

Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas. Parte 1 de 2: Morfogénesis cardíaca

MSc. Dr. Noel Taboada Lugo✉

Centro Provincial de Genética Médica, Hospital Gineco-Obstétrico Mariana Grajales. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Full English text of this article is also available

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Recibido: 11 de octubre de 2018

Aceptado: 23 de noviembre de 2018

Conflictos de intereses

El autor declara que no existen conflictos de intereses

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

FGF: siglas en inglés de factor de crecimiento de los fibroblastos

FT: factores de transcripción

RESUMEN

Las cardiopatías congénitas son los defectos congénitos más frecuentes en humanos. Muchos estudios indican que el desarrollo cardíaco está estrechamente regulado por diferentes vías de señalización celular y eventos morfológicos, genéticamente controlados. La identificación de nuevos genes que intervienen en el proceso de cardiogénesis es de gran utilidad para conocer los mecanismos moleculares y celulares por el que se genera el amplio espectro fenotípico de las cardiopatías congénitas. Se realizó una revisión bibliográfica, con el objetivo de identificar los avances más recientes en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas; lo que permite una clasificación más efectiva de estos defectos congénitos y una futura optimización del tratamiento individualizado para cada paciente, además de ofrecer posibles puntos específicos y susceptibles de intervención que posibilitarían la prevención de algunos de los defectos congénitos más frecuentes en los seres humanos.

Palabras clave: Cardiopatías congénitas, Morfogénesis, Polimorfismos de un simple nucleótido, Factores de transcripción, Metilación de ADN, Vías de transducción de señales

Advances in the knowledge of the molecular and cellular bases of congenital heart diseases. Part 1 of 2: Cardiac morphogenesis

ABSTRACT

Congenital heart diseases are the most common congenital defect in humans. Many studies indicate that the cardiac development is tightly regulated by different cell signaling pathways and genetically controlled morphological events. The identification of new genes involved in the cardiogenesis process is very useful in order to know the molecular and cellular mechanisms by which the broad phenotypic spectrum of congenital heart disease is generated. An updated bibliographic review was carried out, with the aim of identifying the most recent advances in the knowledge of the molecular and cellular bases of congenital heart disease. This knowledge allows a more effective classification of these congenital defects and a future optimization of the individualized treatment for each patient, in addition to offering possible specific and susceptible points of intervention that would allow the prevention of some of these more frequent congenital defects in humans.

Keywords: Congenital heart defects, Morphogenesis, Single nucleotide polymorphism, Transcription factors, DNA methylation, Signal transduction

✉ N Taboada Lugo

Calle 1ra e/ A y B

Reperto Escambray

Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Correo electrónico:

noeltl@infomed.sld.cu

INTRODUCCIÓN

Se define como defecto congénito a toda alteración de estructura anatómi-

ca visible al examen clínico del recién nacido, o posterior al nacimiento, cuando se percibe el defecto funcional de un órgano interno afectado anatómicamente¹.

Las cardiopatías congénitas son todos los defectos congénitos cardíacos que se producen como consecuencia de alteraciones morfológicas durante el proceso de organogénesis. La mayoría son bien toleradas durante la vida intrauterina y se manifiestan después del nacimiento, cuando se pierde el contacto con la circulación materna. Existen diferentes clasificaciones, basadas en criterios clínicos (cianóticas y acianóticas), genéticos (sindrómicas y no sindrómicas), pronóstico (críticas, potencialmente críticas y no críticas), y según la presencia o no de defectos congénitos extracardíacos (aisladas y asociadas). El Registro Cubano de Malformaciones Congénitas (RECUMAC) las clasifica en simples y complejas, mientras que la propuesta por Hoffman y Kaplan se basa en la gravedad del defecto congénito¹⁻³.

Las cardiopatías congénitas constituyen los defectos congénitos más frecuentes, y afectan aproximadamente entre 6 a 11 neonatos por cada 1000 nacidos vivos. Entre 20% y 30% de estas cardiopatías son graves y se ha informado su incremento en estudios recientes, específicamente defectos septales sin que existan variaciones relevantes en las prevalencias de las más graves, lo que está relacionado con un mayor nivel diagnóstico⁴.

Se desconocen las causas en un gran número de casos, aunque existen evidencias de que los factores genéticos desempeñan un papel decisivo en aproximadamente un 8% de los casos y los agentes ambientales están involucrados entre 1-2% de ellos, la génesis del resto (90%) es multifactorial y resulta de una compleja interrelación entre la predisposición genética, la susceptibilidad epigenética, el ambiente parental y el estilo de vida.

Entre los síndromes genéticos que cursan con cardiopatías congénitas se describen los monogénicos (3-5%), cromosómicos (5-8%), microdeleciones y algunos por mutaciones en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial. Los desbalances génicos detectados por cariotipo convencional o por estudios de citogenética molecular explican entre el 9% y el 13% de todos los casos de cardiopatías congénitas en el período neonatal⁵⁻⁷.

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) ha emergido como una poderosa herramienta para estudiar la secuencia de todo el

exoma humano mediante la técnica denominada WES (del inglés *Whole-exome sequencing*) o la secuenciación de exones específicos en enfermedades monogénicas de interés. Estas dos metodologías de genética molecular han revolucionado la comprensión de las bases moleculares de muchos defectos congénitos, como las cardiopatías congénitas, al proveer una información más detallada de las variaciones génicas que las que aportan los amplios estudios de asociación genómica en el estudio de polimorfismos de un simple nucleótido (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*)⁸⁻¹².

Muchos estudios indican que el desarrollo cardíaco está estrechamente regulado por una serie de vías de señalización celular que modulan la proliferación, la migración y la diferenciación celulares en el proceso del desarrollo cardiovascular. Mutaciones en diferentes genes que participan en estas vías de comunicación intercelular subyacen en las bases de diferentes tipos de cardiopatías congénitas¹³⁻¹⁷.

MÉTODO

Se realizó una revisión de la literatura médica nacional e internacional publicada en idiomas español e inglés, la información se recopiló a través de buscadores como Google académico, las bases de datos Medline/PubMed, Bireme (SciELO, Lilacs) y la biblioteca médica Cochrane en Octubre de 2018, con el objetivo de identificar los avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas. La revisión bibliográfica se realizó en función de criterios cronológicos y temáticos, para la cual se seleccionaron los de mayor nivel de actualización y pertinencia.

BASES MOLECULARES Y CELULARES DEL PROCESO DE MORFOGÉNESIS CARDÍACA

Las células musculares cardíacas o miocardiocitos se diferencian en etapas tempranas del desarrollo de un grupo de células progenitoras localizadas en la porción anterior de la placa mesodérmica lateral. El corazón y los grandes vasos se forman a partir de las células mesenquimatosas del área cardiogénica, la primera señal es la aparición de bandas endoteliales pares llamadas «cordones angioblásticos» en el mesodermo cardiogénico durante la tercera semana de gestación. Estos cordones se canalizan para formar conductos longitudinales emparejados, tapiza-

dos de endotelio, denominados «tubos cardíacos endocárdicos»; los cuales, conforme tiene lugar el plegamiento embrionario lateral, migran a la línea media, se aproximan entre sí y se fusionan para formar el tubo cardíaco primordial, que para entonces ya posee dos capas de tejido: una interna de tejido endotelial y una capa externa de células miocárdicas⁵⁻⁷.

La fusión de los tubos cardíacos comienza en el extremo cefálico del corazón en desarrollo y progresa en dirección caudal. Al final de la tercera semana el corazón comienza a latir (entre los 22 y 23 días) y la sangre a circular. Los fenómenos eléctricos y contráctiles que suceden en el miocardiocito son controlados por genes que codifican proteínas transmembranales encargadas de transportar iones a través de la membrana celular. Estos canales iónicos forman complejos macromoleculares que incluyen una unidad principal formadora del poro de los canales de sodio y de potasio, y proteínas auxiliares que lo regulan⁵⁻⁷.

Este corazón primitivo sufre una torsión y rotación hacia la derecha alrededor de la cuarta semana de gestación, lo cual posiciona a las aurículas por encima de los ventrículos, asimismo a partir del tracto de salida comienzan a emerger las arterias del arco aórtico.

Alrededor de la quinta y sexta semanas de desarrollo embrionario, se forman los septos cardíacos para dividir al corazón en cuatro cámaras, y el tracto de salida o conducto arterioso se divide en la arteria pulmonar y la aorta, lo que resulta en la división de la circulación en pulmonar y sistémica, respectivamente. Más tarde ocurre una reestructuración valvular intensiva junto con el crecimiento de los ventrículos para completar la maduración del corazón. El establecimiento de la simetría izquierda-derecha es muy importante para el desarrollo normal del corazón¹⁸.

El músculo de la aurícula y ventrículos primitivos es continuo. La aurícula actúa como marcapasos cardíaco transitorio, hasta que el seno venoso asume esa función. El nodo sinusal aparece durante la quinta semana de desarrollo, inicialmente en la pared del seno venoso, pero luego se incorpora a la pared de la aurícula derecha, cerca de la entrada de la vena cava superior. Junto con células de la región aurículo-ventricular (AV) forman el nodo y fascículo AV, localizado justo por encima de los cojinetes endocárdicos. Las fibras que nacen del fascículo AV pasan de la aurícula al ventrículo y se dividen en dos ramas, derecha e izquierda, que se distribuyen

por todo el miocardio ventricular.

El sistema cardiovascular es el primer sistema orgánico que alcanza un estado funcional, este desarrollo cardíaco precoz es necesario debido a que el rápido crecimiento del embrión en desarrollo no puede suplir sus necesidades nutricionales y de oxígeno, sólo mediante el proceso de difusión¹⁸.

Aunque el corazón de diferentes especies de vertebrados puede tener entre dos y cuatro cámaras, las diferentes etapas del proceso de morfogénesis están altamente conservadas a nivel molecular y celular. Los morfógenos son moléculas difusibles que especifican el tipo de célula generada en una localización anatómica específica y dirigen la migración celular y sus procesos hasta su destino definitivo, entre estos se distinguen el ácido retinoico, el factor beta transformante del crecimiento, las proteínas morfogénicas óseas, la vía de comunicación intercelular Hedgehog y la familia de proteínas Wnt^{2,19}.

El ácido retinoico es la forma bioactiva de la vitamina A, que a nivel molecular se une a sus receptores intracelulares, los activa, y regula la expresión génica «secuencia abajo». Los genes Hox son dianas cruciales de los receptores de este ácido en el proceso de morfogénesis.

La superfamilia del factor beta de transformación del crecimiento está formada por más de treinta miembros, entre los cuales se encuentran los factores beta de transformación del crecimiento (TGFB, del inglés *Transforming Growth Factor Beta*) y las proteínas morfogénicas óseas (BMP, del inglés *Bone Morphogenic Proteins*). La superfamilia TGFB desempeña un importante papel en el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y la organogénesis, y la evidencia filogenética sugiere que esta es una de las más antiguas vías de señalización intercelular, al estimarse su surgimiento hace 1,3 billones de años, antes de la divergencia evolutiva de artrópodos y vertebrados. Estudios realizados en vertebrados demuestran que al menos tres miembros de la familia BMP se expresan en la cardiogénesis. BMP-2 se expresa en el endodermo lateral, mientras que BMP-4 y 7 se expresan en el ectodermo inmediato adyacente al mesodermo precardiaco. Las BMP, de conjunto con los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblastic Growth Factor*), promueven la inducción cardiogénica y regulan el tamaño de los campos cardíacos, lo que confirma la importancia de esta vía de señalización intercelular en el proceso de morfogénesis^{2,3,13,18}.

Esta señalización es el proceso mediante el cual

las células intercambian mensajes químicos que modulan el funcionamiento intracelular y dan lugar a respuestas específicas tendientes a promover la adaptación de la totalidad del organismo en un medio ambiente cambiante. La unión de una molécula de señalización extracelular (*ligando*) con su receptor en una célula diana, desencadena una respuesta específica que consiste en una serie de eventos moleculares mutuos activadores o inhibidores.

Los sistemas de señalización intercelular son fundamentales en el control de la expresión génica y de la función de las proteínas. Estos sistemas serán los que controlen dónde, cuándo, cuánto y por cuánto tiempo se expresan las moléculas de ácido ribonucleico (RNA). En el caso de las proteínas, controlan además, los cambios de localización, el tráfico de proteínas dentro de una célula, cómo se degradan, y las interacciones funcionales que establecen. De forma coherente con este decisivo papel en la función de los organismos, se estima que más del 20% de los genes del genoma humano codifican proteínas implicadas en la transducción de señales²⁰.

La vía de señalización intercelular Wnt es una intrincada red de señales cuyas funciones también se han mantenido a través de la evolución de las especies. La familia Wnt comprende un grupo de genes de señalización que tiene una función muy importante en la organogénesis. Este grupo de genes determina la estructura interna de un órgano o la detención del crecimiento cuando el órgano ha alcanzado su tamaño apropiado. Otras funciones en las que se involucra a estos genes incluyen la polaridad celular, la reestructuración celular y el desarrollo axial. El término Wnt deriva de la contracción de los nombres *wingless* (del inglés, sin alas) e *Integrase-1* (Int-1). Con el primero se acuñó al gen del segmento de polaridad cuya ausencia genera un fenotipo sin alas en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y el segundo dio el nombre a una línea celular de ratón transformada con el virus Maloney que provocaba tumor mamario^{2,18}.

Por su parte, los más de 12 genes que integran la vía de señalización Hedgehog, forman una red, más que una vía unidireccional. La señal Hedgehog (Hh, del inglés erizo), debe su nombre a que el gen que codifica para Hh fue identificado por estudios de mutagénesis en la mosca *Drosophila*, donde los embriones mutantes mostraban un fenotipo con puntas desorganizadas en el exoesqueleto semejantes a las púas de los erizos. En mamíferos se han identificado tres miembros de esta familia de proteínas: *Sonic hedgehog* (Shh), *Indian hedgehog* (Ihh) y *Desert*

hedgehog (Dhh) que participan en el proceso de morfogénesis^{19,21}.

Se ha generado un cambio drástico en el modo de estudiar el desarrollo cardíaco con las nuevas estrategias para el estudio de la cardiogénesis, lo que ha implicado el paso de los cortes secuenciales de corazones embrionarios de distintos animales, a la aplicación de los métodos moleculares de identificación de linajes celulares, al experimentar con modelos transgénicos y análisis clonal retrospectivo. Estas tecnologías han dado una visión más dinámica del desarrollo del aparato cardiovascular y han permitido encontrar el origen, a veces insospechado, de varias estructuras anatómicas a partir de determinados grupos celulares, así como los genes y sus productos proteicos^{9-12,22}.

Estudios realizados en embriones de ratón y de pollo han permitido esclarecer las bases moleculares del proceso cardiogénico, así se ha demostrado la presencia de dos genes básicos hélice-bucle-hélice (bHLH, del inglés *Basic helix-loop-helix*) en los tubos endocárdicos primitivos y en etapas más avanzadas de la morfogénesis cardíaca: HAND1 y HAND2 (del inglés *heart and neural crest derivatives expressed transcript 1 and 2*). Los genes bHLH son una clase de factores de transcripción (FT) que regulan la determinación del destino y la diferenciación celulares en muchos tejidos diferentes durante el desarrollo embrionario^{3,6,14}.

La formación del sistema cardiovascular está estrictamente controlada por una red regulatoria compuesta por muchas vías de señalización intercelular, FT, entre otros. Las células del primordio cardíaco comienzan a expresar genes característicos de miocardio, como NKX2-5 y GATA4. La expresión del primero de estos FT depende de proteínas presentes en el endodermo subyacente, tales como cerberus, la BMP, FGF8 y FGF12^{9,18,20}.

Existen más de 50 factores de crecimiento, conocidos también como citoquinas, que comprenden un numeroso grupo de proteínas que actúan como mensajeros, cada uno de los cuales se une con una gran especificidad a una proteína receptora de la superficie celular, lo que activa a diferentes proteínas intracelulares de transducción de señales. Actúan principalmente sobre la proliferación celular, aunque tienen también otras funciones, como la diferenciación, la supervivencia y la migración celulares. Muchos de los sistemas de transducción de señales usados por los factores de crecimiento para transferir información hacia el núcleo y modular la transcripción génica lo hacen a través de la activi-

dad de FT.

Estos FT son productos proteicos codificados por genes de transcripción. Se calcula que la regulación de la transcripción se basa en al menos 2000 de estos factores proteicos codificados en el genoma de los mamíferos, los cuales se unen a una secuencia de nucleótidos específica en las regiones promotora/amplificadora de genes diana y regulan la velocidad del proceso por el cual un gen se transcribe a una secuencia complementaria de ácido ribonucleico (ARN), lo que inicia el proceso de producción de una proteína, por lo que desempeñan un papel fundamental en el control de la organogénesis. Además, micro-ARN específicos tienen una función fundamental en la morfogénesis cardíaca al coordinar los patrones y niveles de expresión de los FT²⁰.

Los genes expresados en la placa cardiogénica como TBX1, TBX5, NKX2-5, GATA4, HAND2, CASP3, TFAP2, FGF12, LBX1, MYH11, CRKL, PDLIM3 y TXNRD2 codifican para FT que se expresan en etapas tempranas del desarrollo del corazón y que son cruciales para la activación de genes cardíacos específicos y constituyen el centro regulador de la red de morfogénesis cardíaca, la cual controla la rotación del tubo cardíaco, la simetría izquierda-derecha y la formación de las cámaras cardíacas. Los genes TBX5 y NKX2-5 se unen de forma sinérgica al promotor del gen que codifica para el péptido precursor natriurético cardioespecífico tipo A (Nppa, del inglés *cardiac-specific natriuretic peptide precursor type A*) y de esta forma activan a este gen que es índice del desarrollo cardíaco^{23,24}.

Los genes TBX son una familia génica con un alto grado de conservación filogenética y que tienen un dominio de fijación al ADN común, denominado T-box, y codifican para FT que intervienen en la regulación del proceso de morfogénesis cardiovascular, particularmente en la elongación del tubo cardíaco en el polo anterior y el mantenimiento de las células precursoras mesenquimatosas para la formación del tracto de salida miocardializado y tabicado. La reducción de la expresión del TBX1, que se produce en el estado de delección hemicigota al que a menudo se denomina haploinsuficiencia, influye de manera importante en la expresión génica inicial que interviene en la morfogénesis cardíaca²⁵.

Por su parte, NKX2-5 (*NK2 homeobox 5*) y LBX1 pertenecen a un grupo de genes que codifican para FT con dominio *homeobox* (una secuencia de 180 pares de bases conservada en diferentes especies), los cuales poseen un papel importante en la regulación de la expresión genética tejido-específica, esen-

cial para la diferenciación tisular, así como en la determinación de patrones temporales y espaciales durante el desarrollo. Estos FT resultan críticos para la formación cardíaca en *Drosophila*, ya que su ausencia impide la formación del asa y la diferenciación de los ventrículos^{19,20,23,25}.

Otras proteínas que actúan como FT, son las denominadas «en dedos de cinc», ya que se estructuran alrededor de este ión, de modo que se producen prolongaciones digitiformes y, de esta forma, se mantiene fija con una hélice, que reconoce por el surco mayor una secuencia de ADN, y corresponde a promotores de genes específicos. A este grupo pertenece el FT GATA4. El modelo mutante para este gen presenta defectos en el plegamiento anterior del embrión: no hay fusión del tubo cardíaco, y se presenta la muerte, quizá debido a la importancia de GATA4 en la señalización para la migración ventral^{24,25}.

Recientes estudios de secuenciación exómica en casos con cardiopatías congénitas han revelado genes que codifican para proteínas con dos tipos fundamentales de funciones moleculares (las de unión a la cromatina y las que forman el complejo de FT) y desempeñan un papel fundamental en la regulación de los genes críticos del desarrollo cardiovascular. En un análisis de las variaciones en el número de «copias» mediante estudio genómico amplio de 154 casos con comunicación interventricular, An *et al*²³ identificaron mutaciones *de novo* en siete genes (PRKCB, HIRA, SOX2, ING2, TP63, BCL6 y PAX3) que intervienen en la vía de unión a la cromatina, y entre los FT con efecto confirmado en la cardiogénesis se incluyen LBX1, TBX1, EN1, SOX2 y PAX3. Entre los tipos de mutaciones observaron duplicaciones en los genes PAX3 y LBX1 y delecciones en CRKL, GP1BB, PDLIM3, TBX1 y TXNRD2. Además de estas dos funciones moleculares, muchos de estos genes codifican proteínas con importantes funciones biológicas, como el proceso de morfogénesis cardíaca y la regulación de la proliferación celular, entre otras (**Tabla**).

El gen PRKCB codifica para una proteína quinasa y el HIRA lo hace para una histona que interviene en la regulación del ciclo celular, mientras que el gen SOX2 pertenece a los genes que producen alta movilidad (HMG, del inglés *high movility group*) y contienen una secuencia, conservada evolutivamente, de 79 aminoácidos, que dan lugar a tres estructuras helicoidales, una de las cuales está inmovilizada y penetra en el surco menor del ADN, en la zona del promotor, y le provoca una flexión que facilita el

Tabla. Funciones de algunos genes que participan en el proceso de cardiogénesis^{4,7,22-24}.

Funciones	Genes
Funciones moleculares	
Unión a la cromatina	HIRA, SOX2, PRKCB, ING2, TP63, BCL6, PAX3
Unión a secuencias específicas al ADN	PAX3, EN1, SOX2, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Unión a secuencias específicas al ADN con actividad de Factor de Transcripción	HIRA, EN1, SOX2, PAX3, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Unión a ácidos nucleicos con actividad de Factor de Transcripción	HIRA, EN1, SOX2, PAX3, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Procesos celulares y biológicos	
Morfogénesis cardiovascular	MYH11, TXNRD2, CRKL, FGF12, PDLIM3, TBX1, LBX1, CASP3, PRKCB, PAX3
Desarrollo del sistema circulatorio	MYH11, TXNRD2, CRKL, FGF12, PDLIM3, TBX1, LBX1, CASP3, PRKCB, PAX3
Regulación de la proliferación celular	SOX2, CASP3, PAX3, BCL6, COMT, IGFBP7, LBX1, IL4R, TP63, TBX1, CHP2
Regulación negativa de la proliferación celular	SOX2, MED15, TBX1, TP63, LBX1, IL4R, BCL6

acercamiento de otras proteínas al sitio de inicio de la transcripción. Mientras que la familia de genes PAX consta de al menos nueve miembros (PAX1-9) que codifican proteínas y que son FT que tienen en común el dominio de unión al ADN que se encuentra hacia el extremo amino-terminal (dominio de cajas pareadas (PAX, del inglés *paired box*). PAX3 es un factor de regulación clave en el control de la migración de las células precursoras miogénicas^{23,25}.

El estudio de las bases celulares del proceso de cardiogénesis revela que son varios los tipos de células que contribuyen al crecimiento cardíaco. Las células del primer campo del corazón (FHF, siglas en inglés de *first heart field*) contribuyen únicamente a la formación del ventrículo derecho y del canal atrio-ventricular, mientras que las aurículas, ventrículo izquierdo y gran parte del tracto de salida, provienen de precursores mesenquimales que residen en el segundo campo del corazón (SHF, siglas en inglés de *second heart field*)^{17,18,20}.

La vía de señalización celular Nodal/TGF tiene un importante efecto en los estadios tempranos de la diferenciación de las células embrionarias humanas pluripotenciales, que las dirigen a desarrollarse en diferentes linajes celulares. El gen SMAD3 o SEMA3D es un mensajero intracelular clave en la regulación de la vía de señalización Nodal/TGF, que tiene un importante papel en el desarrollo embrionario y particularmente, en el desarrollo del sistema cardiovascular^{15,26,27}.

De igual forma, la vía de señalización Notch desempeña un papel fundamental en el desarrollo del período embrionario, pues es imprescindible para que las capas germinales den origen a los tejidos que constituyen un organismo multicelular. Esta vía de señalización determina, además, la especificación celular, la histogénesis y la morfogénesis de varios tejidos en el desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados, y resulta clave en la especificación de los miocardiocitos y los vasos sanguíneos. Esta vía está conservada evolutivamente en la escala filogenética y debe su nombre al fenotipo que causan mutaciones en el gen que codifica su receptor, el cual se caracteriza por escotaduras (*Notch*) en los márgenes alares de la *Drosophila*^{13,28}.

EPÍLOGO

No existe una exacta correlación genotipo-fenotipo entre los mecanismos moleculares y los defectos morfológicos de las cardiopatías congénitas. Esto sucede porque muchas veces la formación adecuada de una estructura anatómica implica el correcto funcionamiento de varias vías de señalización celular que pueden involucrar el producto proteico de distintos genes. En este sentido, puede que en un mismo defecto congénito estén implicadas diferentes vías y mutaciones génicas, o por el contrario, que debido al efecto pleiotrópico de mutaciones, en

uno de los genes críticos en el proceso de cardiogénesis, se originen diferentes tipos de cardiopatías congénitas; todo lo cual se resumirá en la segunda parte de este artículo donde se discutirán algunos aspectos sobre los genes y las vías de señalización implicados en el origen de las cardiopatías congénitas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taboada Lugo N. Papel del ácido fólico, zinc y cobre en la prevención primaria de los defectos congénitos. *Rev Cuban Med Gen Integr* [Internet]. 2016 [citado 6 Oct 2018];32(4). Disponible en: <http://www.revmgi.sld.cu/index.php/mgi/article/view/167/110>
2. Andersen TA, Troelsen KL, Larsen LA. Of mice and men: Molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(8):1327-52.
3. Bouma BJ, Mulder BJ. Changing landscape of congenital heart disease. *Circ Res*. 2017;120(6):908-22.
4. Cao Y, Wang J, Wei C, Hou Z, Li Y, Zou H, *et al*. Genetic variations of NKX2-5 in sporadic atrial septal defect and ventricular septal defect in Chinese Yunnan population. *Gene*. 2016;575(1):29-33.
5. Postma AV, Bezzina CR, Christoffels VM. Genetics of congenital heart disease: The contribution of the noncoding regulatory genome. *J Hum Genet*. 2016;61(1):13-9.
6. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. *Eur J Med Genet*. 2014;57(8):402-13.
7. Edwards JJ, Gelb BD. Genetics of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2016;31(3):235-41.
8. Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH, Thienpont B, *et al*. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet*. 2016;48(9):1060-5.
9. Pawlak M, Niescierowicz K, Winata CL. Decoding the heart through next generation sequencing approaches. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018 [citado 6 Oct 2018];9(6):289. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/9/6/289/htm>
10. LaHaye S, Corsmeier D, Basu M, Bowman JL, Fitzgerald-Butt S, Zender G, *et al*. Utilization of whole exome sequencing to identify causative mutations in familial congenital heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9(4):320-9.
11. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014;59(1):5-15.
12. Agopian AJ, Mitchell LE, Glessner J, Bhalla AD, Sewda A, Hakonarson H, *et al*. Genome-wide association study of maternal and inherited loci for conotruncal heart defects. *PLoS One*. [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(5):e96057. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011736/pdf/pone.0096057.pdf>
13. Taboada Lugo N, Herrera Martínez M. Mecanismos epigénéticos y vía de señalización Notch en el origen de diferentes defectos congénitos. *Medicentro* [Internet]. 2018 [citado 9 Oct 2018];22(3):197-207. Disponible en: <http://medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/view/2645/2213>
14. Chen H, VanBuren V. A provisional gene regulatory atlas for mouse heart development. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(1):e83364. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0083364>
15. Deng X, Zhou J, Li FF, Yan P, Zhao EY, Hao L, *et al*. Characterization of nodal/TGF-lefty signaling pathway gene variants for possible roles in congenital heart diseases. *PLoS One* [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(8):e104535. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128709/pdf/pone.0104535.pdf>
16. Li Y, Klena NT, Gabriel GC, Liu X, Kim AJ, Lemke K, *et al*. Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*. 2015;521(7553):520-4.
17. Kerstjens-Frederikse WS, van de Laar IM, Vos YJ, Verhagen JM, Berger RM, Lichtenbelt KD, *et al*. Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genet Med*. 2016;18(9):914-23.
18. Moore KL, Persaud TVN. *Aparato Cardiovascular*. En: *Embriología Clínica*. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011. p. 286-336.
19. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech*. 2016;9(3):235-44.
20. Giraldo M, Parra S, Rojas M. Señalización Celular. En: Patiño PJ, editor. *Biología de la célula*. Antioquia: Fondo Editorial Biogénesis; 2014. p.219-31.
21. Sánchez Hernández D, Guerrero Vega I. Función de ihog, boi, dally y dmwif en la formación del gradiente morfo-genético de hedgehog en el disco

- imaginal de ala de drosophila. Análisis de la divergencia funcional de los factores wif-1 humano y de Drosophila [Tesis Doctoral en Internet]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2013 [citado 10 Oct 2018]. Disponible en: <https://repositorio.uam.es/xmlui/handle/10486/662022>
22. Calcagni G, Unolt M, Digilio MC, Baban A, Versacci P, Tartaglia M, *et al.* Congenital heart disease and genetic syndromes: New insights into molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017; 17(9):861-70.
23. An Y, Duan W, Huang G, Chen X, Li L, Nie C, *et al.* Genome-wide copy number variant analysis for congenital ventricular septal defects in Chinese Han population. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2016[citado 6 Oct 2018];9:2. Disponible en: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12920-015-0163-4>
24. Han H, Chen Y, Liu G, Han Z, Zhao Z, Tang Y. GATA4 transgenic mice as an in vivo model of congenital heart disease. *Int J Mol Med.* 2015; 35(6):1545-53.
25. Lantigua Cruz A. Defectos congénitos de origen genético y ambiental. En: Lantigua Cruz A. *Introducción a la Genética Médica.* 2ª Ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011. p. 306-41.
26. Sanchez-Castro M, Pichon O, Briand A, Poulain D, Gournay V, David A, *et al.* Disruption of the SEMA3D gene in a patient with congenital heart defects. *Hum Mutat.* 2015;36(1):30-3.
27. Li F, Zhou J, Zhao DD, Yan P, Li X, Han Y, *et al.* Characterization of SMAD3 gene variants for possible roles in ventricular septal defects and other congenital heart diseases. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 [citado 10 Oct 2018];10(6):e0131542. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131542>
28. Theis JL, Hrstka SC, Evans JM, O'Byrne MM, de Andrade M, O'Leary PW, *et al.* Compound heterozygous NOTCH1 mutations underlie impaired cardiogenesis in a patient with hypoplastic left heart syndrome. *Hum Genet.* 2015;134(9):1003-11.

Advances in the knowledge of the molecular and cellular bases of congenital heart diseases. Part 1 of 2: Cardiac morphogenesis

Noel Taboada Lugo✉, MD, MSc

Centro Provincial de Genética Médica, Hospital Gineco-Obstétrico Mariana Grajales. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Este artículo también está disponible en español

ARTICLE INFORMATION

Received: October 11, 2018
Accepted: November 23, 2018

Competing interests

The authors declare no competing interests

Abbreviations

DNA: deoxyribonucleic acid
TF: transcription factors
FGF: fibroblast growth factor

ABSTRACT

Congenital heart diseases are the most common congenital defect in humans. Many studies indicate that the cardiac development is tightly regulated by different cell signaling pathways and genetically controlled morphological events. The identification of new genes involved in the cardiogenesis process is very useful in order to know the molecular and cellular mechanisms by which the broad phenotypic spectrum of congenital heart disease is generated. An updated bibliographic review was carried out, with the aim of identifying the most recent advances in the knowledge of the molecular and cellular bases of congenital heart disease. This knowledge allows a more effective classification of these congenital defects and a future optimization of the individualized treatment for each patient, in addition to offering possible specific and susceptible points of intervention that would allow the prevention of some of these more frequent congenital defects in humans.

Keywords: Congenital heart defects, Morphogenesis, Single nucleotide polymorphism, Transcription factors, DNA methylation, Signal transduction

Avances en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas. Parte 1 de 2: Morfogénesis cardíaca

RESUMEN

Las cardiopatías congénitas son los defectos congénitos más frecuentes en humanos. Muchos estudios indican que el desarrollo cardíaco está estrechamente regulado por diferentes vías de señalización celular y eventos morfológicos, genéticamente controlados. La identificación de nuevos genes que intervienen en el proceso de cardiogénesis es de gran utilidad para conocer los mecanismos moleculares y celulares por el que se genera el amplio espectro fenotípico de las cardiopatías congénitas. Se realizó una revisión bibliográfica, con el objetivo de identificar los avances más recientes en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de las cardiopatías congénitas; lo que permite una clasificación más efectiva de estos defectos congénitos y una futura optimización del tratamiento individualizado para cada paciente, además de ofrecer posibles puntos específicos y susceptibles de intervención que posibilitarían la prevención de algunos de los defectos congénitos más frecuentes en los seres humanos.

Palabras clave: Cardiopatías congénitas, Morfogénesis, Polimorfismos de un simple nucleótido, Factores de transcripción, Metilación de ADN, Vías de transducción de señales

✉ N Taboada Lugo
Calle Ira e/ A y B
Reperto Escambray
Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
E-mail address: noeltl@infomed.sld.cu

INTRODUCTION

A congenital defect is defined as any alteration of anatomical structure

visible on clinical examination of the newborn, or after birth, when the functional defect of an anatomically affected internal organ is perceived¹.

Congenital heart diseases are all congenital cardiac defects that occur as a consequence of morphological alterations during the organogenesis process. Most are well tolerated during intrauterine life and manifest after birth, when contact with the maternal circulation is lost.

There are different classifications, based on clinical criteria (cyanotic and non-cyanotic), genetic (syndromic and non-syndromic), prognosis (critical, potentially critical and non-critical) and depending on the presence or absence of extracardiac congenital defects (isolated and associated). The *Registro Cubano de Malformaciones Congénitas* (RECUMAC) Cuban Registry of Congenital Malformations classifies them as simple and complex, while the classification proposed by Hoffman and Kaplan is based on the severity of the congenital defect¹⁻³.

Congenital heart disease is the most common congenital defect, affecting approximately 6 to 11 infants per 1000 live births. Between 20% and 30% of these heart diseases are serious and their increase has been reported in recent studies, specifically septal defects without relevant variations in the prevalence of the most serious, which is related to a higher diagnostic level⁴.

The causes are unknown in a large number of cases, although there is evidence that genetic factors play a decisive role in approximately 8% of cases and environmental agents are involved in 1-2% of them, the genesis of the rest (90%) is multifactorial and results from a complex interrelation between genetic predisposition, epigenetic susceptibility, parental environment and lifestyle.

Among the genetic syndromes that occur with congenital heart disease are described monogenic (3-5%), chromosomal (5-8%), microdeletions and some mutations in the mitochondrial deoxyribonucleic acid (DNA) molecule. Gene imbalances detected by conventional karyotype or molecular cytogenetic studies explain between 9% and 13% of all cases of congenital heart disease in the neonatal period⁵⁻⁷.

The development of next-generation sequencing technologies (NGS) has emerged as a powerful tool to study the sequence of the entire human exome through the technique called WES (Whole-exome sequencing) or sequencing of specific exons in monogenic diseases of interest. These two molecular genetic methodologies have revolutionized the un-

derstanding of the molecular bases of many congenital defects, such as congenital heart disease, by providing more detailed information on gene variations than those provided by extensive genomic association studies in the single nucleotide polymorphisms (SNP) study⁸⁻¹².

Several studies indicate that cardiac development is closely regulated by a series of cell signalling pathways that modulate cell proliferation, migration and differentiation throughout developmental phases. Mutations in different genes involved in these intercellular communication pathways underlie the basis of different types of congenital heart disease¹³⁻¹⁷.

METHOD

A review of the national and international medical literature published in Spanish and English languages was performed; the information was collected through search engines such as Google academic, and Medline/PubMed, Bireme (SciELO, Lilacs) and Cochrane medical library databases in October 2018, with the objective of identifying the advances in the knowledge of the molecular and cellular basis of congenital heart disease. A review of the literature was carried out based on chronological and thematic criteria, selecting those with the highest level of updating and relevance.

MOLECULAR AND CELLULAR BASES OF CARDIAC MORPHOGENESIS

Heart muscle cells or cardiomyocytes are specified early in development from a pool of mesodermal progenitors located at the anterior wall of the lateral plate mesoderm. The heart and great vessels are formed from the mesenchymal cells of the cardiogenic area, the first sign being the appearance of endothelial bands called "angioblastic cords" in the cardiogenic mesoderm during the third week of gestation. These cords are channeled to form paired longitudinal ducts, covered with endothelium, called "endocardial cardiac tubes"; which, as the lateral embryonic folding takes place, migrate to the embryonic midline, approach each other and fuse to

form the primitive heart tube, which by then already has two layers of tissue: an inner endothelial tissue and an outer layer of myocardial cells⁵⁻⁷.

The fusion of the cardiac tubes begins at the cephalic end of the developing heart and progresses in a caudal direction. The heart begins to beat at the end of the third week (between 22 and 23 days), with blood flow beginning in the fourth week. The electrical and contractile phenomena that occur in the myocardium are controlled by genes that encode transmembrane proteins responsible for transporting ions through the cell membrane. These ion channels form macromolecular complexes that include a pore-forming main unit of sodium and potassium channels, and auxiliary proteins that regulate it⁵⁻⁷.

This primitive heart undergoes torsion and clockwise rotation around the fourth week of gestation, positioning the atria above the ventricles. Meanwhile, the arteries of the aortic arch begin to emerge from the outflow tract. Around the fifth and sixth weeks of embryonic development, the cardiac septa are formed to divide the heart into four chambers and the outflow tract or ductus arteriosus is divided into the pulmonary artery and the aorta, thus resulting in pulmonary and systemic circulation division. Later an intensive valve remodeling occurs along with the growth of the ventricles to complete the maturation of the heart. The establishment of left-right symmetry is key for normal heart development¹⁸.

Primitive atrium and ventricles muscle is continuous. The atrium acts as a transient cardiac pacemaker, until the venous sinus assumes that function. The sinus node appears during the fifth week of development, initially in the venous sinus wall, but then it is incorporated into the right atrium wall, near the entrance of the superior vena cava. Along with cells of the atrio-ventricular region (AV) they form the node and AV fascicle, located just above the endocardial bearings.

The fibers emerging from the AV fascicle migrate from the atrium to the ventricle (dividing into two branches), right and left, that spread throughout the ventricular myocardium.

The cardiovascular system is the first organic system that reaches a functional state, this early cardiac development is necessary because the rapid growth of the developing embryo cannot meet its nutritional and oxygen needs, only through the diffusion process¹⁸.

Although the heart of different vertebrate species can have between two and four chambers, the different stages of the morphogenesis process are highly conserved at the molecular and cellular level. Morphogens are diffusible molecules that specify the type of cell generated in a specific anatomical location and direct cell migration and its processes to their final destination, among which are distinguished retinoic acid, transforming growth factor-beta, bone morphogenic proteins, the Hedgehog intercellular communication pathway and the Wnt family of proteins^{2,19}.

Retinoic acid is the bioactive form of vitamin A, which at the molecular level binds to its intracellular receptors and activates them, regulating the "sequence down" gene expression. Hox genes are crucial targets of these acid receptors in the morphogenesis process. The transforming growth factor-beta superfamily is made up of more than thirty members, among which are the transforming growth factor-beta (TGFB) and bone morphogenetic proteins (BMP). The TGFB superfamily plays a pivotal role in embryonic development, cell differentiation and organogenesis. Phylogenetic evidence suggests that this is one of the oldest intercellular signaling pathways, (it is estimated that it emerged about 1.3 billion years ago), before the evolutionary divergence of arthropods and vertebrates. Studies in vertebrates show that at least three members of the BMP family are expressed in cardiogenesis. BMP-2 is expressed in the lateral endoderm, while BMP-4 and 7 are expressed in the immediate ectoderm adjacent to the precardiac mesoderm. The BMPs, together with the fibroblast growth factors (FGF), promote cardiogenic induction and limit the size of the heart field, confirming the importance of this intercellular signaling pathway in the morphogenesis process^{2,3,13,18}. Intercellular signaling is the process by which cells exchange chemical messages that modulate intracellular functioning and give rise to specific responses aimed at promoting the adaptation of the entire organism in a changing environment. The union of an extracellular signaling molecule (ligand) with its receptor in a target cell, triggers a specific response consisting of a series of mutual activating or inhibiting molecular events.

Intercellular signaling systems are essential in controlling gene expression and protein function. These systems will be the ones to control where, when, how much and for how long the ribonucleic acid (RNA) molecules are expressed. In the case of

proteins, they also control changes in location, protein traffic within a cell, cellular degradation, and the functional interactions they set up. Consistent with this decisive role in the functioning of organisms, it is estimated that more than 20% of the genes in the human genome encode proteins involved in signal transduction²⁰. The Wnt intercellular signaling pathway is an intricate network of signals whose functions have also been maintained through the evolution of species. The Wnt family comprises a group of signaling genes that has a very important function in organogenesis. This group of genes determines the internal structure of an organ or growth arrest when the organ has reached its appropriate size. Other functions that involve these genes include cell polarity, cell restructuring and axial development. The term Wnt derives from the contraction of wingless and integrase-1 (Int-1). The first was coined from the polarity segment gene whose absence generates a wingless-fruit fly (*Drosophila melanogaster*)-phenotype, and the second gave the name to a mouse cell line transformed by Moloney virus that caused breast tumor^{2, 18}.

For their part, the more than 12 genes that make up the Hedgehog signaling pathway form a network, rather than a unidirectional pathway. The Hedgehog signal owes its name to the fact that the Hh gene coding was identified by mutagenesis studies in the *Drosophila* fly, where the mutant embryos showed a phenotype with disorganized spike-like exoskeleton tips similar to those of hedgehogs. Three members of this family of proteins have been identified in mammals: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh), and Desert hedgehog (Dhh) that participate in the morphogenesis process¹⁹⁻²¹.

New strategies for the study of cardiogenesis have led to a drastic change in the way cardiac development is being approached, which has implied moving from sequential cuts of embryonic hearts of different animals, to the implementation of molecular cell-lineage tracing methods, when experimenting with transgenic models and retrospective clonal analysis. These technologies have given a more dynamic view of the development of the cardiovascular system and have made it possible to find the sometimes unsuspected origin of various anatomical structures from certain cell groups, as well as genes and their protein products^{9-12, 22, 9-12, 22}. Studies on mouse and chicken embryos have clarified the molecular basis of the cardiogenic process, thus demonstrating the presence of two basic helix-loop-

helix (bHLH) genes in the primitive endocardial tubes and in more advanced stages of cardiac morphogenesis: HAND1 and HAND2 (heart and neural crest derivatives expressed transcript 1 and 2). The bHLH genes are a class of transcription factors (TF) that regulate the determination of cell fate and differentiation in many different tissues during embryonic development^{3, 6, 14}.

The formation of the cardiovascular system is strictly controlled by a regulatory network made up of many intercellular signalling pathways, TF, among others. Primordial cardiac cells begin to express characteristic myocardial genes, such as NKX2-5 and GATA4. The expression of the first of these TFs depends on the proteins in the underlying endoderm such as cerberus, BMP, FGF8 and FGF12^{9, 18, 20}.

There are more than 50 growth factors, also known as cytokines, comprising a large group of proteins that act as messengers, each of which binds with great specificity to a cell surface receptor protein, activating different intracellular signal transduction proteins. They act mainly on cell proliferation, although they also have other functions such as cell differentiation, survival and migration. Many of the signal transduction systems used by growth factors to transfer information to the nucleus and modulate gene transcription do so through TF activity. These TFs are protein products encoded by transcription genes. It is estimated that transcription regulation is based on at least 2000 of these protein factors encoded in the mammalian genome, which bind to a specific nucleotide sequence in the promoter/amplifier regions of target genes and regulate the speed of the process by which a gene is transcribed to a complementary sequence of ribonucleic acid (RNA), which starts the protein production process, thus playing an important role in the control of organogenesis. Moreover, specific micro-RNAs have a key role in cardiac morphogenesis by coordinating the patterns and levels of TF expression²⁰.

Genes expressed in the cardiogenic plaque such as TBX1, TBX5, NKX2-5, GATA4, HAND2, CASP3, TFAP2, FGF12, LBX1, MYH11, CRKL, PDLIM3 and TXNRD2 code for TF that are expressed in early stages of heart development and are crucial for the activation of specific cardiac genes thus constituting the regulatory center of the cardiac morphogenesis network, which controls cardiac tube rotation, left-right symmetry and the formation of cardiac chambers. TBX5 and NKX2-5 genes directly bind to the promoter of the gene for cardiac-specific natriuretic

peptide precursor type A (Nppa) and thus activate this gene which is essential in cardiac development^{23,24}. TBX genes belong to a gene family with a high degree of phylogenetic conservation. They have a common DNA binding domain called T-box, and code for TF involved in the regulation of cardiovascular morphogenesis, particularly in heart tube elongation within the anterior pole and the preservation of mesenchymal precursor cells for formation of a myocardialized and septated outflow tract. The reduction in TBX1 expression occurring in the hemizygotic deletion, often referred to as haploinsufficiency, significantly influences the initial gene expression involved in cardiac morphogenesis²⁵.

On the other hand, NKX2-5 (NK2 homeobox 5) and LBX1 belong to a group of genes that code for homeobox domain TF (a DNA sequence around 180 base pairs long found in different species), which have an important role in the regulation of tissue-specific genetic expression, essential for tissue differentiation and determination of temporal and spatial patterns during development. These TFs are critical for cardiac formation in *Drosophila*, since their absence prevents the formation of the loop and differentiation of the ventricles^{19,20,23,25}. Other TF proteins are the so-called "zinc finger" as they are structured around this ion and contain finger-like protrusions. In this way, they remain fixed with a helix that recognizes a DNA sequence in the major groove, corresponding to promoters of specific genes; TF GATA4 belongs to this group.

The mutant model of this gene causes a defective anterior folding of the embryo; there is no fusion of the cardiac tube, and death occurs perhaps due to the importance of GATA4 in signaling for ventral migration^{24,25}.

Recent studies of exomic sequencing in cases with congenital heart disease have revealed genes encoding for proteins with two main types of molecular functions (those of chromatin binding and those forming the TF complex) which play a major role in the regulation of critical-cardiovascular development-genes. When analyzing variations in the number of «copies» by a comprehensive genomic study of 154 cases with interventricular communication *An et al*²³ identified *de novo* mutations in seven genes (PRKCB, HIRA, SOX2, ING2, TP63, BCL6 and PAX3) that are involved in the chromatin-binding pathway. TFs with confirmed effect on cardiogenesis include, LBX1, TBX1, EN1, SOX2 and PAX3. Among the types of mutations, they observed duplications in the

PAX3 and LBX1 genes and deletions in CRKL, GP1BB, PDLIM3, TBX1 and TXNRD2. In addition to these two molecular functions, many of these genes encode proteins with important biological functions, such as the cardiac morphogenesis process and the regulation of cell proliferation, among others (**Table**).

PRKCB gene codes for protein kinase and HIRA does it for a histone involved in the cell-cycle regulation. SOX2 genes belong to the HMG (high mobility group) which contain an evolutionarily conserved sequence of 79 amino acids which give rise to three helical structures, one of which is immobilized and penetrates into the DNA minor groove, in the promoter region, causing a flexion that facilitates the approach of other proteins to the transcription start site. Whereas the PAX gene family consists of nine members (PAX1-9) which encode FT proteins with the same DNA-binding domain located towards the amino-terminal end (paired box domain). PAX3 is a key regulatory factor in controlling the migration of myogenic precursor cells^{23,25}.

Studies on the cellular bases of the cardiogenesis process reveal that there are several types of cells contributing to cardiac growth. First heart field cells (FHF) contribute only to the formation of the right ventricle and atrioventricular canal, while the atria, left ventricle and much of the outflow tract, come from mesenchymal precursors residing in the second heart field (SHF)^{17,18,20}.

Nodal/TGF signaling pathway has an important effect at early stages of differentiation of human embryonic stem cells in directing them to develop into different embryonic lineages. SMAD3 or SEMA3D gene is a key intracellular messenger regulating factor in the Nodal/TGF signaling pathway, playing important roles in embryonic and, particularly, cardiovascular system development^{15,26,27}.

Likewise, the Notch signaling pathway plays a fundamental role throughout the embryonic development period, as it is essential for the germ layers to give rise to the tissues that constitute a multicellular organism. This signaling pathway also determines the cellular specification, histogenesis and morphogenesis of different tissues in the embryonic development of vertebrates and invertebrates, and is key in the specification of cardiomyocytes and blood vessels. This pathway is evolutionarily conserved in the phylogenetic scale and owes its name to the phenotype that cause mutations in the gene encoding its receptor, characterized by recesses (Notch)

Table. Functions of some genes that participate in the cardiogenesis process^{4,7,22-24}.

Functions	Genes
Molecular Functions	
Chromatin binding	HIRA, SOX2, PRKCB, ING2, TP63, BCL6, PAX3
DNA-specific sequence binding	PAX3, EN1, SOX2, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Sequence-specific DNA binding transcription factor activity	HIRA, EN1, SOX2, PAX3, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Nucleic acid binding transcription factor activity	HIRA, EN1, SOX2, PAX3, TBX1, TP63, LBX1, BCL6
Cellular/Biological processes	
Cardiovascular morphogenesis	MYH11, TXNRD2, CRKL, FGF12, PDLIM3, TBX1, LBX1, CASP3, PRKCB, PAX3
Circulatory system development	MYH11, TXNRD2, CRKL, FGF12, PDLIM3, TBX1, LBX1, CASP3, PRKCB, PAX3
Regulation of cell proliferation	SOX2, CASP3, PAX3, BCL6, COMT, IGFBP7, LBX1, IL4R, TP63, TBX1, CHP2
Negative regulation of cell proliferation	SOX2, MED15, TBX1, TP63, LBX1, IL4R, BCL6

on the wing margins of *Drosophila* fly^{13,28}.

EPILOGUE

There is no exact genotype-phenotype correlation between molecular mechanisms and morphological defects of congenital heart disease. This happens because the proper formation of an anatomical structure often involves the right functioning of various cell signalling pathways that may involve the protein product of different genes. In this sense, different genetic pathways and mutations may be involved in the same congenital defect, or on the contrary, that due to the pleiotropic effect of mutations in one of the critical genes in the cardiogenesis process, different types of congenital heart disease arise; All of which will be summarized in the second part of this article where some aspects of genes and signaling pathways involved in the origin of congenital heart disease will be discussed.

REFERENCES

1. Taboada Lugo N. Papel del ácido fólico, zinc y cobre en la prevención primaria de los defectos congénitos. Rev Cuban Med Gen Integr [Internet]. 2016 [citado 6 Oct 2018];32(4). Available at: <http://www.revmgisld.cu/index.php/mgi/article/view/167/110>
2. Andersen TA, Troelsen KL, Larsen LA. Of mice and men: Molecular genetics of congenital heart disease. Cell Mol Life Sci. 2014;71(8):1327-52.
3. Bouma BJ, Mulder BJ. Changing landscape of congenital heart disease. Circ Res. 2017;120(6):908-22.
4. Cao Y, Wang J, Wei C, Hou Z, Li Y, Zou H, *et al*. Genetic variations of NKX2-5 in sporadic atrial septal defect and ventricular septal defect in Chinese Yunnan population. Gene. 2016;575(1):29-33.
5. Postma AV, Bezzina CR, Christoffels VM. Genetics of congenital heart disease: The contribution of the noncoding regulatory genome. J Hum Genet. 2016;61(1):13-9.
6. Lalani SR, Belmont JW. Genetic basis of congenital cardiovascular malformations. Eur J Med Genet. 2014;57(8):402-13.
7. Edwards JJ, Gelb BD. Genetics of congenital heart disease. Curr Opin Cardiol. 2016;31(3):235-41.
8. Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, Breckpot J, Turki SH, Thienpont B, *et al*. Distinct genetic architectures for syndromic and nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. Nat Genet. 2016;48(9):1060-5.
9. Pawlak M, Niescierowicz K, Winata CL. Decoding

- the heart through next generation sequencing approaches. *Genes* (Basel) [Internet]. 2018 [citado 6 Oct 2018];9(6):289. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4425/9/6/289/htm>
10. LaHaye S, Corsmeier D, Basu M, Bowman JL, Fitzgerald-Butt S, Zender G, *et al.* Utilization of whole exome sequencing to identify causative mutations in familial congenital heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9(4):320-9.
 11. Rabbani B, Tekin M, Mahdih N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet*. 2014;59(1):5-15.
 12. Agopian AJ, Mitchell LE, Glessner J, Bhalla AD, Sewda A, Hakonarson H, *et al.* Genome-wide association study of maternal and inherited loci for conotruncal heart defects. *PLoS One*. [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(5):e96057. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011736/pdf/pone.0096057.pdf>
 13. Taboada Lugo N, Herrera Martínez M. Mecanismos epigénéticos y vía de señalización Notch en el origen de diferentes defectos congénitos. *Medicentro* [Internet]. 2018 [citado 9 Oct 2018];22(3):197-207. Available at: <http://medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/view/2645/2213>
 14. Chen H, VanBuren V. A provisional gene regulatory atlas for mouse heart development. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(1):e83364. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0083364>
 15. Deng X, Zhou J, Li FF, Yan P, Zhao EY, Hao L, *et al.* Characterization of nodal/TGF-lefty signaling pathway gene variants for possible roles in congenital heart diseases. *PLoS One* [Internet]. 2014 [citado 9 Oct 2018];9(8):e104535. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4128709/pdf/pone.0104535.pdf>
 16. Li Y, Klena NT, Gabriel GC, Liu X, Kim AJ, Lemke K, *et al.* Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*. 2015;521(7553):520-4.
 17. Kerstjens-Frederikse WS, van de Laar IM, Vos YJ, Verhagen JM, Berger RM, Lichtenbelt KD, *et al.* Cardiovascular malformations caused by NOTCH1 mutations do not keep left: data on 428 probands with left-sided CHD and their families. *Genet Med*. 2016;18(9):914-23.
 18. Moore KL, Persaud TVN. *Aparato Cardiovascular*. En: *Embriología Clínica*. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2011. p. 286-336.
 19. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech*. 2016;9(3):235-44.
 20. Giraldo M, Parra S, Rojas M. Señalización Celular. En: Patiño PJ, editor. *Biología de la célula*. Antioquia: Fondo Editorial Biogénesis; 2014. p.219-31.
 21. Sánchez Hernández D, Guerrero Vega I. Función de *ihog*, *boi*, *dally* y *dmwif* en la formación del gradiente morfogenético de *hedgehog* en el disco imaginal de ala de *drosophila*. *Análisis de la divergencia funcional de los factores wif-1 humano y de Drosophila* [Tesis Doctoral en Internet]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2013 [citado 10 Oct 2018]. Available at: <https://repositorio.uam.es/xmlui/handle/10486/662022>
 22. Calcagni G, Unolt M, Digilio MC, Baban A, Versacci P, Tartaglia M, *et al.* Congenital heart disease and genetic syndromes: New insights into molecular mechanisms. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(9):861-70.
 23. An Y, Duan W, Huang G, Chen X, Li L, Nie C, *et al.* Genome-wide copy number variant analysis for congenital ventricular septal defects in Chinese Han population. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2016 [citado 6 Oct 2018];9:2. Available at: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12920-015-0163-4>
 24. Han H, Chen Y, Liu G, Han Z, Zhao Z, Tang Y. GATA4 transgenic mice as an in vivo model of congenital heart disease. *Int J Mol Med*. 2015;35(6):1545-53.
 25. Lantigua Cruz A. Defectos congénitos de origen genético y ambiental. En: Lantigua Cruz A. *Introducción a la Genética Médica*. 2ª Ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011. p. 306-41.
 26. Sanchez-Castro M, Pichon O, Briand A, Poulain D, Gournay V, David A, *et al.* Disruption of the *SEMA3D* gene in a patient with congenital heart defects. *Hum Mutat*. 2015;36(1):30-3.
 27. Li F, Zhou J, Zhao DD, Yan P, Li X, Han Y, *et al.* Characterization of SMAD3 gene variants for possible roles in ventricular septal defects and other congenital heart diseases. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 [citado 10 Oct 2018];10(6):e0131542. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131542>
 28. Theis JL, Hrstka SC, Evans JM, O'Byrne MM, de Andrade M, O'Leary PW, *et al.* Compound hetero-

ozygous NOTCH1 mutations underlie impaired cardiogenesis in a patient with hypoplastic left

heart syndrome. Hum Genet. 2015;134(9):1003-11.