

Biología Molecular y Celular. Volumen II

**Biomedicina**



**Biología Molecular y Celular.  
Volumen II**

**Biomedicina**

Juan Peragón Sánchez y M.<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros (eds.)



Biología Molecular y Celular. Volumen 2, Biomedicina /  
Juan Peragón Sánchez y M<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros  
(eds.) -- Jaén : Editorial Universidad de Jaén, 2019. --  
(Ciencias Experimentales. Avances recientes ; 2)

234 p. ; 17 x 24 cm

ISBN 978-84-9159-188-7

1. Biología molecular I. Peragón Sánchez, Juan , ed.lit.  
II. Peinado Herreros, María de los Ángeles, ed.lit. III. Jaén.  
Editorial Universidad de Jaén, ed.  
577.2

Esta obra ha superado la fase previa de evaluación externa realizada por pares mediante el sistema de doble ciego

COLECCIÓN: Ciencias Experimentales

Directora: M.<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros

SERIE: *Avances recientes*, 2

© Autores

© Universidad de Jaén

Primera edición, marzo 2019

ISBN: 978-84-9159-188-7

Depósito Legal: J-135-2019

EDITA

Editorial de la Universidad de Jaén  
Vicerrectorado de Proyección de la Cultura y Deportes  
Campus Las Lagunillas, Edificio Biblioteca  
23071 Jaén (España)  
Teléfono 953 212 355  
web: [editorial.ujaen.es](http://editorial.ujaen.es)



[editorial@ujaen.es](mailto:editorial@ujaen.es)

DISEÑO Y MAQUETACIÓN  
Yerro Servicios Editoriales

IMPRESO

Gráficas «La Paz» de Torredonjimeno, S. L.

Impreso en España/*Printed in Spain*

«Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, [www.cedro.org](http://www.cedro.org)) si necesita fotocopiar, escanear o hacer copias digitales de algún fragmento de esta obra».

# Prólogo

La investigación que se realiza actualmente en las áreas de Biología Molecular y Celular está orientada hacia la lucha contra los principales problemas sanitarios de nuestra sociedad y hacia la obtención de nuevas herramientas tecnológicas con proyección en el ámbito farmacéutico-sanitario, agrícola, ganadero, industrial y ambiental. Esto ha dado lugar al nacimiento y desarrollo de la Biomedicina y de la Biotecnología. El objetivo de esta obra es doble, en primer lugar, difundir la investigación que se realiza en estos campos en nuestra universidad y entidades colaboradoras y, en segundo lugar, escribir un texto que pueda servir como referencia para los alumnos del Máster Universitario en Biotecnología y Biomedicina por la Universidad de Jaén.

Este volumen está dedicado a la Biomedicina y en él se tratan temas de mucho interés relacionados con la patología cardiovascular, envejecimiento, enfermedades infecciosas, neuroendocrinología, cáncer colorrectal y la insuficiencia placentaria, haciéndose hincapié en la contribución particular realizada en cada campo por investigadores de los grupos implicados en nuestro máster.

En el primer capítulo de este volumen se resume el desarrollo y regeneración del músculo estriado y la contribución del grupo de la Dra. Amelia E. Aránega Jiménez al conocimiento de la función del factor de transcripción Pitx2 en este proceso y su relación con patologías cardíacas como la fibrilación auricular.

El segundo capítulo está dedicado a las bases biológicas del envejecimiento y su relación con la aparición de enfermedades y su prevención. Se explica lo que se conoce sobre las bases moleculares implicadas y la contribución del grupo de la Dra. M.<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros relativa a la función de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en este proceso.

En el tercer capítulo, el grupo del Dr. Antonio Caruz Arcos resume la relación entre la genética y la predisposición a enfermedades infecciosas. Se muestran las diferentes estrategias experimentales para identificar polimorfismos genéticos asociados a enfermedades virales, bacterianas o parasitarias, y su aplicación en el tratamiento, diagnóstico y prevención de estas enfermedades.

En el cuarto capítulo, el grupo del Dr. Manuel Ramírez Sánchez se centra en las bases de la neuroendocrinología clínica y su implicación en las enfermedades

neurodegenerativas, cardiovasculares y obesidad, enfatizando en la función de las enzimas proteolíticas y en su papel en la regulación de la actividad de neuropéptidos y neurohormonas.

A continuación, en el quinto capítulo, el Dr. Antonio Fernández Suárez aborda los procedimientos de diagnóstico y seguimiento clínico del cáncer colorrectal, haciendo hincapié en los métodos no invasivos, en concreto en la descripción de los principales marcadores tumorales, estudios genéticos y las nuevas metodologías utilizadas.

Por último, en el sexto capítulo, el Dr. Daniel Fatela Cantillo y colaboradores describen los factores que predisponen a la preeclampsia y diabetes mellitus gestacional en el primer trimestre del embarazo poniendo especial interés en su manejo clínico y en la aplicación de las herramientas diagnósticas basadas en la Biología Molecular.

Como editores de esta obra esperamos que sea útil a los objetivos propuestos, subrayando muy especialmente la contribución de los Grupos de Investigación de la Universidad de Jaén al conocimiento y difusión de la ciencia en un campo de tanto interés y actualidad como es el de la Biomedicina.

*Juan Peragón Sánchez, María Ángeles Peinado (Eds)*

# Índice

Contribución del factor de transcripción Pitx2 durante el desarrollo y la regeneración del músculo estriado .....	11
Introducción .....	12
Regulación transcripcional del desarrollo cardiovascular .....	13
Mecanismos moleculares del desarrollo muscular esquelético.....	14
El factor de transcripción Pitx2 .....	15
Pitx2 en el desarrollo y la homeostasis cardiovascular .....	16
Pitx2 en arritmogénesis cardiovascular .....	18
Pitx2 en el desarrollo y la homeostasis del músculo esquelético .....	21
Conclusiones y perspectivas .....	22
Bibliografía.....	23
Bases biológicas del envejecimiento: una mirada desde la gerociencia.....	37
Introducción: biogerontología y gerociencia.....	39
Envejecimiento y niveles de organización en los metazoos.....	40
Las teorías sobre el envejecimiento sientan las bases biológicas del proceso.....	41
<i>El envejecimiento actúa desde el nivel subcelular hasta el nivel de organismo .....</i>	<i>43</i>
Mecanismos biológicos del envejecimiento.....	45
<i>Los daños al genoma integran el principal conjunto de factores primarios que afectan al envejecimiento .....</i>	<i>45</i>
<i>El mantenimiento de un proteoma sano permite aumentar la esperanza de vida y la salud .....</i>	<i>49</i>
<i>La producción de especies reactivas de oxígeno y la disfunción mitocondrial inducen envejecimiento .....</i>	<i>51</i>
<i>La homeostasis de nutrientes y el mantenimiento del estado energético celular son fundamentales para preservar la salud y aumentar la longevidad.....</i>	<i>53</i>
<i>La senescencia celular, junto al agotamiento de progenitores y al deterioro de la comunicación, intercelular induce envejecimiento .....</i>	<i>55</i>
<i>Tratamientos anti-envejecimiento.....</i>	<i>58</i>
Bibliografía.....	59

Genética humana y enfermedades infecciosas.....	67
Introducción .....	68
Variabilidad funcional del genoma humano .....	69
<i>SNPs</i> .....	71
<i>INDELS</i> .....	73
<i>Inserción diferencial de elementos transponibles</i> .....	74
<i>Variación del número de copias y otros polimorfismos estructurales</i> .....	78
Tecnologías para el estudio de la variabilidad del genoma .....	82
<i>Técnicas de bajo rendimiento</i> .....	82
<i>Técnicas de rendimiento medio</i> .....	85
<i>Técnicas de alto rendimiento</i> .....	88
Correlación genotipo-fenotipo.....	90
<i>Selección de casos y controles y estimación de potencia</i> .....	91
<i>Selección de las variantes génicas</i> .....	93
<i>Estrategias de análisis de datos</i> .....	95
<i>Limitaciones de los estudios de asociación genética</i> .....	96
Estudios funcionales y determinación del efecto fenotípico de la variación génica ..	97
<i>De la asociación estadística a la variante causal</i> .....	98
<i>Modelos experimentales para las validaciones funcionales</i> .....	102
Genética humana, descubrimiento de biomarcadores y nuevas dianas terapéuticas: casos de éxito .....	104
Conclusiones.....	107
Bibliografía.....	108
Avances en neuroendocrinología clínica: papel de los neuropéptidos y su regulación proteolítica .....	117
Historia.....	118
Neuropéptidos .....	120
<i>Coexistencia de neurotransmisores en una misma neurona</i> .....	120
<i>Funcionalidad de neuropéptidos y neuropeptidasas</i> .....	121
Técnicas utilizadas en neuroendocrinología .....	123
<i>Arilamidas</i> .....	125
Neuroendocrinología.....	127
<i>Interacción central y periférica en condiciones fisiológicas y patológicas</i> .....	127

Neuroendocrinología de la enfermedad de Parkinson.....	131
Neuroendocrinología de las enfermedades cardiovasculares .....	133
Neuroendocrinología de la obesidad .....	134
<i>Papel del hipotálamo en la regulación de la ingesta de alimento</i> .....	135
Conclusión.....	136
Bibliografía.....	137
Detección del cáncer colorrectal desde el laboratorio clínico mediante procedimientos no invasivos .....	143
Introducción .....	144
Marcadores tumorales serológicos clásicos .....	145
<i>Estrategias para optimizar el uso de los marcadores tumorales tradicionales</i> .....	147
Marcadores serológicos de proliferación, inflamación y angiogénesis .....	149
<i>Piruvato quinasa tumoral M2 plasmática (M2-PK)</i> .....	149
<i>Citoquinas inflamatorias (IL-6)</i> .....	151
<i>VEGF</i> .....	151
Marcadores fecales .....	152
<i>Sangre oculta en heces (cribado poblacional)</i> .....	152
<i>Piruvato quinasa tumoral M2 fecal</i> .....	153
<i>ADN fecal</i> .....	154
<i>Calprotectina</i> .....	155
Marcadores de protección y riesgo .....	156
<i>Diabetes y hemoglobina glicada</i> .....	156
<i>Deficiencia de vitamina D</i> .....	156
<i>Microbiota intestinal</i> .....	157
Marcadores genéticos en el cáncer colorrectal familiar.....	158
<i>Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC)</i> .....	164
<i>Poliposis adenomatosa familiar (gen APC)</i> .....	167
<i>Nuevos síndromes de predisposición hereditaria al cáncer colorrectal:</i> <i>POLE y POLD1</i> .....	167
<i>Reflexiones acerca de los estudios genéticos en CCR hereditario</i> .....	167
Nuevas metodologías.....	168
<i>Células tumorales circulantes</i> .....	168
<i>RNA no codificante</i> .....	169
Bibliografía.....	169

Biomarcadores de insuficiencia placentaria y estrés oxidativo para el cribado de la preeclampsia y diabetes mellitus gestacional en primer trimestre del embarazo .....	183
Introducción .....	184
Preeclampsia .....	185
<i>Definición y epidemiología</i> .....	185
<i>Fisiopatología</i> .....	188
Diagnóstico de preeclampsia .....	190
<i>Biomarcadores de utilidad en la preeclampsia</i> .....	192
<i>Utilidad de la ratio sFlt-1 /PlGF en la preeclampsia</i> .....	195
Manejo clínico de la gestante con preeclampsia .....	201
Diabetes mellitus gestacional .....	202
<i>Definición y epidemiología</i> .....	202
<i>Fisiopatología</i> .....	204
Diagnóstico de diabetes mellitus gestacional .....	205
<i>Biomarcadores de utilidad en DMG</i> .....	207
Manejo clínico de la gestante con diabetes mellitus gestacional .....	212
<i>Complicaciones de la diabetes gestacional</i> .....	213
<i>Manejo clínico del embarazo</i> .....	214
<i>Tratamiento</i> .....	216
<i>Control del parto</i> .....	216
<i>Control puerperal</i> .....	218
Abreviaturas .....	218
Bibliografía.....	219

# Contribución del factor de transcripción Pitx2 durante el desarrollo y la regeneración del músculo estriado

Amelia E. Aránega, Estefanía Lozano-Velasco, Francisco Hernández-Torres, Houria Daimi, Daniel Vallejo-Pulido, Jorge N Domínguez Macías, Diego Franco<sup>a</sup>

Grupo de Estudios Cardiovasculares, Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén. Jaén

<sup>a</sup> dfranco@ujaen.es

## Resumen

El desarrollo del sistema cardiovascular es un proceso complejo, en el cual distintas poblaciones celulares convergen en la línea media del embrión desarrollando un tubo cardíaco lineal que rápidamente sufre una torsión hacia la derecha y va configurando las cámaras auriculares y ventriculares a la vez que se tabica en regiones sistémicas y venosas. El músculo estriado esquelético del tronco y las extremidades deriva del miotomo, migrando hacia distintas partes del embrión para finalmente configurar los distintos músculos estriados mientras que el músculo esquelético craneal se origina a partir del mesodermo anterior. Las células musculares estriadas esqueléticas y cardíacas muestran grandes similitudes morfológicas y estructurales, si bien los procesos genético-moleculares que determinan la formación del músculo cardíaco y esquelético divergen bastante.

El factor de transcripción Pitx2 está codificado por un gen homeobox que interviene en el desarrollo tanto del músculo cardíaco como del músculo esquelético. En los últimos años nuestro grupo de investigación ha disecionado el papel funcional de Pitx2 tanto en el desarrollo cardíaco como en la musculatura esquelética. Pitx2 juega un papel esencial regulando múltiples canales iónicos y su falta de función provoca procesos arritmogénicos. En el músculo esquelético Pitx2 juega un papel controlando la proliferación y la diferenciación en células madre adultas del músculo es-

triado. En este capítulo abordamos el papel funcional del factor de transcripción Pitx2 en el desarrollo y patología del músculo estriado.

Palabras clave: Pitx2, regulación transcripcional, desarrollo cardiovascular, arritmogenesis, microRNAs.

## Abstract

*Cardiovascular development is a tightly regulated morphogenetic process involving distinct cell subpopulations that converge into the embryonic midline forming a linear straight cardiac tube that subsequently bends rightwardly as the atrial and ventricular chambers are formed and separated into systemic and venous components. Limb and body trunk skeletal striated muscles are derived from the myotome, migrating towards distinct embryonic regions and configuring different muscle packages whereas the cranial striated muscle are derived from the anterior mesoderm. Striated cardiac and skeletal muscle cells display a large array of morphological and structural similarities, yet the molecular mechanisms determining the formation of the skeletal and cardiac muscle is highly divergent.*

*The homeobox transcription factor Pitx2 is involved in both cardiogenesis and myogenesis. Over the last years, we have dissected the functional role of Pitx2 both in cardiac and skeletal muscle development. Pitx2 plays a fundamental role controlling the expression of multiple ion channels and its loss-of-function results in cardiac arrhythmic events. In skeletal muscles, Pitx2 plays a key role regulating cell proliferation and myogenic differentiation in adult skeletal muscle satellite cells. In this chapter we will summarise our current understanding of the functional role of the homeobox transcription factor Pitx2 during striated muscle development and disease.*

Key words: *Pitx2, transcriptional regulation, cardiovascular development, arrhythmogenesis, microRNAs.*

## Introducción

El desarrollo del corazón es un proceso morfogénico complejo. Las primeras fases de desarrollo se inician mediante la formación de dos subpoblaciones celulares a cada lado del embrión en desarrollo (García-Martínez y Shoenwolf, 1992, 1993). Estas dos subpoblaciones se unen en la línea media para formar

un tubo cardíaco primitivo, el cual sufre invariablemente una torsión a la derecha, configurando así el corazón embrionario (de Jong *et al.*, 1992, 1993). Posteriormente, el corazón embrionario desarrolla dos cámaras auriculares y dos ventriculares, y se produce a su vez la septación de ambas cámaras (Moorman y Christoffels, 2003). El corazón adulto muestra finalmente dos cámaras auriculares y dos cámaras ventriculares, derecha e izquierda, respectivamente (Franco *et al.*, 2000), teniendo cada una de ellas un tracto de entrada y un tracto de salida independientes (Anderson *et al.*, 2003ab; Moorman *et al.*, 2003). A su vez, el corazón en desarrollo se dota de un sistema especializado de conducción, el sistema de conducción cardíaco, que le permite sincronizar los procesos de contracción y dilatación de las cámaras cardíacas (Moorman y Lamers, 1994; Moorman *et al.*, 1998). A nivel histológico, el corazón está compuesto de tres capas celulares: una capa interna, el endocardio; una capa media, el miocardio, y una capa externa, el epicardio (Moorman y Christoffels, 2003).

El músculo esquelético del tronco y de las extremidades se desarrolla mayoritariamente a partir de un conjunto de células derivadas de los somitos. Estas células se configuran en el miotomo y adquieren en este contexto las señales de especificación hacia el linaje muscular esquelético (Buckingham y Rigby, 2014). Posteriormente van a iniciar un proceso de migración celular, para situarse, de este modo, en sus correspondientes destinos finales (Buckingham y Rigby, 2014). En contraposición a los músculos esqueléticos troncales, los músculos craneales no derivan de los somitos, sino que se originan a partir del mesodermo anterior (Michailovici *et al.*, 2015), adquiriendo finalmente un proceso de especificación y diferenciación semejante, aunque no exactamente igual que el acontecido en los músculos derivados de los somitos.

## Regulación transcripcional del desarrollo cardiovascular

En los últimos años, nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo del corazón y del músculo esquelético se han incrementado de forma exponencial. En el contexto cardíaco, los mecanismos de especificación del mesodermo lateral hacia precursores cardíacos vienen determinados por factores de crecimiento de la familia de los Bmps y Fgfs, actuando señales del tipo Wnt como represoras en este contexto (López-Sánchez *et al.*, 2002, 2009; López-Sánchez y García-Martínez, 2011). El inicio del linaje celular cardiomiogénico se produce con la expresión de factores de transcripción tales como Nkx2.5, Mef2c y Gata4 (Srivastava, 2006; Cordes y

Srivastava, 2009). Una vez iniciado este proceso de determinación celular, el corazón tiene que ir adquiriendo una morfología distinta en cada una de las regiones cardíacas. En este contexto, distintos miembros de la familia Tbox de factores de transcripción, tales como Tbx1 (región arterial), Tbx2 y Tbx3 (futuro sistema de conducción), Tbx5 (formación del septo interventricular), Tbx18 (epicardio) y Tbx20, juegan un papel esencial (Greulich *et al.*, 2011).

El factor de transcripción Pitx2 es bastante llamativo, pues su expresión embrionaria se inicia antes de la formación del corazón, se mantiene en el corazón embrionario primitivo e incluso posteriormente, durante el periodo fetal, neonatal y adulto (Campioni *et al.*, 1999, 2002; Hernández-Torres *et al.*, 2016). Otra de las peculiaridades de este factor de transcripción es su perfil dinámico de expresión a lo largo del desarrollo y en concreto la adquisición de una expresión diferencial derecha-izquierda, como veremos en los próximos subcapítulos (Logan *et al.*, 1998; Campione *et al.*, 1999). A continuación describiremos el papel del factor de transcripción Pitx2 durante la cardiogénesis y su implicación en procesos fisiopatológicos, así como en la regeneración cardíaca.

## Mecanismos moleculares del desarrollo muscular esquelético

El desarrollo de la musculatura esquelética del tronco y de las extremidades se produce a partir de los somitos, que son estructuras transitorias del mesodermo paraxial que se configuran por pares a lo largo del tubo neural y que siguen un proceso antero-posterior de formación y maduración. Inicialmente el somito es una unidad esférica de células epiteliales, que rápidamente se subdivide en dos porciones, una ventral que adquiere características mesenquimales, el esclerotomo, y una dorsal epitelial que se denomina dermomiótomo. A partir del dermomiótomo se inicia una delaminación por ambos extremos, dando lugar así a los precursores miogénicos de la musculatura hipoaxial (dorsal) y epaxial (ventral). Estos procesos conllevan procesos de transición epitelio-mesenquima (EMT) (Buckingham y Relais, 2015).

A nivel molecular, los factores de transcripción Pax3 y Myf5 juegan un papel esencial en la determinación del linaje miogénico. Pax3 se expresa en el mesodermo presomítico y, al configurarse los somitos, queda progresivamente restringido al dermomiótomo (Schubert *et al.*, 2001; Goulding *et al.*, 1991) y mantiene su expresión incluso cuando los precursores miogénicos se delaminan del dermomiótomo para migrar hacia su destino final. La activación del

programa de diferenciación miogénica se produce con la expresión de genes de determinación tales como Myf5/Myf6 y MyoD.

La activación en las regiones epaxial difiere respecto a las regiones hipoaxiales. En la región epaxial, la activación de Myf5 es dependiente de la señalización de Wnt y Shh, pero independiente de Pax3 o Pax7 (Buckingham y Relaix, 2015). Estas células no activan MyoD, sino MyoG, y entonces inician su diferenciación. Por el contrario, la activación de Myf5 en la región hipoaxial es dependiente de Pax3 (Bajard *et al.*, 2006; Buckingham y Relaix, 2015). MyoD se activa con posterioridad a Myf5 y es requerido para diferenciación terminal y fusión de los miotubos (Hu *et al.*, 2008).

Si bien los somitos dan lugar a toda la musculatura troncal, la musculatura craneal deriva del mesodermo anterior y los precursores musculares son poco evidentes hasta que se empiezan a configurar las distintas poblaciones musculares: a) extra-oculares, b) branquiales, c) laringoglosales y d) axiales y nucales (Tzahor, 2015). La determinación genético-molecular de la musculatura craneal difiere sustancialmente de la acontecida en el tronco. La activación de la cascada de determinación miogénica está controlada por distintos factores, que responden de forma diferencial según la región embrionaria en la que acontezca. En el caso de los músculos branquiales, por ejemplo, la activación miogénica depende de Myf5/Myf6/MyoD, mientras que en los músculos oculares se inicia con Myf5/Myf6, pero no puede ser re-emplazada por MyoD (Tajbakhsh y Buckingham, 2000).

## El factor de transcripción Pitx2

El factor de transcripción Pitx2 pertenece a la familia de factores homeóticos. En ratones, Pitx2 presenta tres isoformas que se generan por corte y empalme alternativo (Pitx2a y Pitx2b, respectivamente), así como por el uso de un promotor alternativo (Pitx2c) (Schweickert *et al.*, 2000, 2001) (**Figura 1**). En humanos, se ha descrito una cuarta isoforma (Pitx2D) que carece del dominio de unión a ADN y, por tanto, funciona como una isoforma con efecto dominante negativo (Cox *et al.*, 2002). Cada una de estas isoformas presenta un papel regulador transcripcional diferente (Toro *et al.*, 2003; Ganga *et al.*, 2003).

La expresión de Pitx2 durante el desarrollo embrionario es muy dinámica (Piedra *et al.*, 1998; Campione *et al.*, 1999; Furtado *et al.*, 2011). La primera expresión se observa poco después de iniciarse el proceso de gastrulación mediante la activación del eje derecha-izquierda y, como consecuencia de ello, Pitx2 empieza a expresarse en el mesodermo lateral izquierdo.

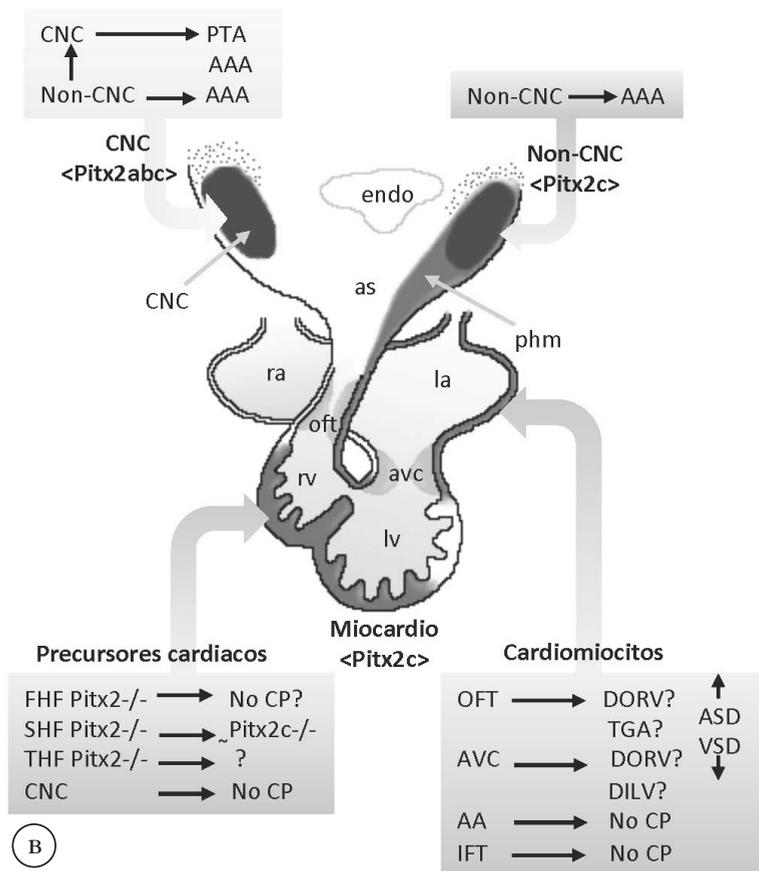
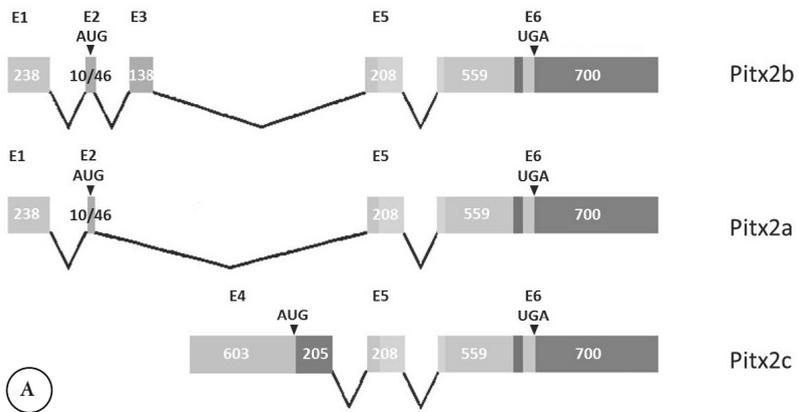


Figura 1. A. Esquema representativo de las tres isoformas de Pitx2. Las isoformas Pitx2a y Pitx2b se transcriben a partir de un promotor aguas arriba del exón 1 y comparten todos los exones excepto el exón E3, que es específico de la isoforma Pitx2b. La isoforma Pitx2c tiene un promotor alternativo aguas arriba del exón 4 y solo comparte los exones E5 y E6 con las otras dos isoformas de Pitx2. B. Esquema representativo del papel de Pitx2 durante el desarrollo cardíaco y su relación con distintas cardiopatías congénitas. La expresión de Pitx2 se encuentra enmarcada en tres tipos celulares distintos: la cresta neural cardíaca (CNC), el mesodermo faríngeo (Non-CNC) y el miocardio. En este último tejido podemos distinguir dos acciones temporales distintas, es decir, en precursores cardíacos y en los cardiomiocitos adultos. La falta de función de Pitx2 en la CNC puede dar lugar a cardiopatías congénitas como alteración en los derivados de los arcos aórticos (AAA) o tronco arterioso permanente (PTA). Estas alteraciones pueden estar, a su vez, condicionadas por la función de Pitx2 en las células del mesodermo faríngeo, dando lugar igualmente a AAA. En el caso del miocardio, el papel de Pitx2 ha sido más profusamente establecido en los cardiomiocitos adultos, dando lugar a un amplio rango de cardiopatías congénitas tales como doble salida de ventrículo derecho (DORV), doble entrada de ventrículo izquierdo (DILV), transposición de grandes vasos (TGA), defectos del septo interatrial (ASD) o interventricular (VSD), respectivamente. Tales cardiopatías congénitas se achacan principalmente a una falta de función de Pitx2 en distintas regiones cardíacas, tales como el tracto de salida (OFT), el canal atrioventricular (AVC), las cámaras auriculares (AA) o el tracto de entrada (IFT). En estas últimas dos regiones, la falta de función de Pitx2 aparentemente no origina ningún tipo de cardiopatía congénita (no CP). En los precursores cardiomiogénicos, el papel de Pitx2 no está tan claramente establecido. En el campo cardíaco primario (FHF) no se han descrito cardiopatías congénitas, que sí están presentes cuando se elimina la función de Pitx2 en el campo cardíaco secundario (SHF), recapitulando los efectos fenotípicos del mutante sistémico Pitx2 (Pitx2c<sup>-/-</sup>). Finalmente, la función de Pitx2 en el tercer campo cardíaco aun no está esclarecida.

Existen múltiples estudios sobre el papel esencial del factor de transcripción Pitx2 en el eje derecha-izquierda en distintas especies (Bisgrove *et al.*, 2000, 2001; Chazzaud *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004; Gaio *et al.*, 1999; Gormley *et al.*, 2003; Hachisuga *et al.* 2015; Ji *et al.*, 2016; Kathuriya *et al.*, 2000; Meno *et al.*, 1998; Meyers *et al.*, 1999; Patet *et al.*, 1999) y en distintos primordios embrionarios, como el sistema digestivo (Dagle *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2008; Essner *et al.*, 2000) o el sistema nervioso central (Essner *et al.*, 2000). En este capítulo centraremos nuestra atención en el papel de Pitx2 en el eje derecha-izquierda durante el desarrollo cardiovascular y su relación con cardiopatías congénitas (Bamford *et al.*, 2000, 2004; Franco *et al.*, 2003). Poco después, la expresión de Pitx2 también se observa en el mesodermo anterior, si bien en esta región no muestra diferencias significativas de expresión entre las porciones derecha e izquierda.

Posteriormente y según avanza el desarrollo embrionario, Pitx2 se expresa en distintos tejidos, tales como en el sistema gastrointestinal, la glándula pituitaria, el ojo embrionario, así como en el corazón y músculo esquelético (Franco y Aránega, 2017).

La generación de mutantes sistémicos deficientes en el factor de transcripción Pitx2 ha demostrado el papel esencial de este factor en distintos procesos morfogénéticos. Los ratones deficientes en Pitx2 muestran alteraciones cardiovasculares, deficiencias en la formación del ojo e incapacidad de cierre abdominal, entre otras alteraciones del desarrollo. Recientemente se han realizado ensayos con ratones mutantes condicionales para analizar con precisión el papel funcional de Pitx2 en distintos tipos celulares. Estos ensayos han permitido determinar el papel primordial de Pitx2 en la formación y desarrollo de distintos tipos neuronales, de la córnea y cristalino en el ojo (Reis *et al.*, 2012; Bohnsack *et al.*, 2012; Branford *et al.*, 2000; Guioli *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004). En este capítulo nos centramos en analizar el papel funcional de Pitx2 durante el desarrollo cardiovascular.

## Pitx2 en el desarrollo y la homeostasis cardiovascular

El papel de Pitx2 es determinante en múltiples etapas del desarrollo del corazón. En los ratones sistémicos deficientes para Pitx2 se observan distintos tipos de cardiopatías congénitas, como doble salida de ventrículo derecho (DORV), defectos de septación ventricular (VSD), isomería atrial derecha (RAI) y alteraciones en el retorno venoso y transposición de grandes vasos (TGA) (Ryan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1999; Gage *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999). Dado que estos mutantes carecen de las tres isoformas, recientemente se han realizado mutantes condicionales específicos para las isoformas Pitx2ab y Pitx2c, respectivamente. El análisis de estos mutantes demostró que la principal isoforma responsable de las cardiopatías congénitas es la isoforma Pitx2c, dado que los mutantes Pitx2ab no muestran alteraciones cardíacas significativas (Liu *et al.*, 2001, 2002). Dada la complejidad en el fenotipo cardíaco observado en los mutantes sistémicos para Pitx2, se han desarrollado distintas estrategias para deleccionar de forma tejida específico la expresión de este factor de transcripción. Pitx2 es esencial para el correcto desarrollo de los arcos faríngeos, controlando la carga hemodinámica diferencial entre las regiones derecha e izquierda (Yashiro *et al.*, 2007). El papel de Pitx2 en el campo cardíaco secundario (Kelly *et al.*, 2003) ha sido demostrado por distintos autores (Ai *et al.*, 2006; Galli *et al.*, 2008), particularmente en el tracto de salida (Kioussi *et al.*, 2002), proceso dependiente de la interacción Tbx1-Pitx2 (Nowotschin *et al.*, 2006). Tessari *et al.* (2006) demostraron, usando la tecnología de escisión génica condicional Cre/LoxP, que la falta de función de Pitx2 en el miocardio temprano

( $\alpha$ MCHCre) condicionaba la mioarquitectura de un conjunto de cardiomiocitos ventriculares, si bien no generaba alteraciones considerables en las cámaras auriculares ni en sus respectivas vías de entrada venosas. Así pues, la falta de función temprana en el miocardio no condicionaba su desarrollo morfogenético, si bien sí presentaba distintos grados de disfunción eléctrica. Posteriormente, se generaron mutantes condicionales en las distintas cámaras cardíacas, atriales y ventriculares (Chinchilla *et al.*, 2011), respectivamente. La falta de función en el miocardio atrial no condicionaba el desarrollo morfogenético del polo venoso, aunque sí existía una dilatación significativa de las cámaras auriculares embrionarias (Chinchilla *et al.*, 2011). De modo semejante, la falta de función en las cámaras ventriculares provoca un incremento significativo en el grosor del septo interventricular, pero sin defectos morfogenéticos más severos. Estos datos revelan el papel esencial y diferencial de Pitx2 en los distintos tipos de cardiomiocitos y ponen de manifiesto que las alteraciones en el eje derecha-izquierda acontecen en estadios de desarrollo aún más tempranos. En ese contexto, el trabajo de Ammirabile *et al.* (2012) demuestra que la pérdida de expresión de Pitx2 en los precursores cardíacos (cTnTCre; es decir, en los cardiomioblastos) es suficiente para provocar defectos morfogenéticos tan severos como la isomería atrial derecha. Mommersteeg *et al.* (2007) demostraron, además, el papel esencial de Pitx2 en la formación de las venas pulmonares y del nódulo sinoatrial.

Dado el papel esencial que Pitx2 muestra durante la cardiogénesis murina, se ha explorado si mutaciones en este factor de transcripción están asociadas con distintas cardiopatías congénitas. Los primeros ensayos en pacientes con transposición de grandes vasos no revelaron mutaciones causativas en Pitx2 (Muncke *et al.*, 2005). Sin embargo, la presencia de variantes raras en el número de copias sí identificó a Pitx2 como posible causante de distintas cardiopatías congénitas (Fakhro *et al.*, 2011). Más recientemente se han identificado mutaciones en Pitx2 asociadas a defectos en la septación auricular (Yuan *et al.*, 2013), formación de los cojines endocárdicos (Zhao *et al.*, 2015), así como en distintas cardiopatías congénitas complejas (Wei *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013), como la Tetralogía de Fallot (Sun *et al.*, 2016). Estos datos refuerzan, por tanto, el papel funcional de Pitx2 durante la cardiogénesis humana, si bien los mecanismos moleculares subyacentes a estas alteraciones congénitas siguen sin estar esclarecidos.

## Pitx2 en arritmogénesis cardiovascular

Además de este papel morfogenético, nuevas evidencias ponen de manifiesto que Pitx2 también tiene un papel esencial en el corazón adulto. Estudios de

asociación de genoma completo han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; *single nucleotide polymorphism*) cercanos a *Pitx2* asociados con fibrilación auricular en humanos (Gujbartson *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que las regiones genómicas que contienen dichos SNPs interactúan de forma diferencial con los promotores de *Pitx2ab* y *Pitx2c* (Aguirre *et al.*, 2015). Análisis genético-moleculares, en cuatro modelos distintos de falta de función, han demostrado que la falta de función de *Pitx2* provoca o favorece (según los modelos) arritmias auriculares en ratones (Wang *et al.*, 2010; Kirchhof *et al.*, 2011; Chinchilla *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2010) demostró que la falta de función de *Pitx2* provocaba una alteración embrionaria en la expresión de *Shox2* y *Hcn4*, lo cual predisponía en el adulto a una mayor predisposición a fibrilación auricular inducida. Kirchoff *et al.* (2011) demostró en mutantes isoforma específico de *Pitx2c* unos resultados similares y además identificó múltiples canales iónicos desregulados en el corazón por la haploinsuficiencia de *Pitx2c*, lo que explicaría la mayor predisposición a la fibrilación auricular inducida. Por el contrario, Chinchilla *et al.* (2011) demostraron que la falta de función de *Pitx2* en las cámaras auriculares era suficiente para desencadenar procesos espontáneos de fibrilación auricular, que eran principalmente debidos a disfunciones electrofisiológicas en el potencial de membrana en reposo y en la fase de despolarización del potencial de acción cardiaca. Estos datos fueron corroborados por Tao *et al.* (2014) usando un modelo transgénico de falta de función de *Pitx2* en el corazón adulto exclusivamente.

Si bien el gen del factor de transcripción *Pitx2* fue el primer gen asociado con fibrilación auricular mediante estudios de asociación genómica global (*genome wide association studies*; GWAS), nuevos estudios en otras poblaciones humanas han identificado nuevas variantes asociadas a fibrilación auricular. Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha analizado en papel regulador de *Pitx2* en relación con estos otros genes asociados a fibrilación auricular. La colaboración entre *Pitx2* y *Tbx5* ha sido puesta de manifiesto recientemente (Nadadur *et al.*, 2016). Nuestros análisis han demostrado que *Pitx2* regula la expresión de *Wnt8* y *Wnt11*, los cuales ejercen un papel esencial en el control de la regulación de múltiples microRNAs involucrados en la regulación de distintos canales iónicos cardiacos, así como de los mismos canales (Lozano-Velasco *et al.*, 2016), en consonancia con datos previos que demostraban el papel regulador de *Pitx2* sobre distintos microRNAs en el contexto de fibrilación auricular (Wang *et al.*, 2014). A su vez, hemos demostrado que *Pitx2* regula también al factor de transcripción *Zfhx3*, si bien su contribución a la arritmogénesis auricular parece ser mínima (Lozano-Velasco *et al.*, 2016). Todo estos datos sugieren un panorama complejo mediante el cual *Pitx2* regula a *Wnt8*/