

Malformaciones cardíacas, heterotaxia y lateralidad

José Manuel Icardo, Juan Manuel García Rincón y María Ángeles Ros

Departamento de Anatomía y Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander. España.

Las malformaciones cardíacas ocurren en aproximadamente el 0,8% de todos los nacidos vivos. Muchas de estas malformaciones se presentan en grupos familiares y muestran un tremendo polimorfismo. El origen de la mayor parte de las malformaciones cardíacas se desconoce, estableciéndose lo que se ha llamado un origen multifactorial. Aunque este término implica la expresión anómala de genes y la intervención de factores epigenéticos, el desarrollo de las malformaciones cardíacas se asocia en algunos casos a anomalías cromosómicas o a defectos de un único gen. Curiosamente, defectos de un único gen pueden explicar gran parte de las presentaciones polimórficas si este gen controla procesos embrionarios básicos que afectan, en tiempo y espacio diferentes, a distintos órganos. Algunos de estos genes parecen estar implicados en el establecimiento de la lateralidad embrionaria.

El establecimiento izquierda-derecha del eje embrionario comienza en el nódulo de Hensen donde se rompe la simetría inicial y se inducen cascadas de expresión génica que confieren a cada lado del embrión propiedades específicas. Aunque los desencadenantes de la ruptura inicial de la simetría varían entre las diferentes especies, existen patrones de expresión génica (*Nodal*, *Pitx2*) conservados a lo largo de la escala filogenética. La expresión anormal de estos genes induce la aparición del síndrome de heterotaxia, que se acompaña de malformaciones cardíacas. El desarrollo de estas malformaciones se ilustra con la mutante de ratón *iv/iv*, que constituye un modelo del síndrome de heterotaxia y las malformaciones cardíacas asociadas.

Palabras clave: Malformaciones cardíacas. Heterotaxia. Asimetría izquierda-derecha.

Congenital Heart Disease, Heterotaxia and Laterality

Congenital heart disease occurs in about 0,8% of all newborns. Many cardiac malformations occur among relatives and have a polymorphic presentation. The origin of most congenital heart disease is thought to be multifactorial, implying both anomalous expression of genes and the influence of epigenetic factors. However, in a small number of cases, the origin of congenital heart disease has been directly related to chromosomal anomalies or to defects in a single gene. Curiously, defects in a single gene can explain a polymorphic presentation if the anomalous gene controls a basic embryonic process that affects different organs in time and space. Some of these genes appear to control the establishment of laterality.

The establishment of the left-right asymmetry starts at the Hensen node. Here, the initial embryonic symmetry is broken by cascades of gene activation that confer specific properties on the left and right sides of the embryo. Although there are variations between species, some basic patterns of gene expression (*Nodal*, *Pitx2*) appear to be maintained along the phylogenetic scale. Anomalous expression of these genes induces the heterotaxia syndrome, which usually courses with congenital heart disease. The development of heart malformations is illustrated with the mouse mutant *iv/iv*, which is a model for the heterotaxia syndrome and the associated congenital heart disease.

Key words: Congenital heart disease. Heterotaxia. Left-right asymmetry.

Full English text available at: www.revespcardiol.org

Correspondencia: Dr. J.M. Icardo.
Departamento de Anatomía y Biología Celular.
Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.
Polígono de Cazoña, s/n.
39011 Santander.
Correo electrónico: icardojm@unican.es

INTRODUCCIÓN

Las malformaciones cardíacas representan casi la mitad de las malformaciones que se encuentran al nacer. Aproximadamente el 0,8% de todos los nacidos vivos presentan este tipo de malformaciones¹⁻³. La incidencia tan elevada de malformaciones congénitas del corazón ha hecho que la búsqueda para identificar los factores implicados en el desarrollo de dichas malformaciones sea muy intensa. Sin embargo, los resultados

ABREVIATURAS

FISH: hibridación *in situ* por fluorescencia.

LRD: *left-right dynein*.

Shh: *sonic hedgehog*.

Car: *caronte*.

BMP: *bone morphogenetic proteins*.

TGF: *transforming growth factor*.

CAVC: canal atrioventricular común.

DSVD: doble salida del ventrículo derecho.

de esta búsqueda han sido poco menos que decepcionantes dado que el 90% de todas las malformaciones sigue siendo de origen desconocido. Se habla en estos casos de un origen multifactorial, término que refleja más nuestra ignorancia sobre el tema que aquello que realmente comprendemos. Parece lógico, sin embargo, que el desarrollo de estas malformaciones pueda deberse a factores genéticos y ambientales por igual. De hecho, se ha postulado que factores ambientales, que actúan en individuos predispuestos genéticamente, activan la expresión anómala de genes hasta que, superado el umbral de normalidad, se induce el desarrollo de una determinada malformación⁴. La expresión anormal de todos los genes implicados resultaría en la producción de un defecto grave, muchas veces incompatible con la vida, mientras que la alteración de sólo una parte de esos genes resultaría en defectos mucho más leves (o en su ausencia). Esto explicaría la presencia de formas intermedias o subclínicas, que se pueden considerar como formas frustradas del defecto básico heredado⁵⁻⁸. La expresión fenotípica variable sucede tanto en grupos familiares^{3,4} como en modelos animales de malformaciones cardíacas^{5,9,10}.

ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS. DEFECTOS DE UN ÚNICO GEN

Aunque nuestro conocimiento real sobre el origen de la mayor parte de las malformaciones cardíacas es bastante impreciso, no se puede olvidar que en un número corto de casos se ha establecido de manera clara un origen genético. La relación existente entre la presencia de anomalías cromosómicas y de malformaciones cardíacas se conoce muy bien. Estas anomalías pueden ser numéricas, por falta de disyunción de los cromosomas, o estructurales, por rotura del cromosoma y pérdida del fragmento roto o su traslocación a otro cromosoma. Dentro de las numéricas, la trisomía 21 se asocia en la mitad de los casos a malformaciones complejas, especialmente canal atrioventricular común y discordancias ventriculoarteriales². El estudio de

casos con trisomía parcial de este cromosoma ha demostrado que el origen del fenotipo cardíaco anormal reside en la banda q22 del brazo largo de este cromosoma¹¹. La trisomía 18 presenta un número elevado de casos de comunicaciones auriculares y ventriculares, y displasia valvular en el 100% de los casos¹². La trisomía 13 se asocia con un porcentaje elevado de dextrocardia y la tetrasomía del brazo corto del cromosoma 22 (síndrome del ojo de gato) se asocia con retorno venoso pulmonar anómalo¹³. Lo mismo sucede en los casos en los que no se realiza la disyunción de los cromosomas sexuales, como en el síndrome de Turner (asociado a coartación aórtica y estenosis de la aorta) y en el de Klinefelter (asociado a tetralogía de Fallot y a la anomalía de Ebstein)¹⁴.

Un grupo importante de síndromes clínicos que incluyen malformaciones cardíacas se ha asociado con deleciones específicas en diferentes cromosomas. La deleción del brazo corto del cromosoma 5 (síndrome del maullido de gato), o del cromosoma 4 (síndrome de Wolf-Hirschhorn), se acompañan igualmente de malformaciones cardíacas. El desarrollo de nuevas técnicas como el bandeado cromosómico de alta resolución y la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) permite establecer la presencia de deleciones mínimas de genes contiguos, y ha llevado a reconocer nuevos síndromes como la deleción del cromosoma 22q11 (CATCH 22, síndrome velo-cardio-facial) y los síndromes de Miller-Dieker (17p13.3) y Williams (17q11.23), entre otros¹⁵.

El reconocimiento de nuevos síndromes no explica de manera directa el desarrollo de malformaciones cardíacas específicas ni la gravedad del síndrome. El hecho de haber reducido la búsqueda de genes anómalos a segmentos cromosómicos cada vez más cortos no ha hecho posible por el momento la identificación masiva de los genes candidatos. De hecho, los mecanismos por los cuales un gen o grupo de genes produce un síndrome específico son muy variados. Por ejemplo, se ha asumido que la pérdida de función de un alelo dominante resulta en la producción de síndromes específicos. Sin embargo, el incremento de función de un gen, con el consiguiente incremento en la cantidad del producto de ese gen (o en una producción anómala), puede interferir con los mecanismos de desarrollo normales resultando en la producción de un determinado síndrome.

Otra alternativa es que sólo el alelo paterno o materno de un determinado gen sea activo en el desarrollo (impresión genómica). Un defecto en la copia materna puede transmitirse como un defecto autosómico dominante, mientras que el mismo defecto en la copia paterna no produce alteraciones. De igual manera, un defecto de origen materno puede producir un determinado síndrome, mientras que el mismo defecto de origen paterno produce un síndrome totalmente diferente, como sucede con la deleción de la banda q12 del cro-

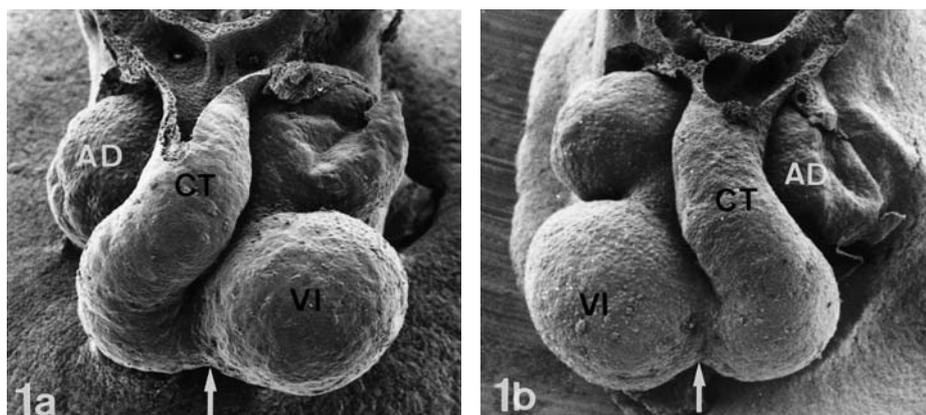


Fig. 1. Microscopia electrónica de barrido. Corazones de ratón, E10.5. a: *situs solitus*; b: *situs inversus*. Ambos corazones son morfológicamente normales y aparecen como imágenes especulares. AD: aurícula derecha; VI: ventrículo izquierdo; CT: conotruncos. Las flechas en a y b indican el surco interventricular. a,b: $\times 95$. (Reproducido de Icardo, 1997.)

mosoma 15 (15q12). De manera semejante, el fenotipo cardíaco en el síndrome de Turner (45,X) parece depender del origen parental del cromosoma X anómalo.

El 3% de todas las malformaciones cardíacas parece deberse a la acción de un único gen. Dentro de este grupo se incluyen la comunicación auricular asociada a defectos de la conducción cardíaca y la estenosis subaórtica hipertrófica^{4,8}. El origen genético está también claro en otras anomalías como la displasia ventricular derecha, algunas miocardiopatías dilatadas, y defectos complejos de la tabicación atrioventricular, que parecen transmitirse de forma autosómica dominante¹⁶⁻¹⁸. De igual manera, la presencia de malformaciones cardíacas es frecuente en coagulopatías como el síndrome de von Willebrand o la hemofilia⁸.

La existencia de fenotipos cardíacos debido a la pérdida de función de un único gen constituye una hipótesis atractiva en el estudio del desarrollo del corazón. En estos casos, ¿se puede explicar de manera adecuada el llamado origen multifactorial y la presentación polimórfica? Evidencias recientes indican que muchas de las presentaciones polimórficas se pueden deber a la acción de un único gen. Para explicarlo se ha recurrido al concepto de parsimonia. A lo largo del desarrollo, un único gen puede controlar un proceso morfogenético básico, como la síntesis o la degradación de una proteína. Esa proteína puede ser fundamental para el desarrollo de órganos tan diferentes como el cerebro y el riñón, por lo que el gen ha de activarse durante la embriogénesis en tiempo y lugar diferentes. Su inactivación resultará en una serie de defectos en órganos distantes, y la gravedad de la presentación dependerá de la capacidad de cada órgano para suplir o compensar el defecto genético. En humanos, varias formas de defectos con transmisión autosómica y presentación polimórfica al parecer tienen su causa en la inactivación de un único gen¹⁹. Algunos de estos genes parecen estar implicados en el establecimiento de la lateralidad embrionaria. Su inactivación resulta en anomalías de la posición visceral espacial y en un amplio abanico de malformaciones cardíacas.

SIMETRÍA, ASIMETRÍA Y MALFORMACIONES CARDÍACAS

El diseño del cuerpo humano, como el de la mayoría de los vertebrados, presenta una simetría bilateral evidente con respecto a la línea media. Sin embargo, esta simetría no se mantiene en el interior de nuestro cuerpo ya que la disposición de los órganos es claramente asimétrica. Se dice que nuestro cuerpo presenta una simetría pseudobilateral. La asimetría visceral no se limita a los órganos torácicos y abdominales, sino que se extiende al cerebro y a la organización del sistema nervioso. Esto tiene gran importancia en la especialización funcional de los hemisferios cerebrales y en aspectos conductuales como el uso preferente de una mano. El establecimiento de la asimetría en el sistema nervioso parece que se produce de manera independiente a la del tronco, cuestión que no va a ser objeto de este artículo.

Entre las primeras tareas de un embrión se encuentra la de definir el plan corporal, es decir, establecer los ejes embrionarios primarios. Se define un eje anteroposterior o craneocaudal que distinguirá el extremo cefálico del caudal, y un eje dorsoventral que distinguirá el dorso del vientre del embrión. El eje izquierda-derecha queda automáticamente definido tras la formación de los ejes anteriores.

La disposición normal del corazón y de los órganos se llama *situs solitus* (fig. 1). Aunque hay algo de confusión en la bibliografía, se denomina *situs inversus* a una inversión perfecta del *situs solitus*, con el corazón hacia la derecha. Cualquier disposición diferente se denomina heterotaxia o *situs ambiguus* (véase más adelante). La incidencia de *situs inversus* se estima que es de 1 en 10.000 nacimientos. La incidencia de heterotaxia es generalmente mucho menor y se suele acompañar de malformaciones cardiovasculares complejas²⁰.

La relación existente entre la presencia de malformaciones cardíacas y defectos de lateralidad se conoce desde hace mucho tiempo²¹. Un número importante de cardiopatías se acompaña de anomalías en la posición

cardíaca, de isomerismo auricular, de drenaje venoso anómalo, de alteraciones en la forma y posición del bazo y de anomalías en la posición de las vísceras torácicas y/o abdominales. Se llegó así a la descripción de un síndrome, el de asplenia-poliesplenia²¹⁻²⁴, caracterizado básicamente por la tendencia a la simetría visceral en órganos que son normalmente asimétricos. Otro aspecto fundamental de este síndrome es su marcado polimorfismo, definiéndose la existencia de una causa común con expresión final diferente²⁵. El reconocimiento de la existencia de un único síndrome condujo a la definición más general de heterotaxia, implicando la presencia, más o menos compleja, de anomalías de lateralidad visceral y/o venosa. La heterotaxia incluye también la falta total de asimetría visceral, una situación que se conoce como isomerismo o secuencia de isomerismo, y que en el tórax afecta principalmente a bronquios, pulmones y aurículas.

Aunque las descripciones de heterotaxia se realizaron inicialmente en casos aislados, el estudio de series amplias ha puesto de manifiesto que existe en muchos casos una relación familiar clara. Quizás, el ejemplo más demostrativo es el de una familia amish, con un grado de consanguinidad elevado, en la que varios de sus miembros mostraban *situs inversus* visceral y malformaciones cardíacas²⁶. El estudio de este y otros grupos familiares²⁷⁻²⁹ indicaba la presencia de un defecto genético transmitido de forma autosómica recesiva, autosómica dominante, o incluso ligado al cromosoma X³⁰. Grados diferentes de heterotaxia se observan también en síndromes de la línea media como el síndrome de Meckel (*situs inversus* y poliesplenia)³¹, o en el síndrome de Kartagener³², una anomalía ciliar primaria caracterizada por bronquiectasias y un 50% de *situs inversus*. Este último síndrome se debe a hipomotilidad ciliar por ausencia de los brazos externos de la dineína microtubular^{33,34}.

MODELOS ANIMALES DE HETEROTAXIA

La existencia de una raza mutante de ratón con el síndrome de heterotaxia ha permitido abrir nuevas vías de investigación. La cepa mutante *iv/iv* (*inversus viscerum*) se conocía desde hace tiempo³⁵, pero sólo recientemente se descubrió la existencia de malformaciones cardíacas en los productos embrionarios^{36,37}. Los ratones adultos muestran inversión del sitio cardíaco en el 50% de los casos y un porcentaje cercano al 30% de heterotaxia visceral y/o venosa. La heterotaxia incluye retorno venoso anómalo, vena porta localizada en situación ventral, isomerismo pulmonar y hepático, isomerismo atrial, poliesplenia y discordancia visceral toracoabdominal. Además, los embriones muestran malformaciones cardíacas en un 45% de los casos^{9,10,36,38,39}. Una caracterización cuidadosa de estos corazones permitió reconocer la existencia de una malformación tipo, el llamado corazón bulboventricu-

lar, caracterizado por persistencia del seno venoso, canal atrioventricular común (CAVC) y doble salida arterial del ventrículo derecho (DSVD)^{9,10}. Éste sería el defecto básico heredado, que cursa normalmente con isomerismo auricular. Como ocurre en los síndromes humanos, la presentación es polimórfica, con simples comunicaciones atriales o ventriculares en el lado opuesto del espectro fenotípico^{9,10,39}. La presentación es, además, independiente del sexo. De igual manera que en el humano, el gen *iv* parece exhibir una dominancia completa de modo que, en ausencia de función, el sitio visceral se determina al azar. La ausencia de este control genético explicaría tanto los diferentes patrones de heterotaxia³⁵ como los diferentes fenotipos cardíacos^{40,41}.

Otra cepa mutante de ratón, la llamada *legless*, obtenida por inserción transgénica, muestra anomalías craneofaciales y de las extremidades, y *situs inversus* en el 50% de los casos⁴². Los ratones *inv/inv*, otra cepa mutante obtenida por inserción transgénica⁴³, muestran *situs inversus* total en el 90% de los casos, heterotaxia venosa, y anomalías del tracto de salida cardíaco derecho y comunicaciones ventriculares⁴⁴.

El gen *iv* parece encontrarse a 3 centimorgans del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igh-C, en el cromosoma 12 del ratón^{45,46}, que es el equivalente al cromosoma 14 humano. Curiosamente, la inserción transgénica en el ratón *legless* también se localiza en el cromosoma 12, cerca del lugar del gen *iv*⁴⁷, sugiriendo que la mutación pueda haber afectado al *locus iv*. Mientras que las mutaciones *iv* y *lgl* producen aleatorización del sitio visceral, el gen mutado en la cepa *inv*, que codifica para la inversina, se localiza en el cromosoma 4 y parece dirigir el sitio visceral⁴⁸. Sin embargo, podría ser también una mutación por pérdida de función. La razón por la cual han de existir controles genéticos para el establecimiento del sitio visceral situados en posiciones tan diferentes no se conoce, pero habla a favor de una regulación muy estrecha y compleja.

La identificación de los diferentes genes mutados en estas cepas de ratón ha clarificado aspectos importantes de su función. El gen alterado en las cepas *iv* y *lgl* codifica por una dineína asociada a los microtúbulos de los cilios⁴⁹, que se ha venido en llamar LRD (*left-right dynein*). Cuando esta proteína se inactiva en ratones transgénicos, se reproducen las anomalías de lateralidad encontradas en los ratones *iv* y *lgl*⁵⁰. Otras cepas de ratones mutantes con alteraciones en la morfogénesis de los cilios^{51,52} también presentan anomalías de lateralidad. Curiosamente, la identificación de la inversina como el producto del gen mutado en la cepa *inv/inv* no puede explicar ningún aspecto de su función.

Gran parte de estas cepas mutantes de ratón no muestra anomalías estructurales en los cilios. Esto hizo pensar que no presentaba ningún tipo de relación con el síndrome de Kartagener humano, donde sí exis-

ten esas anomalías estructurales. Sin embargo, los pacientes con el síndrome de Kartagener también muestran mutaciones en las proteínas de dineína⁵³, lo que sugiere que gran parte de los síndromes con alteraciones de lateralidad puede tener un origen común. Los avances más recientes de la biología molecular y las nuevas técnicas de detección han hecho posible la elaboración de un cuadro complejo, todavía incompleto, que incluye la expresión en cascada de una serie de genes, la expresión concurrente de otros genes a esa cascada y la actividad ciliar en el nodo (de Hensen) u organizador durante los estadios embrionarios de gastrulación. Todos estos factores están implicados en el establecimiento de la lateralidad normal, y su disrupción ocasiona defectos en dicha lateralidad, tanto en el humano como en los modelos animales.

ESTABLECIMIENTO DE LA LATERALIDAD

En los estadios iniciales del desarrollo el embrión aparece como simétrico respecto a la línea media. Aunque en el embrión de pollo se ha descrito una asimetría transitoria leve en la morfología del nódulo de Hensen⁵⁴, la primera evidencia clara de asimetría morfológica surge con la formación del asa cardíaca⁵⁵. El corazón, que al principio es tubular y medial, se incurva para formar, invariablemente, un asa a la derecha. Al continuar el desarrollo embrionario, el resto de los órganos adquiere progresivamente su distribución asimétrica característica.

Conceptualmente, el establecimiento del eje izquierda-derecha tiene lugar en tres fases^{56,57}. En una primera fase, la simetría inicial del embrión se rompe especificándose dos mitades, una derecha y otra izquierda, no equivalentes. La ruptura inicial de la simetría tiene lugar durante la gastrulación, en relación con el nódulo de Hensen. En una segunda fase, y como consecuencia de la anterior, numerosos genes se expresan asimétricamente, a la izquierda o a la derecha, dando de esta manera identidad a cada uno de los lados embrionarios. La mayoría de estos genes codifica moléculas señalizadoras que interaccionan estableciendo cascadas de señalización. Estas cascadas de expresión asimétrica se inician alrededor del nódulo para desembocar posteriormente en el establecimiento de amplios dominios de expresión génica asimétrica en el mesodermo lateral. Finalmente, estas expresiones génicas se traducen en la morfología asimétrica normal de los órganos.

Los factores implicados en la ruptura inicial de la simetría son todavía desconocidos en gran parte. En el ratón, y por extensión en los mamíferos, se ha propuesto el novedoso y atractivo modelo del «flujo nodal»⁵⁸⁻⁶⁰. Las células del nodo presentan en su superficie ventral un cilio único. Estos cilios tienen un movimiento vorticial que, en conjunto, produce un flujo del fluido perinodal hacia la izquierda. Se postula que este flujo causa una distribución asimétrica de un

presunto y, por ahora, no identificado morfógeno, responsable del comienzo de la vía de señalización izquierda-derecha. De hecho, el flujo de fluido perinodal a la izquierda es muy débil en los ratones *inv/inv*, y no se produce en los ratones *iv/iv* debido a la ausencia de motilidad ciliar. El flujo ciliar podría también estar alterado en otras cepas mutantes de ratón caracterizadas por la morfogénesis anormal de los cilios nodales^{50,58}, o por su ausencia⁵¹. Los síndromes humanos en los que se asocian alteraciones del *situs* con anomalías primaria de los cilios^{61,62} constituyen un soporte importante para este modelo.

Sin embargo, el modelo del flujo nodal puede no ser válido en otras especies. En el embrión de pollo, células con monocilio se distribuyen de manera irregular por las superficies ventral y dorsal del embrión, constituyendo sólo una parte de las células del nódulo de Hensen⁶³. Así, la hipótesis del flujo nodal no se puede aplicar fácilmente en el embrión de pollo. Además, se ha demostrado que algunos genes se expresan de manera asimétrica antes de la formación del nodo⁶⁴. Se ha propuesto entonces que, en aves y en anfibios, la ruptura de la simetría le es dada al nodo por los tejidos que le rodean⁶⁵⁻⁶⁸.

Una hipótesis actualmente en estudio implica a las uniones celulares tipo *gap* que se establecen en los tejidos que rodean al nodo. Si una molécula de pequeño tamaño fuera capaz de circular a través de esas uniones en una sola dirección, se acumularía a un lado de la línea media rompiendo la simetría y desencadenando en el nodo una respuesta de activación génica asimétrica⁶⁷. En cualquier caso parece que, en todas las especies estudiadas, la ruptura inicial de la simetría tiene lugar en relación con el nódulo de Hensen⁶⁴. A partir del nodo, en una segunda fase, se activarían cascadas génicas específicas de lado, de modo que la información asimétrica se refuerza y se transmite al mesodermo lateral (figs. 2 y 3). Los derivados del mesodermo lateral formarán los órganos asimétricos.

En el embrión de pollo se ha demostrado que varias moléculas señalizadoras muestran pequeños dominios de expresión asimétrica en el nódulo de Hensen. Entre estas moléculas se establecen bucles reguladores que controlan las asimetrías de lateralidad (fig. 2). Por ejemplo, la expresión asimétrica de *Sonic hedgehog* (*Shh*) en el lado izquierdo del nodo es esencial para que la lateralidad se desarrolle de manera adecuada. En un principio, *Shh* se expresa simétricamente en el nodo pero, debido a la señalización negativa mediada por la Activin β B y por Bmp4, su expresión se reprime en el lado derecho y se queda restringida al lado izquierdo. La expresión asimétrica de *Shh* en el lado izquierdo del nodo induce la expresión asimétrica de *Nodal* en el mesodermo lateral izquierdo^{67,69-76}. A su vez, *Nodal* induce la expresión de *Pitx2*.

La inducción de *Nodal* por *Shh* no es directa, sino que está mediada por un factor intermedio identificado recientemente como *Caronte* (*Car*)^{64,77-79}. *Car* se inclu-

Control molecular de la asimetría (pollo)

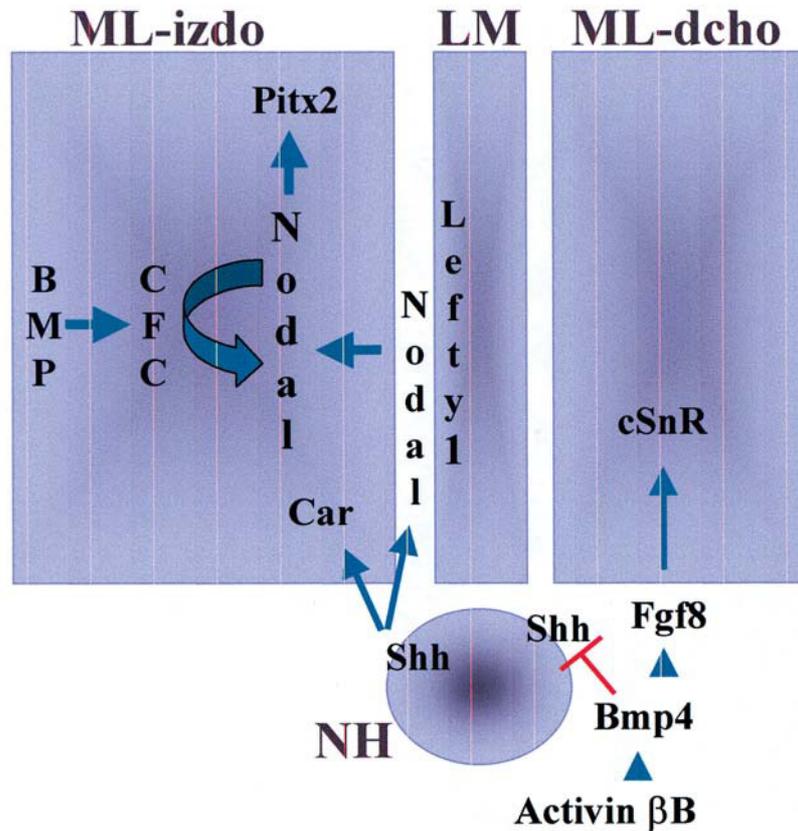


Fig. 2. En el embrión de pollo, la expresión inicialmente simétrica de *Shh* en el nódulo de Hensen (NH) queda restringida al lado derecho por la actividad de activin β mediada por *Bmp4*. *Shh* induce la expresión de *Lefty1* en la mitad izquierda de la línea media y de *Nodal* y *Car*. La expresión de *Nodal* en el mesodermo lateral izquierdo (MLI) es facilitada por la expresión de CFC bajo el control de BMP. En el lado derecho, la vía de la activina induce *Fgf8*, que a su vez induce *cSnR* e impide la expresión de *Nodal*.

ye dentro de un grupo de moléculas (la familia de Cerberus/DAN) que actúan como antagonistas de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP, *bone morphogenetic proteins*). Varias BMP se expresan en el mesodermo lateral en un dominio lateral al de *Nodal*. Debido a que *Car* bloquea la actividad de estas BMP, se ha propuesto^{77,78} que la función de *Car* sería antagonizar el efecto represor de las BMP sobre la expresión de *Nodal* (fig. 2). Sin embargo, nosotros hemos demostrado recientemente que la señalización por BMP regula positivamente la expresión de *Nodal*⁸⁰. La actividad BMP induce la expresión de CFC (*Cripto/FRL-1/Cryptic*), que es el único miembro de la familia de EGF (*epidermal growth factor*)-CFC identificado en el embrión de pollo hasta la fecha^{81,82}. CFC es un factor extracelular esencial para la señalización por *Nodal*⁸³. Aunque se necesitan más estudios para establecer de manera clara el papel que juegan las BMP en la especificación izquierda-derecha, las discrepancias existentes ponen de manifiesto la gran complejidad de las regulaciones que se establecen entre las diferentes vías moleculares que controlan la lateralidad.

También en el embrión de pollo, la activación de la vía de la activina en el lado derecho del nódulo de

Hensen resulta en la expresión derecha de *Bmp4*. A su vez, *Bmp4* inhibe la expresión derecha de *Shh* e induce la de *Fgf8* que, a su vez, induce la del factor de transcripción *Snail* (cSnR) en el mesodermo lateral derecho. Estas secuencias de activación son específicas del lado derecho.

Puesto que en cada lado embrionario se establecen vías de señalización específicas, es importante que la información de un lado no pase al opuesto. En este aspecto, la línea media embrionaria desempeña un papel crucial que actúa como barrera. Aquellas mutaciones que cursan con defectos morfológicos o bioquímicos de la línea media se acompañan de alteraciones de la lateralidad. La expresión de *Lefty1* en la línea media (en la mitad izquierda de los precursores de la placa del suelo; fig. 3), se ha propuesto como responsable molecular de dicha barrera⁸⁴. *Lefty1* es un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformantes β (TGF- β , *transforming growth factor β*) que podría realizar su función bloqueando *Nodal*. Otro miembro de la misma familia, *Lefty2*, parece controlar la extensión temporal de la expresión de *Nodal*⁸⁴. Un ejemplo que ilustra la importancia de la línea media en humanos son las alteraciones del sitio visceral que se encuentran en

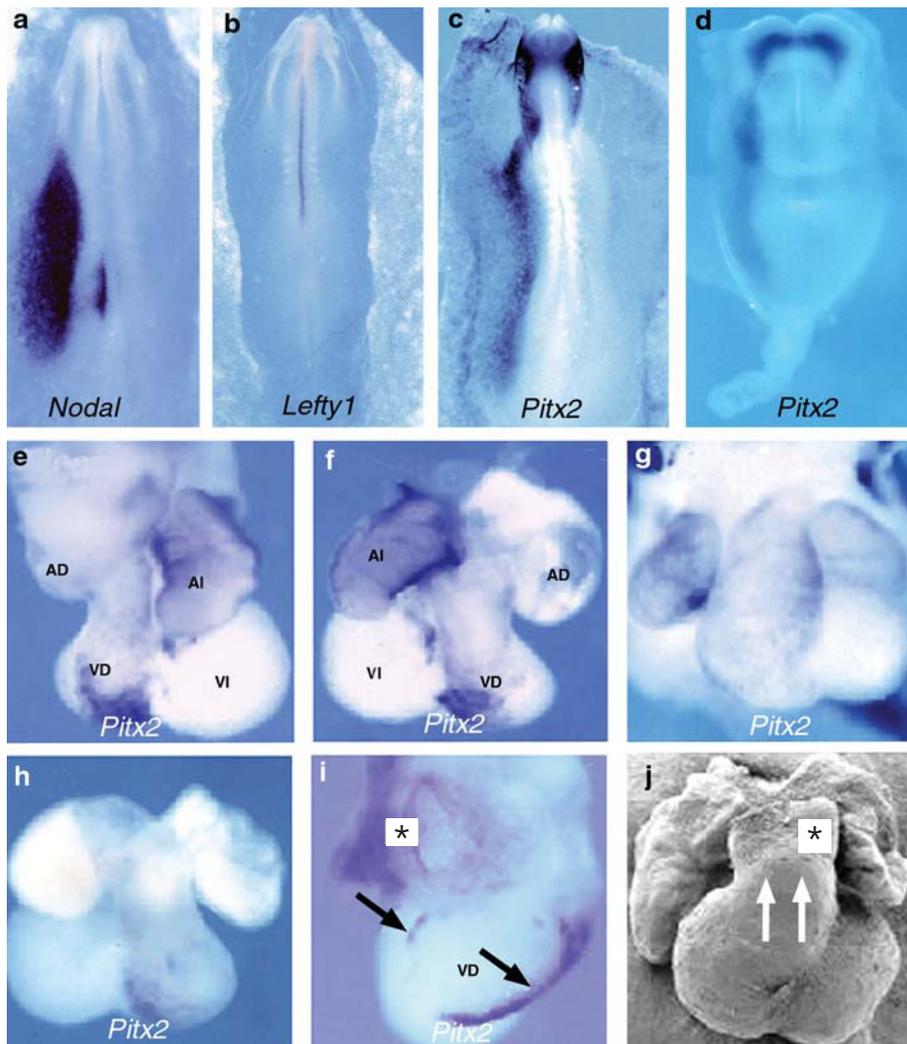


Fig. 3. a: expresión de *Nodal* en un embrión de pollo de 4 somites; b: expresión de *Lefty1* en un embrión de pollo de 4 somites; c: expresión de *Pitx2* en un embrión de pollo de 4 somites; d: expresión de *Pitx2* en un embrión de ratón de E8.25; e: expresión de *mPitx2* en el corazón de un ratón *iv/iv* de E11.5 con asa derecha; f: expresión de *mPitx2* en el corazón de un ratón *iv/iv* de E11.5 con asa izquierda; g: expresión atrial bilateral de *mPitx2* en E11.5 con asa a la derecha; h: ausencia de expresión atrial de *mPitx2* en un corazón con asa a la izquierda. en E11.5; i: visión derecha de un corazón de ratón *iv/iv* en E11.5 que muestra expansión de la expresión de *mPitx2* en la pared dorsal del ventrículo derecho; la aurícula derecha (asterisco) también es positiva; j: microfotografía electrónica de barrido que muestra DSVD (doble fecha) en un corazón que mostraba expresión dorsal de *mPitx2* en el ventrículo derecho en E11.5. AD: aurícula derecha; AI: aurícula izquierda; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo. (Figs. e-j reproducidas de Campione et al, 2001.)

los gemelos siameses. Desde antiguo se ha reconocido que en los gemelos unidos por el tronco el gemelo de la derecha presenta alteraciones del sitio visceral con frecuencia. Esto se interpreta como la influencia de la cascada de señalización izquierda del gemelo situado en el lado izquierdo sobre el del lado derecho.

Ya hemos comentado anteriormente que parece existir una marcada divergencia entre las diferentes especies en el inicio de la especificación izquierda-derecha. Sin embargo, evidencia muy reciente indica que las señales últimas de lateralización, así como las vías que las modulan, funcionan en el hombre de una manera similar. Por ejemplo, mutaciones en el gen del receptor de la activina⁸⁵ ocasionan alteraciones de la lateralidad y malformaciones cardíacas. En particular, el patrón de expresión de *Nodal* se encuentra tremendamente conservado en todas las especies estudiadas hasta la fecha, desde el pez cebra hasta el hombre⁸⁶. *Nodal* pertenece a la superfamilia de los TGF- β , se expresa transitoriamente en el mesodermo lateral izquierdo, y se considera un determinante izquierdo

dado que su expresión se correlaciona directamente con la lateralidad del corazón y otros órganos^{69,87}. La conservación del patrón de expresión de *Nodal* y de su gen diana *Pitx2* (fig. 3) ha hecho que el estadio en el que se expresan se denomine estadio filotípico de la asimetría izquierda-derecha^{88,89}.

La tercera fase en el establecimiento de la asimetría es la traducción de las expresiones génicas anteriores en la morfogénesis asimétrica normal de los órganos. *Pitx2* es el principal gen diana de *Nodal* identificado hasta la fecha⁹⁰⁻⁹⁴. *Pitx2* se expresa inicialmente en un dominio muy similar al de *Nodal*, pero su expresión continúa mientras los esbozos viscerales realizan su morfogénesis asimétrica, cuando la expresión de *Nodal* ya se ha reprimido. *Pitx2* es un factor de transcripción con homeodominio del tipo *bicoid*⁹⁵ que tiene funciones importantes durante el desarrollo embrionario además de su participación en la asimetría. *Pitx2* presenta tres isoformas denominadas a, b y c. La expresión asimétrica de *Pitx2* corresponde exclusivamente a la isoforma *Pitx2c*^{96,97}. El estudio de ratones

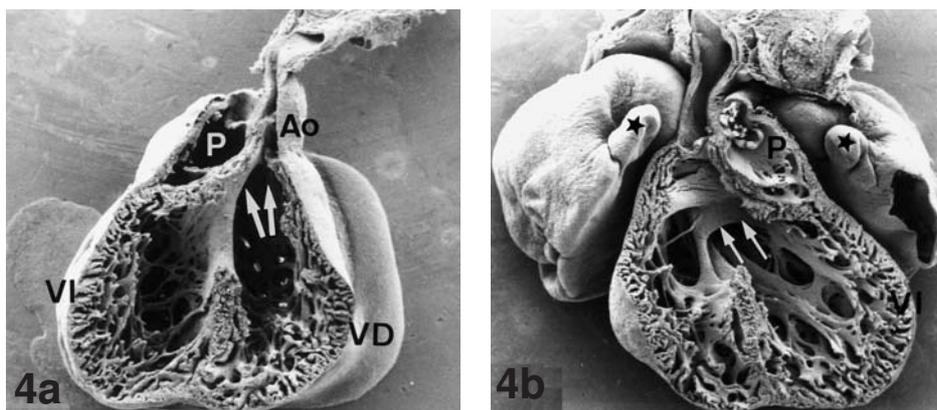


Fig. 4. Microscopia electrónica de barrido que muestra el aspecto interno de un corazón (E18.5) con canal atrioventricular común y doble salida arterial del ventrículo derecho. *Situs solitus*. El corazón se ha seccionado en el plano frontal y se muestran las mitades ventral (a) y dorsal (b). Los dos ventrículos se comunican a través de una gran comunicación interventricular que ocupa aproximadamente la mitad de la altura ventricular. La hoja anterior (flechas en b) de la válvula atrioventricular común está unida al lado derecho del tabique ventricular por un úni-

co músculo papilar. Los dos grandes vasos se originan del ventrículo derecho por medio de cámaras de salida independientes (flechas en a). Una banda muscular separa el origen de ambas cámaras. Las aurículas son simétricas e incluso muestran unas prolongaciones anteriores también simétricas (estrellas en b). Ao: aorta; P: arteria pulmonar. a, b: $\times 45$. (Reproducido de Icardo y Sánchez de Vega, 1991.)

transgénicos en los que se ha eliminado o disminuido (mutaciones hipomórficas)⁹⁸ la expresión de *Pitx2* indica que los diferentes órganos muestran una sensibilidad variable a la presencia de *Pitx2*.

Para entender la variabilidad fenotípica en la heterotaxia se ha sugerido que los umbrales de *Pitx2* necesarios para una morfogénesis correcta son variables para cada órgano. De hecho, niveles de expresión diferentes en varios segmentos del mesodermo lateral podrían estar relacionados con discordancias toracoabdominales^{91,98}. Si esto es cierto, se podría especular también que algo parecido pueda ocurrir en los diferentes segmentos del corazón. Esto ayudaría a explicar los diferentes fenotipos cardíacos.

Pitx2 se expresa inicialmente en el lado izquierdo del corazón tubular y del asa cardíaca, para restringirse posteriormente a la aurícula izquierda, la cara anterior de los ventrículos y el lado izquierdo de la cámara de salida (fig. 3). En una última fase, la expresión de *Pitx2* se limita a la aurícula izquierda, hasta que termina desapareciendo⁹⁹. Los patrones de expresión de *Pitx2* son equivalentes en pollo y en ratón, y se encuentran invertidos en los ratones con *situs inversus*. En los corazones malformados, el isomerismo auricular se acompaña de expresión atrial bilateral (o ausencia bilateral de expresión), pudiendo existir, además, expresión en la cara posterior del ventrículo derecho (fig. 3). En el ratón *iv/iv*, esta expresión anómala parece relacionarse directamente con el desarrollo de doble salida de ventrículo derecho⁹⁹. Así, aunque existen indicaciones claras de que *Pitx2* interviene de manera directa en la morfogénesis cardíaca, la relación exacta se desconoce dado que aún no se han identificado los posibles genes diana. La hidroxilisina del procolágeno podría ser una de estas dianas¹⁰⁰, pero su papel exacto se desconoce.

LAS MALFORMACIONES CARDÍACAS EN LA HETEROTAXIA

Los órganos alcanzan su forma definitiva a través de una serie de actividades básicas que incluyen la división y la muerte celular, la emigración celular, la agregación de células en tejidos que se especializan en funciones diferentes, la secreción de materiales extracelulares y, en el corazón, la posible interacción de todos esos factores con las fuerzas hemodinámicas. En este momento se desconoce cuál o cuáles de estas actividades dependen directamente de la expresión de *Pitx2*. Hasta la fecha, la única asimetría detectada a estos niveles es la distribución de flectina, una glucoproteína extracelular que se expresa en el lado izquierdo del ventrículo y en el lado derecho de la cámara de salida durante la formación del asa cardíaca. La expresión diferencial de flectina se halla invertida en el ratón *iv/iv*, por lo que se ha sugerido que esta proteína esté implicada en la dirección del asa cardíaca¹⁰¹.

Como hemos indicado más arriba, la mutante *iv/iv* es un modelo excelente para el estudio del síndrome de heterotaxia. Aunque no sabemos cómo se resuelven los patrones de expresión génica en patrones específicos de conductas celulares, la mutante *iv/iv* también se ha revelado como un modelo para el estudio de las malformaciones cardíacas encontradas en la heterotaxia^{9,37}. El estudio secuencial del desarrollo de los corazones en la mutante *iv* nos ayuda a comprender no sólo el desarrollo cardíaco normal, sino también las equivocaciones del desarrollo que resultan en la producción de malformaciones^{9,38-40}.

La malformación cardíaca básica o tipo se corresponde con el llamado corazón bulboventricular. Dentro del espectro fenotípico cardíaco existe, sin embargo, una combinación habitual que consiste en CAVC y

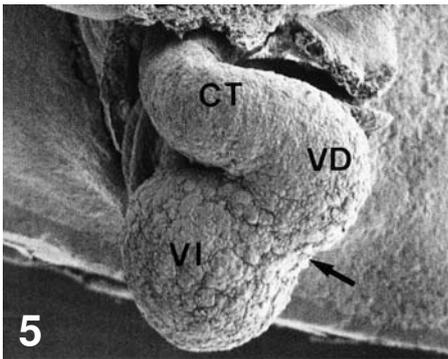


Fig. 5. E10.5. *Situs inversus*. Este corazón está desplazado hacia el lado derecho del embrión. El ventrículo derecho (VD) y el conotruncos (CT) forman una U sin límite claro de separación. El ventrículo derecho es craneal con respecto al ventrículo izquierdo (VI). La flecha indica el surco interventricular. $\times 45$.

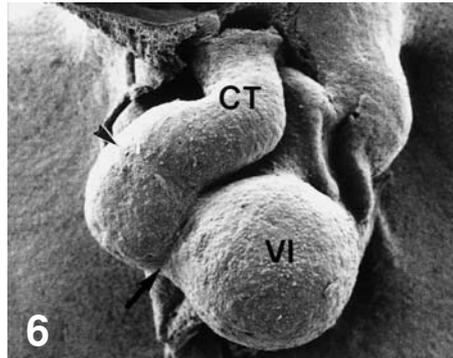


Fig. 6. E10.5. *Situs solitus*. Los dos ventrículos no guardan la relación lateral característica. Los surcos interventricular (flecha) y conoventricular (punta de flecha) aparecen anormalmente marcados. Compare la morfología de los corazones ilustrados en las figuras 5 y 6 con los de la figura 1, que están en el mismo estadio de desarrollo. $\times 110$.

Figs. 5-9. Microscopia electrónica de barrido que muestra algunos aspectos morfológicos de corazones normales y malformados. (Reproducido de Icardo et al, 1995.)

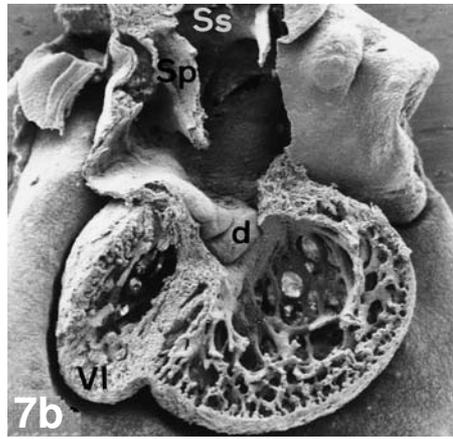
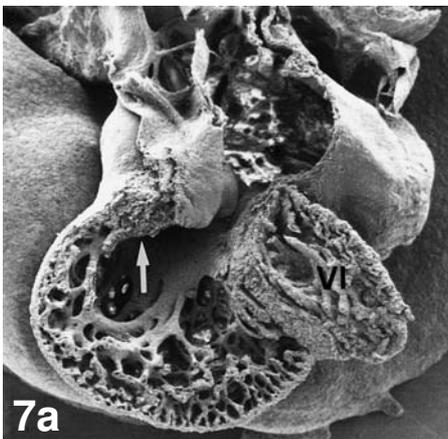


Fig. 7. Esta fotografía muestra las mitades ventral (a) y dorsal (b) de un corazón malformado (E12.5) que se ha seccionado en el plano frontal. *Situs inversus*. Los ventrículos y el tabique interventricular aparecen seccionados tangencialmente indicando una posición espacial anormal. El ventrículo derecho es más anterior que el izquierdo. El *septum primum* (Sp) y el *septum secundum* (Ss) aparecen en b. Note la disposición espacial anormal entre los tabiques atrial y ventricular. El cojinete dorsal (en b) aparece bifurcado. Las dos grandes arterias se originan del ventrículo derecho (flecha en a). a y b: $\times 85$.

DSVD (fig. 4)¹⁰². El CAVC es una malformación compleja que incluye comunicación interauricular, comunicación interventricular y válvula atrioventricular común¹⁰³⁻¹⁰⁶.

En el desarrollo normal, los dos cojinetes atrioventriculares ventral y dorsal se fusionan formando el llamado cojinete septal. Esta masa mesenquimatosa constituye el centro del corazón en desarrollo y sobre ella confluyen el *septum primum* que tabica inicialmente la aurícula, el tabique interventricular y el tabique conal¹⁰⁷. En los corazones malformados, las primeras desviaciones morfológicas aparecen durante la formación del asa cardíaca³⁷, pero se hacen más claras en el estadio E10.5⁴⁰, caracterizándose por la presencia de relaciones espaciales anormales entre los diferentes segmentos cardíacos (figs. 5 y 6). La estructura del co-

razón es normal aunque los cojinetes endocárdicos empiezan a mostrar anomalías de posición y forma. En los estadios E11.5 y E12.5, estas anomalías se hacen más marcadas (fig. 7). Los cojinetes aparecen hipoplásicos, adoptan formas triangulares y pueden estar divididos o presentar relaciones anormales. En algunos casos uno de los cojinetes laterales está enormemente aumentado de tamaño. En el estadio E13.5 los cojinetes atrioventriculares se fusionan en los corazones normales (fig. 8). En los corazones malformados no lo hacen y quedan separados por un amplio espacio (fig. 9). Al mismo tiempo, el *septum primum* no contacta los cojinetes y no cierra el foramen *primum* (fig. 7). El tabique interventricular, que ha de contactar con el lado derecho del cojinete septal, no lo hace, y queda en una posición media o incluso desviado hacia el lado iz-

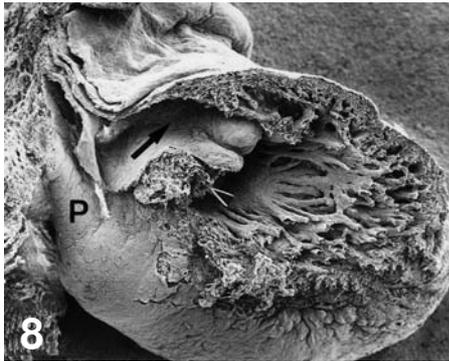


Fig. 8. Corazón normal (E13.5). *Situs solitus*. El corazón se ha diseccionado en el plano parasagital. El plano de disección pasa por el lado izquierdo de la región atrioventricular. Se observa la mitad derecha después de eliminar el fragmento izquierdo. Los cojinetes atrioventriculares se están fusionando y el *septum primum* (flecha) se continúa con el cojinete septal. La comunicación interventricular (punta de flecha) permanece abierta. P: arteria pulmonar. x90.



Fig. 9. Corazón malformado (E.13.5). *Situs solitus*. La preparación es similar a la de la figura 8. Los cojinetes atrioventriculares ventral (v) y dorsal (d) no se han fusionado. El *septum primum* (flecha) es normal, pero no contacta con los cojinetes. La punta de flecha indica la comunicación interventricular. P: arteria pulmonar. x90.

quierdo. La tabicación de la cámara de salida cardíaca, el troncocono, se puede realizar de manera normal. Sin embargo, la disposición espacial anormal del tabique interventricular y del canal atrioventricular indiviso hace que ambos tabiques no contacten. Con esto, las dos cámaras de salida ventriculares no se independizan y se originan de manera anormal. El desarrollo posterior de los cojinetes atrioventriculares (dorsal, ventral y laterales) determinará la morfología final de la válvula atrioventricular común.

Está claro que la principal anomalía en el desarrollo del CAVC en el síndrome de heterotaxia es la falta de fusión de los cojinetes atrioventriculares. Sin embargo, otras estructuras como los tabiques interatrial e interventricular pueden mostrar un desarrollo anómalo, contribuyendo de manera variable al fenotipo anormal. El desarrollo de cualquier órgano se debe a la asociación estrecha que se establece entre las diferentes partes que lo componen. Todos los componentes han de coincidir en tiempo y espacio de modo que los órganos adquieran su forma definitiva. Cuando uno o varios de estos componentes fallan los mecanismos morfogenéticos generales continúan su curso, pero el órgano en cuestión arrastra un déficit que se va potenciando a lo largo del desarrollo.

Una cuestión importante que ha de plantearse es si todos los fenotipos cardíacos que se encuentran en el síndrome de heterotaxia se pueden explicar por la unidad de acción de un único gen. Está claro que en los estadios iniciales del desarrollo se producen anomalías de posición y rotación del asa cardíaca. Estas anomalías no se corrigen, sino que se arrastran en estadios posteriores. La falta de alineación entre los tabiques interatrial e interventricular se puede explicar por la pérdida de señales espaciales en la aurícula

y en el ventrículo primitivos, y entre estas cámaras y el canal atrioventricular. En el canal atrioventricular debe de ocurrir lo mismo. Una vez modificadas las señales espaciales, se pierde el control sobre la formación de los cojinetes. Esto explicaría tanto su posición anormal como las variaciones en forma y tamaño⁴⁰. En cualquier caso, el desarrollo de estas malformaciones no se puede reducir de manera simplista recurriendo a anomalías espaciales. Las anomalías de lateralidad han de ponerse en relación con mecanismos morfogenéticos básicos. Por ejemplo, los corazones *iv/iv* muestran a menudo una desviación lateral del tabique interventricular con respecto a los cojinetes atrioventriculares. El crecimiento del tabique interventricular está asociado de manera estrecha al crecimiento de los ventrículos. El crecimiento de los ventrículos depende en gran medida de la presencia de centros activos de proliferación celular. Si estos centros no reciben o producen señales adecuadas, o están situados en un aposición anormal, el desarrollo ventricular será anormal y el tabique se localizará en un aposición alterada. Mecanismos hipotéticos de malformaciones como el que se acaba de enunciar se encuadran perfectamente dentro de la unidad de acción de un único gen. Sin embargo, la posible influencia del gen *iv* sobre la proliferación celular y otros mecanismos morfogenéticos básicos se desconoce. Es de esperar que algunas de estas relaciones se comiencen a desvelar en un futuro próximo.

AGRADECIMIENTOS

Subvencionado con las becas PB98-1418-C02-02 y BMC2000-0118-CO2-01 (JMI) y DGICYT-PM-98-0151 (MAR) del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mitchell SC, Korones SB, Berendes HW. Congenital heart disease in 56,109 births: Incidence and natural history. *Circulation* 1971;43:323-32.
2. Gray SW, Skandalakis JE. Anomalías congénitas. Embriogénesis, diagnóstico y tratamiento. 1.ª ed. Barcelona: Editorial Pediátrica, 1975.
3. Samanek M, Goetzova J, Benesova D. Distribution of congenital heart malformations in an autopsied child population. *Int J Cardiol* 1985;8:235-48.
4. Nora JJ. Update on the etiology of congenital heart disease and genetic counselling. En: Van Praagh R, Takao A, editors. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. 1.ª ed. New York: Futura Pub. Co., 1980; p. 21-39.
5. Patterson DF. Genetic aspects of cardiovascular development in dogs. En: Van Praagh R, Takao A, editors. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1980; p. 1-19.
6. Kogure K, Miyagawa S, Ando M, Takao A. AV canal defect in a feline species. En: Nora JJ, Takao A, editors. *Congenital Heart Disease: Causes and Processes*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1984; p. 69-77.
7. Van Mierop LHS, Patterson DF, Schnarr WR. Hereditary conotruncal defects in keeshond dogs: Embryologic studies. *Am J Cardiol* 1977;40:936-50.
8. Ferencz C, Boughman JA, Neill CA, Brenner JJ, Perry LW. Congenital cardiovascular malformations: Questions in inheritance. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:756-63.
9. Icardo JM, Sánchez de Vega MJ. Spectrum of malformations in mice with *situs solitus*, *situs inversus* and associated visceral heterotaxia. *Circulation* 1991;84:2547-58.
10. Icardo JM, Sánchez de Vega MJ, Archedera H, Colvee E. Espectro de malformaciones cardíacas en el ratón *iv/iv*. Universidad de Cantabria: Servicio de Publicaciones, 1991.
11. Korenberg JR, Bradley C, Distechi CM. Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Human Genet* 1992;50:294-302.
12. Matsuoka R, Yamamoto Y, Kuroki Y, Matsui I. Phenotypic expression of the trisomic segments in partial trisomy 18. En: Van Praagh R, Takao A, editors. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1980; p. 41-50.
13. McDermid HE, Duncan AM, Brasch KR, Simpson NE, Souza CD, Holden JJ, et al. Characterization of the supernumerary chromosome in cat eye syndrome. *Science* 1986;232:646-8.
14. Char F. Table of heritable cardiovascular conditions and associated anomalies. *Birth Defects: Original Article Series* 1972;8: 313-22.
15. Burn J. Overview: Heart malformation: The human model. En: Clark EB, Markwald RR, Takao A, editors. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co, 1995; p. 489-504.
16. O'Nuallain S, Hall JG, Stamm SJ. Autosomal dominance inheritance of endocardial cushion defects. *Birth Def* 1977;13(3A): 143-7.
17. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, et al. Familial occurrence of right ventricular dysplasia – A study involving 9 families. *J Am Coll Cardiol* 1988;12: 1222-8.
18. Fragola PV, Autore C, Picelli A, Sommariva L, Cannata D, Sangiorgi M. Familial idiopathic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1988;115:912-4.
19. Opitz JM, Clark EB. Heart development: An introduction. *Am J Med Genet* 2000;97:238-47.
20. Casey B, Hackett BP. Left-right axis malformations in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:257-61.
21. Rose V, Izukawa T, Moes CAF. Syndromes of asplenia and polysplenia. A review of cardiac and noncardiac malformations in 60 cases with special reference to prognosis and diagnosis. *Br Heart J* 1975;37:840-52.
22. Ivemark BI. Implications of agenesis of the spleen on the pathogenesis of conotruncus anomalies in childhood. An analysis of the heart; malformations in the splenic agenesis syndrome with 14 new cases. *Acta Paediatr Scand* 1955;44:1-110.
23. Stanger P, Rudolph AM, Edwards JE. Cardiac malpositions. An overview based on study of sixty-five necropsy specimens. *Circulation* 1977;56:159-72.
24. Sapiro DW, Ho SY, Anderson RH, Rigby ML. Diagnosis and significance of atrial isomerism. *Am J Cardiol* 1986;58:342-6.
25. Distefano G, Romeo MG, Grasso DM, Sciacca P, Mollica F. Dextrocardia with and without *situs viscerus inversum* in two sibs. *Am J Med Genet* 1987;27:929-34.
26. Arnold GL, Bixler D, Girod D. Probable autosomal recessive inheritance of polysplenia, *situs inversus* and cardiac defects in an Amish family. *Am J Med Genet* 1983;16:35-42.
27. Niikawa N, Kohsaka S, Mizumoto M, Hamada I, Kajii T. Familial clustering of *situs inversus totalis*, and asplenia and polysplenia syndromes. *Am J Med Genet* 1983;16:43-7.
28. De la Monte SM, Hutchins GM. Sisters with polysplenia. *Am J Med Genet* 1985;21:171-3.
29. Zlogotora J, Schimmel MS, Glaser Y. Familial *situs inversus* and congenital heart defects. *Am J Med Genet* 1987;26:181-4.
30. Mathias RS, Lacro RV, Jones K. X-linked laterality sequence: *Situs inversus*, complex cardiac defects, splenic defects. *Am J Med Genet* 1987;28:111-6.
31. Shen-Schwarz S, Dave H. Meckel syndrome with polysplenia: Case report and review of the literature. *Am J Med Genet* 1988;31:349-55.
32. Moreno A, Murphy EA. Inheritance of Kartagener's syndrome. *Am J Med Genet* 1981;8:305-15.
33. Afzelius BA. Genetical and ultrastructural aspects of the immotile-cilia syndrome. *Am J Human Genet* 1981;33:852-64.
34. Gershoni-Baruch R, Gottfried E, Perin M, Sahin A, Etzioni A. Immotile cilia syndrome including polysplenia, *situs inversus* and extra-hepatic biliary atresia. *Am J Med Genet* 1989;33: 390-3.
35. Hummel KP, Chapman DB. Visceral inversion and associated anomalies in the mouse. *J Heredity* 1959;50:9-13.
36. Layton WM. Heart malformations in mice homozygous for a gene causing *situs inversus*. En: Rosenquist GC, Bergsma D, editors. *Morphogenesis and Malformation of the Heart*. 1st ed. New York: Alan R Liss, 1978; p. 277-93.
37. Layton WM, Manasek FJ. Cardiac looping in early *iv/iv* mouse embryos. En: van Praagh R, Takao A, editors. *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1980; p. 109-26.
38. Icardo JM. Development of the outflow tract. A study in hearts with *situs solitus* and *situs inversus*. *Ann NY Acad Sci* 1990;588:26-40.
39. Seo J-W, Brown NA, Ho SY, Anderson RH. Abnormal laterality and congenital cardiac anomalies: relationships of visceral and cardiac morphologies in the *iv/iv* mouse. *Circulation* 1992;67:316-20.
40. Icardo JM, Archedera H, Colvee E. The role of atrioventricular endocardial cushions in the pathogenesis of common atrioventricular canal: morphological study in the *iv/iv* mouse. En: Clark EB, Markwald RR, Takao A, editors. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1995; p. 529-44.
41. Icardo JM, Colvee E. Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in *iv/iv* mice. *J Anat* 2001;199:473-82.
42. McNeish JD, Thayer J, Walling K, Sulik KK, Potter SS, Scott WJ. Phenotypic characterization of the transgenic mouse insertional mutation, legless. *J Exp Zool* 1990;253:151-62.
43. Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA, Montgomery CA, Elder FF, Overbeek PA. Reversal of left-right asymmetry: a *situs inversus* mutation. *Science* 1993;260:679-82.
44. McQuinn TC, Miga DE, Mjaatvedt CH, Phelps AL, Wessels A. Cardiopulmonary malformations in the *inv/inv* mouse. *Anat Rec* 2001;263:62-71.

45. Brueckner M, D'Eustacchio P, Horwich A. Linkage mapping of a mouse gene, *iv*, that controls left-right asymmetry of the heart and viscera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5035-8.
46. Hanzlik A, Binder M, Layton WM, Rowe L, Layton M, Taylor BA, et al. The murine *situs inversus viscerum* (*iv*) gene responsible for visceral asymmetry is linked tightly to the Igh-C cluster on chromosome 12. *Genomics* 1990;7:389-93.
47. Singh G, Supp DM, Schreiner C, McNeish J, Merker HJ, Copeland M, et al. Legless insertional mutation: morphological, molecular, and genetic characterization. *Genes Dev* 1991;5:2245-55.
48. Mochizuki T, Saijoh Y, Tsuchiya K, Shirayoshi Y, Takai S, Taya C, et al. Cloning on *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 1998;395:177-81.
49. Supp DM, Witte DP, Potter SS, Brueckner M. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* 1997;389:963-6.
50. Supp DM, Brueckner M, Kuehn MR, Witte DP, Lowe LA, McGrath J, et al. Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* 1999;126:5495-504.
51. 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;96:5043-8.
52. Brody SL, Yan XH, Wuertffel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4 null mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:45-51.
53. Guichard C, Harricane MC, Lafitte JJ, Godard P, Zaegel M, Tack V, et al. Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in *situs inversus* and primary cilia dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am J Hum Genet* 2001;68:1030-5.
54. Cooke J. Vertebrate embryo handedness. *Nature* 1995;374:681.
55. Icardo JM. Morphogenesis of vertebrate hearts. En: Burggren WW, Keller BB, editors. *Development of Cardiovascular Systems. Molecules to Organisms*. 1st ed. New York: Cambridge University Press, 1997; p. 114-26.
56. Capdevila J, Vogan KJ, Tabin CJ, Izpisua-Belmonte JC. Mechanisms of left-right determination in vertebrates. *Cell* 2000;101:9-21.
57. Mercola M, Levin M. Left-right asymmetry determination in vertebrates. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001;17:779-805.
58. 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. *Cell* 1998;95:829-37.
59. Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H, Hirokawa N. Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mice. *Mol Cell* 1999;4:459-68.
60. Takeda S, Yonekawa Y, Tanaka Y, Okada Y, Nonaka S, Hirokawa N. Left-right asymmetry and the kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by *kif3a*^{-/-} mice analysis. *J Cell Biol* 1999;145:825-36.
61. Pennarun G, Chapelin C, Escudier E, Bridoux AM, Dastot F, Cacheux V, et al. The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *Hum Genet* 2000;107:642-9.
62. Brueckner M. Cilia propel the embryo in the right direction. *Am J Med Genet* 2001;101:339-44.
63. Manner J. Does an equivalent of the «ventral node» exist in chick embryos? A scanning electron microscopic study. *Anat Embryol* 2001;203:481-90.
64. Levin M. The roles of activin and follistatin signalling in chick gastrulation. *Int J Dev Biol* 1998;42:553-9.
65. Pagan-Westphal SM, Tabin CJ. The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* 1998;93: 25-35.
66. Hyatt BA, Yost HJ. The left-right coordinator: the role of Vgl in organizing left-right axis formation. *Cell* 1998;93:37-46.
67. Levin M, Mercola M. Gap junction-mediated transfer of left-right patterning signals in the early chick blastoderm is upstream of *Shh* asymmetry in the node. *Development* 1999;126:4703-14.
68. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 1995;82:803-14.
69. Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn M, Tabin C. Left-right patterning signals and the independent regulation of different aspects of *situs* in the chick embryo. *Develop Biol* 1997;189:57-67.
70. Boettger T, Wittler L, Kessel M. FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr Biol* 1999;9:277-328.
71. Shamin H, Masson I. Expression of *fgf4* during early development of the chick embryo. *Mech Develop* 1999;85:189-92.
72. García-Castro ML, Vielmetter E, Bronner-Fraser M. N-cadherin, a cell adhesion molecule involved in the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science* 2000;288:1047-51.
73. Monsoro-Burq AH, Le Douarin NM. Left-right asymmetry and *Bmp4* signalling pathway during chick gastrulation. *Mech Dev* 2000;97:105-8.
74. Monsoro-Burq AH, Le Douarin NM. *Bmp4* plays a key role in left-right patterning in chick embryos by maintaining Sonic Hedgehog asymmetry. *Molecular Cell* 2001;7:789-99.
75. Kawakami M, Nakanishi N. The role of an endogenous PKA inhibitor, PKIa, in organizing left-right axis formation. *Development* 2001;128:2509-15.
76. Rodríguez-Esteban MC, Capdevila J, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC. Wnt signalling and PKA control Nodal expression and left-right determination in the chick embryo. *Development* 2001;128:3189-95.
77. Rodríguez-Esteban MC, Capdevila J, Economides AN, Pascual J, Ortiz A, Izpisua-Belmonte JC. The novel Cer-like protein *Caronte* mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* 1999;401:243-51.
78. Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse RV, Tabin CJ. Antagonistic signalling by *Caronte*, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression. *Cell* 1999;98:573-83.
79. Zhu L, Marvin MJ, Gardiner A, Lassar AB, Mercola M, Stern CD, et al. Cerberus regulates left-right asymmetry of the embryonic head and heart. *Curr Biol* 1999;9:931-8.
80. Piedra ME, Ros MA. BMP signalling positively regulates *Nodal* expression during left-right specification in the chick embryo. *Development* 2002;129:3431-40.
81. Colas J, Schoenwolf GC. Subtractive hybridisation identifies chick-cripto, a novel EGF-CFC ortholog expressed during gastrulation, neurulation and early cardiogenesis. *Gene* 2000;255: 205-17.
82. Schlange T, Schnipkowitz I, Anfree B, Ebert A, Zile MH, Arnold H-H, et al. Chick CFC controls *lefty1* expression in the embryonic midline and nodal expression in the lateral plate. *Develop Biol* 2001;234:376-89.
83. Shen MM, Schier AF. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. *Trends Genet* 2000;16:303-9.
84. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, Yoshiro 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;94:287-97.
85. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki A, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, et al. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J Med Genet* 1999;82:70-6.
86. Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, De la Cruz J, Splitt M, et al. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene *CFC1* are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet* 2000;26:365-9.
87. Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR. Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* 2001; 128:1831-43.
88. Yost HJ. Diverse initiation in a conserved left-right pathway? *Curr Opin Cardiol* 1999;13:185-9.

89. Yost HJ. Establishment of left-right asymmetry. *Int Rev Cytol* 2001;203:357-81.
90. Logan M, Pagan-Westphal SM, Smith DM, Paganessi L, Tabin CJ. The transcription factor *Pitx2* mediates *situs*-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* 1999;94:307-17.
91. Piedra ME, Icardo JM, Albajar M, Rodríguez-Rey JC, Ros MA. *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* 1998;94:319-24.
92. 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;394:545-51.
93. Yoshioka H, Meno C, Koshida K, Sugihara M, Itoh H, Ishimaru Y, et al. *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signalling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* 1998;94:299-305.
94. Campione M, Stenbeisser H, Schweickert A, Deissler K, Van Bebber F, Lowe LA, et al. The homeobox gene *Pitx2* mediator of asymmetric left-right signalling invertebrate heart and gut looping. *Development* 1999;126:1225-34.
95. Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward VLM, Small KV, Datson NA, et al. Cloning and characterization of a novel *bicoid*-related homeobox transcription factor gene, *RIEG*, involved in Rieger syndrome. *Nature Genet* 1996;14:392-9.
96. Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H, Blum M. *Pitx2* isoforms: involvement of *Pitx2c* but not *Pitx2b* in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Devel* 2000;90:45-51.
97. Essner JJ, Bransford WW, Zhang J, Yost HJ. Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *Pitx2* isoforms. *Development* 2000;127:1081-93.
98. Liu C, Liu W, Lu M-F, Brown NA, Martin JF. Regulation of left-right asymmetry by thresholds of *Pitx2c* activity. *Development* 2001;128:2039-48.
99. Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, et al. *Pitx2* expression defines a left cardiac lineage of cells: Evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the *iv/iv* mice. *Develop Biol* 2001;231:252-64.
100. Hjalt TA, Amendt BA, Murray JC. *Pitx2* regulates procollagen lysyl hydrolase (PLOD) gene expression: implications for the pathology of Rieger syndrome. *J Cell Biol* 2001;152:545-52.
101. Tsuda T, Majumder K, Linask KK. Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev Genet* 1998;23:203-14.
102. Icardo JM, Colvee E. Common atrioventricular canal and conotruncal anomalies in mice with heterotaxia. En: Clark EB, Markwald RR, Takao A, editors. *Developmental Mechanisms of Heart Disease*. 1st ed. New York: Futura Pub. Co., 1995; p. 615-20.
103. Rastelli GC, Kirklin JW, Titus JL. Anatomic observations on complete form of persistent common atrioventricular canal with special reference to atrioventricular valves. *Mayo Clin Proc* 1966;41:296-308.
104. Anderson RH, Becker AE, Lucchese FE, Meier MA, Rigby ML, Soto B. *Morphology of Congenital Heart Disease. Angiographic, Echocardiographic and Surgical Correlates*. Turnbridge Wells: Castle House Publications, 1983.
105. Anderson RH, Wenink ACG. Thoughts on concepts of development of the heart in relation to the morphology of congenital heart malformations. *Experientia* 1988;44:951-60.
106. Karczenski K. Malformations of the cardiac infundibulum. En: Rosenberg HS, Bernstein J, editors. *Cardiovascular Diseases*. Basel: S Karger AG, 1988; p. 100-14.
107. Icardo JM. The growing heart: An anatomical perspective. En: Zak R, editor. *Growth of the Heart in Health and Disease*. 1st ed. New York: Raven Press, 1984; p. 41-79.