liberación de calcio intracelular así como de la activación de fosfolipasa C (PLC) y la proteína kinasa C (PKC)^{22,23}. En las mESCs, la cardiomiogénesis depende de la regulación de las isoformas ζ y ϵ de PKC²⁴. La proteína intracelular Dishevelled modula ambas vías, la canónica y la no canónica, mientras que Strabismus y Naked Cuticle, junto con la PKC y la calmodulina kinasa II (que es también una diana de la vía Wnt/Ca²⁺), inhibe la vía canónica de señalización por β -catenina²⁵⁻²⁸.

Algunos estudios realizados en células de carcinoma de p19 involucran a la vía de señalización canónica Wnt como inductor cardíaco, reflejando su posible papel en los embriones^{29,30}. La paradoja de que los antagonistas y agonistas Wnt sean ambos inductores puede resolverse si ambos funcionan en diferentes momentos, y así el modelo propuesto puede resolver este problema. El miembro de la familia TGF- β , Nodal, y su coreceptor asociado a la membrana, Cripto, son importantes en la inducción cardíaca tanto en embriones como en células mESCs^{31,32}. Las proteínas BMPs, a través de la regulación de Smads, promueve la cardiogénesis en los em-

briones en sinergia con las isoformas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) para extender la región cardiogénica posteriormente³³⁻³⁵. Estudios embriológicos realizados en *Xenopus* sugieren que las BMPs actúan tras el antagonismo de Wnt o de Nodal y son necesarias para mantener la cardiogénesis desde el estadio Nkx2.5³⁶. Las BMPs también estimulan la cardiogénesis de las células mESC^{37,38}, y son necesarias para la diferenciación de las células Sca1⁺, obtenidas a partir de corazón adulto³⁹.

Los segundos mensajeros del tipo de las kinasas, fosfatasa, lipasa, y proteínas activadas por calcio que transducen las señales explicadas anteriormente se ilustran en el dibujo de la figura 3 (fig. 3, adaptada de Puceat y Jaconi⁴⁰). La asociación de estos segundos mensajeros a sus vías y su relación con los iniciadores y con la cascada transcripcional que tiene lugar tras su activación, se ha obtenido en algunos casos a partir de estudios realizados directamente sobre células cardiomiogénicas, sin embargo, en la literatura que puede encontrarse una vasta cantidad de información que asocia estos mismos módulos en otras condiciones. El objetivo principal del presente trabajo es medir el flujo a través de estas vías, usando herramientas cuantitativas.

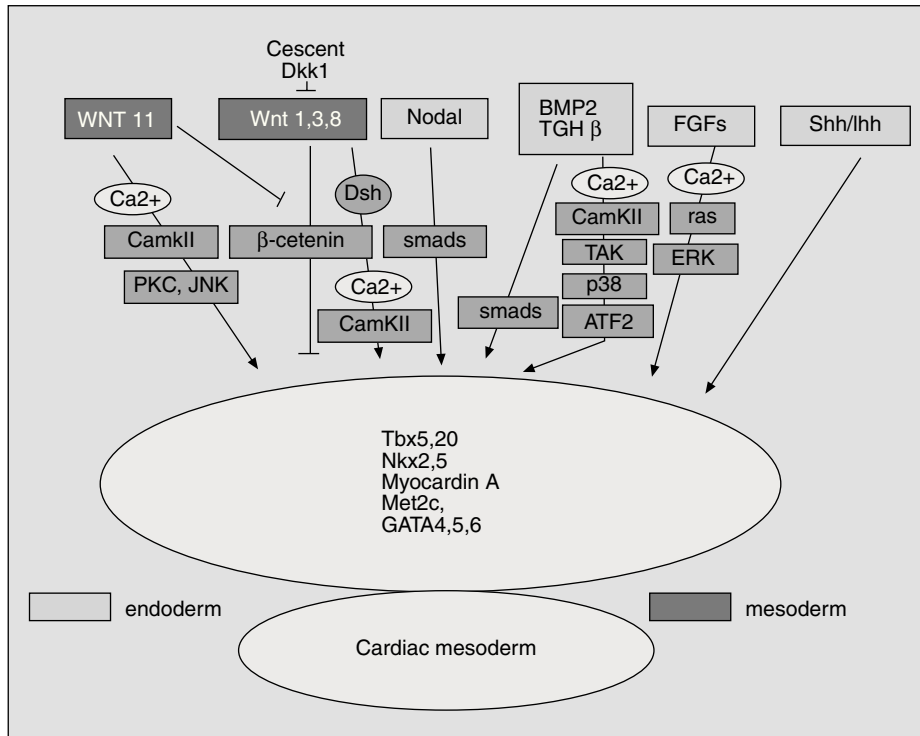


Figura 3. Factores cardiogénicos secretados por el mesodermo o factores de las familias del TGFβ o del FGF liberados por el endodermo, activan las vías de señalización dependientes de Ca²⁺ induciendo la transcripción de factores de transcripción cardíacos. Esto lleva consigo la inducción del campo cardíaco del mesodermo. Adaptado de Puceat y Jaconi⁴⁰.

En la actualidad resulta fácil medir el flujo a través de vías de señalización analizando los estados de fosforilación de los componentes críticos de cada vía, usando reactivos selectivos (anticuerpos fosfo-específicos) y la tecnología de arrays de genes. Además todas estas redes tienen un efecto directo o indirecto sobre las vías de Ca²⁺ a través de las enzimas fosfolipasas, las proteínas G monoméricas o las proteínas que almacenan Ca²⁺ del tipo de la calmodulina. La mayoría de los factores de transcripción cardíacos como el Nkx2.5, Mef2c, GATA4,5,6, miocardina, Tbx5 y Tbx20 han sido implicados en el proceso de cardiogénesis y se modulan directamente por vías de calcio.

Papel del calcio: el calcio desempeña un papel fundamental en la señalización intracelular regulando una gran cantidad de eventos que tienen lugar más adelante en la cascada de señalización y que están implicados en numerosas funciones celulares como la expresión génica, la proliferación celular, la apoptosis y la contracción muscular entre otros muchos. En una célula eucariota la concentración de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_i), es baja (entre 50 - 100 nM), mientras que las concentraciones en el espacio extracelular [Ca²⁺]_o y en el retículo endoplasmático [Ca²⁺]_{ER} son unas 10.000 veces más elevadas⁴¹. Las células utilizan este elevado gradiente de concentración de Ca²⁺ entre los diferentes compartimentos para generar cambios rápidos en la concentración de Ca²⁺ intracelular a través de mecanismos mediados por receptores como son la apertura del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃)-receptor y/o los canales del receptor de rianodina

(RyR) de la membrana del ER, así como los canales que operan en reservorios (SOC) y los canales activados por voltaje o los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje de la membrana plasmática. Las características de la respuesta al Ca²⁺ intracelular en cuanto a su amplitud, duración, o frecuencia de oscilación puede transferir señales diferentes que van a regular varios procesos celulares.

Mishra y Bhalla⁴² han desarrollado un modelo cuantitativo bastante detallado para explicar la señalización por calcio que incorpora los mecanismos de señalización a través de proteínas G, canales IP₃ y la unión del calcio a muchas proteínas del tipo de la calmodulina. Este es un modelo cinético cuantitativo más detallado que existe en la literatura. Actualmente los laboratorios de la Alianza por la Señalización Celular AfCS (el IP de este proyecto es el director del centro de bioinformática del AfCS (<http://www.signaling-gateway.org>), se está realizando el conjunto de experimentos más completo relacionado con la señalización por calcio en las células de macrófago RAW 264.7 (células no excitables).

La literatura aparece repleta de modelos simples de señalización por calcio. Entre otros, De Young y Keizer⁴³ han desarrollado un modelo detallado de la activación/desactivación de los canales IP₃ que posteriormente ha sido simplificado por Li y Rinzel⁴⁴. Sin embargo, ninguno de estos dos modelos considera otros inositol-fosfatos. Hofer y colaboradores⁴⁵ han utilizado también un modelo reducido que utiliza expresiones empíricas simplificadas para la señalización a través de proteínas G y para el flujo del calcio a través de los ca-

nales IP_3 . También han desarrollado un modelo para explicar cómo la liberación de IP_3 puede afectar a células vecinas conectadas a través de uniones gap. Este modelo resulta útil a la hora de predecir la propagación de las ondas de calcio, que son particularmente relevantes a la hora de comprender cuantitativamente la iniciación del ritmo cardíaco. A pesar de que los detalles relacionados con el mecanismo de activación y desensibilización del receptor acoplado a proteínas G (GPCR) han sido presentados en el campo de las proteínas G por varios grupos de investigación, no se incluyen en la mayoría de los modelos de señalización por calcio. Recientemente Lemon y colaboradores⁵⁰ han presentado un modelo de señalización por calcio a través de la proteína heteromérica GPRC en el cual se incluyen algunos detalles referentes a la desensibilización. Estos autores incluyen una descripción de un sólo estado simplificada del metabolismo de IP_3 .

De nuestro conocimiento previo, acerca de los agentes involucrados en la diferenciación cardíaca, destacan dos características principales. En primer lugar, es necesario desarrollar un mapa de señalización de los estados de diferenciación que incluya una explicación sobre las interferencias moleculares. En segundo lugar, no existen dudas acerca del papel de la señalización por calcio en la mayoría de las vías implicadas en este proceso, que incluyen desde la activación de las rutas de la MAPK en estadios tempranos, hasta los estadios más tardíos en los que la contracción requiere un papel directo de la señalización por calcio, y por este motivo, deberíamos ser capaces de crear modelos cuantitativos para explicar la señalización por calcio, utilizando medidas precisas de las concentraciones de calcio en función del tiempo durante todas las fases de la diferenciación. La identificación de las moléculas señalizadoras obtenidas a partir de los experimentos de proteómica, la identificación de las interferencias a partir de las perturbaciones del uso de inhibidores y la identificación de elementos desconocidos mediante el análisis de la expresión génica, podrían integrarse para generar un esquema más detallado de las vías cardiomiogénicas y las medidas de calcio se utilizarían para convertir este modelo en un modelo cuantitativo de la respuesta a estímulos cardiomiogénicos.

USO DE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA COMO MARCADORES DE LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS CARDIOMIOCITOS

Los programas miogénicos y morfogenéticos cardíacos están regulados por cascadas de factores de transcripción (ver revisiones^{51,52}). Dado que estas proteínas controlan etapas concretas dentro del programa de diferenciación, son marcadores ideales a la hora de controlar el progreso de la diferenciación. Así, algunas proteínas como GATA 4,5,6 y los factores de homeo-

minios divergentes Nkx2.5 y Tbx2,5,20 desempeñan un papel importante en la especificación del mesodermo cardiogénico. Ya que estos factores se expresan selectivamente en tejidos cardiogénicos pueden utilizarse como marcadores de precursores comprometidos a células cardíacas. Posteriormente, conforme la diferenciación va progresando el miocardio se caracteriza por la expresión de factores de transcripción del tipo bHLH Hand1,2 y de los represores transcripcionales de bHLH HRT1,2, de las proteínas de homeodominios divergentes de la familia Irx1,2,3,4 así como de Cited1,2 y miocárdina. La expresión de proteínas contráctiles comienza tras la expresión de estas cascadas de factores de transcripción y pueden incluirse como marcadores tempranos de esta fase la cadena pesada de la α -miosina (α MHC) que se expresa en todo el miocardio del tubo cardíaco lineal. Marcadores de identidad de las cámaras son el ANF y la conexina 43 mientras que los marcadores del canal atrioventricular temprano son BMP2 y Tbx2. Conforme el miocardio se va diferenciando y va adoptando identidad de cámara individual, el miocardio ventricular se caracteriza por la expresión de marcadores tardíos, como la cadena ligera de la miosina 2V (MLC2V), por presentar elevados niveles y organización citológica de titina, conexina 43, el canal de calcio SERCA2 y otros canales necesarios para la adquisición de potenciales de acción ventriculares y ondas de calcio contráctiles.

IMPORTANCIA PARA LA BIOMEDICINA

El desarrollo de un modelo cuantitativo para explicar la cardiomiogénesis permitirá sin lugar a dudas comprender en profundidad la etiología de complejos defectos cardíacos congénitos (CHDs). Gracias a su capacidad de tomar en cuenta la interconexión de las rutas de transducción de señales, el desarrollo de un método cuantitativo, aportará explicaciones para comprender las malformaciones que no pueden ser causadas mediante manipulaciones de un único gen en los sistemas experimentales ordinarios. Una investigación de este tipo no sólo tiene importancia en cardiología pediátrica, sino que tiene un significado más profundo en cardiología adulta ya que ofrece la promesa de mejorar las perspectivas de la intervención terapéutica. De este modo, enfermedades cardíacas adultas como la hipertrofia ventricular, reitera las vías moleculares características del desarrollo embrionario, de manera que las predicciones basadas en el desarrollo de modelos cuantitativo y en la experimentación *in vitro* podrían definir dianas que permitan el desarrollo de tratamientos farmacológicos. Además la estimulación de la regeneración de cardiomiocitos a partir de células madre o progenitores es recientemente prioridad mundial. En la actualidad, sin embargo la producción de cardiomiocitos a partir de mESC está en desventaja debido a que el

bajo rendimiento que se obtiene, excluye de momento la consideración de experimentos de este tipo a gran escala con fines clínicos. La regeneración de cardiomiocitos a partir de otras fuentes tampoco ha tenido éxito hasta el momento, en parte debido a la escasez de células madre, pero también debido al escaso conocimiento que existe sobre las moléculas que promueven la diferenciación, supervivencia e integración de estas células en el miocardio dañado. Las rutas modeladas en esta investigación tendrán un impacto directo sobre el desarrollo de los cardiomiocitos.

A lo largo de las dos últimas décadas se ha realizado un progreso enorme en lo que se refiere a la definición muchos componentes de vías de señalización y componentes de las cascadas de factores de transcripción que controlan la diferenciación de los miocardiocitos. Este trabajo ha podido ser terminado prácticamente en su totalidad ya que las principales vías y factores han sido ya descubiertos llegarán a comprenderse en un futuro próximo gracias a los avances en la tecnología genómica y proteómica. Llegados a este punto el principal desafío es comprender la complejidad de las redes en las que estas moléculas operan. El método tradicional consistente en manipular un sólo gen o un pequeño número de moléculas y evaluar el efecto neto que estas manipulaciones ejercen sobre la diferenciación es realmente ineficaz a la hora de proporcionar información relevante que ayude a explicar las complejas interacciones que subyacen tras el desarrollo de los cardiomiocitos. Por este motivo estamos desarrollando un sistema de modelaje cuantitativo complementado con el análisis y el refinamiento experimental de los modelos. La investigación acerca de estas redes es de gran importancia ya que ofrecerá conocimiento a nivel de redes y rutas sobre los defectos cardíacos y hará posible la producción de cardiomiocitos con fines regenerativos, toxicológicos y todo tipo de fines clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Foley A, Mercola M. Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:121-5.
- Solloway MJ, Harvey RP. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res*. 2003;58:264-77.
- Nascone N, Mercola M. An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development*. 1995;121:515-23.
- Sater AK, Jacobson AG. The role of the dorsal lip in the induction of heart mesoderm in *Xenopus laevis*. *Development*. 1990;108:461-70.
- Fullilove SL. Heart induction: distribution of active factors in newt endoderm. *J Exp Zool*. 1970;175:323-26.
- Jacobson AG. Influences of ectoderm and endoderm on heart differentiation in the newt. *Dev Biol*. 1960;2:138-54.
- Yatskievych TA, Ladd AN, Antin PB. Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of the hypoblast and activin. *Development*. 1997;124:2561-70.
- Schultheiss TM, Xydias S, Lassar AB. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development*. 1995;121:4203-14.
- Sugi Y, Lough J. Anterior endoderm is a specific effector of terminal cardiac myocyte differentiation of cells from the embryonic heart forming region. *Developmental Dynamics*. 1994;200:155-62.
- Arai A, Yamamoto K, Toyama J. Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. *Developmental Dynamics*. 1997;210:344-53.
- Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res*. 2002;91:659-61.
- Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn R. Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*. 1993;361(6412):543-7.
- Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, Barth KS, Kispert A, Herrmann B et al. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development*. 1994;120:1919-28.
- Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell*. 1998;92:797-808.
- Hrabe de Angelis M, Kirchner C. Fibroblast growth factor induces primitive streak formation in rabbit pre-implantation embryos in vitro. *Anat Embryol (Berl)*. 1993;187:269-73.
- Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev*. 1999;13:1834-46.
- Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*. 2001;1:37-49.
- Riese J, Zeller R, Dono R. Nucleo-cytoplasmic translocation and secretion of fibroblast growth factor-2 during avian gastrulation. *Mech Dev*. 1995;49:13-22.
- Foley AC, Mercola M. Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev*. 2005;19:387-96.
- Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*. 2001;15:304-15.
- Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev*. 2001;15:316-27.
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol*. 2003;161:769-77.
- Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*. 2002;418(6898):636-41.
- Zhou X, Quann E, Gallicano G.I. Differentiation of nonbeating embryonic stem cells into beating cardiomyocytes is dependent on downregulation of PKC beta and zeta in concert with upregulation of PKC epsilon. *Dev Biol*. 2003;255:407-22.
- Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS et al. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and tricho-

- mes [erratum appears in *Plant J* 2001 Mar;25(5):593]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:5328-33.
26. Kuhl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ signaling. *Mech Dev*. 2001;106:61-76.
 27. Darken RS, Scola AM, Rakeman AS, Das G, Mlodzik M, Wilson PA. The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *Embo J*. 2002;21:976-85.
 28. Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol*. 2002;4:20-5.
 29. Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. A Wnt- and beta-catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5834-9.
 30. Naito AT, Akazawa H, Takano H, Minamino T, Nagai T, Aburatani H et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res*. 2005;97:144-51.
 31. Xu C, Liguori G, Adamson ED, Persico MG. Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol*. 1998;196:237-47.
 32. David NB, Rosa FM. Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signaling. *Development*. 2001;128:3937-47.
 33. Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL, Zhu, X. Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precordial embryonic mesoderm. *Dev Biol*. 1996;178:198-202.
 34. Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev*. 2000;91:259-70.
 35. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:451-62.
 36. Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol*. 2000;224:226-37.
 37. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J*. 2002;16:1558-66.
 38. Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H et al. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*. 2004;68:691-702.
 39. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:12313-8.
 40. Puceat M, Jaconi M. Ca2+ signalling in cardiogenesis. *Cell Calcium*. 2005;38:383-9.
 41. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:517-29.
 42. Mishra J, Bhalla US. Simulations of inositol phosphate metabolism and its interaction with InsP(3)-mediated calcium release. *Biophys J*. 2002;83:1298-316.
 43. De Young GW, Keizer J. A single-pool inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in Ca2+ concentration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:9895-9.
 44. Li YX, Rinzel J. Equations for InsP3 receptor-mediated [Ca2+]i oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin-Huxley like formalism. *J Theor Biol*. 1994;166:461-73.
 45. Hofer T, Venance L, Giaume C. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J Neurosci*. 2002;22:4850-9.
 46. Hoffman JF, Linderman JJ, Omann GM. Receptor up-regulation, internalization, and interconverting receptor states. Critical components of a quantitative description of N-formyl peptide-receptor dynamics in the neutrophil. *J Biol Chem*. 1996;271:18394-404.
 47. Riccobene TA, Omann GM, Linderman JJ. Modeling activation and desensitization of G-protein coupled receptors - Provides insight into ligand efficacy. *J Theor Biol*. 1999;200:207-22.
 48. Woolf PJ, Linderman JJ. Untangling ligand induced activation and desensitization of G-protein-coupled receptors. *Biophys J*. 2003;84:3-13.
 49. Yi TM, Kitano H, Simon M. A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle; *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10764-9.
 50. Lemon G, Gibson WG, Bennett MR. Metabotropic receptor activation, desensitization and sequestration-I: modelling calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate dynamics following receptor activation. *J Theor Biol*. 2003;223:93-111.
 51. Olson EN. A genetic blueprint for growth and development of the heart. *Harvey Lect*. 2002;98:41-64.
 52. Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 2002;90:509-19.