

Genes del desarrollo y enfermedad cardíaca

Pilar Ruiz-Lozano, Tomoyuki Nakamura y Kenneth R. Chien

Universidad de California, San Diego. EE.UU.

Los últimos 3 años pueden considerarse críticos en el área de la cardiología en cuanto a la comprensión de la relevancia que tienen los genes del desarrollo en la fisiología cardíaca del adulto. Además, se ha demostrado por primera vez que el control endógeno de la muerte celular programada determina la transición entre la respuesta adaptativa normal y la hipertrofia cardíaca. La mayor parte de este trabajo se ha basado en análisis previos que han usado marcadores moleculares de la determinación y diferenciación cardíacas, un trabajo que ha tenido un doble objetivo: en primer lugar, la determinación de los procesos celulares que contribuyen a la especificación del corazón funcionando y, en segundo lugar, la caracterización de los factores reguladores clave en la cardiogénesis. Estos estudios, junto con la disponibilidad de técnicas nuevas, como la mutación de un único gen en ratones transgénicos, han dado lugar a una perspectiva nueva sobre la naturaleza de los defectos cardíacos, tanto de forma como de función. En esta revisión analizamos algunos de los factores clave en la morfogénesis cardíaca desde la perspectiva del análisis de la mutación génica.

Palabras clave: *Morfogénesis cardíaca. Genética. Cardiopatía. Mutación génica. Genes.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1439-1445)

Developmental Genes and Heart Disease

The past three years can be considered in cardiology as critical for understanding the relevance of developmental genes in the adult cardiac physiology. Also, for the first time, endogenous control of programmed cell death has been demonstrated to mark the transition between normal adaptation and cardiac hypertrophy. Most of this work has been based on previous analysis using molecular markers of cardiac determination and differentiation, work that has served a double aim: First, the determination of the cellular process that contribute to the specification of the working heart and secondly, the characterization of key regulatory factors in cardiogenesis. These studies in conjunction with the recent availability of single gene mutation in transgenic mice have furnished a new perspective in the nature of cardiac defects either in shape or function. Here we review some of the key factors in cardiac morphogenesis from the perspective of the analysis of gene mutation.

Key words: *Cardiac morphogenesis. Genetics. Heart disease. Gene mutation. Genes.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 1439-1445)

MORFOGENES CARDÍACOS: EFECTO DE LA VITAMINA A

Desde hace tiempo se sabe que las anomalías dietéticas (ya sea exceso o deficiencia) en la ingesta de vitamina A producen malformaciones embrionarias, que incluyen defectos en la morfogénesis del corazón^{1,2}. La acción de los derivados de la vitamina A (retinoides) está mediada por receptores nucleares que se unen al ADN y controlan directamente la transcripción

de genes diana. Se han caracterizado dos familias de receptores nucleares para el ácido retinoico: RAR y RXR. Los miembros de la familia RAR se activan por la mayor parte de retinoides que se producen fisiológicamente (todo-trans RA, 9-cis RA, 4oxo RA y 3,4 dihidro RA). Por el contrario, los miembros de la familia RXR sólo se activan por el 9-cis RA³.

Además de la multiplicidad de receptores, la complejidad de la señal de retinoides está aumentada por el hecho de que, al menos *in vitro*, los RAR se unen a sus elementos de respuesta afines como heterodímeros con los RXR. Además, los RXR también se pueden unir, *in vitro*, a algunos elementos del ADN como homodímeros, y son parejas heterodiméricas para otros receptores nucleares, como el receptor de la hormona tiroidea, el receptor de la vitamina D, los receptores de peroxisomas activados por la proliferación (PPAR) y un gran número de receptores nucleares huérfanos³⁻⁵.

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

Correspondencia: Dra. P. Ruiz-Lozano.
University of California. School of Medicine.
9500 Gilman Dr. La Jolla, CA 92093-0613. EE.UU.

Los experimentos con animales *knockout* han proporcionado una información importante acerca del papel fisiológico de los receptores retinoides. Las mutaciones en los diversos RAR dan lugar a distintos tipos de deficiencias de vitamina A, como letalidad posnatal, escasa ganancia de peso corporal, esterilidad masculina y defectos oculares⁶. La única mutación de un único gen en un receptor retinoide que produce defectos cardíacos es la RXR-alfa. Los fetos que carecen del gen RXR-alfa presentan una pared ventricular delgada, defectos en el mesénquima de las almohadillas cardíacas, función ventricular deprimida y mueren en el útero por insuficiencia cardíaca^{7,8}. También se ha observado una hipoplasia miocárdica en algunos mutantes del componente RAR, así como en fetos deficientes en vitamina A^{4,6}.

A pesar de la amplia caracterización del mutante RXR-alfa, la principal causa de su cardiopatía sigue siendo desconocida, pero presumiblemente incluye señales paracrinas que están moduladas por retinoides y que residen fuera del músculo ventricular cardíaco. La mutación del RXR restringida al ventrículo no tiene fenotipo⁹, lo que sugiere que las funciones de un compartimento vecino del corazón en desarrollo generan una señal que es necesaria para el desarrollo del miocito cardíaco ventricular y la maduración de la cámara.

Conviene mencionar el hecho de que el miocardio delgado también aparece en una gran variedad de mutaciones génicas, que incluyen genes que no se expresan en el corazón, como el PPAR-gamma. Curiosamente, durante el desarrollo, el gen PPAR-gamma se expresa solamente en la placenta y en el tejido adiposo pardo y la mutación de este gen produce una pared miocárdica delgada. La aparición de miocardio delgado no tiene lugar en embriones tetraploides con placenta normal, lo que sugiere que la proliferación de los miocitos cardíacos está regulada por factores tróficos¹⁰. Además, la búsqueda de la expresión de genes diferenciales en el mutante RXR-alfa permitió encontrar un grupo de genes metabólicos que estaban mal expresados en los embriones mutantes, lo que confirma la existencia de una influencia metabólica sobre el miocardio en desarrollo¹¹. Todavía están pendientes de ser caracterizados los genes regulados por los derivados de la vitamina A que son responsables de la formación del mesénquima de las almohadillas cardíacas y del tracto de salida.

SEÑALES PARACRINAS QUE REGULAN LA FORMACIÓN MIOCÁRDICA

Un número creciente de mediadores biológicos que actúan localmente han sido implicados en la regulación del desarrollo miocárdico, así como en la subsiguiente respuesta adaptativa de crecimiento del músculo cardíaco posnatal al estrés fisiológico.

Además de la acetilcolina y de las aminas biógenas, la mayor parte de estos mediadores son factores de

crecimiento peptídicos que actúan localmente y que están sintetizados por las células musculares cardíacas o por otras células parenquimatosas del corazón, como las células endoteliales de la microvasculatura y el endocardio. Las endotelinas y angiotensinas, por ejemplo, que han demostrado inducir un crecimiento hipertrofico en los miocitos cardíacos^{12,13}, son sintetizadas y liberadas por las células endoteliales de la microvasculatura coronaria.

Otro sistema de señalización de factores de crecimiento que ha sido implicado recientemente en el desarrollo cardíaco es el de las «neuregulinas», una familia de péptidos autacoides de acción local conocida por su importancia en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico. La interrupción dirigida del gen de la neuregulina-1 (NRG1) o de cualquiera de los 2 receptores de neuregulina (ErbB2 o ErbB4) conduce a la muerte durante la embriogénesis media a partir del desarrollo abortado de la trabeculación en el músculo ventricular del miocardio fetal¹⁴⁻¹⁶. Estos trabajos indican que las neuregulinas, liberadas por el endotelio endocárdico, son esenciales para el crecimiento y la adaptación fenotípica de los miocitos cardíacos subyacentes durante el desarrollo.

Si las señales procedentes del endocardio son necesarias para el desarrollo del músculo trabecular cardíaco, trabajos recientes señalan la importancia del tejido epicárdico en la proliferación de la zona compacta cardíaca. Se han descrito defectos cardíacos en varios modelos de ratones mutantes en los cuales estaban afectados el desarrollo o la función del epicardio¹⁷. La alfa-4-integrina es una subunidad del receptor de membrana celular que actúa como mediador entre la matriz extracelular y la célula e interviene en la adhesión célula a célula interaccionando con la fibronectina y la molécula de adhesión vascular celular (VCAM-1). La alfa-4-integrina está producida en el epicardio mientras que la VCAM-1 es segregada por el miocardio. Otras evidencias del papel putativo del epicardio en la formación del miocardio proceden de la mutación de la eritropoyetina y su receptor. La mutación dirigida de la eritropoyetina (EPO) y de su receptor (EPOR)¹⁸ da lugar a letalidad embrionaria con hipoplasia ventricular acoplada a defectos en el septo ventricular. Estas anomalías cardíacas parecen estar ligadas a una disminución en la proliferación celular, que parece ser específica del corazón.

CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL AL DESARROLLO CARDÍACO

Las células que se encuentran en la cresta dorsal del tubo neural en desarrollo sufren una transición epitelial-a-mesénquimal y migran al resto del organismo, donde se diferencian en diversas formas celulares. Estas células se denominan células de la cresta neural y

TABLA 1. Mutaciones de un único gen que causan fenotipos relacionados con la cresta neural

Genes mutados	Expresión	Defectos del arco aórtico	PTA	TGA	DORV o TOF	Defectos del timo	Defectos craneofaciales	Otros	Referencias
Pax3	NC Tubo neural	+	+	-	+	+	+	Letal antes de e13	(54)
ETA o	ETA: NC	+	+	+ (sólo en ETA-/-)	+	+	+		(55)
ET-1 o ECE-1	ET-1: endotelio ECE-1: mesénquima, células endocárdicas								
Sox4	Endocardio del tracto de salida, almohadilla AV	Raro	+	+	+	-	-	Letal en e14 Ventrículo izquierdo hipoplásico	(56-58)
RxRa	NC, miocardio, endocardio, epicardio	-	+	-	+	-	-	Letal en e14 Miocardio delgado, defectos oculares	(59)
Cx43	NC, miocardio	-	-	-	-	+	-	Estenosis pulmonar	(60)
NT-3 o TrkC	NC, miocardio, músculo liso	-	+	-	+	-	-	Estenosis pulmonar, ASD, VSD	(61)
NF-1	NC	-	-	-	+	-	-	Hiperplasia en OT, miocardio delgado	(62)
NMHC-B	NC, miocardio	-	-	-	+	-	-	Estenosis pulmonar, hipertrofia ventricular	
TGF- β 2	Miocito, mesénquima de las almohadillas	Adelgazamiento pared aórtica	-	-	+	-	+		(64)
DHAND	NC Miocardio	+	-	-	-	-	+	Letal en e11 Pérdida de RV	(65)
MFH-1	NC Mesénquima	+	-	-	-	-	+	VSD	(66)
Rae28	NC?	-	-	-	+	+	+	Estenosis pulmonar, VSD	(67)
Síndrome DiGeorge	Tbx-1 (Cromosoma 22q11)	+	+	Raro	+	+	+		(20-22)

llegan a ser nervios periféricos, células pigmentarias de la piel, células musculares lisas, y contribuyen también al timo o a la glándula paratiroidea. La contribución de las células de la cresta neural al desarrollo cardíaco fue reconocida por primera vez por los experimentos de Kirby et al, en 1983, que demostraron que la ablación segmentaria de la cresta neural en embriones de pollo causa defectos conotruncales tales como el *truncus arteriosus* persistente, doble salida del ventrículo derecho y defectos en el arco aórtico.

Como estos defectos se presentan junto con defectos faciales y del timo, los fenotipos en conjunto tienen un gran parecido a una enfermedad congénita humana, el síndrome cardiofacial de DiGeorge, que está causado por una delección homocigótica del cromosoma 22q11. Un estudio de linaje con marcadores¹⁹ también ha revelado que una gran población de células de las almohadillas del tracto de salida se deriva de la cresta neural. La almohadilla del tracto de salida es un tejido extracelular rico en matriz, que se convierte en septo

entre la aorta y la arteria pulmonar y que es responsable de la correcta orientación y conexión de estas grandes arterias con los ventrículos. Aunque las células derivadas del endocardio (endotelio) y las células derivadas de los miocitos cardíacos también contribuyen a la formación de los tejidos de las almohadillas, no sólo el síndrome DiGeorge, sino también la mayor parte de las anomalías del tracto de salida son consideradas como «enfermedades de la cresta neural». Hasta el momento se han identificado muchos genes responsables de la correcta alineación del tracto de salida y del desarrollo del arco aórtico, principalmente por técnicas de modificación génica en ratones. De estos genes, los que son expresados por las células de la cresta neural, o por los tejidos que rodean e interaccionan con las células de la cresta neural, pueden ser considerados como verdaderos genes relacionados con la cresta neural (tabla 1). Muy recientemente se ha descubierto que el *Tbx1* es el gen responsable de la anomalía vascular en el síndrome de DiGeorge²⁰⁻²². Datos experimentales recientes sugieren que el *Tbx1* no se expresa en las células de la cresta neural, pero es necesario para mantener la función de estas células^{21,23,24}. Todavía no se ha esclarecido el mecanismo por el que el *Tbx1* y otros genes que se relacionan en la tabla 1 actúan sobre la migración y/o diferenciación de las células de la cresta neural.

LATERALIDAD CARDÍACA

El plano corporal de los vertebrados exhibe simetría bilateral, mientras que los órganos internos se encuentran localizados asimétricamente en relación con los lados izquierdo y derecho de la línea media. El corazón es el primer órgano que presenta una asimetría izquierda-derecha, ya que gira hacia la derecha de manera temprana durante la embriogénesis. Las anomalías en la disposición de los órganos internos a menudo están asociadas a malformaciones cardíacas congénitas²⁵⁻²⁷. Excepto en el caso de la inversión especular del corazón, la mayor parte de los casos de lateralidad incorrecta dan lugar a disfunciones cardíacas severas²⁸ debidas a la inversión del asa normal (hacia la derecha) del tubo cardíaco inicial o a la indefinición del asa. La discordancia entre el *situs visceral* observado en individuos con heterotaxia sugiere que las vías que determinan el *situs* en los órganos individuales son separables. Sin embargo, algunos defectos de lateralidad en diversos órganos parecen estar asociados, lo que sugiere una especificación coincidente de sus *primordia*. Por ejemplo, el isomerismo auricular izquierdo está asociado al isomerismo bronquial izquierdo, venas cavas anteriores bilaterales y unión auriculoventricular ambigua, pero presenta una unión ventriculoarterial relativamente normal²⁹.

En las aves, las primeras señales de asimetría izquierda-derecha son la expresión del gen nodal (rela-

cionado con el TGF-alfa) en el lado izquierdo del organizador en fases del desarrollo previas a la formación del órgano primordial. La expresión asimétrica del gen nodal activa una cascada de «genes de expresión izquierda» que se encuentra bien conservada en los vertebrados³⁰. El mecanismo que inicia la asimetría izquierda/derecha en los mamíferos ha permanecido sin aclararse hasta muy recientemente, ya que no hay una expresión asimétrica del gen nodal en el nódulo de los mamíferos. Sin embargo, sí que existe en los mamíferos una expresión asimétrica del gen nodal en la hoja lateral izquierda del mesodermo. Las mutaciones en los genes necesarios para la integridad de los cilios han abierto un nuevo campo de investigación en esta área. Las mutaciones producidas en ratones que afectan a los cilios en las células nodales, incluidas las mutaciones de los componentes del complejo de kinesina-II, *KIF3A*³¹ o *KIF3B*³², no sobreviven más allá de la mitad de la gestación, y exhiben asa cardíaca de sentido aleatorio y giro embrionario. La pérdida de los cilios nodales es, por tanto, la anomalía más precozmente detectable en estos embriones y está seguida por una expresión errónea de los genes específicos del lado izquierdo³¹. La existencia de un flujo extraembrionario que es regulado por los cilios nodales se postula como la señal que rompe la simetría bilateral en los mamíferos³³. Estos datos están de acuerdo con el hallazgo en determinados síndromes congénitos (síndrome de Kartagener) de anomalías en el *situs visceral* que están asociadas a defectos en el desarrollo de los cilios³⁴, como las disfunciones respiratorias y de la fertilidad.

Las asimetrías moleculares más precoces en el ratón ocurren después del establecimiento del flujo nodal con la aparición de los miembros nodales de la superfamilia del TGF-alfa y *Lefty-1* en el lado izquierdo adyacente al nódulo^{35,36}. Los patrones aberrantes de la expresión nodal se correlacionan con anomalías del *situs* y la expresión errónea del gen nodal en el lado derecho del embrión produce un *situs* aleatorio^{35,37-40}. Además, la expresión nodal responde al ácido retinoico^{30,41} y, una vez activada, sufre un proceso de autorregulación.

Por debajo del gen nodal existe una «barrera de la línea media» para prevenir la activación de los genes específicos del lado izquierdo en el lado derecho del embrión. En el ratón, el *Lefty-1* se expresa en el lado izquierdo de la placa basal. La mutación del locus del *Lefty-1* produce una expresión ectópica de los genes específicos del lado izquierdo en el lado derecho del embrión⁴², lo que sugiere que la actividad del *Lefty-1* es necesaria para la función de la barrera de la línea media.

La información posicional proporcionada por la cascada de señalización nodal tiene que ser transmitida al órgano primordial. Por debajo del gen nodal, el factor de transcripción *Pitx2* (izquierdo, caja homeótica rela-

cionada con el bicoide) es un buen candidato para proporcionar lateralidad izquierda a los órganos en desarrollo. El Pitx2 ectópico causa defectos de lateralidad en una gran variedad de vertebrados. Además, los ratones deficientes en Pitx2 presentan un asa cardíaca normal pero especificación anormal de los ventrículos izquierdo y derecho, yuxtaposición de las aurículas, malposición de las grandes arterias en el corazón⁴³ e isomerismo pulmonar derecho⁴³⁻⁴⁵, que es consistente con el papel del Pitx2 como determinante de lateralidad izquierda en órganos específicos.

GENES DEL DESARROLLO E INSUFICIENCIA CARDÍACA

Trabajos recientes han demostrado que muchos genes del desarrollo se siguen expresando en el adulto, donde desempeñan papeles específicos y esenciales en el mantenimiento de la función cardiovascular. Estas funciones son, por lo general, desveladas sólo después de que se hayan fenotipificado cuidadosamente los alelos más débiles. Por ejemplo, el producto del gen de la caja homeótica NKX2.5 es necesario para la formación del asa cardíaca, y la mutación nula del gen NKX2.5 produce letalidad embrionaria⁴⁶⁻⁴⁸. Recientemente se ha descubierto un grupo de alelos mutantes del NKX2.5 que causan formas no sindrómicas de enfermedad cardíaca congénita humana, lo que indica que el NKX2.5 es importante para la regulación de la septación durante la morfogénesis cardíaca y para el mantenimiento de la función del nodo auriculoventricular a lo largo de la vida⁴⁸. Otros factores de transcripción se han relacionado recientemente con el correcto desarrollo del sistema de conducción cardíaco. En particular, el gen Sp4/HF1B regula la formación de las fibras ventriculares de Purkinje y la expresión errónea de este gen produce muerte cardíaca súbita⁴⁹.

Mediante la técnica de *knockout* génico se ha conseguido una serie de modelos animales para la insuficiencia cardíaca que incluyen mutaciones en moléculas de señalización, factores de transcripción y proteínas contráctiles. Por ejemplo, el gen MLP es una proteína que se expresa sólo en LIM en músculos estriados terminalmente diferenciados, donde se acumula en estructuras formadas por actina que forman parte de la arquitectura celular. La interrupción del gen MLP en ratones da lugar a una miocardiopatía dilatada con hipertrofia e insuficiencia cardíaca poco después del nacimiento⁵⁰. Los animales mutantes mueren de insuficiencia cardíaca en 2 grupos de edades, alrededor de la segunda semana posnatal (45-65% de penetrancia) y en la edad adulta (100% de penetrancia), con signos manifiestos de agrandamiento cardíaco asociados a la expresión de genes marcadores de miocardiopatía. El fenotipo cardíaco del ratón adulto deficiente en MLP reproduce la clínica de la miocardiopatía e insuficiencia cardíaca, como se demuestra por la expresión génica (aumento del ANF,

alfaactina esquelética y beta-MHC), los estudios ecocardiográficos (aumento de la pared ventricular izquierda, adelgazamiento de la pared, disminución de la función ventricular izquierda) y aumento del peso pulmonar (indicativo de acumulación de fluidos) y disminución de la sensibilidad de la contractilidad y relajación a la estimulación betaadrenérgica. Es importante señalar que la mutación doble de MLP y del inhibidor de la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico específica de músculo (SERCA2a), el fosfolambano, previene el fenotipo de insuficiencia cardíaca encontrado en el ratón MLP-KO⁵¹, lo que sugiere que la regulación de la contractilidad constituye una posible estrategia terapéutica. En este sentido, la proteína LIM asociada a la alfa-actinina (ALP) ejerce un papel esencial en el desarrollo embrionario del ventrículo derecho. La interrupción del gen de ALP se acompaña de una dilatación ventricular derecha y de disfunción, posiblemente como consecuencia de la ausencia de anclaje a la actina en el músculo cardíaco⁵².

Un hallazgo notable que permite explicar la transición entre los miocitos normales y la insuficiencia cardíaca fue obtenido mediante el estudio de la mutación específica ventricular del gp130⁵³. Los ratones mutantes para este gen presentan una estructura y función cardíacas normales, pero durante la sobrecarga de presión aórtica desarrollan un comienzo rápido de miocardiopatía dilatada y una inducción masiva de apoptosis miocitaria frente a la respuesta hipertrófica compensatoria observada en los animales del grupo control.

CONCLUSIÓN

La identificación de las vías moleculares responsables de la especificación cardíaca y de la morfogénesis ha proporcionado un conocimiento preliminar sólido para comprender la enfermedad cardíaca congénita. Además, el análisis de las diversas cascadas de señalización a partir de precursores cardíacos no musculares está arrojando luz sobre los mecanismos de la función cardiovascular y su mantenimiento. La posibilidad de realizar un análisis genético de los fenotipos cardiovasculares complejos se está haciendo realidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 837-841.
2. Werler MM, Lammer EJ, Mitchell AA. Teratogenicity of high vitamin A intake [carta; comentario]. *N Engl J Med* 1996; 334: 1195-1196; discusión: 1197.
3. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-895.
4. Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced

- by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997; 124: 313-326.
5. Thompson CC, Evans RM. Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3494-3498.
 6. Mark M, Kastner P, Ghyselinck NB, Krezel W, Dupe V, Chambon P. Genetic control of the development by retinoic acid. *C R Seances Soc Biol Fil* 1997; 191: 77-90.
 7. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D et al. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 1994; 78: 987-1003.
 8. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994; 8: 1007-1018.
 9. Chen J, Kubalak SW, Chien KR. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* 1998; 125: 1943-1949.
 10. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; 4: 585-595.
 11. Ruiz-Lozano P, Smith SM, Perkins G, Kubalak SW, Boss GR, Sucov HM et al. Energy deprivation and a deficiency in downstream metabolic target genes during the onset of embryonic heart failure in RXRalpha^{-/-} embryos. *Development* 1998; 125: 533-544.
 12. Sadoshima, J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. *Circ Res* 1995; 76: 1-15.
 13. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton, KU, Glembotski CC, Brown JH et al. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 1990; 265: 20555-20562.
 14. Hertig CM, Kubalak SW, Wang Y, Chien KR. Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 37362-37369.
 15. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; 378: 394-398.
 16. Zhao YY, Sawyer DR, Baliga RR, Opel DJ, Han X, Marchionni MA et al. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 10261-10269.
 17. Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 1995; 121: 549-560.
 18. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis [in process citation]. *Development* 1999; 126: 3597-3605.
 19. Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 2000; 127: 1607-1616.
 20. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001; 104: 619-629.
 21. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001; 410: 97-101.
 22. Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet* 2001; 27: 286-291.
 23. Lindsay EA, Baldini A. Recovery from arterial growth delay reduces penetrance of cardiovascular defects in mice deleted for the DiGeorge syndrome region. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 997-1002.
 24. Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, Carattini-Rivera S, Cheah YC, Rosenblatt HM, et al. Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature* 1999; 401: 379-383.
 25. Martin G. Observation d'une deviation organique de l'estomac, d'une anomalie dans la situation et dans la configuration du coeur et des vaisseaux qui en partent ou qui s'y rendant. *Bull Soc Anat Paris* 1826; 1: 40-48.
 26. Moller JH, Nakib A, Anderson RC, Edwards JE. Congenital cardiac disease associated with polysplenia. A developmental complex of bilateral «left-sidedness». *Circulation* 1967; 36: 789-799.
 27. Van Mierop LHS, Wigglesworth FW. Isomerism of the cardiac atria in the asplenia syndrome. *Lab Invest* 1962, 1303-1315.
 28. Burn J, Goodship J. Developmental genetics of the heart. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 322-325.
 29. Lander A, King T, Brown NA. Left-right development: mammalian phenotypes and conceptual models. *Cell & Dev Biol* 1998; 35-41.
 30. Tsukui T, Capdevila J, Tamura K, Ruiz-Lozano P, Rodríguez-Esteban C, Yonei-Tamura S et al. Multiple left-right asymmetry defects in Shh(-/-) mutant mice unveil a convergence of the shh and retinoic acid pathways in the control of Lefty-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11376-11381.
 31. Marszalek JR, Ruiz-Lozano P, Roberts E, Chien KR, Goldstein LS. Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5043-5048.
 32. Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y et al. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein [fe de erratas aparece en *Cell* 1999; 99: 117]. *Cell* 1998; 95: 829-837.
 33. Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H, Hirokawa N. Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice [in process citation]. *Mol Cell* 1999; 4: 459-468.
 34. Gershoni-Baruch R, Gottfried E, Pery M, Sahin A, Etzioni A. Immotile cilia syndrome including polysplenia, situs inversus, and extrahepatic biliary atresia. *Am J Med Genet* 1989; 390-393.
 35. Lowe LA, Supp DM, Sampath K, Yokoyama T, Wright CV, Potter SS et al. Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus [see comments]. *Nature* 1996; 381: 158-161.
 36. Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M et al. Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos [see comments]. *Nature* 1996; 381: 151-155.
 37. Levin M. Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays* 1997; 19: 287-296.
 38. Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR, Tabin CJ. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol* 1997; 189: 57-67.
 39. Lohr JL, Danos MC, Yost HJ. Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development* 1997; 124: 1465-1472.
 40. Ryan AK, Blumberg B, Rodríguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T et al. Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 1998; 394: 545-551.
 41. Chazaud C, Chambon P, Dolle P. Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development* 1999; 126: 2589-2596.
 42. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yashiro K, Mochida K, Ohishi S et al. Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* 1998; 94: 287-297.
 43. Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R et al. Mouse pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and pericardial mesoderm and right pulmonary isomerism [in process citation]. *Development* 1999; 126: 5749-5758.
 44. Gage PJ, Suh H, Camper SA. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 1999; 126: 4643-4651.

45. Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F et al. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 1999; 401: 279-282.
46. Grow MW, Krieg PA. Tinman function is essential for vertebrate heart development: elimination of cardiac differentiation by dominant inhibitory mutants of the tinman-related genes, XNkx2-3 and XNkx2-5. *Dev Biol* 1998; 204: 187-196.
47. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993; 119: 969.
48. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5 [see comments]. *Science* 1998; 281: 108-111.
49. Nguyen-Tran VT, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB et al. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell* 2000; 102: 671-682.
50. Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J et al. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997; 88: 393-403.
51. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y et al. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 1999; 99: 313-322.
52. Pashmforoush M, Pomies P, Peterson K, Kubalak S, Ross J, Hefti A et al. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nature Medicine* 2001; 7: 591-597.
53. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999; 97: 189-198.
54. Franz T. Persistent truncus arteriosus in the Splotch mutant mouse. *Anat Embryol* 1989; 180: 457-464.
55. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T et al. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998; 125: 813-824.
56. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H, Maemura K, Nagai R, Ishikawa T et al. Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1 [see comments]. *J Clin Invest* 1995; 96: 293-300.
57. Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* 1997; 17: 77-88.
58. Kamaras J, Lancos F, Kelemen J. The role of cardiac developmental anomalies in infant mortality and the possibilities heart surgery in infancy. *Orv Hetil* 1970; 111: 13-17.
59. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE et al. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 1998; 125: 825-836.
60. Ya J, Schilham MW, de Boer PA, Moorman AF, Clevers H, Lamers WH. Sox4-deficiency syndrome in mice is an animal model for common trunk. *Circ Res* 1998; 83: 986-994.
61. Gruber PJ, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest* 1996; 98: 1332-1343.
62. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [see comments]. *Science* 1995; 267: 1831-1834.
63. Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, Hempstead BL. Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development. *Nat Genet* 1996; 14: 210-213.
64. Tessarollo L, Tsoulfas P, Donovan MJ, Palko ME, Blair-Flynn J, Hempstead BL, et al. Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14776-14781.
65. Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev* 1994; 8: 1019-1029.
66. Tullio AN, Accili D, Ferrans VJ, Yu ZX, Takeda K, Grinberg A et al. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12407-12412.
67. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997; 124: 2659-2670.