

Fluxo nodal e *situs inversus*: Uma revisão da literatura



<https://doi.org/10.56238/sevenced2023.007-021>

Angela Chaves de Oliveira Garcia

Discente da Faculdade Atenas Passos

Lucélia Rita Gaudino Caputo

Docente da Faculdade Atenas Passos
Docente da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG Passos)

Wellington Venâncio de Andrade

Docente da Faculdade Atenas Passos

Elder Francisco Latorraca

Docente da Faculdade Atenas Passos

RESUMO

Variações do situs solitus totalis, o padrão de disposição normal dos órgãos, envolvem dextrocardia, situs inversus, situs inversus totalis e situs ambiguous. Estes defeitos de lateralidade são documentados há mais de 400 anos, e uma conexão com anormalidades ciliares foi elucidada pela observação de cílios do nó primitivo, que podem promover o “fluxo nodal”, possivelmente necessário para o desenvolvimento da assimetria

esquerda-direita. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura, evidenciando variações da anatomia habitual e a ligação entre fluxo nodal e padrão assimétrico normal. Realizou-se uma revisão narrativa com artigos das bases MEDLINE/PubMed, SciELO e LILACS e com livros pertinentes à temática. O desenvolvimento embrionário inicial compreende a formação da estrutura organizadora, nó primitivo, sendo seus cílios responsáveis pelo fluxo nodal, determinante em muitos vertebrados na quebra da simetria bilateral embrionária. A formação da assimetria associa-se a gradientes morfogênicos à esquerda do nó, ao modelo de dois cílios e ao mecanismo das parcelas vesiculares nodais, até resultar na organogênese. As anormalidades ciliares configuram manifestações clínicas em distúrbios como discinesia ciliar primária e síndrome de Kartagener. O fluxo nodal, de fato, é importante na padronização anatômica normal, sendo os cílios necessários para a configuração do situs solitus totalis.

Palavras-chave: Fluxo nodal, Situs Inversus, Defeitos de lateralidade, Discinesia ciliar primária, Síndrome de Kartagener.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cer12 - Cerberus-like 2
FGF8 - Fator de crescimento de fibroblastos 8
LPM - Mesoderma da placa lateral
NVP - Parcela vesicular nodal
PCP - Polaridade celular planar
SHH - Sonic Hedgehog
RA - Ácido Retinóico
TGF- β - Fator de crescimento transformador beta
TIF - Transporte intraflagelar

1 INTRODUÇÃO

O padrão anatômico normal, com todas as estruturas em sua posição habitual, é denominado *situs solitus totalis*. Há variações desta padronização, que podem estar associadas ou não a alterações funcionais importantes: *situs solitus* com dextrocardia, no qual a anormalidade é a presença do ápice



cardíaco no lado direito; *situs inversus*, com os órgãos localizados em posição invertida, mas sem dextrocardia; *situs inversus totalis*, com todos os órgãos invertidos, e *situs ambiguous*, ou heterotaxia, no qual os órgãos toracoabdominais não seguem um padrão normal de disposição, podem estar parcialmente invertidos, dispostos na linha média ou simétricos bilateralmente. A heterotaxia, que frequentemente causa sérios problemas de saúde, é dividida em duas categorias: *situs ambiguous* com poliesplenia, ou isomerismo esquerdo, com um número variável de baços e pulmões bilateralmente bilobados, e *situs ambiguous* com asplenia, ou isomerismo direito, com ausência de baço e pulmões bilateralmente trilobados. Os pacientes com estas alterações são propensos a ter outras malformações, especialmente defeitos cardíacos ¹⁻³.

No contexto anatômico geral, considerando-se além das variações da morfologia cardíaca, os defeitos de lateralidade conhecidos, caracterizados pela disposição anormal de estruturas e órgãos, são documentados há mais de 400 anos, tendo em muitos relatos, entretanto, causas subjacentes desconhecidas. Girolamo Fabrizio foi o primeiro a descrever tais anormalidades, por volta de 1600, seguido por Marco Aurelio Severino, que em 1643 documentou um caso de dextrocardia humana, e por Matthew Baillie, responsável pela descrição de uma reversão completa dos órgãos toracoabdominais em 1788 ^{4,5}.

Em 1995, o estudo publicado de Afzelius demonstrou uma conexão entre alterações nas estruturas ciliares e o *situs inversus*, um dos defeitos de lateralidade da anatomia geral existentes ⁶. Esta correlação pode ser elucidada com as evidências de estudos sobre a gastrulação de embriões de camundongos, que demonstraram que o nó primitivo, caracterizado como uma estrutura organizadora, é constituído por células apresentadoras de cílio único, ou seja, cada célula apresenta um monocílio ⁷.

No nó primitivo totalmente desenvolvido, há um total de 200 a 300 cílios, cada um destes medindo de 7 a 10 micrômetros de comprimento e encontrando-se espaçados por intervalos de 5 a 10 micrômetros. As células nodais centrais contêm monocílios que apresentam motilidade, enquanto as células nodais periféricas (células da coroa) apresentam monocílios imóveis. Os cílios centrais, de tal forma, são capazes de produzir uma rotação e gerar um fluxo direcionado de fluido extra-embriônico para a esquerda através do nó. Esse fato apoia a existência de um modelo de “fluxo nodal”, o qual seria necessário para o desenvolvimento da assimetria esquerda-direita do embrião e, portanto, para uma disposição normal das estruturas anatômicas ^{7,8}.

O conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na determinação da assimetria esquerda-direita fisiológica é fundamental para a compreensão da causalidade de diversos defeitos de lateralidade. O estudo destes estados anatômicos anormais em distúrbios característicos ou de forma isolada permite elucidar não somente o fator desencadeador do problema, mas estabelecer a correlação entre a anormalidade embrionária envolvida e a clínica apresentada. Sob essa perspectiva, o trabalho objetiva apresentar uma revisão da literatura existente nesta esfera, evidenciando as variações do *situs*



habitual em um contexto anatômico geral – sem limitar-se às nomeclaturas do contexto cardíaco – e a ligação entre o conhecido fluxo nodal e a padronização da assimetria normal.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma revisão narrativa da literatura, fundamentada em artigos científicos selecionados das bases de dados MEDLINE/PubMed, SciELO (Scientific Electronic Library Online) e LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), bem como em livros importantes para a explanação da temática. Foram coletados dados e informações pertinentes, com a busca de estudos utilizando-se descritores relacionados aos assuntos tratados e sem um período de publicação pré-estabelecido.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL

Durante a primeira semana do desenvolvimento humano, no estágio de blastogênese, o concepto – formado pelo embrião e suas membranas – dá origem ao blastocisto. Neste, a separação dos blastômeros por líquido na cavidade blastocística configura o trofoblasto e o embrioblasto, que constituem, respectivamente, a formação de sua parede e uma projeção para a cavidade blastocística. Com a degeneração gradual da zona pelúcida, o blastocisto cresce rapidamente e é aderido ao epitélio endometrial. A partir deste momento, o trofoblasto prolifera e se diferencia em duas camadas: o citotrofoblasto (camada interna) e o sinciciotrofoblasto (camada externa) que, com sua síntese enzimática, possibilita a efetiva implantação do blastocisto no endométrio ^{9, 10}.

Com a continuação do progresso de implantação do blastocisto, na segunda semana de desenvolvimento, mudanças morfológicas no embrioblasto, responsável pela formação do embrião, levam à geração do disco embrionário bilaminar, constituído pelo epiblasto e pelo hipoblasto. O epiblasto contribui para a formação da cavidade amniótica, e o hipoblasto, para a da cavidade exocelômica. A formação do disco bilaminar, de tal modo, define o eixo dorsoventral primitivo do embrião. Na terceira semana de desenvolvimento, o disco embrionário bilaminar, por fim, converte-se em um disco embrionário trilaminar, caracterizando o evento de gastrulação. As três camadas germinativas (ectoderma, endoderma e mesoderma embrionários) formadas durante o estágio dão origem a órgãos e tecidos específicos, constituindo o princípio da morfogênese ^{7, 9, 11}.

A gastrulação tem seu início com a formação de uma estrutura longitudinal na linha mediana da superfície do epiblasto: a linha primitiva, próxima à região caudal do disco embrionário, decorrente de uma indução das células epiblasticas pela região extraembrionária. Essa formação define os principais eixos corporais: eixos craniocaudal, mediolateral, dorsoventral e esquerdo-direito. A extremidade cefálica da linha primitiva forma o nó primitivo, considerado uma estrutura organizadora;



este contém uma depressão circular denominada fosseta primitiva, que é contínua caudalmente com o sulco primitivo, uma depressão desenvolvida na linha. A fosseta e o sulco são resultantes de uma invaginação de células da linha primitiva. Algumas dessas células, que migram para o interior do disco embrionário, invadem o hipoblasto, formando uma camada de endoderma definitivo. Outras migram bilateralmente, entre o endoderma e o epiblasto, para formar o mesoderma intra-embrionário. As células epiblasticas remanescentes formam o ectoderma embrionário ^{10, 12}.

3.2 ESTRUTURA CILIAR

Os cílios podem ser definidos como prolongamentos delgados que se projetam da superfície de diferentes células. São constituídos por um eixo citosólico – a matriz ciliar – envolto por um prolongamento da membrana plasmática; em seu interior, essa matriz compreende o axonema, um arcabouço filamentososo que acompanha o eixo longitudinal da estrutura ciliar e é formado por microtúbulos. Estes microtúbulos constituem-se de protofilamentos e brotam do corpúsculo basal (ou corpo basal), que está localizado dentro da célula, sob a membrana plasmática, e ancora os cílios. Além disso, apresentam uma extremidade positiva e uma extremidade negativa, estando esta última voltada para o corpúsculo. O axonema e o corpo basal apresentam duplas (dupletos) e trios de microtúbulos, respectivamente, e são conectados por uma zona de transição. Os microtúbulos A e B das duplas do axonema são contínuos com os microtúbulos A e B das trincas do corpúsculo basal ^{13, 14}.

Os processos de formação e manutenção de cílios e de suas contrapartes, os flagelos, ocorrem mediante o sistema de transporte intraflagelar (TIF), com proteínas motoras associadas aos microtúbulos - cinesina e dineína citoplasmática – envolvidas. Sob um sistema diferente, o processo fundamental para a movimentação das estruturas requer uma proteína motora da classe das dineínas distinta: a dineína axonemal ¹⁵, cuja atividade motriz, assim como a das proteínas do TIF, também demanda a hidrólise de ATP como fonte energética ¹⁶. A dineína axonemal contém braços internos e externos que se projetam do microtúbulo A dos dupletos do axonema e interagem com o microtúbulo B dos dupletos adjacentes, formando pontes de dineína; através de sua atividade ATPásica, então, as porções da proteína associadas ao microtúbulo B deslizam ao longo deste em direção à extremidade negativa. Como efeito, as proteínas motoras promovem o deslizamento de um duplete em relação ao outro e induzem uma curvatura ciliar, caracterizando, desse modo, a dinâmica do batimento de cílios e flagelos ^{13, 17}.

Há três categorias básicas de cílios: móveis, primários e nodais. Os cílios móveis, comumente encontrados em epitélios responsáveis pelo transporte de secreções, e os flagelos, consideravelmente mais longos e únicos por células, possuem uma organização axonemal 9 + 2, ou seja, apresentam 9 dupletos de microtúbulos circundando 2 microtúbulos centrais; os microtúbulos encontram-se associados a proteínas motoras necessárias para a motilidade ciliar. Os cílios primários são projeções



celulares imóveis em um arranjo de microtúbulos $9 + 0$ (9 dupletos de microtúbulos, sem um par central), com ausência de proteínas motoras associadas. São encontrados em células como as dos ductos renais e no epitélio dos ductos biliares, e curvam-se passivamente em decorrência do fluxo de fluidos; desse modo, são capazes de atuar como antenas sensoriais e de gerar e transmitir sinais para o meio intracelular em resposta a eventos extracelulares. Além disso, os cílios primários também estão envolvidos na transdução do sinal Hedgehog atuante no desenvolvimento inicial de vertebrados. Por fim, os cílios nodais, encontrados no embrião, apresentam uma organização axonemal semelhante a dos cílios primários; no entanto, são detentores de proteínas motoras associadas, tendo a capacidade de realizar movimento ativo. A ausência dos pares centrais de microtúbulos possivelmente é responsável por seu movimento rotacional em trajetória de cone completo, contrastando com os cílios móveis $9 + 2$, cuja trajetória é em meio cone ^{18,19}.

Os cílios nodais com arquitetura axonemal $9 + 0$, então, são os responsáveis pela dinâmica do fluxo nodal, que ocorre a uma velocidade de 15 a 20 $\mu\text{m/s}$, especificamente entre os estágios de um a dois somitos e o de seis somitos ²⁰. Ainda, o movimento rotacional é estabelecido no sentido horário, diferentemente dos cílios comumente encontrados ²¹. Estudos em vertebrados também demonstram um posicionamento posterior destes cílios em um momento coincidente com o início do fluxo especificamente para a esquerda. Inicialmente, eles são projetados no centro das células, mas aparentemente tornam-se posteriores pelo movimento do corpo basal para o polo celular posterior ²². Este posicionamento dos monocílios é determinado pela sinalização da via de PCP (Polaridade Celular Planar) em alguns vertebrados ²³.

Além disso, o caráter unidirecional dominante do fluxo para a esquerda torna-se viável pela inclinação também posterior destes cílios a partir de um ângulo vertical, com a trajetória de sua ponta deslocada posteriormente quando comparado à sua raiz; com essa configuração, os cílios realizam um balanço para a esquerda, distanciando-se da superfície da célula, e um movimento para a direita, em direção à superfície desta. Desse modo, ocorre uma movimentação de fluido direcionado especificamente para a esquerda, uma vez que, em acordo com a hidrodinâmica, a superfície da célula é estacionária e retarda o movimento de fluido pela resistência ao cisalhamento e, como efeito, a varredura para a direita é menos efetiva que o movimento para a esquerda ^{22,24}.

3.3 DETERMINAÇÃO DO PLANO ESQUERDO-DIREITO

Na totalidade dos vertebrados, apesar da perceptível simetria externa entre os lados direito e esquerdo, há processos que desencadeiam um padrão assimétrico de organização das estruturas internas e dos órgãos, bem como da rede vascular ²⁵. Os processos fundamentais para gerar assimetria requerem mecanismos distintos. Inicialmente, necessita-se de um mecanismo para a quebra de simetria bilateral do embrião, como uma assimetria molecular. Posteriormente, a sinalização desta assimetria



gerada em pequena escala deve ser estabelecida em regiões maiores do embrião e, finalmente, resultar em uma organogênese assimétrica. Desse modo, o desenvolvimento normal da configuração esquerda-direita resulta no denominado *situs solitus*⁸. O eixo esquerdo-direito é possivelmente determinado com relação aos eixos anteroposterior e dorsoventral, sendo estes os eixos ao longo dos quais ocorre a morfogênese embrionária²⁶.

O início da configuração assimétrica esquerda-direita em vertebrados é um processo controverso. Em camundongos, entretanto, experimentos realizados sugerem que a quebra de simetria inicia-se com a geração do fluxo de fluido extra-embriônico para a esquerda: o conhecido fluxo nodal, que ocorre através do nó primitivo²⁰. O nó é descrito como uma estrutura transitória da linha mediana, detentora de um “poço ciliado” na superfície ventral, que comporta atividade importante para a determinação da assimetria esquerda-direita. Esta atividade pode ser comprovada pelo papel dos monocílios das células nodais, que com seus movimentos rotacionais, são responsáveis por gerar este fluxo nodal. Análises de experimentos com esferas fluorescentes adicionadas ao líquido na região do nó demonstraram a atividade dos cílios no fluxo nodal: em embriões selvagens normais, essas esferas moveram-se unidirecionalmente para a esquerda, mas em embriões mutantes com ausência das proteínas motoras KIF3A e KIF3B, pertencentes à superfamília da cinesina, apresentaram movimento browniano (aleatório)²⁴.

A aplicação de fluxo artificial em embriões de camundongos cultivados também evidenciou a relação entre o fluxo nodal e o início do processo de assimetria. Observou-se que um fluxo rápido direcionado para a direita resultou em uma reversão do fluxo normal para a esquerda e em um desenvolvimento esquerdo-direito reverso. Já a aplicação de um fluxo direcionado para a esquerda em embriões com mutações afetando a inversina – proteína com repetições de anquirina –, que possuíam fluxo nodal lento, e a dineína axonemal esquerda-direita, que possuíam paralisia monociliar, foi suficiente para resgatar o padrão assimétrico normal. Diversas mutações estão relacionadas ao comprometimento do desenvolvimento esquerdo-direito, e alguns dos genes envolvidos são responsáveis pela formação do próprio nó embrionário⁸.

Hirokawa *et al*²⁴ consideram uma ausência de evento assimétrico anterior ao fluxo nodal em camundongos. Dessa maneira, discutem a possibilidade de que o fluxo tenha se tornado o principal mecanismo de assimetria com o surgimento de vivíparos e que seja suficiente para a determinação de lateralidade nos mamíferos. Dasgupta e Amack²² relatam que muitos embriões de vertebrados apresentam estruturas ciliadas análogas ao nó primitivo do camundongo que são responsáveis por um fluxo assimétrico, como a vesícula de Kupffer em determinados peixes, a placa de teto de gastrocele no sapo e a placa notocordal posterior no coelho, caracterizando organizadores esquerda-direita. Entretanto, apontam que os cílios não seriam necessários para gerar assimetria em todos os vertebrados. O nó de Hensen, como exemplificam, comporta a primeira expressão gênica assimétrica



no pintinho, entretanto, essa estrutura pode não apresentar cílios móveis, uma vez que mutantes com cílios defeituosos apresentam desenvolvimento normal da assimetria. Ainda, relatam que o nó do embrião de porco não apresenta cílios, assim como não é exposto a um líquido extra-embriônico – fator também presente no embrião de vaca –, ao contrário do que ocorre no embrião de camundongo. Assim, demonstram que alguns vertebrados, e dentre eles os mamíferos, podem utilizar mecanismos independentes dos cílios no desenvolvimento da assimetria, diferentemente da ideia de que o fluxo nodal, *per se*, seja suficiente.

Considerando uma geração de informação assimétrica pautada no mecanismo do fluxo nodal, esta pode ser elucidada, a princípio, a partir de dois modelos propostos. O primeiro diz respeito à formação de um gradiente de morfógenos no lado esquerdo do nó – equivalente ao organizador esquerdo-direito do camundongo; os morfógenos químicos seriam secretados no nó e transportados para a esquerda através do fluxo nodal. O segundo propõe a existência de uma estimulação física gerada pelo fluxo, que seria mecanicamente detectada pelos cílios imóveis da região periférica do nó, sendo denominado “modelo de dois cílios”, uma vez que há cílios distintos responsáveis tanto pela geração do fluxo, quanto pela percepção deste ²⁴.

McGrath e Brueckner ⁸ esclarecem que, de fato, o fluxo pode ser responsável por gerar um gradiente morfogênico no lado esquerdo do nó; a molécula morfogênica, então, seria capaz de configurar uma cascata de expressão gênica assimétrica à esquerda. Muitas moléculas encontradas na estrutura, como o Nodal, realizam uma atividade no desenvolvimento esquerdo-direito, sendo, desse modo, candidatas ao papel de morfógeno. Os genes expressos em um lado único da linha média embrionária empregam mecanismos para propagar sinais entre subpopulações celulares, e isso resulta, ocasionalmente, na morfogênese assimétrica de estruturas específicas. No geral, os produtos gênicos responsáveis pela assimetria não estão envolvidos unicamente neste processo, e alguns deles nem mesmo estão presentes de maneira assimétrica ²⁶.

Nodal é uma molécula de sinalização pertencente à família de proteínas do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), inicialmente expressa de forma bilateral nas células da coroa do organizador do camundongo. A proteína produzida no nó pode migrar para o mesoderma da placa lateral (LPM) esquerda e, assim, ativar a expressão do próprio gene *Nodal*; a manifestação assimétrica no LPM tem seu início no estágio de dois somitos e finda no estágio de seis somitos, levando à conclusão de que o fluxo nodal pode ocorrer especificamente para dar início à expressão *Nodal* no lado esquerdo. As células do LPM esquerda que receberam a sinalização Nodal, então, contribuem para as características morfológicas específicas do lado esquerdo, enquanto as do lado direito, que não receberam, contribuem para as características do direito ^{20, 27}.

O fator de crescimento de fibroblastos 8 (FGF8) transportado pelo fluxo nodal também parece necessário para a determinação esquerda-direita por algum mecanismo, uma vez que camundongos



deficientes em *Fgf8* apresentam ausência de expressão *Nodal* no LPM. Nos mamíferos, a sinalização *Nodal* também induz a expressão dos genes *Lefty*: *Lefty1*, predominantemente na linha média do embrião, e *Lefty2*, predominantemente no LPM esquerda. A ausência de algum destes – *Lefty1*, que atua como uma barreira na linha média, ou *Lefty2*, que atua como um inibidor de feedback do *Nodal* – leva a um “vazamento” do sinal *Nodal* do mesoderma da placa lateral esquerda para o lado direito, resultando em expressão *Nodal* bilateral e alteração da morfologia normal ^{20, 26}.

Além dos genes *Nodal* e *Lefty2*, *Pitx2* também é expresso no LPM esquerda, e sua expressão assimétrica é induzida pela sinalização *Nodal*. O fator de transcrição *Pitx2* é considerado o principal regulador da organogênese assimétrica em nível molecular, mas há mecanismos independentes do fator também operantes. A atividade *Nodal*, necessária para a cascata de expressões assimétricas, pode, ainda, ser controlada por uma proteína pertencente à família dos antagonistas do TGF- β , *Cerl2* (Cerberus-like 2). A princípio, a proteína é encontrada nas células da coroa de ambos os lados do nó, no estágio inicial de desenvolvimento do camundongo. *Cerl2*, então, acumula-se no lado direito e impede que o *Nodal* atue no LPM direita. Posteriormente, a proteína é translocada pelo fluxo nodal para a esquerda, encerrando a atividade *Nodal* no lado esquerdo do nó e no LPM esquerda em um tempo preciso ^{20, 28}.

Já no “modelo de dois cílios”, as características distintas dos monocílios do organizador do camundongo podem ofertar fundamentação para a hipótese. Os monocílios que são móveis, localizados centralmente, contêm a proteína motora *Lrd* (dineína esquerda-direita) e a proteína policistina-2, um canal permeável a cátions; os cílios imóveis, localizados periféricamente, carecem da proteína *Lrd*, mas possuem a policistina-2. Esta proteína é um canal ativado por cálcio, que nos cílios primários do epitélio renal funciona como um mecanotransdutor, aumentando a concentração de cálcio intracelular em resposta ao fluxo de fluidos. Na estrutura nodal, evidencia-se que, enquanto os monocílios detentores de *Lrd* geram o fluxo nodal, os monocílios imóveis, que não possuem a proteína *Lrd*, podem funcionar como cílios mecanossensoriais. Assim, eles detectam o fluxo nodal para a esquerda, e a policistina-2 existente leva a um aumento de cálcio intracelular no lado esquerdo do nó, gerando uma sinalização assimétrica. O sinal de cálcio resultante da mecanossensibilidade, então, pode desencadear a expressão de um fator de crescimento específico à esquerda do nó ^{25, 29}.

Um terceiro mecanismo proposto para a geração de informação assimétrica pelo fluxo nodal – análogo ao primeiro modelo – diz respeito às parcelas vesiculares nodais (NVPs). NVPs são materiais secretados da superfície do nó de camundongo que são transportados para a esquerda através do fluxo. Estas vesículas são constituídas por partículas lipoproteicas revestidas por uma membrana; podem compreender, também, um conteúdo de moléculas de sinalização, como Sonic Hedgehog (SHH), Ácido Retinóico (RA) e outros morfógenos. As NVPs aparentemente fragmentam-se no lado esquerdo do nó, com o auxílio dos cílios periféricos, através da interação do SHH das vesículas com o seu



receptor denominado Smoothed nos cílios, e são absorvidas pela superfície nodal. Assim, elas podem ser responsáveis pela produção de um gradiente de concentração à esquerda do nó, e as moléculas liberadas podem desempenhar um papel na determinação esquerda-direita. Além disso, podem ser também responsáveis por uma elevação assimétrica de cálcio intracelular através da sinalização Hedgehog ^{21, 24}.

Shiratori e Hamada ²⁰, entretanto, expõem o fato de que o SHH desempenha um papel importante na determinação esquerda-direita em espécies aviárias, mas em vertebrados distintos, como o camundongo, não parece estar diretamente envolvido na determinação assimétrica, e sim na formação de uma linha média funcional. Da mesma forma, o RA estaria relacionado à manutenção de simetria bilateral durante a formação de somitos, mas não à determinação esquerda-direita em si. Com isso, os autores refutam o potencial papel do conteúdo das NVPs no estabelecimento, de fato, da configuração assimétrica em outros vertebrados.

Macroscopicamente, ao menos três mecanismos distintos estão envolvidos na formação das estruturas anatomicamente assimétricas: o primeiro diz respeito ao “looping” direcional de órgãos inicialmente tubulares, como o coração, que passam por uma série de etapas (looping, flexão e rotação) e alcançam o seu posicionamento final correto; o segundo corresponde à ramificação diferencial, em que um par de órgãos formados simetricamente, em ambos os lados, adquire diferenças em seu tamanho ou padrão de ramificação, como ocorre com os pulmões e; o terceiro – regressão unilateral – está relacionado ao desaparecimento de um dos lados de uma estrutura simétrica, como um vaso sanguíneo ²⁰. A falha nos processos de estabelecimento da assimetria esquerda-direita adequada resulta em uma gama de defeitos de lateralidade, como ausência da quebra da simetria bilateral, localização independente das estruturas em relação ao *situs* normal e orientação assimétrica parcial ou totalmente anormal ^{26, 29}.

3.4 ANORMALIDADE CILIAR

Alterações de genes associados aos cílios podem levar a mudanças de sua estrutura e afetar seus mecanismos de sinalização em variadas localidades anatômicas. O gene *PKHD1* (Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1), por exemplo, codifica a proteína fibrocistina, ou poliductina, expressa no axonema e no corpo basal de cílios primários. As mutações no gene levam à doença renal policística autossômica recessiva, uma forma grave de doença renal cística pediátrica ³⁰. Os genes *PKD1* (Polycystic Kidney Disease 1) e *PKD2* (Polycystic Kidney Disease 2) codificam as proteínas policistina, que também estão localizadas nos cílios primários e que desempenham papel necessário para a funcionalidade renal. As mutações que envolvem estes genes são responsáveis pela ciliopatia da doença renal policística autossômica dominante, ou doença policística renal do adulto ^{31, 32}.



Os genes ciliares *BBS* (Bardet-Biedl Syndrome) mutantes causam a síndrome de Bardet-Biedl, uma desordem autossômica recessiva rara que leva a manifestações variadas, como obesidade, anomalias renais, hipogonadismo e retinopatia³³. Também é caracterizada por acometimento dos cílios primários, uma vez que as proteínas BBS normalmente codificadas localizam-se no corpo basal e no axonema ciliares e contribuem para a formação de um complexo atuante no sistema de transporte intraflagelar³⁴.

Outras mutações que levem à ausência ou à imotilidade dos cílios podem acarretar anormalidades na organização esquerda-direita, confirmando o papel essencial destes em gerar o fluxo nodal direcionado e, conseqüentemente, o processo inicial de quebra de simetria. Os camundongos com o gene *Dvl* mutante – gene responsável pela codificação da Dishevelled, proteína citoplasmática da via de PCP – apresentam interrupção do posicionamento posterior dos corpos basais e randomização do fluxo, o que também determina uma defeituosa padronização esquerda-direita³⁵.

3.4.1 Alterações da lateralidade do coração

A anatomia cardíaca também envolve a caracterização de *situs* e suas complexidades. O *situs solitus* atrial corresponde ao arranjo habitual do átrio morfologicamente direito à direita e do esquerdo à esquerda, enquanto a imagem espelhada desta situação corresponde ao *situs inversus*. A presença de isomerismo atrial, com os dois átrios apresentando a morfologia direita ou esquerda, constitui o *situs ambiguous*. Ainda, a conexão atrioventricular é caracterizada como concordante, quando o átrio direito está conectado ao ventrículo direito e o átrio esquerdo ao ventrículo esquerdo, e discordante, quando o átrio direito conecta-se ao ventrículo esquerdo e o átrio esquerdo ao ventrículo direito; quando os átrios estão conectados a uma única câmara ventricular, configura-se a conexão univentricular. A conexão venoatrial também é analisada, observando-se como as veias sistêmicas e pulmonares estão conectadas às câmaras atriais. A conexão ventriculoarterial, por fim, é classificada como: concordante, quando a aorta emerge do ventrículo esquerdo e o tronco pulmonar do ventrículo direito; discordante, quando ocorre o oposto; dupla via de saída, quando os dois vasos emergem de um mesmo ventrículo; e via de saída única, quando apenas um vaso arterial emerge do coração ou existe atresia aórtica ou pulmonar^{36, 37}.

3.5 NA CLÍNICA MÉDICA

3.5.1 Discinesia Ciliar Primária

A discinesia ciliar primária (DCP) é um distúrbio classicamente autossômico recessivo, raramente ligado ao cromossomo X, ocasionado por mutações em mais de 40 genes responsáveis pela codificação de proteínas necessárias para a montagem e o funcionamento adequados dos cílios móveis. Genes mutantes distintos determinam gravidades também distintas de sintomatologia, sendo esta



dependente da extensão das alterações estruturais e funcionais ciliares. Mutações no gene *DNAH5* (Dynein Axonemal Heavy Chain 5), por exemplo, que codifica a cadeia pesada do braço externo da dineína das zonas proximal e distal do cílio, levam à imotilidade ciliar, enquanto mutações no gene *DNAH9* (Dynein Axonemal Heavy Chain 9), que codifica a cadeia pesada do braço externo da dineína da zona distal, levam apenas a uma curvatura reduzida da porção ciliar distal e não alteram a frequência de batimento^{38,39}.

O distúrbio é caracterizado por uma disfunção ciliar generalizada e, portanto, há comprometimentos ciliares em distintas regiões anatômicas, como no epitélio do trato respiratório, no epitélio dos ductos deferentes, nas tubas uterinas e no epêndima, bem como há comprometimento dos espermatozoides. Assim, a doença predispõe à depuração mucociliar disfuncional e a infecções respiratórias recorrentes, sendo importante considerá-la como um diagnóstico diferencial nos casos de infecções crônicas do sistema respiratório, e também se associa frequentemente à infertilidade e à hidrocefalia, além de outras manifestações clínicas (TAB. 1). A presença de outros indicadores clínicos também levanta a suspeita de DCP, incluindo um histórico familiar ou pessoal de ciliopatias e a existência de distúrbios de lateralidade, uma vez que os cílios que apresentam motilidade desempenham papel essencial no padrão esquerdo-direito^{40,41}.

TABELA 1 - Manifestações clínicas da discinesia ciliar primária

Pulmão	Síndrome de dificuldade respiratória, pneumonia, atelectasia (período neonatal)
	Tosse crônica produtiva
	Broncorreia
	Episódios recorrentes de pneumonia
	“Asma brônquica” grave e/ou atípica, com ausência de resposta à terapêutica convencional
	Bronquiectasias
	Hipocratismo digital
Ouvido médio	Otite média serosa crônica
	Hipoacusia de transmissão
	Otorreia persistente após timpanostomia
Seios paranasais e fossas nasais	Rinossinusite crônica
	Polipose nasal
	Rinorreia mucopurulenta contínua (início do período neonatal)
Lateralização de órgãos	<i>Situs inversus</i> total
	Heterotaxia -isomerismo esquerdo (poliesplenia) -isomerismo direito (asplenia)
Fertilidade	Infertilidade masculina



	Diminuição da fertilidade feminina e gravidez ectópica
Doenças associadas	Cardiopatía congênita complexa
	Doença policística renal e/ou hepática
	Atresia biliar
	Atresia esofágica
	Refluxo gastroesofágico grave
	Hidrocefalia
	Retinite pigmentosa

Fonte: Adaptado de Fermeiro *et al*⁴²

O diagnóstico definitivo é estabelecido quando coexistem pelo menos três das seguintes manifestações fenotípicas: dificuldade respiratória em nascidos a termo, congestão nasal crônica e tosse produtiva crônica durante o ano todo, otite média crônica com efusão por mais de 6 meses, pansinusite crônica, bronquiectasia e outras infecções recorrentes do trato respiratório inferior e, por fim, infertilidade masculina, defeitos de lateralidade e histórico familiar da doença. Quando há uma presença simultânea de bronquiectasia, pansinusite e *situs inversus totalis*, um dos distúrbios de lateralidade existentes, o diagnóstico é de síndrome de Kartagener^{41, 42}.

3.5.2 Síndrome de Kartagener

A síndrome de Kartagener é um subgrupo da discinesia ciliar primária, sendo a forma clínica mais grave do distúrbio e estando presente em 50% dos casos. Relaciona-se à deficiência da dineína ciliar, proteína responsável pela geração da força mecânica no movimento dos cílios. Também é conhecida como síndrome dos Cílios Imóveis, associando-se à ausência de seios frontais, à rinosinusite crônica e à bronquiectasia, com infecções respiratórias recorrentes e danos às vias aéreas. Os espermatozoides são imóveis, sendo o indivíduo do sexo masculino portador, infértil^{40, 43}.

O principal quadro de uma criança nascida com o distúrbio é baseado em sintomas pulmonares, que se tornam evidentes dentro de 24 horas pós-nascimento e que, em um significativo número de casos, causam a síndrome do desconforto respiratório neonatal. Outros sintomas típicos associados à busca de auxílio médico referem-se a infecções recorrentes da orelha, tosse úmida persistente, congestão nasal e sibilância crônica. Em acordo com as anormalidades que acompanham a DCP, a síndrome de Kartagener também apresenta condições justificadas pelas alterações ciliares, que levam ao posicionamento anormal de determinados órgãos e a alterações da função de outras estruturas. Aproximadamente 20% dos pacientes com *situs inversus* pertencem ao grupo portador da síndrome de Kartagener^{44, 45}.



3.5.3 *Situs Inversus*

O *situs inversus* é caracterizado como um arranjo em imagem espelhada dos órgãos abdominais, mas com um *situs* cardíaco normal, ou seja, o ápice está localizado no hemitórax esquerdo e, portanto, há uma levocardia. Já o *situs inversus totalis* caracteriza-se pela imagem espelhada do *situs solitus totalis*, incluindo vísceras abdominais em localização reversa, pulmão direito bilobado e esquerdo trilobado e dextrocardia. Assim, o indivíduo exibe assimetria esquerda-direita completamente invertida, com transposição das vísceras no tórax e no abdome^{46,47}. A anormalidade é tipicamente assintomática e não é considerada uma condição pré-maligna, entretanto, um pequeno número de casos de câncer foi relatado, bem como malformações cardiovasculares, anomalias intestinais e comorbidades respiratórias⁴⁸.

Esta anormalidade é herdada como um traço genético autossômico recessivo e pode ocorrer em combinação com a discinesia ciliar primária. No entanto, alguns genes são responsáveis pela ocorrência do *situs inversus* e não estão associados à ocorrência da DCP, sendo os mecanismos envolvidos nesta alteração de lateralidade isolada fundamentados no papel de alguns destes genes na codificação de proteínas ciliares. Mutações no gene *CFAP52* (Cilia and Flagella Associated Protein 52), por exemplo, que codifica uma proteína atuante nos processos de transdução de sinal ciliares, estabelecem causalidade com a ocorrência do *situs inversus* e da heterotaxia em pacientes não portadores de discinesia^{49,50}.

Nos Estados Unidos, observou-se uma distribuição média de 1 a cada 10 mil indivíduos, no entanto, a descoberta de tal alteração morfológica não depende de sintomas decorrentes da própria inversão dos órgãos, muitas vezes sendo descoberta na pesquisa de alterações de saúde não relacionadas, ou até mesmo no momento da necropsia. Tal fato pode ser observado com a paciente americana Rose Marie Bentley, que faleceu de causas naturais, mas assim que seu corpo foi doado para pesquisas a uma universidade em Portland, no Estado do Oregon, os alunos de uma turma de anatomia perceberam que muitos de seus órgãos estavam espelhados⁵¹.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As evidências científicas pautadas nos estudos analisados denotam o papel que, de fato, o fluxo nodal pode desempenhar no estabelecimento da assimetria esquerda-direita normal em determinados vertebrados e, portanto, no padrão anatômico habitual. Adicionalmente, a clínica apresentada por pacientes portadores de distúrbios ciliares reafirma a concepção de que os cílios estão envolvidos na definição de um padrão de *situs solitus totalis*. Como efeito, os defeitos de lateralidade que inicialmente possuíam uma causalidade indefinida podem ser progressivamente compreendidos e, assim, notabiliza-se a necessidade de uma constante obtenção de conhecimento no âmbito da



embriologia, visando elucidar as diversas anormalidades que envolvem o desenvolvimento humano e os mecanismos envolvidos na ocorrência destas.



REFERÊNCIAS

- MUJO, T.. FINNEGAN, T.. JOSHI, J.. WILCOXEN, K. A.. REED, J. C. Situs ambiguous, levocardia, right sided stomach, obstructing duodenal web, and intestinal nonrotation: a case report. *J Radiol Case Rep.* 2015;9(2). p. 16-23.
- JUNCOS C., María. ROS F., María Amparo. MARAVALL LL, María. ÁLVAREZ-PITTI, Julio. Situs inversus totalis: a propósito de 2 casos clínicos. *Rev chil pediatr.* 2014;85(3). p. 344-50,.
- LAGROTTA, G.. MOISES, M. Heterotaxy Polysplenia Syndrome in Adulthood: Focused Review and a Case Report. *Cureus.* 2020;12(1). p. e6822.
- CHANDRARAJ, S. Observations on some additional abnormalities in situs inversus viscerum. *J Anat.* 1976;122(Pt 2). p. 377-88.
- PENNEKAMP, P.. MENCHEN, T.. DWORNICZAK, B.. HAMADA, H. Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later, what is the connection? *Cilia.* 2015;4(1). p. 1.
- AFZELIUS, B. A. Situs inversus and ciliary abnormalities. What is the connection? *Int J Dev Biol.* 1995;39(5). p. 839-44.
- SCHOENWOLF, S.. BLEYL, S.B.. BRAUER, P.R.. FRANCIS-WEST, P.H. Larsen: *Embriologia Humana.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. 576 p.
- MCGRATH, J.. BRUECKNER, M. Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(4). p. 385-92.
- MOORE, K.L.. PERSAUD, T.V.N.. TORCHIA, M.G. *Embriologia Clínica.* 10ª ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. 552 p.
- SADLER, T. W. Langman: *Embriologia médica.* 13ª ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016. 348 p.
- CARLSON, B.M. *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento:* Elsevier Editora Ltda.; 2014. 520 p.
- STANDRING, S. *Gray's anatomia: A base anatômica da prática clínica.* 40ª ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda.; 2010. 1583 p.
- DE ROBERTIS, E. M.. HIB, J. *Biologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
- ISHIKAWA, T. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(1). p.
- KIERSZENBAUM, A.L.. TRES, L. L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.* 4 ed. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan; 2016. 752 p.
- NELSON, D.L.. LEHNINGER, A.L.. COX, M.M.. FOIX, C.M.C.. LEÓN, S.. ROCA, J.V. *Lehninger principios de bioquímica.* 6 ed ed. Porto Alegre: Artmed; 2013. 1328 p.
- LODISH, Harvey. BERK, Arnold. KAISER, Chris A.. KRIEGER, Monty. BRETSCHER, Anthony. PLOEGH, Hidde. *Biologia celular e molecular.* 7ª ed. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014. 1244 p.



PAWLINA, W. Ross Histologia: Texto e Atlas. 7^o ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016. 984 p.

GOETZ, S. C.. ANDERSON, K. V. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5). p. 331-44.

SHIRATORI, H.. HAMADA, H. The left-right axis in the mouse: from origin to morphology. *Development.* 2006;133(11). p. 2095-104.

HIROKAWA, N.. TANAKA, Y.. OKADA, Y. Left-right determination: involvement of molecular motor KIF3, cilia, and nodal flow. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(1). p. a000802.

DASGUPTA, A.. AMACK, J. D. Cilia in vertebrate left-right patterning. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1710). p.

WALLINGFORD, J. B.. MITCHELL, B. Strange as it may seem: the many links between Wnt signaling, planar cell polarity, and cilia. *Genes Dev.* 2011;25(3). p. 201-13.

HIROKAWA, N.. TANAKA, Y.. OKADA, Y.. TAKEDA, S. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell.* 2006;125(1). p. 33-45.

NORRIS, D. Breaking the left-right axis: do nodal parcels pass a signal to the left? *Bioessays.* 2005;27(10). p. 991-4.

LEVIN, M. Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech Dev.* 2005;122(1). p. 3-25.

NAKAMURA, T.. MINE, N.. NAKAGUCHI, E.. MOCHIZUKI, A.. YAMAMOTO, M.. YASHIRO, K., et al. Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system. *Dev Cell.* 2006;11(4). p. 495-504.

INACIO, J. M.. MARQUES, S.. NAKAMURA, T.. SHINOHARA, K.. MENO, C.. HAMADA, H., et al. The dynamic right-to-left translocation of *Cer12* is involved in the regulation and termination of Nodal activity in the mouse node. *PLoS One.* 2013;8(3). p. e60406.

MCGRATH, J.. SOMLO, S.. MAKOVA, S.. TIAN, X.. BRUECKNER, M. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell.* 2003;114(1). p. 61-73.

DIAS, Natasha Favoretto. LANZARINI, Vivian. ONUCHIC, Luiz Fernando. KOCH, Vera Hermina Kalika. Aspectos clínicos da doença renal policística autossômica recessiva DRPAR. *Brazilian Journal of Nephrology.* 2010;32. p. 263-7.

BETTENCOURT-DIAS, M.. HILDEBRANDT, F.. PELLMAN, D.. WOODS, G.. GODINHO, S. A. Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet.* 2011;27(8). p. 307-15.

WALKER, R. V.. KEYNTON, J. L.. GRIMES, D. T.. SREEKUMAR, V.. WILLIAMS, D. J.. ESAPA, C., et al. Ciliary exclusion of Polycystin-2 promotes kidney cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Nat Commun.* 2019;10(1). p. 4072.

TOLEDO, Nathalia Bufolin. MAIMONE, Juliana Borges Risolia. MARCOS, Alléxya Affonso Antunes. LEITE, Eduardo Henrique Morizot. COUTO JUNIOR, Abelardo de Souza. Síndrome de Bardet-Biedl: série de caso e revisão da literatura. *Revista Brasileira de Oftalmologia.* 2018;77. p. 360-2.



ADAMIOK-OSTROWSKA, A.. PIEKIELKO-WITKOWSKA, A. Ciliary Genes in Renal Cystic Diseases. *Cells*. 2020;9(4). p.

WALLINGFORD, J. B. Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(5). p. 597-604.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo: patologia*. 9ª ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016. 1556 p.

CAVALINI, J. F.. AIELLO, V. D.. EBAID, M. Ausência de Conexão Atrioventricular à Direita. Apresentação Morfológica e Clínica quando o Ventrículo Principal é Morfologicamente Direito. *Arq Bras Cardiol*. 2020;71(6). p. 793-6.

POPRZECZKO, M.. BICKA, M.. FARAHAT, H.. BAZAN, R.. OSINKA, A.. FABCZAK, H., et al. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells*. 2019;8(12). p.

HORNEF, N.. OLBRICH, H.. HORVATH, J.. ZARIWALA, M. A.. FLIEGAUF, M.. LOGES, N. T., et al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(2). p. 120-6.

ORTEGA, Hugo Alejandro Vega. VEGA, Nelson de Araujo. SANTOS, Bruno Quirino dos. MAIA, Guilherme Tavares da Silva. Discinesia ciliar primária: considerações sobre seis casos da síndrome de Kartagener. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007;33. p. 602-8.

OLM, Mary Anne Kowal. CALDINI, Elia Garcia. MAUAD, Thais. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2015;41. p. 251-63.

FERMEIRO, Joana. BANDEIRA, Teresa. LOBO, Luísa. PEREIRA, Luísa. Discinesia ciliar primária revisitada: A propósito de três casos clínicos *Revista Portuguesa de Pneumologia*. 2010;16. p. 837-47.

GOMES, Juliana de Oliveira. SCURO, Gisele. GREGÓRIO, Carla. LOPES, Renato Delascio. GUIMARÃES, Hélio Penna. LOPES, Antonio Carlos. Síndrome de Kartagener. Relato de Caso. *Rev Bras Clin Med*. 2008;6. p. 210-2.

GÓMEZ-CORREA, Sandra Viviana. RUÍZ-ÁNGEL, Iván David. SALAZAR-DÍAZ, Luis Carlos. Kartagener syndrome, current data on a classical disease. case report. *Case reports*. 2018;4. p. 137-44.

PÉREZ CRESPO, Ma. del Rocío. FARÍÑAS SALTO, Mercedes. CHACÓN AGUILAR, Rocío. NAVAS CARRETERO, Adriana. SANAVIA MORÁN, Eva. ALBI RODRÍGUEZ, Salomé, et al. Síndrome de Kartagener: diagnóstico neonatal. A propósito de un caso. *Arch Argent Pediatr*. 2019;117(3). p. 292-6.

GONÇALVES, Luiz Flávio Galvão. SOUTO, Fernanda Maria Silveira. FARO, Fernanda Nascimento. MENDONÇA, Rodrigo de Castro. OLIVEIRA, Joselina Luzia Menezes. SOUSA, Antônio Carlos Sobral. Dextrocardia com situs inversus associada à miocardiopatia não compactada. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2013;101. p. e33-e6.

YILMAZ, Seher. DEMIRTAS, Abdullah. TOKPINAR, Adem. ACER, Niyazi. Dextrocardia and Situs Inversus Totalis in a Turkish Subject: A Case Report. *International Journal of Morphology*. 2019;37. p. 900-2.



ALJURE REALES, Vicente de Jesús. ÁLVAREZ GALLEGO, Gloria Camila. ÁVILA ESPITIA, Nasly Consuelo. ARRIETA COLEY, Alexandra. ÁNGEL SUÁREZ, Orlando Germany. Situs inversus totalis: revisión de tema con aproximación a la Genética y reporte de casos. Revista Colombiana de Cardiología. 2017;24(1). p. 40-7.

POSTEMA, Merel C.. CARRION-CASTILLO, Amaia. FISHER, Simon E.. VINGERHOETS, Guy. FRANCKS, Clyde. The genetics of situs inversus without primary ciliary dyskinesia. Scientific Reports. 2020;10(1). p. 3677.

GORT HERNÁNDEZ, Magaly. Situs inversus totalis: presentación de un caso. Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río. 2010;14. p. 250-5.

LAMOTTE, Sandee. CNN News. She lived for 99 years with organs in all the wrong places and never knew it. 2019. p.