Mary Anne Kowal Olm

Avaliação da ultraestrutura e do movimento ciliar em crianças com pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Carlos Rodrigues

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Olm, Mary Anne Kowal

Avaliação da ultraestrutura e do movimento ciliar em crianças com pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido / Mary Anne Kowal Olm. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Pediatria.

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Joaquim Carlos Rodrigues.

Descritores: 1.Síndrome de Kartegener/diagnóstico 2.Síndrome de Kartegener/patologia 3.Cílios

USP/FM/SBD-001/10

A meus pais,
Nádia Kowal Olm e Erich Willy Olm,
pelo eterno exemplo.

A minha tia Anna Saj Kowal,
pelo constante estímulo a meus projetos acadêmicos,
e

Aos meus amigos especiais,
Jacy Pontremolez Varalta
e

Ney Luiz Bellegard,
pelo apoio em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Dr. Joaquim Carlos Rodrigues, pela oportunidade de realizar esta pesquisa, pela disposição em resolver todas as adversidades encontradas no percurso deste trabalho, e pelo exemplo de correção.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pelo financiamento deste projeto, via FAPESP, e pela disponibilização do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental - Lim - 05 para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Eduardo Kögler Jr., pelo desenvolvimento do sistema de captura de imagem e medição aqui descritos, que deu um diferencial para esta pesquisa, e pela paciência extrema com minhas eternas dúvidas.

À bióloga britânica Amélia Shoemark, do Hospital Royal Brompton de Londres, Reino Unido, pelos ensinamentos de microscopia eletrônica ciliar e certificação dos laudos.

À Profa. Dra. Mariângela Macchione, pela orientação nos ensinamentos do laboratório.

Ao Dr. Ascédio José Rodrigues, pela realização das broncoscopias de mucosa brônquica dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Ulisses Dória, pela atenção recebida e pela orientação estatística.

Às Professoras Naomi Kondo Nakagawa e Regiane de Oliveira, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, pelo estímulo constante.

Ao Prof. Dr. Adriano Alencar, pela opinião especializada.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Fonseca, pelo auxílio na revisão e ensinamentos.

À Profa. Dra. Élia Caldini, pelo apoio concedido às dificuldades da microscopia eletrônica durante esta pesquisa.

Aos médicos radiologistas Dr. Luís Antônio Nunes de Oliveira, Dra. Lisa Suzuki e Dra. Carmen Fujita, pelas avaliações das imagens.

Ao médico otorrinolaringologista Dr. Waldir Carreirão Neto, que trabalhou nas avaliações da especialidade.

Aos médicos assistentes do serviço de pneumologia do Instituto da Criança: Cleyde Myriam Aversa Nakaie, Joselina Magalhães Andrade Cardieri, Fabíola Villac Adde e Luís Vicente Ribeiro Ferreira da Silva Filho, pela atenção dedicada a esta pesquisa.

Ao técnico em microscopia eletrônica Adão Caetano Sobrinho, pelo apoio na leitura da microscopia eletrônica.

Às funcionárias do laboratório de microscopia eletrônica: Maria Margarida Teixeira Monteiro, Maria Cecília Santos Lobo Marcondes e Mirian Regina Pelleschi Taborda Simoni, pelo esforço e cuidado para que o material encaminhado pudesse ser avaliado.

À bióloga Júlia Maria Lúcia La Chioma Silvestre, do Laboratório de Microscopia eletrônica do INCOR, pela atenção dispensada a este trabalho.

À professora de português Sra. Ivone Borelli, que corrigiu esta tese baseada nas novas normas da ortografia da língua portuguesa.

À amiga Therezinha Beatriz Rodrigues Barros, cirurgiã e especialista em web design, pelo auxílio nas edições dos vídeos.

À bibliotecária Mariza Kazue Uemetsu Yoshikawa, pela ajuda na aquisição do material bibliográfico de estudo.

Às minhas amigas pediatras Sheila Niskier e Eliana Goldman Fares pelos constantes estímulos para com este trabalho.

Aos pacientes e voluntários desta pesquisa, pela colaboração e pelo muito que me ensinaram.

“O batimento ciliar foi uma das primeiras características, o alpha (α),
da vida animal na terra, e será a última, o ômega (Ω)”
J. C. de Man, médico e historiador holandês.
Acta Otorhinolaryngol Belg. 2000;54(3):293-8

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de tabelas
Lista de figuras
Lista de abreviaturas
Resumo
Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Revisão da Literatura	1
1.1.1	Histórico	1
1.1.2	Prevalência	2
1.1.3	A estrutura e função do aparelho ciliar	2
1.1.4	Genética.....	10
1.1.5	Defeitos ciliares	13
1.1.6	Função ciliar: frequência de batimento e padrão da onda	18
1.1.7	Quadro clínico	21
1.1.8	Condições clínicas associadas.....	23
1.1.9	Síndromes comumente associadas.....	25
1.1.10	Diagnóstico	28
1.1.11	Testes de triagem diagnóstica	30
1.1.12	Obtenção de cílios	32
1.1.13	Fisiopatologia da doença do trato respiratório.....	33
1.1.14	Radiologia	33
1.1.15	Evolução	34
1.1.16	Tratamento	34
1.1.17	Prognóstico	37
1.2	Justificativa da Pesquisa.....	37
2	OBJETIVOS	39
3	MÉTODOS	40
3.1	Limitações do estudo	41
3.2	População analisada	41
3.3	Crítérios de seleção de pacientes	41
3.4	Número de pacientes.....	43
3.5	Procedimentos realizados.....	43
3.6	Sistema de medição da frequência de batimento ciliar	47
3.7	Medição da frequência de batimento ciliar	51
3.8	Cálculo da frequência de batimento ciliar de cada paciente.....	51
3.9	Procedimentos realizados com os pacientes diagnosticados.....	54
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS	57
5.1	Casuística.....	57
5.2	Resultados da frequência de batimento ciliar.....	58
5.3	Verificação do padrão da onda	60
5.4	Características dos pacientes com discinesia ciliar primária	61
6	DISCUSSÃO	71
6.1	Quanto à seleção de pacientes para investigação diagnóstica	71
6.2	Quanto ao uso do escovado nasal.....	72
6.3	Quanto ao cálculo da frequência de batimento ciliar estabelecido ..	73

6.4	Padrão de onda	77
6.5	Quanto à avaliação da microscopia eletrônica	78
6.6	Pacientes diagnosticados	82
6.7	Função pulmonar	83
6.8	Avaliação radiológica	84
6.9	Avaliação otorrinolaringológica	85
6.10	Síntese	86
7	PERSPECTIVAS	88
8	CONCLUSÕES	89
9	ANEXOS	90
9.1	Autorização do Comitê de Ética	90
9.2	Termo de consentimento para participação em pesquisa	91
9.3	Protocolo de Pesquisa	96
9.4	Técnica do escovado nasal para a coleta de células ciliadas	99
9.5	Protocolo de radiação para realização de tomografias	101
9.6	Escores de Bhalla e de Lund-Mackay	102
9.7	Contagem e descrição dos defeitos ciliares – Royal Brompton.....	104
9.8	Casuística de centros britânicos de discinesia ciliar primária	105
9.9	DVD do movimento ciliar	109
10	REFERÊNCIAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura ciliar em corte axial	4
Figura 2 - Esquema da haste ciliar	5
Figura 3 - Localização das cadeias de proteínas	7
Figura 4 - Classificação dos cílios	9
Figura 5 - Genes relacionados com defeitos da ultraestrutura	12
Figura 6 - Orientação ciliar normal e alterada	16
Figura 7 - Movimento ciliar normal (A) e alterado (B,C e D)	20
Figura 8 - Escova de citologia descartável utilizada	44
Figura 9 - Ponta da escova para a coleta do escovado nasal	44
Figura 10 - Tubo de eppendorf para coleta de células ciliadas	46
Figura 11 - Porta-telas de amostras para microscopia eletrônica	46
Figura 12 - Sistema de medição da frequência de batimento ciliar	47
Figura 13 - Tela do sistema de medição desenvolvido	52
Figura 14 - Detalhe da tela do sistema de medição da frequência predominante a ser registrada	53
Figura 15 - Distribuição das médias dos batimentos ciliares de acordo com o grupo de estudo.	60
Figura 16 - Foto de tela com microscopia eletrônica de cílios normais.	62
Figura 17 - Foto de tela de microscopia eletrônica com defeito ciliar de ausência de braços externos	63
Figura 18 - Foto de tela de microscopia eletrônica mostrando defeito nas espículas radiadas (desarranjo dos microtúbulos) e cílios com ausência de braços internos	63
Figura 19 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios com defeito de ausência do par central com transposição	64
Figura 20 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios com encurtamento dos braços externos	64
Figura 21 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios compostos: membrana comum (defeito secundário)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos genes relacionados com discinesia ciliar primária	13
Tabela 2 - Condições associadas à discinesia ciliar primária e outras ciliopatias	24
Tabela 3 - Resultados da frequência de batimento ciliar* (Hz) do grupo de estudo em relação aos controles	58
Tabela 4 - Análise estatística dos grupos de estudo	59
Tabela 5 - Caracterização dos pacientes com discinesia ciliar primária, de acordo com o defeito da ultraestrutura	61
Tabela 6 - Função pulmonar dos pacientes com discinesia ciliar primária	65
Tabela 7 - Parâmetros de função pulmonar dos pacientes diagnosticados	66
Tabela 8 - Escore radiológico* de bronquiectasia (CT de tórax) dos pacientes com discinesia ciliar primária segundo o escore de Bhalla	67
Tabela 9 - Caracterização dos achados da tomografia de tórax dos pacientes com discinesia ciliar primária	68
Tabela 10 - Avaliação otorrinolaringológica dos pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária	69

LISTA DE ABREVIATURAS

br intern	braço interno
bra.cur	braço curto
br	branco
brq	bronquiectasia
CC	Cardiopatía Complexa
CVF	Capacidade Vital Forçada
CPT	Capacidade Pulmonar Total
ds	desvio de septo
e.rad	espículas radiadas
FBC	Frequência de Batimento Ciliar
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
NC	Não Colabora
OMS	Otite média secretora
Par	pardo
ROI	region of interest (região de interesse do observador)
USP	Universidade de São Paulo
SI	Situs inversus
trans	transposição
VAS	Vias Aéreas Superiores
VAI	Vias Aéreas Inferiores
VEF1	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
VR	Volume Residual

RESUMO

OLM MAK; Avaliação da ultraestrutura e do movimento ciliar em crianças com pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido (tese). São Paulo: Instituto da Criança, Universidade de São Paulo; 2010, 121 págs.

INTRODUÇÃO: A discinesia ciliar primária é uma doença genética que se caracteriza pela alteração da ultraestrutura e função do cílio móvel, com consequentes alterações do transporte mucociliar, causando infecções das vias aéreas superiores, inferiores e infertilidade. O diagnóstico, realizado por avaliação da ultraestrutura ou pesquisa de mutação genética, é feito mediante critérios de seleção de pacientes e testes de *screening*. Esta pesquisa avalia a ultraestrutura e frequência de batimento ciliar, propõe um modelo de investigação de discinesia ciliar primária, e caracteriza os pacientes diagnosticados. **MÉTODO:** Foi realizado um estudo transversal controlado entre janeiro de 2007 e julho de 2009, no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança. Foram selecionadas 28 crianças e adolescentes (6 meses a 19 anos, de ambos os sexos), de uma população de 75 crianças com pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido, que apresentavam ao menos um dos seguintes achados: bronquiectasia de causa desconhecida, doença de vias aéreas superiores com sintomatologia crônica, infecções pulmonares de repetição, dextrocardia e/ou *situs inversus* acompanhados de sintomas em vias aéreas superiores e/ou inferiores, e asma de difícil controle com sintomas em vias aéreas superiores e/ou inferiores. A presença de pneumopatias crônicas com diagnóstico definido foi utilizada como critério de exclusão por meio dos seguintes exames: dois testes do suor (exclusão de fibrose cística), tomografia computadorizada do tórax (suspeita de bronquiolite obliterante), dosagem de alfa-1 antitripsina (investigação de déficit de alfa-1 antitripsina), e exames de investigação das imunodeficiências mais frequentes (hemograma, dosagens de imunoglobulinas, contagem de linfócitos T e B, sorologias para avaliação da produção ativa de anticorpos, PPD e HIV). Foi desenvolvido um sistema medição da frequência de batimento ciliar, baseado em análise espectral. Dez adultos voluntários saudáveis (maiores ou iguais a 17 anos, de ambos os sexos), sem doença infecciosa respiratória aguda no último mês e não fumantes, formaram o grupo controle para a frequência do batimento ciliar. Foi realizada a coleta ciliar por escovado nasal. A amostra foi dividida para a avaliação da ultraestrutura e verificação da frequência do batimento ciliar. Os pacientes diagnosticados foram avaliados com tomografia de tórax e seios da face (esta última nos maiores de cinco anos), provas de função pulmonar e avaliação otorrinolaringológica. **RESULTADOS:** Os 28 pacientes selecionados foram submetidos ao escovado nasal. Para 24 dos 28 pacientes foi possível produzir filmes passíveis de avaliação. O grupo com ultraestrutura alterada (diagnóstico de discinesia ciliar primária) mostrou diferença das médias da frequência de batimento ciliar em relação ao grupo com ultraestrutura normal ($p < 0,001$) e em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). O grupo com ultraestrutura normal e o grupo controle, quando comparados entre si, também apresentaram

diferenças ($p < 0,005$). Foram diagnosticados 12 pacientes com discinesia ciliar primária: dois com ausência de braços externos de dineína, um com encurtamento dos braços externos de dineína, cinco com defeitos nas espículas radiadas e braços internos de dineína, três com defeitos de ausência do par central com transposição, e um com ultraestrutura normal (Kartagener). Os pacientes, sete homens e cinco mulheres, com predomínio da etnia branca (11 pacientes - 91,6%), eram na maior parte fruto de pais consanguíneos (8 pacientes - 66,6%). Sete dos 12 pacientes (58,3%) apresentaram *situs inversus*. Sete dos dez pacientes que realizaram as provas de função pulmonar (70%) apresentaram distúrbio ventilatório obstrutivo. Achados radiológicos: Dez pacientes (83,3%) apresentaram algum grau de colapso ou consolidação, 11 (91,6%) apresentaram bronquiectasias, e todos (100%) algum grau de espessamento brônquico. A avaliação otorrinolaringológica apontou alterações em seis pacientes (50%): pólipos em três pacientes (25%), otite secretora em dois (16,6%), desvio de septo em dois (16,6%), e esclerose do tímpano em um (8,3%). CONCLUSÃO: Foi padronizada a técnica do escovado nasal para a coleta de material ciliar. Foram estabelecidos critérios de uniformidade quanto à análise dos defeitos ultraestruturais ciliares, baseados em experiência internacional. Foi desenvolvido um novo método de medição da frequência de batimento ciliar baseado em metodologia de análise espectral e vídeos de alta velocidade. Os pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária foram caracterizados, sendo a maioria: da etnia branca, de pais consanguíneos, com predomínio dos defeitos de espículas radiadas e braços internos de dineína, situs inversus, e distúrbio ventilatório obstrutivo. Problemas otorrinolaringológicos foram encontrados em metade dos pacientes.

Descritores:

1. Síndrome de Kartagener/diagnóstico
2. Síndrome de kartagener/patologia
3. Cílios

SUMMARY

OLM, MAK - Evaluation of the ultrastructure and of the movement of cilia in children with chronic and repetition pneumopathies without a defined diagnosis.

INTRODUCTION: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a genetic disorder of the ultrastructure and function of mobile cilia, with consequent impairment of mucociliary clearance, leading to upper and lower airways respiratory infection and infertility. The diagnosis, based on ultrastructure evaluation or genetic scan, is performed according to patient selection and screening tests. This research evaluates cilia ultrastructure and beat frequency, proposes a model for investigating primary ciliary dyskinesia, and characterizes the patients diagnosed. **METHOD:** A controlled and observational study was carried out at the Pediatric Pulmonology Ambulatory of the Instituto da Criança between January 2007 and July 2009. Twenty eight children and teenagers (ages between 6 months and 19 years) were selected, from a population of 75 patients with chronic and repetition pneumopathies without a defined diagnosis, which met at least one of the following inclusion criteria: bronchiectasis of unknown cause, upper respiratory disease with chronic symptoms, repetition pulmonary infections, dextrocardia and/or situs inversus with symptoms in upper and/or lower respiratory airways, and asthma of difficult control with symptoms in upper and/or lower respiratory airways. The presence of chronic pneumopathies with a defined diagnosis was used as exclusion criterion, based on the following exams: two sweat tests (cystic fibrosis exclusion), lung CT scan (bronchiolitis obliterans exclusion), seric levels of alpha-1 anti-trypsin (alpha-1 anti-trypsin deficit evaluation), and evaluation of more frequent immunodeficiency disorders (white blood cells, T and B lymphocytes levels, and sorology tests for humoral immunity, PPD and HIV). A cilia beat frequency measurement system was developed, based on spectral analysis. Ten healthy adult volunteers (ages greater than or equal to 17 years old, of both sexes), without an acute respiratory disease in the last month, and non-smoking, formed the control group for the cilia beat frequency measurements. Cilia samples were collected employing nasal brushing. The sample was divided for cilia ultrastructure evaluation and for cilia beat frequency measurement. Diagnosed patients were sent to lung and sinuses CT scan (> 5 years), pulmonary function tests and ear, nose and throat evaluation. **RESULTS:** For the 28 patients selected a nasal brushing was performed. For 24 of the 28 patients it was possible to make films suitable for evaluation. The average cilia beat frequency of the defective ultrastructure group (primary ciliary dyskinesia group) was different from the average frequency of the normal ultrastructure group ($p < 0.001$) and from the control group ($p < 0.001$). The average cilia beat frequency of the normal ultrastructure group was different from the average frequency of the control group ($p < 0.005$). Twelve patients were diagnosed with primary ciliary dyskinesia: two with absence of outer dynein arm, one with a shortened outer dynein arm, five with radial spoke and inner dynein arm, three with absence of central par and transposition, and one with a normal ultrastructure (Kartagener). The patients, seven men and five women, were mostly white

(11 patients – 91.6%) and had parents who were relatives (eight patients – 66.6%). Seven of the twelve patients (58.3%) had Situs inversus. Seven of the ten patients (70%) for whom pulmonary function tests were performed presented a ventilatory obstructive pattern. Radiological findings: Ten patients (83.3%) presented signs of consolidation or collapse, eleven patients (91.6%) had bronchiectasis, and 12 (100%) presented some degree of bronchial wall thickening. Otorhinolaryngological evaluation indicated impairments in 6 patients (50%): polyps in three patients (25%), effusion otitis in two (16.6%), sept problems in two (16.6%) and tympanus sclerosis in one (8.3%). CONCLUSION: The nasal brushing technique was standardized for the collection of cilia. Uniform criteria for the analysis of ultrastructural cilia defects were established, based on international experience. A new method of cilia beat frequency measurement was developed, based on spectral analysis and high speed video images. Patients diagnosed with primary ciliary dyskinesia were characterized. The majority was white, had parents who were also relatives, had a prevalence of radial spoke and inner dynein arm defects, situs inversus, and ventilatory obstructive pattern. Otorhinolaryngological problems were found in 50% of the patients.

Descriptors:

1. Kartagener syndrome/diagnosis
2. Kartagener syndrome/pathology
3. Cilia

1 INTRODUÇÃO

Discinesia ciliar primária é o nome atribuído à doença genética que inclui alterações na estrutura e função ciliar, com consequente dano do transporte mucociliar, resultando em doenças oto-sino-pulmonares e infertilidade ¹.

O transporte mucociliar constitui um dos mais importantes mecanismos de defesa das vias aéreas, e os prejuízos na depuração mucociliar aumentam o risco de infecções e inflamação no sistema respiratório. O sistema mucociliar é o resultado final da organização funcional e estrutural dos cílios do aparelho respiratório em diferentes níveis: a unidade ciliar, a coordenação interciliar, o formato de onda interciliar produzido pelo batimento e a drenagem do muco ^{2,3,4}.

1.1 Revisão da Literatura

1.1.1 Histórico

A história da discinesia ciliar primária originou-se no início do século XX, com a observação de síndromes que envolviam várias combinações de doença pulmonar, *situs inversus* e infertilidade. A ocorrência de *situs inversus* com bronquiectasias foi primeiro relatada por Siewart em 1904. Em 1933, Kartagener fez um estudo detalhado de pacientes que apresentavam sinusite, bronquiectasia e *situs inversus*, sendo o primeiro a sugerir uma patogênese comum. A tríade ficou, então, conhecida como “Síndrome de Kartagener” ².

Em 1960, Arge observou uma associação entre *situs inversus* e infertilidade masculina. Contudo, por muitos anos, a etiologia da síndrome

permaneceu desconhecida, até que, em 1976, Afzelius usando microscopia eletrônica encontrou alterações anatômicas nos espermatozóides de pacientes com Síndrome de Kartagener (deficiência nos braços de dineína). Mais tarde, o autor relaciona a ausência de uma função ciliar normal com uma rotação visceral inadequada na embriogênese precoce. Em 1977, Eliason deu o nome “Síndrome da imotilidade ciliar”, porque observou que alguns pacientes possuíam cílios imóveis. Sleight ⁵ introduz o nome “discinesia ciliar primária”, para incluir todos os defeitos congênitos, envolvendo dismotilidade ciliar.

1.1.2 Prevalência

Estima-se que a prevalência da discinesia ciliar primária seja em torno de 1:15.000 a 1:20.000 indivíduos, e o baixo número de casos diagnosticados ao redor do mundo pode estar associado ao fato de que poucos centros possuem recursos adequados para sua investigação ^{6,7}.

1.1.3 A estrutura e função do aparelho ciliar

Os dois pulmões possuem meio metro quadrado de epitélio ciliado, com um número total de cílios de 3×10^{12} . O epitélio ciliado ocorre na cavidade nasal, nos seios paranasais, ouvido médio, trompa uterina, cérvix feminino, nos ductos deferentes masculinos e no epêndima cerebral. Imediatamente abaixo da laringe, a árvore brônquica é formada pelo epitélio colunar pseudoestratificado, em cuja superfície os cílios são encontrados até a 16ª divisão brônquica. As células ciliadas do epitélio respiratório são caracterizadas por suas longas projeções citoplasmáticas e numerosos

microvilos com cerca de 200 cílios por célula. Cada cílio tem uma extensão de 5 a 7 μm na traqueia e 2 a 3 μm na sétima geração aérea, com um diâmetro de 0,25 a 0,33 μm ^{8,9}.

Os cílios estão dispostos à semelhança dos pelos de um pincel, e são presos aos corpos basais em fileira, logo abaixo da membrana celular.

A estrutura ciliar em corte axial (Figura 1) apresenta ^{10,11,12}:

- a) nove pares de microtúbulos periféricos: os elementos subfibra (A) e subfibra (B) de cada díade estão unidos entre si por vínculos de uma proteína conhecida como nexina;
- b) no microtúbulo (A) estão os braços de dineína externos e internos;
- c) dois microtúbulos centrais ligados por uma ponte e circundados por uma membrana (bainha central);
- d) espículas radiadas que se conectam dos túbulos centrais aos periféricos.

Figura 1 - Estrutura ciliar em corte axial
 Fonte: Cowan et al.¹²

Os axonemas, o centro dos cílios respiratórios e a cauda dos espermatozóides são compostos por longos microtúbulos que se estendem do citoplasma para o topo do cílio (Figura 2):

Figura 2 - Esquema da haste ciliar

Fonte: Carson e Collier ¹¹

Os microtúbulos são estruturados em três formas: únicos, duplos e triplos, e são compostos por polímeros de tubulina. A tubulina alfa e a beta são proteínas globulares de, aproximadamente, 450 resíduos com um diâmetro de 4 nm. As tubulinas alfa e beta formam um heterodímero de 8 nm de extensão, e estes heterodímeros polimerizam para formar protofilamentos. Microtúbulos são compostos de anéis de protofilamentos, cujo número em cada tipo de microtúbulo é característico: 13 no único, 23 no duplo e 33 no triplo. Os padrões de nomenclatura dos microtúbulos dão o nome de “A” para o microtúbulo com anéis completos de 13 protofilamentos. Microtúbulos “B” e “C” são os com anéis incompletos de 10 protofilamentos cada (Figura 1). Os cílios são ancorados em um corpo basal, dentro do citoplasma, próximo da membrana plasmática. Esta estrutura é composta de nove trios de microtúbulos que se continuam para fora do corpo basal e para

dentro do cílio para formar os nove pares de microtúbulos externos do cílio. Em uma estrutura conhecida como zona de transição, cada um dos nove triplos microtúbulos torna-se duplo. Em adição, um par central de microtúbulos únicos é formado dentro do centro do axonema. Há, então, um par central de únicos microtúbulos, circundados por nove pares de duplos (9+2). Uma bainha fibrosa envolve o par central de microtúbulos.

As espículas radiadas ligam cada microtúbulo A do anel externo para o par central. O microtúbulo A do anel externo apresenta várias estruturas associadas: são os braços externos e internos de dineína que possuem proteínas de alta, intermediária e baixa massa molecular ¹³. Cadeias pesadas de proteína nos braços de dineína possuem atividade ATPase, que é um aminoácido de 4.500 resíduos com um peso molecular de 540 kDa. As proteínas intermediárias e pequenas, provavelmente, regulam a associação da dineína com os microtúbulos. A motilidade ciliar ocorre pela hidrólise do ATP pelas cadeias pesadas que resultam no deslizamento do microtúbulo A com o microtúbulo B, o que resulta em encurvamento do cílio. Os pares de microtúbulos do lado oposto do cílio auxiliam o encurvamento em outra direção. A seguir, a Figura 3 localiza as cadeias pesadas, intermediárias e leves de proteínas nos braços de dineína, dentro da estrutura geral.

Figura 3 - Localização das cadeias de proteínas
 Fonte: Leigh et al.¹³

O encurvamento ocorre pelo braço interno de dineína. Estes fatores resultam em duas diferentes forças de movimento ciliar: o movimento ativo para a frente e um reverso, de recuperação, que permite uma propulsão efetiva¹².

Os cílios executam ainda movimentos oscilatórios, formando ondulações coletivas que se assemelham ao que o vento realiza no canavial, arrozal ou trigal. O cílio normal desloca-se rapidamente para diante em movimento eficaz (1/5 do ciclo) e recua lentamente (4/5 do ciclo), em movimento de recuperação, e pode bater, em média, até 20 vezes por segundo.

O batimento ciliar realiza um movimento oscilatório de cerca de 20 μm de extensão, os microtúbulos deslizam uns sobre os outros, e a energia para isso advém da hidrólise do ATP em ADP¹⁰.

A função básica dos cílios do aparelho respiratório é fazer a limpeza das regiões canaliculares (traqueia, brônquios, bronquíolos terminais), impelindo o tapete mucoso, carregado de partículas e detritos, em direção à faringe. O tapete mucoso, à altura de 5 μm , move-se continuamente, de baixo para cima, em uma velocidade de 0,25 a 1,5 mm/minuto, de modo que uma partícula aderida ao gel do tapete mucoso, ao nível da junção bronquíolo alveolar, chegará à faringe para ser deglutida em aproximadamente 20 a 30 minutos ¹⁰.

Os cílios batem de maneira coordenada e metacrônica em ondas, na camada inferior menos viscosa. O resultado ou o efeito dos movimentos ciliares é sempre o de carrear material para as zonas de desembocadura: dos seios paranasais aos seus óstios, das fossas nasais à laringe, das áreas traqueobrônquicas à faringe, da parte posterior das cordas vocais para cima ¹⁰.

Estruturalmente, os cílios humanos são classificados conforme sua mobilidade e a presença de par central, e encontram-se presentes na espécie humana em determinadas posições anatômicas e no período gestacional. São classificados de acordo com a seguinte descrição:

a) Móveis:

- arranjo 9+0 (nove pares periféricos e ausência do par central):
cílio embriológico nodal;
- arranjo 9+2 (nove pares periféricos e par central): cílio respiratório, cílio da trompa uterina, flagelo do espermatozóide, epêndima cerebral.

b) Imóveis:

- arranjo 9+0 (nove pares periféricos e ausência do par central): renal, ducto biliar; ducto pancreático, cartilagem óssea, conectores das células fotorreceptoras da retina;
- arranjo 9+2 (nove pares periféricos e par central): cílios do ouvido médio.

A Figura 4 descreve os tipos de cílios conforme seu padrão de movimento.

Figura 4 - Classificação dos cílios

Fonte: Leigh et al.¹³

As ciliopatias podem envolver órgãos únicos ou podem ocorrer como doenças sistêmicas com fenótipos variáveis^{14,15}.

O cílio embriológico nodal (arranjo 9+0, móvel) tem recebido importância em pesquisa pela sua relação com a determinação da lateralidade visceral humana, sendo encontrado na maioria dos vertebrados. O movimento horário de dineína do cílio nodal gera um fluxo para a esquerda do fluido extraembrionário que circunda o nodo correspondente no 17º dia de gestação humana (8º em ratos). O fluxo nodal desencadeia uma cascata de sinais assimétricos que culminam no tubo cardíaco primitivo e morfogênese cardíaca normal ¹⁶.

1.1.4 Genética

Na maioria dos casos é uma doença autossômica recessiva, o que explica a alta incidência da doença em populações consanguíneas.

Em alguns casos, outros padrões de herança têm sido descritos: autossômica dominante ou ligado ao cromossoma X, sendo que uma associação entre retinite pigmentosa ligada ao X e discinesia ciliar primária tem sido relatada ¹⁷.

Existem no mínimo 250 proteínas relacionadas aos componentes dos cílios, codificadas por genes diferentes, sendo que muitos outros genes estão envolvidos na construção e regulação dos cílios.

A maioria dos conhecimentos sobre cílios provém do estudo dos flagelos em organismos unicelulares. Estudos em organismos modelo como a *Chlamydomonas reinhardtii*, considerada ortóloga ¹⁸ (organismos com genomas relacionados por meio de um ancestral comum e com funções relacionadas) do cílio humano, identificaram o *gene* DNAI1, relacionado com o IC78 da *Chlamydomonas reinhardtii* ^{19,20} que codifica cadeias

intermediárias de proteínas dos braços de dineína, nos quais mutações são associadas à ausência de braços externos. O DNAI1 é composto de 20 exons localizados no cromossoma 9p13-p216-8. São também descritos o DNAH5 (do cromossoma 5p), associado aos defeitos dos braços de dineína, e o DNAH11 (cromossoma 7p), que codifica as cadeias pesadas de dineína, e tem sido proposto como gene para a discinesia ciliar primária ^{6,7,17,18,19,21}.

Análises de rastreamento genético feitas em afetados e em seus familiares referem vários locus potenciais de localização nos cromossomas 3p, 4q, 5p, 7p, 10p, 11q, 13q, 15q, 16p, 17q e 19q. Análises ainda de familiares com deficiência específica de braços de dineína sugerem evidências para alterações no cromossoma 8q e 16p. Análises em familiares com *situs inversus* resultam em escore sugestivo para os cromossomas 8q e 19q. A heterogeneidade da doença dificulta os estudos de localização, e alguns *genes* isolados apresentam pouca casuística de pacientes ^{22,23,24}. A seguir, o desenho (Figura 5) relaciona os genes com a localização da ultraestrutura comprometida e a tabela seguinte (Tabela 1) localiza-os no mapa genético humano.

Figura 5 - Genes relacionados com defeitos da ultraestrutura

Fonte: Leigh et al. ²⁵

(*) Mutações vistas em pacientes com braços de dineínas normais

(**) Codifica proteína requerida para a montagem do braço externo de dineína, e mutações identificadas em pacientes com defeitos envolvendo ambos os braços externos e internos de dineína

Tabela 1 - Relação dos genes relacionados com discinesia ciliar primária

Genes	Localização no mapa genético	Comentários
DNA I 1	Cromossoma 9p13-p21	Codifica cadeia intermediária do braço externo de dineína. Causa assimetria corporal e infertilidade. Responde por 14% dos pacientes.
DNA H 5	Cromossoma 5p15	Codifica cadeia pesada e braço externo de dineína.
DNA H 11	Cromossoma 7 p 15,3-21	Codifica cadeia pesada. Associado a ultraestrutura normal, Kartagener e fertilidade.
RPGR (Retinite pigmentosa guanossina trifosfatase regulador)	Cromossoma X (p 21,1)	O mais comum gene envolvido na retinite pigmentosa ligado ao X.
DNA I 2	Cromossoma 17 q25	Codifica cadeia intermediária do braço externo.
TXNDC3	Codifica tireodoxina nucleosídeo difosfato kinase	É expresso no testículo e células respiratórias.
RSPH9	Cromossoma 6	Mutação na proteína 9 das espículas radiadas
RSPH4A		Mutação na proteína 4 das espículas radiadas

Fonte: Escudier et al.²⁶, Leigh et al.^{13,25}, Moore²⁷

1.1.5 Defeitos ciliares

As alterações congênitas da ultraestrutura ciliar podem produzir sintomas característicos no trato respiratório e, também, no epitélio ciliar

sensorial modificado dos olhos e ouvidos. Nos defeitos ciliares congênitos, os sintomas estão presentes ao nascimento ou se desenvolvem nas primeiras semanas de vida ²⁸. Qualquer alteração na organização funcional ou estrutural dos cílios respiratórios nos seus diferentes níveis pode causar uma redução do transporte mucociliar com estase das secreções e subsequente colonização bacteriana.

O transporte de muco pode estar prejudicado nas seguintes condições ²⁹:

- discinesia ciliar primária: quando um defeito genético danifica a ultraestrutura ou orientação do batimento do cílio;
- discinesia ciliar secundária, que pode ser causada por agressões que interferem no batimento ciliar e causam danos às células epiteliais;
- ocorrência de propriedades físico-químicas anormais do muco, causando dificuldades na movimentação dos cílios ao longo das vias aéreas, como ocorre na fibrose cística.

As alterações ultraestruturais encontradas na discinesia ciliar primária incluem ^{30,31,32,33,34,35,36,37,38}:

- a) defeitos nos braços de dineína: ausência dos braços internos e externos de dineína, redução dos braços de dineína pela metade, ausência apenas dos braços externos de dineína, ausência apenas dos braços internos de dineína, braços de dineína curtos e retos em vez de curvos. A ausência parcial de ambos os braços foi relatada em um número limitado de pacientes, e sua natureza primária necessita ser provada desde que também pode ser secundária ³⁹;
- b) ausência de espículas radiadas e bainha central;

- c) microtúbulos centrais ausentes, sendo substituídos por um microtúbulo externo;
- d) defeitos das ligações de nexina, causando desarranjo dos microtúbulos;
- e) microtúbulos centrais e bainha central ausente;
- f) cílios de tamanho duplicado;
- g) corpos basais ausentes ou com redução do número de cílios;
- h) cílios com ultraestrutura normal, porém imóveis.

A desorientação ciliar é, também, descrita como causa de discinesia ciliar primária^{40,41,42,43,44}. Em tal situação, o cílio possui ultraestrutura normal, e a frequência de batimento ciliar é normal ou quase normal, mas seu movimento ciliar não é eficiente, porque sua direção de batimento não é bem orientada. Esta condição é verificada na microscopia eletrônica por meio da realização de um corte transversal na haste ciliar (entre os pares centrais) ou no pé basal, ou entre o ponto médio da base com o ápice do pé basal.

Estas linhas deveriam todas estar paralelas com as outras e fazer um ângulo paralelo com uma segunda verticalmente. O desvio-padrão desses ângulos deveria ser pequeno. Em adultos, valores normais de desvio-padrão estão entre 10 e 15 graus. Na discinesia ciliar primária com desorientação ciliar são encontrados valores entre 20 e 25 graus. Contudo, a desorientação ciliar pode ocorrer secundariamente às infecções o que, muitas vezes, justifica a coleta de uma segunda amostra, após controle da inflamação e infecção.

Portanto, a desorientação ciliar é suspeitada se a média do desvio dos ângulos for maior que 20 graus, não reduzidos após o tratamento e presente em dois sítios (nariz e brônquio) ³⁷.

A Figura 6 compara a orientação ciliar normal com a alterada.

Figura 6 - Orientação ciliar normal e alterada
Fonte: Longh & Rutland (1990) ⁴²

A agressão ao cílio respiratório pode causar discinesia ciliar secundária ou adquirida, que pode ocorrer em razão de insultos variados por agentes físicos e químicos, como por exemplo excesso de muco (bloqueio à ação ciliar), poluentes como a fumaça de cigarro (ciliotóxica), álcool (torna mais lenta a ação ciliar e reduz a velocidade do tapete mucoso), baixa temperatura (deprime a atividade ciliar) e ressecamento da secreção brônquica (a desidratação fragmenta o tapete mucoso) ¹⁰.

Agentes infecciosos, como vários vírus respiratórios, comuns em crianças foram associados às anormalidades ciliares. Alterações microtubulares foram observadas em estágios precoces.

A normalização do epitélio ocorre entre 2-10 semanas. *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* causam discinesia ciliar secundária e, eventualmente, destruição do epitélio. Cepas encapsuladas de *Haemophilus influenzae* tipo b parecem tornar mais lento o movimento dos cílios. A infecção por *Mycoplasma* causa desorganização do axonema formando cílios compostos, com alterações encontradas em 2 a 3 meses após a exposição.

A rinite alérgica pode provocar descamação do epitélio com consequente aplasia ciliar. Quanto às drogas, sabemos que o cloreto de benzalcônio e soluções hipertônicas de NaCl produzem ciliostase⁴⁵.

Entre as lesões secundárias encontradas, são descritos os cílios compostos (fusão das membranas ou aumento do número de axonemas em uma membrana), as anormalidades nas tubulopatias periféricas e centrais, o inchaço nas membranas, braços de dineína encurtados, as bolhas na membrana, a ausência da membrana do axonema e cílios desnudos. Em pacientes saudáveis e em pacientes sem discinesia ciliar, até 4% dos cílios^{45,46} avaliados podem ter anormalidades ultraestruturais secundárias; alguns autores dão uma faixa maior de normalidade de $4\pm 3\%$ para o grupo controle⁴⁷.

A ausência de defeitos secundários, após crescimento em meios de cultura (ciliogênese), é uma grande vantagem para o diagnóstico de discinesia ciliar primária, especialmente em casos com anormalidade do par central e dos túbulos periféricos.

Quanto à frequência dos defeitos encontrados, existe uma prevalência maior dos defeitos dos braços de dineína, com a seguinte

sequência: braços externos – 30% a 43%, internos e externos – 9% a 36%, defeitos dos braços internos – 11% a 30%, ultraestrutura normal - 25%, transposição - 14%, aplasia ciliar - 6% ⁴⁸.

A aplasia ciliar obriga a biópsia em mucosa brônquica para afastar uma localização apenas nasal. A estrutura normal com a função alterada necessita do estudo da orientação ciliar. Nos casos em que os defeitos se cruzam e persistem mesmo após o tratamento da infecção ou inflamação em uma segunda amostra, a cultura dos cílios em meio especial pode esclarecer o diagnóstico ^{39,47,49,50,51,52}.

1.1.6 *Função ciliar: frequência de batimento e padrão da onda*

Em relação ao estudo cinético dos batimentos ciliares, os diferentes defeitos ultraestruturais, tais como lesões dos braços externos e internos de dineína, lesões do par central e os defeitos dos túbulos periféricos, estão relacionados com diferentes padrões de movimento e frequências de batimento ciliar. Cada defeito ultraestrutural pode ser relacionado especificamente a diferentes padrões de transporte mucociliar, com frequências diversas de batimento e de tipos de movimento ciliar alterados, que determinam variações na gravidade da doença ^{47,49,50,51}.

A frequência do batimento ciliar está muito diminuída na discinesia ciliar primária, e o valor de 11 Hz é considerado como um ponto de corte para o *screening* da doença ^{6,34} em determinados centros internacionais, porém os registros variam entre os métodos utilizados, e cada centro deveria mensurar seu próprio valor normal entre as diferentes faixas etárias ⁵³. Deve-se observar, também, a orientação do movimento ciliar, pois sua

desorientação mesmo com ultraestrutura normal é descrita como uma variante de discinesia ciliar primária ^{6,53}.

Na verificação da frequência de batimento ciliar a temperatura ambiental necessita permanecer constante já que a frequência ciliar é temperatura dependente. O pH e a osmolaridade do meio não influenciam a frequência do batimento ciliar ⁵⁴. As frequências de batimento ciliar possuem variações de acordo com a faixa etária ⁵⁵, e segundo Chilvers e O'Callaghan (2003) a média da frequência de batimento ciliar para a população pediátrica, apesar de casuística pequena, é um pouco maior que a da população adulta ⁴⁹.

A caracterização das frequências e os padrões de batimento ciliares ("fenótipos de movimento") desencadeados pelos defeitos ultraestruturais podem ser relacionados com padrões de gravidade da doença e possibilitam o entendimento dos defeitos ciliares e suas consequências no transporte mucociliar. A investigação detalhada no estudo da discinesia ciliar tem sido realizada com sucesso em alguns centros internacionais de pesquisa ^{6,53,56,57,58,59}.

Os defeitos ultraestruturais ciliares determinam frequências de batimento ciliares e padrões de onda de movimento ciliar específicos, que podem ser registrados e gravados por técnica especial de captura de imagens, utilizando-se uma câmera digital de alta velocidade acoplada a um microscópio óptico. A Figura 7 exemplifica os diferentes movimentos de acordo com os padrões ultraestruturais ⁵⁰.

Figura 7 - Movimento ciliar normal (A) e alterado (B,C e D)
 Fonte: Chilvers et al. 2003⁵⁰

A Figura 7-A representa o movimento ciliar normal (cílio move-se no mesmo plano, para frente e para trás). A Figura 7-B reflete o padrão de movimento ciliar dos cílios com defeitos nos braços externos e internos de dineína ou de defeitos isolados nos braços externos de dineína, nos quais o cílio movimenta-se com um pequeno tremor.

A Figura 7-C representa o movimento ciliar alterado de defeito de braço interno de dineína ou de um defeito das espículas radiadas (possui uma redução importante de sua amplitude).

A Figura 7-D representa o padrão de batimento discinético de um cílio com defeito de transposição (o cílio bate num largo movimento circular sobre sua base).

O sistema de obtenção de imagens digitais possui a vantagem de ser o método de captura de imagens que possibilita ao mesmo tempo a mensuração da frequência e do formato da onda ciliar, e tem se mostrado o

método de registro do movimento ciliar mais eficiente quando comparado a outros métodos de mensuração ^{60,61}.

A interpretação da frequência de batimento ciliar deve ser acompanhada pela análise do padrão de batimento (formato de onda) e pela avaliação ciliar pela microscopia eletrônica, pois cerca de 10% dos casos de frequência de batimento ciliar considerados normais por vídeos de alta velocidade, podem ter alteração em seu padrão de batimento ⁵³.

A obtenção das informações quantitativas sobre o batimento ciliar exigirá que se obtenham dados instantâneos das diferentes fases do movimento do cílio durante o batimento.

1.1.7 Quadro clínico

O quadro clínico deve ser lembrado em uma série de circunstâncias ^{6,34,62,63,64,65,66,67,68,69}.

- a) No período neonatal: presença de taquipneia ou pneumonia inexplicada (em recém nato sem fator de risco para infecção congênita) ⁶⁴ rinite, dextrocardia, *situs inversus*, doença cardíaca complexa (desordens de lateralidade), atresia de esôfago ou outros defeitos graves da função esofágica, atresia biliar ⁷⁰, hidrocefalia ^{71,72}, e história familiar positiva ⁷³.
- b) Em lactentes e crianças mais velhas: tosse produtiva, asma atípica ou de difícil controle, infecções pulmonares recorrentes, rinossinusites e/ou otites secretoras crônicas, pólipos nasais, bronquiectasias e perda auditiva.

- c) Em adultos: infertilidade masculina ou feminina ^{74,75} com espermatozóides imóveis ou de reduzida mobilidade, apesar da fertilidade não excluir o diagnóstico em homens.

Pacientes suspeitos que apresentam múltiplas manifestações sistêmicas são altamente prováveis de possuir discinesia ciliar primária, em detrimento dos que apresentam apenas tosse ⁶⁸.

Os sinais e sintomas mais prevalentes em algumas casuísticas de discinesia ciliar primária são: tosse produtiva (100%), sinusite (100%), otite (100%), *situs inversus* (48%), bronquiectasia (48%), polipose nasal (19%) e baqueteamento digital (19%). Nem todos os pacientes masculinos adultos possuem imotilidade dos espermatozóides. A análise seminal é sempre recomendada nesses pacientes, mas o diagnóstico costuma ser tardio apesar da presença de sintomas típicos em idade precoce ⁶⁸.

Os pacientes suspeitos costumam ser submetidos a extensas investigações laboratoriais para afastar outras causas de doença respiratória crônica, como: fibrose cística, imunodeficiências, sequelas de infecções por Adenovirus e *Mycoplasma pneumoniae*, refluxo gastroesofágico, deficiência de alfa1–antitripsina e malformações localizadas.

Os primeiros exames de investigação são escolhidos, de acordo com a prevalência de outras doenças. Estes exames incluem: teste do suor (e/ou pesquisa da mutação para fibrose cística), dosagem de Imunoglobulinas (e subclasses), avaliação da síntese ativa de anticorpos, evidência sorológica de infecção por adenovírus ou *Mycoplasma*, níveis de alfa1-antitripsina e triagem de autoanticorpos (fator reumatóide e anticorpo antinúcleo). Se

esses exames forem negativos, uma nova investigação deverá incluir: broncoscopia (particularmente para doenças localizadas em um lobo), monitorização do pH esofágico, testes de função neutrofílica e subclasses de células T, teste da sacarina em adultos e crianças mais velhas, e escovado nasal para estudos ciliares ⁶.

1.1.8 Condições clínicas associadas

Os estudos de genética molecular dos últimos anos sugerem uma clara ligação entre o desenvolvimento e função do cílio primário e várias condições clínicas ^{76,77}.

Existem quadros clínicos associados que possuem características que se cruzam com discinesia ciliar primária, e que justificam, quando presentes, a indicação do estudo ciliar.

É crescente ainda o pensamento de que as desordens ciliares estão relacionadas com diversos problemas de desenvolvimento e condições clínicas, que são denominadas ciliopatias (Tabela 2). Se existir uma história familiar de ciliopatia, uma suspeita diagnóstica deve estar presente para aquele paciente ou membros familiares com possíveis características de discinesia ciliar primária ^{48,78,79,80}.

Tabela 2 - Condições associadas à discinesia ciliar primária e outras ciliopatias

Condições associadas à discinesia ciliar primária	Ciliopatias
doença cardíaca congênita complexa	nefronoftise
atresia biliar	Síndrome de Bardet-Biedl
retinite pigmentosa	Síndrome de Alstrom
Hidrocefalia	Síndrome de Meckel-Gruber
Doença policística renal	
Doença policística hepática	
Doença grave esofagiana	

Fonte: Hogg (2009) ⁴⁸.

Retinite pigmentosa é a forma mais comum de cegueira herdada, com mais de cem genes implicados na sua patogênese. A retinite pigmentosa como doença isolada ou em associação com certas anormalidades sistêmicas, pode ocorrer nas síndromes de Usher e Bardet-Biedl. Existem cílios conectores como componentes dos bastonetes que transportam proteínas e pigmentos. Alguns dos genes envolvidos operam dentro do epitélio pigmentar da retina, e outros são expressos em fotorreceptores. Exemplos incluem o gene regulador da retinite pigmentosa “RGTPase regulador (RPGR)” e o gene “RPGR-proteína interagindo (RPGRIP)”. Ambos se localizam nos conectores dos cones e bastonetes e estão envolvidos no tráfego de proteínas ⁷⁹. Raros casos de discinesia ciliar primária têm sido associados à retinite pigmentosa ligada ao X em razão das mutações no gene regulador (GTPase), que é frequentemente transmitido em uma herança recessiva ligada ao cromossoma X ⁷⁸.

Doenças policísticas pertencem à classe das doenças que podem ser caracterizadas pela formação de cistos, que têm sido notados no rim, pâncreas e fígado, com a hipótese ciliar unificando sua base biológica ⁷⁹.

A síndrome de Bardet-Biedl é considerada uma doença do desenvolvimento, e seu diagnóstico clínico inclui ao menos quatro de seis importantes sintomas primários: obesidade, distrofia de cones e bastonetes, anormalidades renais, polidactilia, hipogonadismo masculino e dificuldades no aprendizado. A variedade da síndrome, que vai desde rim policístico até complicações da obesidade, diabetes tipo II, hipertensão e hipercolesterolemia, pode levar à morte prematura ⁷⁹.

A síndrome de Alstrom é uma desordem autossômica recessiva que se acompanha de retinopatia, obesidade, diabetes mellitus e insuficiência renal ⁷⁸.

A síndrome de Meckel-Gruber é uma doença autossômica recessiva letal, com três manifestações clássicas: cistos renais (100% dos casos), encefalocele occipital (90% dos casos), e polidactilia (80% dos casos). Anomalias associadas incluem fenda palatina, defeitos de lateralidade, malformações congênitas cardíacas, malformações do duto hepático, displasia cística renal e desenvolvimento incompleto dos órgãos genitais masculinos ⁷⁹.

1.1.9 Síndromes comumente associadas

a) Síndrome de Kartagener

A síndrome de Kartagener é uma rara malformação congênita que compreende a tríade: *situs inversus*, bronquiectasia e sinusite. A presença

da coexistência de imotilidade ciliar e *situs inversus* foi relacionada com a hipótese de que o cílio epitelial na embriogênese precoce normal possui uma posição e uma direção de batimento fixa e que seu batimento determina a situação visceral. Quando os cílios são imóveis, é determinada uma assimetria corporal ao acaso, resultando igualmente em muitos casos de *situs inversus*. O *situs inversus* costuma ocorrer em 48% dos pacientes com imotilidade ciliar ⁶². A síndrome de Kartagener apresenta incidência aproximada de 1 para 40.000 nascimentos ^{74,81,82,83,84,85}.

Pacientes com Síndrome de Kartagener têm maior incidência de defeitos cardíacos cardiovasculares, e recentes estudos têm encontrado que aproximadamente 6% dos pacientes com discinesia ciliar primária têm heterotaxia (*situs ambiguus* ou outros defeitos de lateralidade que não *situs inversus totalis*), que é associado a aumento da morbidade em razão das anomalias complexas cardiovasculares. Síndromes com heterotaxia incluem *situs inversus* abdominal, polisplenia (isomerismo esquerdo) e asplenia (isomerismo direito). Recomenda-se que pacientes com anomalias consistentes, como *situs ambiguus* ou heterotaxia, incluindo doença cardíaca complexa, com desconforto respiratório neonatal ou infecções crônicas do trato respiratório sejam encaminhados para investigação de *screening* de discinesia ciliar primária ^{25,86}.

Existem muitos subgrupos de defeitos ciliares que determinam alterações do eixo que indica a lateralidade visceral associada à Síndrome de Kartagener, porém os defeitos de transposição (que são associados à ausência do par central), apesar de causarem sintomatologia clínica, não são capazes de determinar a rotação visceral para *situs inversus*. Um

segundo grupo, o de cílios longos, também não apresenta associação documentada com *situs inversus* ⁸⁵.

A motilidade tanto do flagelo do espermatozóide, bem como do cílio respiratório está relacionada à sua organização estrutural em forma de axonema. A infertilidade de pacientes masculinos associada a sintomas respiratórios tem sido relatada na discinesia ciliar primária, incluindo a síndrome de Kartagener, em que anormalidades ultraestruturais de cílios e flagelos têm sido descritas. As lesões ultraestruturais dos cílios e flagelos dos pacientes com Kartagener variam entre os indivíduos, e podem não ser iguais em um mesmo paciente, o que sugere que os axonemas dos cílios e flagelos devem ser controlados por genes comuns e genes diferentes ^{74,82}.

b) Síndrome de Young

A associação entre infecções nasossinusais e broncopulmonares de repetição com azoospermia de causa obstrutiva é conhecida como síndrome de Young. Nenhuma condição subjacente tem sido estabelecida para a doença respiratória ou associação com a azoospermia obstrutiva. A maioria dos estudos com a síndrome de Young relata que o cílio e o espermatozóide são normais, embora existam registros de algumas anormalidades ^{87,88,89,90,91}.

c) Síndrome de Usher

A síndrome é caracterizada por surdez neurossensorial, comprometimento do sistema vestibular, e perda visual progressiva devido a retinite pigmentosa, associada ainda à bronquiectasia, sinusite crônica e

transporte mucociliar reduzido, de caráter autossômico recessivo. Há especulações de que esteja associada à discinesia ciliar primária ⁹².

1.1.10 Diagnóstico

O diagnóstico de discinesia ciliar, segundo Leigh et al. (2009), ²⁵ deve ser considerado conforme as características e evidências abaixo.

a) Características clínicas fenotípicas que podem estar presentes (no mínimo três, tipicamente cinco ou mais):

- Desconforto respiratório neonatal em lactente de termo;
- Defeitos de lateralidade (*situs inversus* total ou heterotaxia);
- Congestão nasal crônica o ano todo;
- Tosse produtiva crônica o ano todo;
- Infecções recorrentes do trato respiratório inferior;
- Bronquiectasia;
- Otite média crônica (efusão no ouvido médio acima de 6 meses de duração);
- Pansinusite crônica;
- Infertilidade masculina em razão dos danos da motilidade espermática;
- História de discinesia ciliar primária em familiar próximo.

b) Evidências laboratoriais para o diagnóstico definitivo (no mínimo uma):

- Encontro de defeito clássico da ultraestrutura ciliar compatível com discinesia ciliar primária: ausência ou encurtamento dos braços externos de dineína, ausência ou encurtamento dos

braços internos de dineína, ausência das espículas radiadas, ausência do par central de microtúbulos com transposição;

- Diagnóstico genético baseado em duas mutações que causam doenças: DNAH5, DNAI1 e outros genes ainda sem definição das mutações causadoras da doença.

c) Evidência laboratorial apoiando o diagnóstico de “provável discinesia ciliar primária” (se acompanhado por no mínimo três características fenotípicas):

- níveis de óxido nítrico nasal em valores muito baixos (<100nl/min).

d) Evidências laboratoriais apoiando o diagnóstico de “possível discinesia ciliar primária” (se acompanhadas por, no mínimo, três características fenotípicas):

- Defeitos ultraestruturais que podem cruzar com discinesia ciliar secundária: ausência do par central de microtúbulos (sem transposição), ausência de cílios em múltiplas biópsias (aplasia ciliar), desorientação ciliar;
- Teste genético identificando apenas uma mutação da doença;
- Motilidade ciliar alterada em vídeos de alta velocidade;
- Clearance mucociliar alterado.

Uma declaração de consenso recente entre serviços europeus, a respeito de discinesia ciliar primária (Barbato et al., 2009)⁹³, indica a análise

das células epiteliais nasais para avaliar a função e a ultraestrutura ciliar para o diagnóstico de discinesia ciliar primária. Outras investigações, como a cultura de células, podem contribuir para o diagnóstico, que deve ser feito em um centro especializado que revê a história clínica, os testes de *screening* e os testes específicos de função (batimento ciliar e padrão de onda).

1.1.11 Testes de triagem diagnóstica

a) Teste da sacarina

Os pacientes suspeitos de discinesia ciliar primária, maiores de cinco anos, devem ser avaliados pelo teste de triagem da sacarina⁹⁴ que, quando alterado autoriza o estudo funcional e estrutural do cílio. O teste da sacarina é um método simples, reproduzível e de baixo custo que avalia o transporte mucociliar nasal⁵³. Consiste na colocação de uma partícula de sacarina de 1 mm de diâmetro no assoalho da fossa nasal, a cerca de 1 cm para dentro do corneto inferior. Mede-se o tempo em minutos entre a colocação da sacarina e o início da sensação de gosto doce na faringe. O teste será considerado alterado quando esse tempo for maior que 30 minutos.

b) Teste do óxido nítrico nasal

O óxido nítrico (NO) é produzido no trato respiratório superior e inferior da via aérea humana e exerce muitas funções na defesa do hospedeiro, atividade ciliar e inflamação^{95,96}. As suas concentrações nas vias aéreas superiores de indivíduos normais são acentuadamente maiores (variando de 200 a 2.000 partes por bilhão - ppb) que os níveis no trato

respiratório inferior (4 a 160 ppb) e podem ser influenciadas pela idade, hábito de fumar e uso de drogas ⁹⁶. Nos pacientes com discinesia ciliar primária, a produção de NO nasal e exalado é baixa, supostamente por incapacidade genética de produzi-lo, porém os níveis muito baixos de produção do óxido nítrico nasal na discinesia ciliar primária (menores que 250 partes por bilhão) ⁹⁷ em relação a outras doenças, colocam-no como uma ferramenta útil como teste de triagem para a doença ^{97,98,99,100}.

Existe a ideia de uma associação funcional entre os defeitos ciliares e a síntese de óxido nítrico, pois o óxido nítrico sintase foi localizado nos corpos basais dos cílios do pulmão. Uma conexão entre um não funcionamento ciliar e uma não síntese de óxido nítrico poderia ser mais uma característica desses pacientes ⁸⁴. Existem recomendações expressas para a mensuração do óxido nítrico nasal ^{101,102}.

Os pacientes que apresentarem o teste da sacarina alterado (maior que 30 minutos) ou o teste do óxido nítrico nasal alterado (menor que 250 ppb), devem ser submetidos aos estudos da frequência do batimento ciliar e do padrão de onda ciliar ^{6,34}.

c) Teste do *clearance* mucociliar por radiaerosol

O *clearance* mucociliar nasal pode ser usado como uma ferramenta de screening, com sensibilidade alta e especificidade baixa, podendo ser usado como exclusão de discinesia ciliar primária. A avaliação do transporte mucociliar por radiaerosol nas vias aéreas inferiores pode ser usada em crianças acima de cinco anos. Tais testes são estudos suplementares, mas não diagnósticos de discinesia ciliar primária ^{93,103,104,105}.

1.1.12 Obtenção de cílios

a) Técnica do escovado nasal

Para obtenção dos cílios, a técnica do escovado nasal vem se mostrando com menor morbidade e custo ¹⁰⁶, de fácil realização e de igual validade quando comparada à biópsia nasal, se realizada conforme a padronização internacional ^{107,108} (anexo 9.4).

Anormalidades em até 10% dos cílios podem ser vistas em uma amostra normal. Devem ser avaliados um mínimo de 50 cílios (em cerca de cinco cortes transversais de 10 células não adjacentes) ^{6,34}.

b) Repetição de exames

Em caso de suspeita de discinesia ciliar secundária, devem ser tratadas a infecção e a inflamação, e repetida a coleta após 6 semanas. Em rotina do Hospital Royal Brompton, de Londres, Reino Unido, não publicada, caso ocorram dois escovados nasais inconclusivos, a indicação de broncoscopia para coleta de biópsia de mucosa brônquica se faz necessária.

c) Cultura de cílios

A cultura de cílios deve ser realizada quando se torna necessário diferenciar o defeito primário do secundário, porém é realizada apenas em centros muito especializados ^{59,59,109,110,111}. Apresenta índices de sucesso de 75% dos casos e mostra-se conclusiva em 85% dos casos ¹¹¹.

Observa-se que existem algumas desvantagens e limitações para a cultura de cílios ⁵⁹:

- necessita de uma biópsia para iniciar a cultura, pois escovados e escoriações não dão material suficiente. A necessidade de biópsia induz a alguma morbidade: sangramento nasal e dor;

- pode haver material insuficiente, o que causa falha no crescimento e, também, podem existir infecções que inutilizam a cultura;
- o procedimento pede ainda equipamento especial, experiência e perícia nem sempre disponíveis;
- o tempo de cultura leva em torno de 6 semanas.

1.1.13 Fisiopatologia da doença do trato respiratório

O defeito primário ciliar do trato respiratório superior e inferior gera uma ausência ou redução importante do transporte mucociliar, com retenção de secreções que causarão doenças em via aérea superior (sinusite crônica, otite serosa) e em via aérea inferior (bronquite bacteriana crônica, pneumonite aguda e crônica), com consequente evolução para bronquiectasias. A longo prazo poderá ocorrer um comprometimento da troca gasosa na superfície e leito capilar, causando insuficiência respiratória e hipoxemia, hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca direita ⁴⁷.

1.1.14 Radiologia

Espessamento da parede brônquica, hiperinsuflação, atelectasia segmentar ou consolidação são achados universais. As bronquiectasias progridem com a idade, e alguns relatos descrevem uma predileção pelo lobo médio (à esquerda no *situs inversus*). Os pacientes adultos apresentam doença pulmonar avançada ^{112,113,114}.

1.1.15 *Evolução*

A perda de função pulmonar ocorre em razão do subtratamento ou diagnóstico tardio, e existe uma relação entre idade e perda de função, com o VEF1 declinando com a idade. Há registro de perda média de VEF1 de 0,8% por ano (dado não relacionado com o defeito estrutural) ⁵¹.

A presença de bronquiectasia está relacionada à idade. Em casuística de 72 pacientes, 98% dos pacientes acima de 18 anos (entre 19 e 73 anos) apresentavam sinais e sintomas de bronquiectasia, contra 61% em menores de 18 anos (entre 1 e 17 anos) ⁵¹.

A microbiologia do trato respiratório (escarro ou aspirado nasofaríngeo) registra um predomínio dos seguintes agentes: *Hemophilus influenza*, *Pneumococo*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e a presença de *pseudomonas* costuma ser tardia (maiores de 18 anos) ^{6,51,115}.

1.1.16 *Tratamento*

A base do tratamento depende do reconhecimento de quais pacientes necessitam de uma agressividade maior contra infecção para prevenir o dano pulmonar. A educação e informação dos pacientes e familiares também são consideradas importantes ⁶.

A orientação para evitar alérgenos ambientais e fumo deve fazer parte da rotina, e o exercício pode ser um melhor broncodilatador que o uso de beta agonistas, sendo que a importância do exercício deve ser enfatizada para crianças e adultos ^{115,116}.

A consulta em centros de referência pode ser feita a cada 2-3 meses em crianças e a cada 6 meses ou anual em adultos, dependendo da necessidade ⁶.

O tratamento acrescenta, à imunização básica, a vacinação anual da influenza e a vacinação pneumocócica, com enfoque nos seguintes cuidados:

a) Monitorização respiratória

Os dois pilares do tratamento respiratório são a antibioticoterapia e a fisioterapia respiratória.

A fisioterapia respiratória deve ser realizada duas vezes ao dia em sessões de 20 minutos cada, aumentando-se nas exacerbações (com especial atenção para os lobos inferiores, médio e língua) ⁶. O acompanhamento com fisioterapeuta é importante sobretudo nos casos mais graves. A aderência à fisioterapia costuma ser pobre em adolescentes e adultos ¹¹⁷. Culturas de escarro e espirometrias seriadas devem ser realizadas no acompanhamento desses doentes. Ao primeiro sinal do aumento dos sintomas respiratórios ou deterioração da função pulmonar, deve ser iniciada a antibioticoterapia, geralmente por duas semanas. Os antibióticos devem ser escolhidos, conforme a sensibilidade nas culturas. O tratamento intravenoso deve ser realizado se os sintomas não cederem com a antibioticoterapia oral. Em adultos, a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* não é rara e pode requerer terapia mais agressiva intravenosa e a consideração do uso de antibióticos inalatórios a longo prazo ^{6,51,53,118}.

O uso de rhDNase (Pulmozyme®) em pacientes com discinesia ciliar primária necessita de maiores estudos, embora alguns pacientes tenham

apresentado melhora respiratória com a sua indicação. O uso de salina hipertônica pode ser efetivo em melhorar o *clearance* mucociliar, porém não há, até o momento, ensaios terapêuticos controlados que a justifiquem ⁹³.

b) Monitorização auditiva

A avaliação da audição e o seguimento devem ser realizados por serviços de otorrinolaringologia, para controle dos sintomas das vias aéreas superiores e da possível perda auditiva, que exige rotinas específicas ^{6,34,119}. Os estudos para o adequado tratamento da otite média com efusão são ainda conflitantes quanto ao uso de tubos de ventilação, necessitando de maiores casuísticas para conclusões ¹²⁰.

c) Encaminhamento para clínicas de fertilidade

Os pacientes adultos devem ser orientados que poderão ter dificuldade para a concepção ⁶.

d) Psicossocial

A estigmatização referida pelos pacientes também deve ser estudada ¹²¹, mas correlaciona-se com o estado mental e os impactos sociais dos sintomas e não com os sintomas físicos ¹²². É necessário um apoio maior nos casos de infertilidade e possíveis problemas escolares ⁶.

e) Cirurgia

Pacientes com doença grave podem ter benefícios na ressecção de bronquiectasias localizadas ¹²³, e os registros de casos transplantados são poucos na literatura ¹²⁴.

1.1.17 Prognóstico

Considerado bom, com expectativa de vida normal, porém há relatos de algumas mortes no período neonatal. Entretanto, a morbidade é considerável, se for inapropriadamente acompanhada ⁶.

A literatura médica brasileira não dispõe de muitos estudos de discinesia ciliar primária, em parte pelas dificuldades com a exata interpretação da padronização internacional de sua microscopia eletrônica, bem como pela carência de centros de pesquisa para o estudo ciliar, e a uma ausência de técnicas disponíveis para o estudo de sua frequência de batimento ciliar e padrão de onda.

O presente trabalho propõe-se a contribuir para o diagnóstico da discinesia ciliar primária, com o estabelecimento de critérios para sua investigação, sugere a indicação do escovado nasal como uma técnica de eleição para a coleta de células ciliadas, e desenvolve um sistema de captura de imagem que permita o estudo da função ciliar.

1.2 Justificativa da Pesquisa

Nos ambulatórios especializados de pneumologia pediátrica que atendem crianças portadoras de pneumopatias crônicas e de repetição vários pacientes permanecem em seguimento sem diagnóstico definido, particularmente quanto à presença de discinesia ciliar primária. Isto ocorre em parte pela dificuldade de utilização de técnicas específicas e sofisticadas para avaliar a ultraestrutura ciliar e os movimentos ciliares. Até o momento, não existe em nosso meio uma padronização quanto à investigação para o

diagnóstico de crianças com suspeita de discinesia ciliar primária, o que prejudica o correto diagnóstico da doença em nosso País.

2 OBJETIVOS

Os objetivos da pesquisa estão apresentados a seguir.

a) Geral

- Avaliar a ultraestrutura e a frequência de batimento ciliar, a partir de amostras de escovado nasal, em uma população de crianças e adolescentes portadores de pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido.

b) Específicos

- Propor um modelo de investigação de discinesia ciliar primária mediante critérios a serem estabelecidos.
- Caracterizar os pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária.

3 MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº. 518/04 e obteve financiamento da FAPESP- Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo sob o nº.06/50063-5.

Os pacientes e o grupo controle avaliados assinaram uma autorização escrita prévia para inclusão na pesquisa (“Termo de Consentimento Informado para Participação em Pesquisa”). No caso de menores de idade a autorização foi assinada pelo responsável legal.

Este trabalho foi realizado mediante estudo transversal¹²⁵ controlado, pois pretendeu avaliar a presença de uma doença em um período definido de tempo, e utilizou um grupo controle para sua conclusão principal.

A coleta dos dados foi realizada entre janeiro de 2007 e julho de 2009, no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental-Lim-05, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O *software* para a captura de imagens e mensuração da frequência do batimento ciliar foi desenvolvido no Laboratório de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

Os laudos de microscopia eletrônica ciliar foram confirmados no Hospital Royal Brompton, de Londres, no Reino Unido.

3.1 Limitações do estudo

A discinesia ciliar primária, além de ser suspeitada em casos de pneumopatias crônicas sem diagnóstico definido, também deve ser investigada nos seguintes casos: hidrocefalia, atresia biliar, desconforto respiratório neonatal de causa desconhecida ao nascimento, cardiopatias complexas associadas ou não a *situs inversus* e síndromes associadas com ciliopatias. A suspeita de discinesia ciliar primária para os pacientes selecionados para este estudo foi decorrente apenas de casos provenientes de pneumopatias crônicas.

3.2 População analisada

Do total de crianças atendidas no Ambulatório de Pneumologia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre janeiro de 2007 e julho de 2009, foram identificadas as que:

- estavam na faixa etária de 6 meses a 19 anos;
- tinham pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido.

Dessa forma foram separadas 75 crianças para fazerem parte do estudo, conforme os critérios de inclusão e exclusão apresentados a seguir.

3.3 Critérios de seleção de pacientes

Os pacientes foram incluídos na pesquisa de acordo com a presença de ao menos um dos seguintes achados:

- a) bronquiectasia de causa desconhecida;

- b) doenças de vias aéreas superiores com sintomatologia crônica, como sinusites de repetição;
- c) infecções pulmonares de repetição, nas quais foram excluídas outras doenças como fibrose cística, imunodeficiências mais frequentes, déficit de alfa1-antitripsina e bronquiolite obliterante;
- d) dextrocardia e/ou *situs inversus*, acompanhados de sintomas em vias aéreas superiores (VAS) e/ou vias aéreas inferiores (VAI);
- e) asma grave de difícil controle (“necessidade de Beta-2 agonista de alívio maior ou igual a 3 vezes na semana, apesar do tratamento com corticóide inalatório em dose maior ou igual a 800 mcg de Budesonida ou equivalente e uso regular de Beta-2 de longa duração em paciente com terapêutica plena e aderente ao tratamento e sem melhora clínica e/ou funcional, por um período mínimo de 6 meses a um ano”) ⁴⁷, e que apresentasse sinais de doença em vias aéreas superiores e/ou inferiores de repetição.

Foram excluídos os pacientes que apresentaram algum dos seguintes exames positivos para a investigação de pneumopatias crônicas:

- a) dois testes do suor, para exclusão do diagnóstico de fibrose cística;
- b) tomografia computadorizada de tórax, em caso de suspeita de bronquiolite obliterante;
- c) dosagem de alfa-1 antitripsina total;
- d) investigação das imunodeficiências humorais ou celulares mais frequentes, excluídas com a realização de:
 - hemogramas seriados;

- dosagem de imunoglobulinas, contagem de linfócitos T e B; sorologia para avaliação da produção ativa de anticorpo humoral (sarampo, ou rubéola, ou hepatite); PPD não reator e sorologia para avaliação do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV, técnica do Elisa).

3.4 Número de pacientes

Uma casuística de conveniência para estimativa do número de pacientes a serem investigados foi realizada, sendo separados 30 pacientes que poderiam participar do estudo, mediante os critérios estabelecidos.

3.5 Procedimentos realizados

Para o grupo controle foram realizados o escovado nasal e a verificação da frequência de batimento ciliar.

Após respeitados os critérios descritos no item 3.3 os pacientes foram convocados, e seus pais ou responsáveis legais foram solicitados a autorizar a participação dos menores via assinatura no Termo de Consentimento Informado de Participação em Pesquisa.

Com os pacientes selecionados foram realizados os seguintes procedimentos:

- a) Teste da sacarina, nas crianças acima de cinco anos de idade;
- b) Escovado nasal para coleta de células ciliadas (segundo técnica descrita no anexo 9.4). Foram utilizadas para o procedimento escovas descartáveis de citologia, utilizadas em broncoscopia, denominadas

“Disposable Cytology Brush de número BC-202D-3010, OLYMPUS®”
(Figura 8 e Figura 9).

Figura 8 - Escova de citologia descartável utilizada

Figura 9 - Ponta da escova para a coleta do escovado nasal

As amostras de epitélio nasal ciliado foram encaminhadas para as seguintes avaliações:

- a) Frequência de batimento ciliar (realizada no Laboratório de Poluição Atmosférica do Laboratório de Patologia). A ponta da escova de broncoscopia com as células colhidas foi levemente esfregada em uma lâmina de vidro e lubrificada com solução de Ringer aquecida à temperatura corporal (37°C), tendo sido certificada antes a temperatura da solução com termômetro clínico. Foi preferida a solução de Ringer pela referência de que a solução fisiológica pode alterar a frequência do batimento ciliar ¹²⁶. O material foi coberto com lamínula e visualizado no microscópio óptico, onde foram feitas avaliações com aumentos de 630 X e 1000X (esta última com óleo de imersão). As imagens de epitélios e células ciliadas em movimento foram procuradas e gravadas. Todos os filmes foram realizados, para todos os pacientes, dentro de um período de até 40 minutos do ato de coleta ciliar. A temperatura da sala foi controlada e permaneceu constante em torno de 26°C. Os filmes foram arquivados para avaliação em um segundo momento.
- b) Microscopia eletrônica da amostra ciliar. A escova de citologia foi imersa em glutaraldeído dentro de um eppendorf (Figura 10) cheio até a metade, onde o material foi disperso. O Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMUSP realizou o preparo das telas com o material ciliar a ser avaliado (Figura 11). No intuito de confirmarmos nossos resultados de verificação e contagem dos defeitos ciliares, após nossa avaliação o mesmo material foi enviado ao Hospital Royal Brompton, que concordou certificar nossos laudos de microscopia eletrônica. Nossas telas de microscopia eletrônica

foram previamente avaliadas no microscópio eletrônico da FMUSP e Instituto do Coração do HCFMUSP.

Figura 10 - Tubo de eppendorf para coleta de células ciliadas

Figura 11 - Porta-telas de amostras para microscopia eletrônica

Quando após a realização de dois escovados nasais sucessivos, mediante um intervalo mínimo de dois meses no mesmo paciente, não houve conclusão diagnóstica pela microscopia eletrônica, a biópsia de mucosa brônquica via broncoscopia foi indicada.

3.6 Sistema de medição da frequência de batimento ciliar

O sistema de experimentação e análise utilizado foi especificado e desenvolvido particularmente para este projeto. O conjunto dos equipamentos que o compõe é apresentado na Figura 12 sendo indicados os principais componentes:

Figura 12- Sistema de medição da frequência de batimento ciliar

A especificação e a aquisição dos equipamentos seguiram a ordem que vai dos requisitos técnicos do problema à redução de custos e disponibilidade de produtos. Nesse sentido, o procedimento foi o seguinte:

a) Levantamos as características técnicas que definem o microscópio:

- Ampliações – 100, 400, 630 e 1000 x;
- Binocular, com adaptador para câmera susceptível à instalação de adaptações futuras (lentes adicionais, filtros, contraste interferencial e polarização);

b) Determinamos as características dos arquivos de vídeo gerados pelo experimento:

- quadros de alta resolução (mínimo de 1024 x 1024 pixels);
- velocidade de até 500 quadros por segundo.

c) Determinamos os requisitos da placa de captura de vídeo:

- com suporte a vídeo digital;
- possibilidade de configuração da câmera via *software*;
- compatibilidade com plataformas de *software* e
- bibliotecas disponíveis para processamento de imagens.

d) Determinamos a câmera a ser utilizada:

- Compatibilidade com os requisitos de resolução e taxa de captura de vídeo;
- Compatibilidade com o padrão de vídeo digital adotado;
- Configurável por *software*;
- Possibilidade de fixação ao adaptador do microscópio.

e) Especificamos o computador a ser adquirido:

- Barramento capaz de suportar a placa de aquisição;
- Dimensionamento da capacidade de memória e de disco;
- Tamanho do monitor de vídeo;
- Sistema operacional compatível com a plataforma de *software* de processamento de imagens.

A obtenção das informações quantitativas sobre o batimento ciliar requer que se adquiram dados instantâneos das diferentes fases do movimento do cílio durante o batimento. Os requisitos essenciais são

resolução espacial e resolução temporal. Além destes, há itens adicionais que ajudam na obtenção de imagens com qualidade capaz de proporcionar melhor extração de atributos geométricos e dimensionais do movimento, tais como: bom contraste entre objeto e fundo, caracterização suficiente dos padrões visuais e possibilidade de monitorar o fenômeno posteriormente, sem perda de informação, se comparado à visualização direta na ocular.

Em função das dimensões envolvidas, utilizamos um aumento de até 1.000 vezes, possibilitando visualizar as extremidades dos cílios. Considerando-se que a menor dimensão a ser visualizada é o diâmetro do cílio, em torno de 1 a 3 μm e o campo de observação para objetivas de aberturas numéricas de 0,95 (ar) a 1,4 (óleo, imersão), a resolução de sensor de pelo menos 1.024 x 1.024 pixels (1 Megapixel) permite cobrir cada cílio com mais de 2 pixels, evitando-se a subamostragem espacial e evitando-se erro de recobrimento na análise do batimento. Para a aplicação do estudo da morfologia do batimento, deve-se fazer a construção da trajetória do cílio. Para que a reconstrução seja feita sem erros de amostragem, é necessário amostrar o movimento da extremidade superior do cílio em uma quantidade suficiente de pontos. Para tanto propõe-se trabalhar com uma taxa de 500 quadros por segundo, taxa ligeiramente superior aos 400 quadros por segundo, utilizada nos experimentos reportados na literatura^{49,50,60,61}.

Os equipamentos que permitiram a captura das sequências de vídeo digital nas condições acima propostas foram selecionados com um custo relativamente menor que aquele que se alcançaria com a tecnologia utilizada

nos trabalhos descritos na literatura. Estes suprimentos foram assim selecionados:

- Placa de captura de imagens de alta velocidade e baixo custo – foi adquirida a placa NI PCIe – 1429 da National Instruments®;
- Câmera digital de alta velocidade compatível com a placa acima – adquirimos a câmera A504kc da Basler®;
- Estação Dell 690®, que foi entregue com sistema operacional Windows XP Professional versão para arquitetura de 64 bits, processador Xeon 5160, 3 GHz. O sistema é completamente compatível com a plataforma de *software* selecionada, o LabVIEW® com biblioteca de processamento de imagens IMAQ®, ambos da National Instruments®;
- Microscópio Óptico Axio Imager Zeiss®, com os pré-requisitos anteriormente descritos.

3.7 Medição da frequência de batimento ciliar

A metodologia utilizada para medir as frequências foi a estimação da densidade espectral de frequências de Fourier, por meio do periodograma. A amostragem foi realizada sobre um segmento retilíneo, denominado tecnicamente de região de interesse do observador (ROI), tomado sobre o local de batimento mais expressivo no campo do microscópio, no trecho selecionado conforme os critérios apoiados em razões de caráter biofísico, expostas mais adiante. As amostras foram as luminâncias calculadas em cada pixel da ROI a partir das suas componentes R, G e B (*Red*, *Green* e *Blue*). O registro temporal em cada pixel nesse segmento produziu uma amostra do processo estocástico que caracteriza o batimento. Em razão do caráter metacronal do movimento coletivo, há uma diferença de fase relativa entre os pixels, podendo-se compensá-la por meio do algoritmo. Tomando-se um segmento pequeno como ROI, pôde-se apreciar a diferença de fases entre cílios vizinhos.

3.8 Cálculo da frequência de batimento ciliar de cada paciente

Este sistema de mensuração é baseado em análise espectral (Fourier), cuja frequência de batimento ciliar é calculada apoiada na diferença de intensidades luminosas no processamento das imagens.

A frequência de batimento ciliar de cada paciente foi calculada pela média aritmética das 10 primeiras verificações das “Regiões de Interesse do Observador - ROI”, obtidas em diferentes estrias de epitélio ciliado em movimento. Para tal mensuração, foram verificadas regiões em que não havia interferência de movimento de uma célula com outra, estando esse

movimento isolado e sempre no topo ciliar. Os registros da ROI e as mensurações foram gravadas e são passíveis de auditoria. A tela do sistema de medição está apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Tela do sistema de medição desenvolvido

No diagrama da análise espectral, foi selecionada para registro a frequência que se mostrou predominante (Figura 14) em relação a todas as outras frequências com registros mínimos dentro do diagrama

Figura 14 - Detalhe da tela do sistema de medição da frequência predominante a ser registrada

Os resultados das frequências de batimento ciliar (média de 10 diferentes regiões de epitélio ciliado de cada suspeito de doença e grupo controle) foram tabulados e apresentados nos resultados.

3.9 Procedimentos realizados com os pacientes diagnosticados

Os pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária, segundo a avaliação da ultraestrutura foram submetidos aos seguintes exames:

- a) Provas de Função Pulmonar nos pacientes acima de 5 anos de idade, segundo as normas da American Thoracic Society (ATS) e European Respiratory Society ¹²⁷. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Capacidade Vital Forçada (CVF), Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (VEF1), Fluxos médios expiratórios formados entre o 25% e 75% da CVF, Resistência (R) e Condutância(C) das vias aéreas, Volume Residual, Capacidade Pulmonar Total (CPT) e Volume Residual (VR) / Capacidade Pulmonar Total (CPT). Todos os valores foram expressos em percentual dos valores previstos para altura e sexo, segundo Morris et al. (1971)¹²⁸ e Polgar (1979)¹²⁹ para até 17 anos, e Knudson et al. (1983)¹³⁰ para maiores ou iguais a 18 anos. Foram considerados valores de resistência elevados quando do encontro de valores acima de 120, ou de dois desvios padrões acima da média.

- b) Tomografia de tórax e de seios da face (esta última nos maiores de cinco anos). Foram seguidas as orientações protocoladas no Serviço de Radiologia Pediátrica do Instituto da Criança (Anexo 9.5) para a proteção de excesso de radiação, para a realização de tomografias conjuntas de tórax e seios da face. Os resultados da tomografia de tórax foram submetidos a avaliação de três radiologistas independentes que aplicaram o escore radiológico de Bhalla, que consta no anexo 9.6. A média do escore dos três radiologistas foi calculada para o escore

radiológico final de cada paciente. A tomografia de seios da face foi avaliada pelo escore de Lund-MacKay ¹³¹ (Anexo 9.6), que quantifica o grau de comprometimento dos seios da face.

- c) Avaliação otorrinolaringológica, que incluiu nasofibroscopia nos casos suspeitos de polipose nasal, hipertrofia de adenóides e sinusite crônica.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram bicaudais e realizadas com os *softwares* GraphPad InStat 3.06, MedCalc 10.1.2.0 e SPSS 13.0, tendo sido adotado um nível de significância de 5%.

As 10 avaliações individuais de cada paciente e dos voluntários do grupo controle, bem como as médias de cada grupo, foram consideradas com distribuição normal pelo teste, sendo então comparadas. Como foram comparados mais de dois grupos, foi usada a análise de variância (ANOVA).

Na análise de variância, constatou-se que existiu uma diferença entre os três grupos estatisticamente significativa ($p < 0,001$), sendo então realizados testes de múltiplas comparações: Bonferroni e Tukey¹³² (vide resultados).

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

Dos 30 pacientes inicialmente separados para a investigação ciliar:

- 24 foram submetidos ao estudo da frequência de batimento ciliar e da microscopia eletrônica;
- Quatro foram submetidos apenas à microscopia eletrônica (com resultados normais), pois os filmes para o estudo do batimento foram com material insuficientes ou inadequados para avaliação em razão da quantidade de muco;
- Um paciente pediu que a investigação fosse postergada;
- Um paciente solicitou não participar da pesquisa.

O quadro abaixo sintetiza as características dos pacientes selecionados para a pesquisa:

Quadro 1- Caracterização dos pacientes selecionados para a investigação de discinesia ciliar primária

<i>Idade (anos): média ± desvio padrão e variação</i>	<i>12,8 ± 4,7 (1 a 19 anos)</i>
Sexo	14 masc., 14 fem.
Etnia	27 brancos, um pardo
<i>Situs inversus</i> + doença de VAS e/ou doença de VAI	7
Bronquiectasia + doença de VAS	14
Infecções respiratórias de repetição + doença de VAS	4
Bronquiectasia	2
Asma de difícil controle+doença de VAS e/ou VAI	1

Além dos pacientes selecionados, foram coletadas amostras de dez voluntários adultos saudáveis (ambos os sexos, com idades maiores ou iguais a 17 anos, não fumantes e sem queixa respiratória no último mês). Esses voluntários formaram o grupo controle da frequência de batimento ciliar.

5.2 Resultados da frequência de batimento ciliar

Os resultados das medições de frequência de batimento ciliar se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da frequência de batimento ciliar* (Hz) do grupo de estudo em relação aos controles

Pacientes com ultraestrutura ciliar alterada (n=11)	Pacientes com ultraestrutura ciliar normal (n=13)	Grupo Controle (n=10)
4	10	11
2	16	11
3	7	13
6	7	11
5	9	18
3	8	15
2	12	10
2	6	19
4	6	14
7	6	17
7	11	-
-	11	-
-	16	-

*média aritmética de 10 valores de frequência coletados de estrias de epitélio ciliado de cada paciente ou controle

A análise estatística encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise estatística dos grupos de estudo

Grupo	Média ± DP	Mín.	Máx.	ANOVA (p)	Comparação entre os grupos **
1: Ultraestrutura ciliar alterada (n=11)	4,09±1,92	2,0	7,0		1 x 2: são diferentes p< 0,001 (Tukey e Bonferroni)
2: Ultraestrutura ciliar normal (n=13)	9,6 ± 3,50	6,0	16,0		1 x 3: são diferentes p < 0,001 (Tukey e Bonferroni)
3: Controles (n=10)	13,9 ± 3,24	10,0	19,0	< 0,001(*)	2 x 3: são diferentes p<0,006 (Bonferroni) e p<0,005 (Tukey)

(*) Análise estatística comparativa entre os três grupos de estudo, avaliando a presença de diferenças entre eles.

(**) Análise estatística comparativa intergrupar.

Na análise de variância, constatou-se que existe uma diferença entre os três grupos estatisticamente significativa ($p<0,001$), sendo realizados testes de múltiplas comparações: Tukey e Bonferroni.

O grupo com ultraestrutura alterada (diagnóstico de discinesia ciliar primária) mostrou diferença das médias da frequência de batimento ciliar em relação ao grupo com ultraestrutura normal ($p<0,001$) e em relação ao grupo controle ($p<0,001$). O grupo com ultraestrutura normal e o grupo controle, quando comparados entre si, também apresentaram diferenças ($p<0,005$ pelo teste de Tukey e $p<0,006$ pelo teste de Bonferroni).

Figura 15 - Distribuição das médias dos batimentos ciliares de acordo com o grupo de estudo.

5.3 Verificação do padrão da onda

O padrão de onda foi verificado pela caracterização dos movimentos ciliares conforme experiência do Hospital Royal Brompton, e citado na literatura por Hogg (2009) ⁴⁸.

Observamos que o padrão circular de movimento ciliar, em todos os defeitos de transposição encontrados pelo nosso sistema de verificação, confere com o padrão do Hospital Royal Brompton para este tipo de diagnóstico (Hogg, 2009) ⁴⁸. A verificação dos padrões de onda, entretanto, não é utilizada na padronização americana realizada por Leigh et al. (2009) ²⁵ para o diagnóstico de discinesia ciliar primária.

5.4 Características dos pacientes com discinesia ciliar primária

Na Tabela 5 consta a descrição das características mais importantes dos pacientes com diagnóstico confirmado de discinesia ciliar primária.

Tabela 5 - Caracterização dos pacientes com discinesia ciliar primária, de acordo com o defeito da ultraestrutura

Idade (anos)	Sexo	Etnia	Pais parentes	Característica clínica predominante	Teste da sacarina (min)	FBC (Hz)	Defeito na ultraestrutura
1	f	br	N	SI+CC	NC	3	e.rad+br.inter
7	m	br	S	SI	NC	5	e.rad+br.inter
7	m	br	S	brq	NC	7	transposição
9	f	br	S	brq+DVAS	NC	4	transposição
12	m	br	S	brq	30	3	e.rad+br.inter
12	m	br	S	SI	7	2	braço externo
13	m	br	S	SI	40	4	braço externo
14	f	br	N	brq+DVAS	23	7	transposição
15	m	br	S	SI	NC	2	e.rad+br.inter
19	m	par	S	brq	37	6	e.rad+br.inter
19	f	br	N	SI	15	2	braço ext curto
19	f	br	N	SI	26	6	normal

Nota: br: etnia branca; par: etnia parda; S: sim; N: não; SI: situs inversus; CC: Cardiopatia Complexa; brq: bronquiectasia; DVAS: doença de vias aéreas superiores; NC: não colabora; FBC: frequência de batimento ciliar; e. rad: espículas radiadas; br. inter.: braço interno

A doença foi diagnosticada na adolescência na maioria dos pacientes, em ambos os sexos (sete homens e cinco mulheres), com predomínio da etnia branca (11 pacientes - 91,6%) e consanguinidade, ou seja, pais com parentesco (oito pacientes - 66,6%). Observamos sete pacientes (58,3%) com *situs inversus*. O teste da sacarina foi positivo (> 30 minutos) em três pacientes, e próximo do alterado (> 20 minutos) em dois pacientes.

Todos os pacientes diagnosticados possuíam frequência de batimento ciliar muito baixa em relação ao grupo controle. Foi diagnosticado um paciente com Kartagener e ultraestrutura normal.

Com relação aos defeitos da ultraestrutura encontrados, cinco pacientes apresentaram defeitos nas espículas radiadas e braços internos de dineína; três pacientes apresentaram ausência do par central com transposição; dois apresentaram ausência dos braços externos de dineína; um apresentou encurtamento dos braços externos de dineína, e um apresentou ultraestrutura normal (Kartagener). As orientações ciliares foram consideradas normais. Os defeitos ciliares da microscopia eletrônica foram verificados por dois especialistas.

A foto da Figura 16 mostra a ultraestrutura de cílios normais. As fotos seguintes (Figura 17 a Figura 20), da microscopia eletrônica realizada, exemplificam os defeitos primários encontrados (aumentos de 30.000 X nas Figuras 16 a 19, e 39.000 X na Figura 20). A Figura 21 exemplifica um defeito secundário.

Figura 16 - Foto de tela com microscopia eletrônica de cílios normais.

Figura 17 - Foto de tela de microscopia eletrônica com defeito ciliar de ausência de braços externos

Figura 18 - Foto de tela de microscopia eletrônica mostrando defeito nas espículas radiadas (desarranjo dos microtúbulos) e cílios com ausência de braços internos

Figura 19 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios com defeito de ausência do par central com transposição

Figura 20 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios com encurtamento dos braços externos

Figura 21 - Foto de tela de microscopia eletrônica com cílios compostos: membrana comum (defeito secundário)

As tabelas seguintes (Tabela 6 e Tabela 7) detalham a função pulmonar dos pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária.

Tabela 6 - Função pulmonar dos pacientes com discinesia ciliar primária

Defeito ciliar	Idade	Sexo	CVF (%)	VEF1 (%)	FEF 25-75 (%)	Resistência (R) (%prev)	Condutância (C) (%prev)	VR (%prev)	VR/CPT (%)
e.rad+bi	7	m	89	78	60	129	72	331	51
transp	7	m	81	76	40	129	88	188	40
transp	9	f	63	54	40	141	40	158	41
e.rad+bi	12	m	126	86	40	134	39	247	35
br.ext	13	m	111	99	90	124	41	98	19
transp	14	f	113	100	98	131	36	147	26
e.rad+bi	15	m	42	21	9	474	11	292	65
e.rad+bi	19	m	88	73	41	244	33	93	24
br.curto	19	f	105	89	75	342	30	121	24
normal	19	f	88	70	50	123	45	81	20

*Dois pacientes não colaboraram; br.ext=braço externo; e.rad+bi=espícula radiada+braço interno;br curto=braço curto; trans=transposição

CVF: Capacidade Vital Forçada; VR: Volume residual; CPT: Capacidade Pulmonar Total; VEF1: Volume Expiratório Forçado;% prev: porcentagem dos valores previstos para altura e sexo; FEF25-75: fluxos expiratórios médios entre 25 e 75% da Capacidade Vital Forçada.

Tabela 7 - Parâmetros de função pulmonar dos pacientes diagnosticados

Variável	Média $\pm$ DP	Valor máximo	Valor mínimo
CVF	90,6 $\pm$ 24,96	126	42
VEF1	74,6 $\pm$ 23,36	100	21
FEF	54,3 $\pm$ 26,88	98	9
Resistência	197,1 $\pm$ 120,87	474	123
Condutância	43,5 $\pm$ 21,70	88	11
VR	175,6 $\pm$ 87,46	81	331
VR/CPT	34,5 $\pm$ 14,97	65	19

CVF:Capacidade Vital Forçada; VR: Volume residual; CPT: Capacidade Pulmonar Total;
VEF1:Volume Expiratório Forçado; FEF25-75:fluxos expiratórios médios entre 25 e 75% da Capacidade Vital Forçada

Em razão da casuística pequena não foi permitida a comparação entre os grupos.

Distúrbio ventilatório obstrutivo¹²⁸ (VEF1 < 80% e ou FEF 25-75% <70), conforme diretrizes da literatura (Rodrigues et al., 2002)¹³³, foi constatado em 70% dos pacientes que conseguiram realizar as provas de função pulmonar (10 pacientes), sendo um paciente com distúrbio ventilatório obstrutivo muito grave (VEF1=21%).

Dentre os pacientes avaliados, os valores elevados de resistência (maiores que 120, ou dois desvios padrões acima da média) caracterizaram obstrução ao fluxo aéreo nesses pacientes.

O paciente com função pulmonar mais grave (VEF1 = 21%), com defeito de espículas radiadas e braços internos, está em seguimento em conjunto com o grupo de transplante pulmonar.

Tabela 8 - Escore radiológico* de bronquiectasia (CT de tórax) dos pacientes com discinesia ciliar primária segundo o escore de Bhalla

Idade (anos)	Escore médio	Defeito na ultra-estrutura
1	3	e.rad+br.inter
7	14	transposição
7	12	e.rad+br.inter
9	14	transposição
12	9	braço externo
12	14	e.rad+br.inter
13	7	braço externo
14	17	transposição
15	9	e.rad+br.inter
19	12	e.rad+br.inter
19	12	braço curto
19	13	normal

Nota: e.rad: espículas radiadas; br.inter: braço interno

*Escore radiológico calculado pela média aritmética da avaliação independente de três radiologistas

O escore de Bhalla, que se encontra no anexo 9.6, foi usado para avaliação das tomografias. Não foi encontrada correlação (teste de Spearman) estatisticamente significativa entre idade dos pacientes e escore de Bhalla ($p = 0,829$). Os radiologistas constataram um maior acometimento das bases pulmonares.

A casuística pequena não permitiu a associação entre o escore radiológico e o defeito de ultraestrutura nem a análise de *clusters*, porém os pacientes com defeito de ausência do par central com transposição apresentaram as maiores pontuações radiológicas.

Tabela 9 - Caracterização dos achados da tomografia de tórax dos pacientes com discinesia ciliar primária

Parâmetro/ Número de pacientes	Ausente	Leve	Moderado	Grave
Gravidade da Bronquiectasia	1	3	6	2
Espessamento brônquico	-	3	9	-
Extensão da bronquiectasia	1	3	3	5
Extensão das rolhas de muco	2	2	2	6
Ausência de saculações	11	1	-	-
Ramificações da árvore brônquica	1	-	-	11
Colapso	2	4	5	1

Nota: *Escore radiológico calculado pela média aritmética da avaliação de três radiologistas

Dos 12 pacientes com discinesia ciliar primária, 11 apresentaram bronquiectasia (91,6%). Todos apresentaram espessamento brônquico (100%), oito (66,6%) apresentaram extensão moderada ou grave da bronquiectasia, dez com alguma rolha de muco (83,3%), 11 sem abscessos ou saculações e 11 com ramificações brônquicas até a sexta geração (91,6%). Dez pacientes apresentaram algum grau de colapso ou consolidação (83,3%) (Tabela 9).

Tabela 10 - Avaliação otorrinolaringológica dos pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária

Idade (anos)	Sexo	Ouvidos	Nasofibroscopia	Escore de seios da face Lund-MacKay (0-20))	Defeito na ultra-estrutura
1	f	normal	normal	NR	e.rad+br.inter
7	m	normal	normal	10	transposição
7	m	OMS	normal	17	e.rad+br.inter
9	f	OMS	secreção	11	transposição
12	m	normal	ds	12	braço externo
12	m	normal	normal	16	e.rad+br.inter
13	m	normal	pólipos bilaterais	17	braço externo
14	f	normal	-	4	transposição
15	m	normal	pólipos	16	e.rad+br.inter
19	m	escler.tím	pólipos+ds	20	e.rad+br.inter
19	f	normal	normal	10	braço curto
19	f	normal	normal	13	normal

NR: não realizado em razão da idade; NC: não colaborou

ds: desvio de septo; OMS: otite média secretora

Análise estatística: não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre idade e escore de gravidade de seios da face (SPIERMAN, $p = 0,802$)

Dos 12 pacientes estudados, cinco (41,6%) apresentaram problemas relacionados à doença. Foram constatadas alterações em ouvidos de três pacientes, presença de pólipos em três (25%), dois pacientes com desvio do septo nasal (16,6%), um com esclerose do tímpano (8,3%), com um total de metade dos pacientes com algum problema otorrinolaringológico. A mediana do escore de Lund-MacKay foi igual a 12. Cinco pacientes apresentaram-se acima desta mediana (Tabela 10).

O escore de Lund-Mackay é utilizado para pontuar o comprometimento dos seios da face (anexo 9.6), e pode ser usado para descrever a gravidade de doença sinusal.

Com relação à indicação de broncoscopia para a coleta de material foi observado que seis pacientes necessitaram repetir o escovado nasal, e dois pacientes necessitaram da realização de broncoscopia para a coleta de biópsia brônquica, porque o escovado nasal foi inconclusivo devido à quantidade de inflamação encontrada nos pacientes. Portanto, o diagnóstico ou sua exclusão foi feito no primeiro escovado em 22 pacientes (de um total de 28), com um índice de diagnóstico de sucesso para o escovado nasal de 78,5% na primeira vez.

6 DISCUSSÃO

6.1 Quanto à seleção de pacientes para investigação diagnóstica

O presente trabalho pretendeu estabelecer critérios para a investigação da discinesia ciliar primária, visando melhor definir a indicação da microscopia eletrônica para pacientes com suspeita diagnóstica. Do total de pacientes selecionados (28 pacientes), mediante os critérios estabelecidos ^{6,37}, chegamos ao diagnóstico de discinesia ciliar primária em 12 pacientes (42,8%). A utilização dos critérios de seleção, portanto, auxiliou a otimização diagnóstica e a redução de custos.

Em relação a nossos pacientes, foi afastado fibrose cística pela dosagem repetida de cloro no suor, dado este que consideramos importante em razão de ambas as doenças apresentarem alteração do transporte mucociliar, com o teste da sacarina alterado. Foi afastado, também, bronquiolite obliterante pela avaliação tomográfica.

Em relação à investigação das imunodeficiências, não foi nosso objetivo afastar todas as imunodeficiências descritas, tarefa esta considerada pelos imunologistas de difícil realização. A história clínica dos pacientes quanto a infecções se concentrava em doenças de vias aéreas superiores e inferiores, com quadros de bronquiectasia e *situs inversus*, não chamando a atenção para outros sinais de alerta descritos em literatura ^{134,135}, quanto à presença de imunodeficiências. A investigação dos distúrbios de fagócitos foi prejudicada pela não realização do teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT) devido à falta de recursos, e também não obtivemos a adesão de todos os pacientes para a realização de hemogramas seriados, porém não encontramos na história dos pacientes

histórico de infecções como adenites, celulites e abscessos. É importante ressaltar, que a triagem laboratorial realizada pode ser normal em algumas imunodeficiências, como por exemplo, em deficiências seletivas da imunidade celular ou na disfunção de células *natural killer*¹³⁵. Pretendemos apenas afastar as imunodeficiências mais frequentes, como deficiência de IGA e a imunodeficiência comum variada.

A investigação para deficiência de alfa-1 antitripsina foi normal em todos, embora não tenhamos conseguido fazer imunofenotipagem. Os pacientes também apresentaram PPD não reator e HIV negativos (Sorologia Elisa).

Os pacientes com sintomatologia de doença do refluxo gastroesofágico não foram incluídos.

6.2 Quanto ao uso do escovado nasal

O uso do escovado nasal para a coleta de material ciliar foi testado com sucesso em serviços internacionais^{6,106,108,136} e com bons resultados¹³⁷.

Foi estabelecido que a biópsia brônquica possui um índice de sucesso maior para coletar cílios do que o escovado nasal e o escovado nasal é considerado superior à biópsia nasal³⁹.

O presente trabalho utilizou o escovado nasal como técnica de coleta eletiva, em detrimento da biópsia em todos os pacientes, com um índice de diagnóstico (positivo ou não) em 22 pacientes (78,6%) na primeira tentativa, e necessidade de segunda tentativa em seis pacientes (21,4%), o que justifica a sua indicação como procedimento de eleição em relação à biópsia

de mucosa brônquica, que depende da indicação da broncoscopia com anestesia geral para tal procedimento. Até a presente data, a prática nacional é a indicação da biópsia nasal ou da região da carina brônquica para o diagnóstico de discinesia ciliar primária.

A biópsia de mucosa brônquica é indicada por serviço britânico (Hospital Royal Brompton) quando ocorrem duas tentativas de escovado nasal inconclusivo para o diagnóstico, e a preferência pela mucosa brônquica em relação à nasal ocorre em razão da melhor qualidade do material na região, já que as células ciliadas nasais são, muitas vezes, prejudicadas por inflamações constantes e rinite alérgica.

Dois pacientes necessitaram da indicação de broncoscopia para a coleta de biópsia de mucosa brônquica para o diagnóstico, pois apresentaram resultados inconclusivos do escovado nasal devido à quantidade de inflamação encontrada, tendo sido então, indicada broncoscopia para a coleta de biópsia da mucosa brônquica, com um resultado positivo para discinesia ciliar primária.

A biópsia de mucosa brônquica permite maiores quantidades de material sem os inconvenientes das células inflamatórias nasais comuns nesses pacientes, porém obriga a um risco anestésico, ao passo que o escovado nasal tem reduzida morbidade ¹⁰⁶.

6.3 Quanto ao cálculo da frequência de batimento ciliar estabelecido

Trabalhos anteriores ^{49,60,61} reportam o uso de análise de sequências de imagens digitais capturadas na ocular (para câmeras) de microscópio

óptico, para extrair propriedades cinemáticas do batimento ciliar. Entre os atributos do movimento mencionados nesses trabalhos, encontram-se a frequência dos batimentos e a trajetória das extremidades dos cílios. Nesta pesquisa foram realizadas a medição e análise com maior fidelidade que a alcançada com a tecnologia utilizada nos trabalhos anteriores e com a intenção de buscar a extração de características do movimento que são apenas apresentadas naqueles trabalhos, como conjecturas ou estimativas inferidas por meios indiretos a partir das medidas. Obtivemos os dados empregando métodos quantitativos. Este método faz uso do processamento digital de imagens (análise espectral), em que a frequência é calculada pelo *software*, e o observador determina a estria de epitélio onde será realizada a mensuração.

Para a mensuração da frequência ciliar na ROI (região de interesse do observador), foi levado em conta que dentro do fenômeno biofísico do movimento ciliar, o cílio apresenta o movimento de maior propulsão e deslocamento de muco no seu topo, durante o movimento efetivo de propulsão para a frente, e, portanto, a ROI sempre foi estabelecida no topo ciliar, no local de maior movimento. Todas as verificações de frequência foram no topo ciliar.

A temperatura da sala foi mantida em torno de 25°C. A solução de Ringer utilizada para molhar o material obtido por meio do escovado nasal sobre a lâmina de vidro foi controlada com termômetro clínico (em torno de 37°C) em todos os experimentos, o que evitou a interferência da temperatura na mensuração. Todos os filmes foram coletados dentro de até

quarenta minutos do escovado nasal, ficando passíveis de comparação entre si.

O grande desafio do novo método é torná-lo repetitivo e reprodutível. Para resolver tal quesito, e considerando a variabilidade da frequência verificada quando mudamos a ROI, foi necessário estabelecer a orientação para selecionar o valor de frequência do diagrama de análise espectral que acusasse a frequência predominante discriminada no diagrama de potências, em relação a outras frequências quase imperceptíveis. Normalmente, esse registro acusava uma superioridade de mais de 90% maior em relação aos outros registros do periodograma para aquele momento de mensuração, e esse valor foi registrado.

O resultado final para cada paciente foi a média aritmética de 10 medições obtidas da mesma maneira.

Pontos de corte para a frequência de batimento ciliar reduzida variam entre as publicações, de 9 Hz³⁹ a 11 Hz⁶ como valores médios, sendo importante cada serviço estabelecer seu ponto de corte³⁷. Em revisão recente, Stannard et al. (2009)¹³⁸ encontraram uma sensibilidade e especificidade para frequências de batimento ciliar menores que 11Hz e microscopia eletrônica ciliar positiva para discinesia ciliar primária de 87,1% e 77,2%, respectivamente, dando destaque ao estudo dos padrões de onda como *screening* mais eficiente do que a frequência de batimento ciliar, e descreve que um fator difícil de ser controlado são as infecções bacterianas secundárias, que alteram o epitélio *in vitro* e podem reduzir a frequência de batimento ciliar.

Obtivemos valores de frequência ciliar reduzida em alguns pacientes com ultraestrutura normal, que apresentam alguns registros na literatura. É reconhecido que a infecção pode causar discinesia transitória, que pode retornar ao normal com o tempo e tratamento apropriado (Buchdahl et al., 1988)⁶³. Contudo, os pacientes com frequência de batimento ciliar baixa e ultraestrutura normal serão separados para análise genética futura, já que existe a descrição de discinesia ciliar primária com ultraestrutura normal. Isto sugere que os defeitos da adenosina trifosfatase, que é responsável pela motilidade ciliar, podem também ser manifestados em nível molecular e histoquímico³³.

Valores de frequência de batimento ciliar relacionados com defeitos específicos da ultraestrutura, descritos na literatura^{49,50,139}, encontram confirmação nesta pesquisa, pois, apesar da casuística ser pequena, a média das frequências de batimento ciliar nos pacientes com defeitos de braços externos (3Hz) foi menor que a dos pacientes com defeitos das espículas radiadas (3,8Hz), e menor que a dos defeitos de transposição (6Hz).

O registro de frequências de batimento ciliar em literatura, conforme as faixas etárias⁴⁹, descreve médias de batimento ciliar com variações normais entre os valores de 10 Hz a 18,1 Hz para indivíduos entre 0 e 18 anos e valores de 7,7 Hz a 15,5 Hz para maiores ou iguais a 19 anos. No entanto, todos os pacientes deste estudo com diagnóstico de discinesia ciliar primária registraram uma média de frequência de batimento ciliar mais baixa que os valores para a respectiva idade mencionados na literatura. Desse modo, necessitamos de casuística maior para estabelecer nossos

parâmetros segundo as faixas etárias, sobretudo porque usamos um sistema de mensuração diferente do referido na literatura ³⁷.

O método estabelecido, porém, requer treinamento adequado, tempo para a sua utilização, e experiência do pesquisador para reconhecer estrias de epitélio ciliado que não tenham interferências, já que existe o entendimento de que a presença de células lesadas ou com excesso de muco podem afetar o movimento adequado, devendo ser evitadas. Contudo, a vantagem do método é que torna o cálculo da frequência independente do pesquisador, na medida em que esta é inferida pelo sistema desenvolvido.

6.4 Padrão de onda

O diagnóstico de discinesia ciliar primária dos defeitos de ausência do par central com transposição, conforme dados de literatura de Hogg (2009) ⁴⁸ e Chilvers et al. (2003) ⁵⁰, baseia-se no encontro da associação de movimento ciliar circular no padrão de onda com o respectivo defeito da ultraestrutura⁴⁸. No entanto, a verificação dos padrões de onda não é recomendada em importante rotina americana, de Leigh et al. (2009) ²⁵. Em nossa casuística, nossos diagnósticos de ausência de par central com transposição obedeceram às recomendações desses autores.

Necessário se faz comentar que o estudo dos padrões de onda desencadeados pelo movimento ciliar tem a crítica de ser realizado por meio de uma verificação que depende totalmente da visão do observador que o avalia, podendo ocorrer subjetividade. Esta situação pode ser minimizada quando o observador é treinado em serviço de referência internacional, fato este que ocorreu neste estudo. O estudo dos padrões de onda do

movimento ciliar necessita ainda do desenvolvimento de modelos de medição objetiva dos ângulos de movimento, a fim de tornar a medição independente do observador.

Deste modo, no presente estudo, não buscamos encontrar os outros padrões de onda descritos na literatura para os outros defeitos ultraestruturais ⁵⁰, por possuímos casuística de defeitos específicos ciliares pequena, e estes registros não serem considerados fundamentais para o diagnóstico, à exceção dos defeitos de transposição ⁴⁸. Entendemos que uma próxima linha de estudo será o desenvolvimento de uma mensuração objetiva do padrão de onda do movimento ciliar, tornando a investigação automatizada.

6.5 Quanto à avaliação da microscopia eletrônica

Para esta avaliação e no intuito de uniformização com padrões internacionais, a verificação e a contagem dos defeitos ciliares foram realizadas conforme padrão do serviço de microscopia eletrônica ciliar do Hospital Royal Brompton (exemplo de laudo no anexo 9.7), que nos orientou quanto a esta verificação e contagem, e certificou estes resultados. Cumpre comentar que há na Inglaterra três centros de referência para o diagnóstico e pesquisa de discinesia ciliar primária: O Hospital Royal Brompton e os serviços das Universidades de Southampton e Leicester, no interior do país ¹⁴⁰. No anexo 9.8 é apresentada a casuística de dois desses centros, e como esses defeitos são descritos e quantificados. O sistema de verificação do Hospital Royal Brompton registra o encontro de braço de dineína no corte de um cílio quando é encontrado, ao menos, um braço externo (registrado como

braço de dineína externo presente) ou interno (registrado como braço de dineína interno presente), ou ambos (quando ao menos um dos dois é visualizado) em um corte axial de um cílio (vide anexo 9.7). O defeito de braços externos de dineína é definido como ausência de braços externos de dineína ou presença de braços externos de dineína encurtados em comparação com braços plenamente desenvolvidos.

O defeito das espículas radiadas é caracterizado por um desarranjo dos pares de microtúbulos associado à uma ausência dos braços internos de dineína, e o defeito de transposição pela ausência do par central em alguns cortes transversais, que é substituído por uma dupla de microtúbulos externos em outras secções de corte (arranjo 8+2).

Serviços diferentes vêm tentando padronizar critérios diagnósticos para a microscopia eletrônica ciliar, porém nenhum tem sido universalmente aceito. A variedade de defeitos descritos associados à discinesia ciliar primária e a raridade da doença tornaram a padronização da interpretação da microscopia eletrônica difícil ¹⁴¹.

A ausência parcial de dineína é considerada controversa e requer mais estudos para sua confirmação como defeito primário, conforme Jorissen et al. (2000) ³⁹. A ausência parcial não foi considerada como defeito estabelecido em nossa casuística, pois foram seguidas as recentes orientações americana (Leigh et al., 2009)²⁵ e de dois serviços britânicos (Anexos 9.7 e 9.8). A análise ultraestrutural dos cílios e diagnóstico de discinesia ciliar primária são, algumas vezes, confundidos por amostras pobres, pela qualidade do processamento, e o processamento digital das

imagens pode ser usado para confirmar a posição da ultraestrutura (Carson e Collier, 1988; Carson et al., 2000) ^{11,142}.

A quantificação de braços externos e internos é realizada por alguns serviços, porém apresenta variações conforme o país de estudo. Longh e Rutland, na Austrália (1995), em pacientes saudáveis, refere a presença média de braços externos e internos de 7,4 a 9,0 e 3 a 7, respectivamente ³³.

Jorissen et al. (2000), na Bélgica, encontram uma média de $8,7 \pm 0,4$ braços externos e $3,3 \pm 0,4$ braços internos ¹¹¹. Carlén et al. (2003), na Suécia, consideram normal a faixa média de 7,5 a 9 para braços externos e 3 a 5 para braços internos, com pontos de corte para defeitos ciliares de braços externos, médias menores que 1,6 e, para defeitos de braços internos, médias menores que 0,6 ¹⁴³.

Chilvers et al. (2003b) encontram, nos pacientes classificados com defeitos de braços externos e internos, uma presença média de braços externos de 0,6, e uma presença média de braços internos de 0,6, e nos pacientes catalogados com defeitos de braços externos, médias de 1,2 e 6,3 como braços externos e internos, respectivamente ⁵⁰.

Sirvanci et al. (2008) ¹⁴⁴ encontram valores médios da presença de braços internos e externos, respectivamente, em pacientes com síndrome de Kartagener de 0,4 a 3,0 e 0,5 a 5,6; e outros autores consideram apenas a ausência dos braços ou o aspecto "truncado ou interrompido" como defeito (Plesec et al., 2008; Leigh et al., 2009) ^{25,141}.

Diferentemente de registros anteriores que consideram os defeitos de braços de dineína como o defeito mais frequente ^{31,39,48,138,145}, nossa

casuística, nesta amostragem de pacientes, revelou a prevalência dos defeitos de espículas radiadas com defeito de braço interno como o defeito mais frequente, seguida dos defeitos de transposição. Segundo Jorissen et al. (2000), a deficiência dos braços internos de dineína é difícil de ser reconhecida, pois a deficiência isolada apresenta variação semelhante ao grupo controle, sendo sempre associada ao defeito de braço externo ou das espículas radiadas ³⁹. Como o estudo da discinesia ciliar primária ainda é recente no País, não sabemos ainda a real prevalência de nossos defeitos ciliares. É preciso estabelecer investigações de rotina desses defeitos para maiores conclusões a respeito de quais predominam.

Dos pacientes diagnosticados, um paciente com Síndrome de Kartagener não apresentou defeito na ultraestrutura ciliar, embora exista alteração no movimento ciliar. Nesse paciente, o diagnóstico de discinesia ciliar primária foi baseado na presença das características clínicas típicas (*situs inversus*, sinusite e bronquiectasia), associada a uma redução da frequência de batimento ciliar, na alteração quase limítrofe de seu teste da sacarina, e no respaldo da literatura acadêmica da existência de Kartagener com ultraestrutura normal ^{39,59,146,147}. Segundo essa literatura, um defeito no cílio nodal, que determina a rotação visceral na embriogênese precoce, pode ser causado por um defeito genético, sem a devida expressão ultraestrutural. O baixo nível de óxido nítrico nasal expirado poderia ser útil para assegurar o diagnóstico, mas a análise do óxido nítrico nasal não está disponível no País. Tem sido proposto que o defeito poderia estar relacionado com as enzimas associadas com estruturas do axonema ²⁶, e existe já a descrição

de gene envolvido com ultraestrutura ciliar normal e Síndrome de Kartagener.

6.6 Pacientes diagnosticados

A maioria das crianças diagnosticadas foi da etnia branca (11 pacientes – 91,7%), sendo apenas um paciente não branco (pardo). Contudo, há registro de casuística internacional (Canadá), acusando 40% da população do serviço de pacientes de discinesia ciliar primária como de origem não caucasiana, sobretudo asiática. O fato de que a maioria dos pacientes recrutados para os estudos de discinesia ciliar primária são caucasianos sugere um subdiagnóstico dessa doença ¹⁴⁸ nesta pesquisa. A investigação de discinesia ciliar primária em população asiática na Grã-Bretanha foi verificada em um estudo recente, onde foi constatada a forte presença de consanguinidade familiar, com 52% dos pacientes estudados frutos de pais consanguíneos, primos de primeiro grau, e a doença foi associada à presença de tosse crônica e sintomas nasais no primeiro ano de vida, com 73% dos pacientes com história de desconforto respiratório neonatal ¹⁴⁹. A consanguinidade pode não ser a causa, mas um dado importante que, associado a outros dados clínicos, pode aumentar a suspeita de discinesia ciliar primária.

A presença de *situs inversus* costuma ser encontrada na metade das casuísticas de discinesia ciliar primária, bem como as doenças das vias aéreas superiores e inferiores, fatos estes que confirmamos nesta pesquisa, sendo o *situs inversus* uma indicação para o estudo ciliar ^{67,145}. Contudo, a associação de *situs inversus* com cardiopatia complexa, encontrada aqui em

um paciente (Tetralogia de Fallot), não é encontrada em todas as casuísticas

150

Quanto ao teste da sacarina, que foi positivo (> 30 minutos) em três pacientes, e maior que 20 minutos em dois pacientes, lembramos que apesar de ser uma técnica segura e barata, possui uma série de fatores que podem interferir em seu resultado: espirros, olfação, bloqueios nasais que podem danificar o epitélio, metaplasias localizadas, e estase ciliar devido à hiperosmolaridade da sacarina. E ainda em perfeitas condições um baixo transporte ciliar é observado em 20% dos pacientes saudáveis ⁴⁶. Infelizmente, o teste da sacarina não é altamente específico e só pode ser usado como teste de *screening* ¹². Possui também o inconveniente de depender muito da colaboração da criança, não pode ser usado em crianças pequenas e não distingue discinesia ciliar primária de secundária¹⁵¹. Em revisão realizada por Barbato et al. (2009) ⁹³, para a Sociedade Respiratória Européia (European Respiratory Society - ERS), o teste foi considerado difícil de ser realizado, e não confiável em menores de 12 anos.

6.7 Função pulmonar

Dos 12 pacientes avaliados na presente casuística, apenas dez realizaram as provas de função pulmonar (um foi excluído pela baixa idade, e o outro porque não colaborou, após três tentativas em dias diferentes).

A discinesia ciliar primária está acompanhada por uma grande deterioração pulmonar se subtratada, mas a função pulmonar pode ser mantida com tratamento antibiótico adequado e fisioterapia respiratória regular. A função pulmonar é significativamente menor quando o diagnóstico

é feito na vida adulta. O dano pulmonar ocorre pelas infecções recorrentes e pode ser evitado com diagnóstico apropriado e cuidados adequados ¹¹⁸.

O VEF1 dos pacientes com discinesia ciliar primária, segundo Noone et al. ⁵¹, costuma declinar com a idade, com uma queda estimada de 0,8% ao ano.

Não tivemos uma casuística elevada de pacientes diagnosticados que nos permitisse correlacionar defeitos ciliares com função pulmonar e idade, porém percebemos, nos pacientes avaliados, distúrbio ventilatório obstrutivo (7 pacientes - 70%) anteriormente descrito ⁶² e aumento da resistência das vias aéreas, compatível com as doenças obstrutivas. Neste estudo foram considerados elevados os valores de resistência acima de 120 ou acima de dois desvios padrões acima da média.

O paciente mais grave da pesquisa, com 15 anos e síndrome de Kartagener, com defeito de espículas radiadas e braços internos, apresentou distúrbio ventilatório obstrutivo muito grave ($VEF1 < 35\%$ do previsto), enquanto outro paciente, mais velho, de 19 anos, com o mesmo defeito, sem síndrome de Kartagener, apresentou menor comprometimento da função pulmonar. Tal diferença pode se dever tanto a genes relacionados diferentes, como à adesão e resposta ao tratamento diferentes.

6.8 Avaliação radiológica

Na discinesia ciliar primária, dextrocardia representa o achado mais comum na radiografia de tórax, enquanto a tomografia de alta resolução demonstra o espessamento peribronquico e obstruções por muco ao longo da via aérea ^{152,153}. O escore radiológico da tomografia de alta resolução do

pulmão pode ser uma ferramenta para avaliação de estudos longitudinais e, segundo Santamaria et al. (2008)¹⁵⁴, costuma correlacionar-se com os achados espirométricos. A doença pulmonar na discinesia ciliar primária costuma envolver, predominantemente, os lobos médios e inferiores do pulmão¹⁵³, o que é compatível com nossos resultados.

As técnicas de escore radiológico desenvolvidas para a avaliação da fibrose cística¹⁵⁵ foram aplicadas para a avaliação da gravidade desta população de pacientes¹⁵².

Nossa amostra mostrou-se insuficiente para a associação do escore de bronquiectasia com os defeitos de ultraestrutura, porém o comprometimento encontrado mostra-se compatível com um padrão obstrutivo da via aérea, em que o espessamento brônquico e as ramificações da árvore brônquica com obstrução ocupam lugar de destaque. Observou-se que os pacientes com defeitos de transposição apresentaram um maior escore radiológico em nossa casuística.

6.9 Avaliação otorrinolaringológica

A otite média secretora e a sinusite são achados quase universais na discinesia ciliar primária, e, muitas vezes, o otorrinolaringologista pode ser o primeiro especialista para o qual a criança é referida. A vantagem de fazer um diagnóstico precoce e correto é permitir ao especialista tratar a otite média com efusão apropriadamente, evitando as desvantagens dos tubos de inserção.

A polipose nasal é descrita no quadro clínico de discinesia ciliar primária²⁵, tendo sido encontrada em três pacientes.

Otite média secretora é muito comum em crianças com discinesia ciliar primária, e, usualmente, é tratada de forma conservadora, com avaliação audiológica regular. O tratamento conservador deve-se ao fato de que os tubos de ventilação, frequentemente, resultam em otorreia prolongada, presumivelmente devido a uma função mucociliar anormal na tuba auditiva e no ouvido médio. A otite média secretora em crianças sem anormalidades imunológicas, crâniofaciais ou anormalidades mucociliares, resolve-se na maioria das crianças, na idade de 8 anos. Nas crianças com discinesia ciliar primária, a idade em que o limiar de audição torna-se normal na maioria, parece ser aos 12 anos. Os problemas das otorreias da tuba persistentes e das perfurações da membrana timpânica podem ser contornados com a certeza de que a perda auditiva será resolvida espontaneamente com o tempo ¹⁵⁶. Os tubos de ventilação podem predispor a otorreias crônicas quando anulam o efeito de amortecimento do ouvido médio, permitindo insuflação da bactéria via tuba auditiva ¹¹⁹.

6.10 Síntese

Em resumo, a técnica do escovado nasal para a coleta de epitélio ciliado foi eficiente para a avaliação em 22 (dos 28) pacientes na primeira tentativa.

A frequência de batimento ciliar, com base no sistema desenvolvido, acusou diferenças entre grupos de pacientes com diagnóstico de discinesia ciliar primária (ultraestrutura alterada) e os grupos com ultraestrutura normal e controle ($p < 0,001$), e entre os grupos com ultraestrutura normal e grupo controle ($p < 0,005$ Tukey e Bonferroni $p < 0,006$).

Os relatórios da microscopia eletrônica ciliar foram baseados no encontro e quantificação dos defeitos ciliares, e estudos de orientação ciliar. Alguns serviços recomendam a associação do estudo dos padrões de onda do movimento ciliar para o diagnóstico. A contagem dos defeitos da microscopia eletrônica é melhor respaldada quando checada por dois avaliadores ao mesmo tempo.

Foram diagnosticados 12 pacientes com discinesia ciliar primária, sendo dois com ausência dos braços externos de dineína, um com encurtamento dos braços externos de dineína, cinco pacientes com defeitos de espículas radiadas e braços internos de dineína, três com ausência do par central e transposição e um com ultraestrutura normal (Kartagener). Os pacientes diagnosticados foram de ambos os sexos, com predomínio da raça branca (11 pacientes - 91,6%) e filhos de pais consanguíneos na maior parte (oito pacientes - 66,6%).

Na caracterização dos 12 pacientes foram observados sete pacientes (58,3%) com *situs inversus*. As provas de função pulmonar, realizadas em dez dos 12 pacientes, acusaram distúrbio ventilatório obstrutivo em sete pacientes (70,0%).

Dos 12 pacientes diagnosticados, 11 (91,6%) apresentaram bronquiectasia e todos (100%) algum grau de espessamento brônquico. Foram encontradas áreas de colapso em dez pacientes (83,3%). Na avaliação otorrinolaringológica foram encontradas alterações em ouvidos em três pacientes (25%), pólipos nasais em três (25%), dois pacientes com desvio de septo nasal, e um com esclerose do tímpano, num total de seis pacientes (50%), com algum problema otorrinolaringológico.

7 PERSPECTIVAS

Tudo indica que em um futuro próximo, com o avanço das pesquisas de rastreamento genético de discinesia ciliar primária, o diagnóstico poderá ser feito pelo encontro das mutações relacionadas à doença. Este recurso será especialmente útil nos casos em que a ultraestrutura se manifesta como normal, mas acompanhada de uma alteração da frequência de batimento ciliar e/ou alteração do padrão de onda.

O desenvolvimento de sistemas de mensuração de ângulos do movimento ciliar poderá transformar a avaliação dos padrões de onda em uma avaliação objetiva.

No Brasil, onde o estudo da discinesia ciliar primária ainda é inicial, os estudos de prevalência ainda dependem do desenvolvimento de equipados centros de referência para tal tipo de investigação. Contudo, uma caracterização dos pacientes com discinesia ciliar primária do País, nas diferentes etnias, contribuiria muito para um maior conhecimento nacional da doença.

Estudos de coorte da função pulmonar relacionados com a adesão ao tratamento, e ensaios terapêuticos que descrevam melhoras do *clearance* mucociliar, ainda apresentam poucas respostas na literatura médica, juntamente com os procedimentos otorrinolaringológicos, que carecem de maiores estudos para produzirem consensos.

8 CONCLUSÕES

- Foi padronizada a técnica do escovado nasal para avaliação da ultraestrutura ciliar.
- Foram estabelecidos critérios de uniformidade quanto à análise dos defeitos ultraestruturais ciliares, baseados em experiência internacional.
- Foi desenvolvido um novo método de medição da frequência de batimento ciliar baseado em metodologia de análise espectral e vídeos de alta velocidade.
- Os pacientes diagnosticados com discinesia ciliar primária foram caracterizados, sendo a maioria: da etnia branca, de pais consanguíneos, com predomínio dos defeitos de espículas radiadas e braços internos de dineína, situs inversus, e distúrbio ventilatório obstrutivo. Problemas otorrinolaringológicos foram encontrados em metade dos pacientes.

9 ANEXOS

9.1 Autorização do Comitê de Ética

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.08.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **518/04**, intitulado: "Avaliação da Ultraestrutura e do Movimento Ciliar em crianças com Pneumopatias Crônicas e de Repetição sem Diagnóstico Definido" apresentado pelo Departamento de PEDIATRIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Joaquim Carlos Rodrigues**

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Mary Anne Kowal Olm**

CAPPesq, 26 de Agosto de 2004.

PROF. DR. CLÁUDIO LEONE
Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

9.2 Termo de consentimento para participação em pesquisa

TÍTULO: “Avaliação da ultraestrutura e do movimento ciliar de crianças com pneumopatias crônicas e de repetição sem diagnóstico definido.”

A que se refere: Estudo da prevalência da discinesia ciliar e estudo da frequência de batimento do cílio respiratório.

Você está convidado a participar de um estudo de pesquisa em seres humanos. Para que possa decidir se seu filho deve participar, você precisa conhecer os riscos e os benefícios envolvidos. Este processo é conhecido como consentimento informado. Favor avaliar cuidadosamente antes de tomar uma decisão.

Este formulário de consentimento contém informação detalhada sobre o estudo da pesquisa clínica que o médico ou a equipe do estudo irá discutir com você e seu filho. Como seu filho é menor de idade, você estará assinando e agindo inteiramente em nome dele. Uma vez compreendido o procedimento do estudo, você será solicitado a assinar este formulário, caso concorde com a participação de seu filho. Você receberá, também, uma cópia assinada deste formulário para manter em seus registros.

Favor ler cuidadosamente este formulário de consentimento. Não hesite em fazer perguntas sobre quaisquer das informações nele contidas ou sobre as que gostaria de ter mais detalhes. A expressão “seu filho” deve ser interpretada como referente ao paciente e não aos pais ou guardiões legais que estão assinando o formulário e dando o consentimento pelo paciente.

Por que este estudo está sendo realizado?

A discinesia ciliar é uma doença não muito frequente que acomete a proteção interna da via respiratória, chamada epitélio respiratório. O epitélio respiratório é coberto por estruturas pequenas denominadas cílios respiratórios. Se os mesmos se encontram alterados por algum defeito presente ao nascimento ou adquirido, os cílios não estarão exercendo muito bem sua função que é a de movimentação do catarro do pulmão para fora da árvore respiratória. O acúmulo desse muco com substâncias nocivas pode predispor a infecções respiratórias. A repetição dos processos infecciosos em razão desse problema pode causar consequências sérias ao pulmão. Portanto, é muito importante realizar o diagnóstico preciso dessa doença nos casos suspeitos.

Quem deve participar do estudo?

Devem participar do estudo todos os pacientes (ou crianças) que apresentarem sintomas que sugiram algum comprometimento dos cílios que revestem o epitélio respiratório, ou seja, pacientes que tenham as seguintes características:

- a) Infecções de ouvidos e seios da face (sinusites) de repetição e/ou
- b) Infecções respiratórias de repetição, cuja causa não esteja ainda esclarecida ou
- c) Crianças que tenham uma alteração já ao nascimento caracterizada por “coração do lado direito”, que costuma estar associado a essa doença ou
- d) Pacientes que possuem asma brônquica grave de difícil controle, fazendo o uso adequado de tratamento e sem melhora.

Não deverão participar do estudo todos os pacientes que apresentarem doença já diagnosticada para os sintomas acima.

O que serei solicitado a fazer? Quais são as minhas obrigações?

Para o perfeito diagnóstico da discinesia ciliar serão necessárias algumas investigações para afastar outras doenças. Algumas delas já terão sido feitas e constarão no prontuário, pois são exames que fazem parte da investigação de crianças com infecções respiratórias repetidas. Algumas crianças não têm essa investigação completa e necessitarão fazer alguns exames de sangue, caso não tenham sido realizados (Hemograma e exames de avaliação da função imunológica).

A seguir, serão efetuados os seguintes exames:

- 1) Teste da Sacarina: Consiste na colocação de um diminuto grão de açúcar dentro do nariz. É um exame que reflete a velocidade do muco que está dentro das vias respiratórias. Após alguns minutos, o paciente deverá sentir um gosto adocicado na boca que representa o transporte do grão de açúcar pelo muco. É medido, então, o tempo entre a colocação do grão de açúcar no nariz e o gosto de açúcar na boca. Se o paciente apresentar discinesia ciliar, o exame poderá estar alterado. O procedimento não apresenta efeitos colaterais nem riscos à saúde.
- 2) Análise de material da mucosa brônquica: É um exame que será indicado **apenas** aos pacientes que apresentarem sinais nos exames radiológicos de alterações muito localizadas que sugiram doença específica daquela parte do pulmão e que ainda **não** tenham realizado um exame de investigação chamado broncoscopia, pelo meio do qual o material de análise será coletado. O paciente será sedado e monitorizado durante sua realização. A broncoscopia é um exame rotineiro nos serviços de investigação de doenças respiratórias e que não costuma causar nenhuma complicação, mesmo quando retira uma quantidade muito pequena de epitélio da traqueia, que será encaminhada para biópsia. Caso seja indicada a broncoscopia, a sua não realização poderá resultar no atraso ou não diagnóstico de doenças importantes, que podem se comportar de modo parecido com a discinesia ciliar. O material coletado da traqueia será

comparado com os outros estudos do trabalho. Este procedimento não costuma causar complicações. Em casos raros, talvez um pouco de sangramento local que logo será tratado pelo médico assistente sem maiores problemas.

- 3) Prova de Função Pulmonar com Pletismografia: Será indicada apenas para os pacientes acima de cinco anos de idade ou que tenham condições de soprar, pois é avaliada a quantidade de ar que o paciente consegue exalar durante um esforço expiratório máximo.
- 4) Avaliação dos ouvidos, nariz e garganta: Como a discinesia ciliar pode causar infecções de ouvidos de repetição, todos os pacientes passarão por avaliação específica para ouvidos, nariz e garganta. Os pacientes que apresentarem alterações específicas nasais (como pólipos), hipertrofia de adenóide ou sinusite, precisarão fazer um exame mais específico chamado Nasofibroscopia. O exame de Nasofibroscopia será realizado por médicos especializados em ouvidos, nariz e garganta, apenas para os pacientes que apresentarem as alterações acima. Para esse exame, por meio de um aparelho especial é feita uma avaliação específica da anatomia da região a ser estudada. Não apresenta riscos, além de um leve desconforto na região estudada.
- 5) Teste do Escovado Nasal: Trata-se de exame muito importante do estudo, pois por meio dele será retirada uma pequena amostra do epitélio respiratório nasal por uma escova especial. O material será encaminhado para avaliação da estrutura do cílio respiratório. Caso este esteja alterado, teremos o diagnóstico de discinesia ciliar. A obtenção da amostra é feita com o paciente sentado ou seguro no colo da mãe. O médico fará movimentos circulares com uma escova dentro do nariz do paciente para captura de material do epitélio respiratório. O procedimento pode causar um certo desconforto. Se a criança mostrar-se muito agitada, poderá ocorrer algum sangramento local que logo cessará. Não poderão ser usados anestésicos, pois eles poderão comprometer o resultado do exame. Existe, portanto, o risco mínimo de o nariz sangrar. Caso isto ocorra, será feito um tamponamento local com medicamento até o sangramento parar. O paciente só será liberado se estiver sem sangramento. O procedimento só será realizado em local com recursos disponíveis. O benefício de tal procedimento supera em muito os riscos de qualquer complicação.
- 6) Biópsia nasal: este exame será recomendado **apenas** aos pacientes cuja técnica do escovado nasal não foi suficiente para a confirmação do diagnóstico de discinesia ciliar. Tal procedimento será feito sob leve sedação. Apresenta um risco mínimo de sangramento. A sua realização esclarecerá com certeza, a presença de discinesia ciliar. Lembramos que sua realização nem sempre será necessária.

Por quanto tempo meu filho participará do estudo?

Até que toda a investigação acima esteja concluída.

Quantas pessoas estarão participando do estudo?

Todos os pacientes que apresentarem características clínicas da doença serão encaminhados para avaliação no intervalo de até 18 meses. Acreditamos que deverão ser avaliados cerca de 50 pacientes.

Que benefícios posso esperar?

O diagnóstico correto e precoce da doença possibilitará o tratamento adequado e a prevenção de seqüelas graves para o aparelho respiratório.

Quem terá acesso aos registros clínicos de meu filho e estará ciente de sua participação no estudo?

Se você permitir a participação de seu filho neste estudo, seu nome e o de seu filho serão mantidos em sigilo. A menos que exigido por lei, apenas o médico e a equipe do estudo, os comitês independentes de ética, e os inspetores dos órgãos reguladores governamentais terão acesso direto aos registros clínicos de seu filho para verificar a informação relativa ao estudo.

Qualquer publicação dos resultados desse estudo não identificará você ou seu filho pelo nome.**Serei informado (a) se for descoberta, durante o estudo, alguma informação significativa?**

Você será informado sobre qualquer nova informação significativa a respeito do diagnóstico ou que possa afetar sua disposição em permitir a permanência de seu filho no estudo.

Quem devo contatar em caso de dúvida?

Para dúvidas em relação ao estudo, favor contatar a médica pesquisadora:

Mary Anne Kowal Olm

Fone (cel): 011- 8203-0543

(res): 011-5686-5121.

Posso me recusar a participar do estudo ou posso solicitar a saída do meu filho do estudo a qualquer momento?

Neste estudo, a participação de seu filho é voluntária. Você (os pais ou guardiões legais) pode optar por não permitir a participação de seu filho no estudo ou seu filho pode descontinuar em qualquer período. Você e seu filho não perderão os benefícios aos quais teriam direito de outra forma. Seu filho não será impedido de participar de estudos futuros.

Você irá receber uma cópia assinada do consentimento informado.

Eu li e compreendi este formulário de consentimento informado. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Eu consinto, voluntariamente, que meu filho participe do estudo. Declaro que toda a informação que fornecerei sobre o histórico clínico de meu filho é verdadeira e correta. Entendo que a não

informação ao investigador sobre qualquer dado solicitado, poderá prejudicar meu filho.

Nome do paciente	Data
------------------	------

Assinatura dos pais / Guardião legal	Data
--------------------------------------	------

Assinatura da pessoa que revisou o consentimento informado	Data
---	------

9.3 Protocolo de Pesquisa

DISCINESIA CILIAR UNIDADE DE PNEUMOLOGIA PEDIÁTRICA- INSTITUTO DA CRIANÇA – FMUSP.

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:

RG:

Idade:

Nº Paciente:

Sexo:

Data de Nascimento:

Consanguinidade: ☐ SIM ☐ NÃO

Grau de Parentesco:

Fone de contato:

Data da avaliação:

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES:

- ☐ Bronquiectasia de causa desconhecida
- ☐ Doença de VAS com sintomatologia
 - OMA recorrente (> ou igual a 3 episódios em 6 meses ou > ou igual a 4 em 12 meses)
 - OMC (processo inflamatório crônico da OM com perfuração da MT)
 - Sinusopatia crônica (> 12 semanas de doença)
- ☐ Infecção pulmonar de repetição (BCP de repetição: > ou igual a 3 episódios por ano)
- ☐ Dextrocardia / *Situs inversus* (acompanhado de sintomas em VAS e VAI)
- ☐ Asma de difícil controle (paciente com persistência de sintomatologia em terapêutica máxima: maior ou igual a 800 mcg de budesonida ou equivalente e uso regular de broncodilatador longa duração, e necessitando de broncodilatador de alívio maior ou igual a três vezes por semana por um período mínimo de seis a doze meses, aderente ao tratamento e sem melhora clínica e/ou funcional).

2. RESULTADOS DOS EXAMES REALIZADOS PREVIAMENTE

Os dados seguintes (a, b, c, d) serão coletados do prontuário (se realizados previamente, ou completados).

a) Exclusão de Fibrose Cística:

VALORES DE CLORO NO SUOR

DATA	VALOR

b) Estudo Imunológico:

1. HEMOGRAMAS (em número de três, em datas diferentes, com intervalo maior ou igual a uma semana.)

Data	Hb	Ht	leucócitos	neutrófilo	linfócito	eosinófilo	basófilo	monócito	plaquetas
-	-	-	N %	N %	N %	N %	N %	N %	N

2. DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS:

DATA:

IgA = IgG = IgM = IgE=

3. Dosagem de subclasses, linfócitos T e B

4. PPD: dado disponível do último ano.

PPD:	
DATA	VALOR

c) Avaliação de Déficit de α_1 AT :

DATA	VALOR

d) Outros Exames realizados:

☐ EED (data:). Resultado:

☐ Cintilografia com Tc.(data :). Resultado:

☐ Broncoscopia (data:). Resultado:

☐ Ph-metria.(data:). Resultado:

3. RESULTADOS DOS EXAMES DA PESQUISA

a) Teste da Sacarina:

DATA	TEMPO

b) PFP:

Pletismografia: (data:).

PFP: Distúrbio Ventilatório:

CVF		VEF1	
litros	%	litros	%

c) CT Tórax: (data:).

Escore de Bhalla

d) CT seios da face : (data:)

e) Broncoscopia:

Data e descrição (dos casos realizados):

f) Escovado Nasal: (data:)

1. Frequência do batimento ciliar (Unidade de Pol. Atm.):

2. Descrição e data do escovado (cópia anexa do Lab. Patol.).

9.4 Técnica do escovado nasal para a coleta de células ciliadas

O Teste do Escovado Nasal baseia-se na retirada de cílios do epitélio respiratório das fossas nasais. Será utilizada uma escova nasal da marca “OLYMPUS” – Disposable Cytology Brush de número BC-202D-3010. O procedimento será realizado segundo a técnica utilizada pelo Serviço de Pneumologia Pediátrica do Hospital Royal Brompton.

Explicar ao paciente as razões para a necessidade do teste. O procedimento não deve ser realizado se o paciente apresentou infecção de vias aéreas superiores nas últimas duas semanas.

Colocar o paciente deitado ou sentado confortavelmente com a cabeça inclinada para trás. Crianças mais novas deverão ser amparadas e seguras pelas mães.

Lavar as mãos. Molhar a escova citológica no meio de transporte e, em seguida, inseri-la na cavidade nasal até os cornetos. Realizar, então, movimento para frente e para trás (de 0,5 a 1 cm) cerca de 3 a 4 vezes para remoção de algumas faixas de epitélio ciliado, entre o septo transversal e o corneto inferior. Se a criança permitir, um auriscópio poderá ser usado para visualizar o corneto inferior, o que poderá mostrar a área exata para a realização do escovado.

O material poderá ser dividido em duas partes para as seguintes análises: avaliação da frequência de batimento ciliar e material a ser enviado para a microscopia eletrônica. O primeiro obedece à padronização do método anteriormente descrito, e o restante do material poderá ser mergulhado em um ependorf com glutaraldeído pela metade, e ser encaminhado à microscopia eletrônica.

No processamento eletrônico, são necessárias rotações muito baixas (8000 rotações por minuto) para a formação do pellet.

A seguinte orientação é necessária para os cortes dos blocos de resina:

- cortes de espessura de 70-90 nm;
- sem película de formvar.

Microscopia eletrônica: Para as fotos longitudinais dos cílios, o aumento será de 12.000 vezes. Para os cortes transversais, o aumento será de 30.000 vezes.

9.5 Protocolo de radiação para realização de tomografias

Protocolo de radiação para a realização de tomografias de seios da face e tórax em crianças (ICr-HC-FMUSP).

Seios da face:

Peso	KV	MA
< 25	80	60
25-50	100	60
>50	120	60

Tórax:

Idade	KV	MA
1-3 anos	100	50
3-6 anos	100	60
7-14 anos	120	60
>15 anos	120	80

9.6 Escores de Bhalla e de Lund-Mackay

Escore de Bhalla ¹⁵⁵ para avaliação de bronquiectasias.

Categoria	0	1	2	3
Gravidade da bronquiectasia	ausente	Leve (luz sutilmente > que vaso adjacente)	Moderado (luz 2 a 3 X> que vaso adjacente)	Grave (luz 3X> que vaso adjacente)
Espessamento brônquico	ausente	Leve (espessamento da parede igual a vaso)	Moderado (espessamento < ou igual a 2X vaso adjacente)	Grave (espessamento >2X vaso adjacente)
Extensão da bronquiectasia (nº segmentos broncopulmonares)	ausente	1 a 5	6 a 9	>9
Extensão de rolas de muco (nº segmentos broncopulmonares)	ausente	1 a 5	6 a 9	>9
Abscessos ou saculações (nº segmentos broncopulmonares)	ausente	1 a 5	6 a 9	>9
Ramificações da árvore brônquica envolvida	ausente	Até a quarta geração	Até a quinta geração	Até a sexta geração
Número de bolhas	ausente	Unilateral (não >4)	Bilateral (não >4)	>4
Enfisema (nº .segmentos)	ausente	1 a 5	>5	-
Colapso/Consolidação	ausente	Subsegmentar	Segmentar/lobar	-

Escore de Lund-Mackay ¹³¹ para avaliação dos seios da face

Escore de Lund-MacKay			
Seio da face	Esquerdo	Direito	TOTAL
Maxilar			
Etmoidal Anterior			
Etmoidal Posterior			
Esfenoidal			
Frontal			
Complexo ostiomeatal			
TOTAL			

Para todos os seios da face: 0 = sem anormalidades; 1 = opacificação parcial;
2 = opacificação total. Para o complexo óstiomeatal: 0 = não ocluído; 2 = ocluído.

9.7 Contagem e descrição dos defeitos ciliares – Royal Brompton

Contagem e descrição de defeitos ciliares, segundo o padrão estabelecido pelo Hospital Royal Brompton, Londres, Reino Unido.

Royal Brompton & Harefield **NHS**
NHS Trust

Royal Brompton Hospital
Sydney Street
London
SW3 6NP

CILIA ELECTRON MICROSCOPY RESULTS

Name	Hospital number.	EM code	Sample date:
Project	DOB	Sample from:	Date reported:
Sao Paulo University		Mary Anne Olm	14/1/2009

OUTER MICROTUBULES				CENTRAL PAIRS				
NORMAL	DISARRANG	EXTRA TUBULE	SINGLE TUBULE	OTHER DEFECT	ONE OF PAIR MISSING	BOTH OF PA MISSING	COMPOUND	TOTAL CILIA
90	0	9	0	0	0	1	0	100
89	0	10	1	0	0	0	0	100
91	2	7	0	0	0	0	0	100
270	2	26	1	0	0	1	0	300

NUMBER OF CILIA WITH:				
Both arms	Outer arms only	Inner arms only	No arms	Total cilia
7	0	42	0	49
7	0	36	0	43
12	0	44	0	56
26	0	122	0	148

Total NORMAL:	26	Total DEFECTS:	122
---------------	----	----------------	-----

COMMENTS:

The dynein arms were hard to see with the EM as they appeared faint
A lot of cilia appeared to have missing outer arms
Lots of cross sections were clumped together in an unusual fashion (possibly caused by high speed centrifugation)
A large number of cilia had multiple extra tubules

Good sample, with plenty of ciliated epithelium. Findings consistent with an outer arm defect

Please see photographs.

Any queries contact Amelia Shoemark or Tom Burgoyne Tel: 020 7351 8428

BACKGROUND - UK Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) Service

The UK PCD service was designated and commissioned by the National Commissioning Group (NCG) of the Department of Health in 2006 to provide a diagnostic service to England.

There are three designated centres:

- London – Royal Brompton Hospital
- Leicester – Leicester Royal Infirmary
- Southampton – Southampton General Hospital

Introduction:

For diagnosis of PCD by transmission electron microscopy (TEM) the structural detail of cilia is best seen in transverse section. However, it is difficult to obtain perfect transverse sections which means that a diagnosis can sometimes be based on the ultrastructure of as few as five cilia. We have consequently adopted a counting procedure where we score 300 cilia giving a more robust result [1]. This system has the additional benefits of being able to objectively compare results between observers and different PCD centres and hence begin to build up a picture of the overall frequency of ciliary defects (Fig1) in various types of PCD.

Fig 1: Examples of microtubule and dynein arm defects

Method:

· Ciliated cells are obtained by nasal brushing from the inferior turbinate and the ciliary beat frequency (CBF) is measured. Only biopsies with a CBF outside the normal range (11- 18Hz) are examined using TEM.

· Cells are pelleted, processed and embedded using standard methods [2]

· 90nm sections are cut, stained and viewed.

· Counts are made methodically working through the grid square by square. Where the microtubule arrangement can be seen the cilia are counted and classified. This corresponds to the first section of the counting sheet – Fig 2.

· Where high quality cross sections are identified these are assessed for the presence of dynein arms. If a single pair of arms is visible then dynein arms are counted as present on the cross section. Similarly, if one outer arm is seen then the cilium is counted in the outer arms present section. We can plot the results of the ciliary counts – see graphs (Fig 3).

Name	Patient A			Hospital No.	3732746		Counted by	Patricia Goggin	
DOB	09/11/1993			Sample from			Reported by		
EM/HS Numbers	315-07 07HS24462L			Sample date	6.11.07		Report date		
ELECTRON MICROSCOPY OF NASAL BRUSHING FOR PCD DIAGNOSIS (ver2)									
OUTER MICROTUBULES						CENTRAL PAIRS			
Grid	Normal	Disarranged	Extra tubule	Single tubule	Other defects	One of pair missing	Both missing	Compound	Total
A	75	7	2	0	1	0	4	11	100
D	86	4	2	0	0	0	6	2	100
D	96	2	4	0	0	0	0	0	102
Total	257	13	8	0	1	0	10	13	302
%	85%	4%	3%	0%	0%	0%	3%	4%	
Total NORMAL:		257	Total DEFECTS:		45	% DEFECTS:		15%	
Grid	No arms missing	Inner arms missing	Outer arms missing	Both arms missing	Total				
A	9	4	1	21	35				
D	0	3	0	41	44				
D	1	5	0	49	55				
Total	10	12	1	111	134				
O.A.D.:		84%	I.A.D.:		92%	NORMAL:		7%	

Fig2: Counting sheet used for recording ciliary defects showing results for a patient with IAD and OAD.

LIMITATIONS

- Large healthy sample needed
- PCD with normal ultrastructure not detected
- Inflammation or infection can increase number of secondaries

Results and Discussion:

The graphs (Fig 3) show results for 124 PCD patients and 482 patients without PCD referred to two of our clinics (London and Southampton) over a period of twenty years. We have related the number of defects in the biopsies to the PCD phenotype. An expected 'range' of defects for particular phenotypes of PCD can be predicted. For example, we predict that patients with a radial spoke defect will display > 60% of cilia with disarranged microtubules.

Interesting differences in the ranges of defects in 'normal' patients may be explained by

- Population difference between geographical centres
- Observer variation
- Differences in diagnostic criteria

Further analysis as more data are collected should allow us to distinguish which of these factors is most influential.

Regular count comparisons form a quality control system which allows us to maintain reproducibility and minimise observer variation.

Fig 3: Graphs showing % dynein arm defects in PCD and non-PCD patients at the Southampton and London clinics.

References:

1. Primary ciliary dyskinesia: cytological and clinical features. Greenstone M, Rutman A, Dewar A, Mackay I, Cole PJ. Q J Med. 1988 May; 67(253):405-23.
2. Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P. J Clin Pathol. 1982 Mar; 35(3):357-9.

9.9 DVD do movimento ciliar

Foram separados nove filmes de movimento ciliar. Os filmes estão organizados no DVD com a abreviação dos nomes dos pacientes, código de registro, e lente de aumento (630 ou 1000X). O DVD deve ser aberto em computadores com memória RAM de pelo menos 2 GBytes. Utilizar o menu disponível no DVD. A imagem de fundo do menu do DVD corresponde a movimento de campos de trigo com o vento.

Lista de filmes

Grupo Controle:

- LP- 26/03/08- filme ref. 112637-lente 1000X.
- RS- 03/03/08- filme ref. 161916- lente 1000X.
- RS- 03/03/08- filme ref. 162120-lente 1000X.

Grupo da ultraestrutura normal:

- SPS - 21/12/07- filme ref. 154759- lente 1000X.

Defeitos ciliares:

- DS- 07/12/07- filme ref. 105200- lente 1000X - defeito das espículas radiadas e braços internos (redução da amplitude do movimento).
- LFFS- 20/08/08- filme ref. 085014-lente 1000X - defeito nos braços externos de dineína (pequeno movimento, quase estático).
- ESR- 10/11/08-filme ref. 105133-lente 1000X - defeito de transposição (movimento circular).
- ALP- 13/03/09- filme ref. 105133-lente 1000X - defeito de transposição (movimento circular).
- VNS- 13/04/09- filme ref. 092447- lente 630X - defeito de transposição (movimento circular).

10 REFERÊNCIAS

- (1) Noone PG. Meeting report: Primary ciliary dyskinesia: a report from ATS 2001. *Respiratory Research*. 2001; 2:E 001.
- (2) Le Mauviel. Primary ciliary dyskinesia. *West J Med*. 1991; 155:280-283.
- (3) Jorissen M. Correlations among mucociliary transport, ciliary function, and ciliary structure. *American Journal of Rhinology*. 1998; 12:53-58.
- (4) Willems T, Jorissen M. Correlations between ciliary structure and ciliary function. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 2000; 54:299-308.
- (5) Sleight MA. Primary ciliary dyskinesia. *Lancet*. 1981; 2(8244):476.
- (6) Bush A, Cole P, Hariri M, Mackay I, Philips G, O'Callaghan C et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *Eur Respir J*. 1998; 12(4):982-988.
- (7) Meeks M, Bush A. Primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 2000; 29:307-316.
- (8) Houtmeyers E, Gosslink R, Decromer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J*. 1999; 13:1177-1188.
- (9) Van de Baan B. Ciliary function. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 2000; 54:293-298.
- (10) Silveira JC, Abreu WM. Síndrome dos cílios imóveis. *VERJ*. 1986; 5(1):49-55.
- (11) Carson JL, Collier AM. Ciliary defects: cell biology and clinical perspectives. *Adv Pediatr*. 1988; 35:139-166.
- (12) Cowan MJ, Gladwin MT, Shelhamer JH. Disorders of ciliary motility. *Am J Med Sci*. 2001; 321(1):3-10.
- (13) Leigh MW, Pittman J, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD et al. Clinical and genetics aspects of primary ciliary dyskinesia / Kartagener syndrome. *Genet Med*. 2009; 11(7):473-487.
- (14) Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(11):880-93. Review.
- (15) Davenport JR, Yoder BK. An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 289:F1159-F1169.

- (16) Brueckner M. Heterotaxia, congenital heart disease, and primary ciliary dyskinesia. *Circulation*. 2007; 115(22):2793-5.
- (17) Storm GK, Omran H. Primary ciliary dyskinesia: clinical presentation, diagnosis and genetics. *Annals of Medicine*. 2005; 37:439-449.
- (18) Eley L, Yates LM, Goodship JA. Cilia and disease. *Current Opinion in Genetics&Development*. 2005; 15:303-314.
- (19) Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux AM, Cacheux V, Roger G et al. Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Human Genet*. 1999; 65:1508-1519.
- (20) Pennarun G, Bridoux AM, Escudier E, Dastot-Le MF, Cacheux V, Amselem S et al. Isolation and expression of the human hPF20 gene orthologous to *Chlamydomonas* pf20. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2002; 26:362-370.
- (21) Gardiner RM, Probst D, Guerne PA, Delozier-Blanchet CD, Antonarakis SE. Primary ciliary dyskinesia: a genome-wide linkage analysis reveals extensive locus heterogeneity. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8:109-118.
- (22) Blouin JL, Meeks M, Radhakrishna U, Sainsbury A, Gehring C, Sail GD et al. Primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 2000; 54:317-324.
- (23) Pennarun G, Chapelin C, Escudier E, Bridoux AM, Dastot F, Cacheux V et al. The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *J Human Genet*. 2000; 107:642-649.
- (24) Guichard C, Lafitte JJ, Godard P, Tack V, Lalau G, Bouvagnet P. Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in situs inversus and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am J Human Genet*. 2001; 68:1030-1035.
- (25) Leigh MW, Maimoona AZ, Knowles MR. Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach. *Current Opinion in Pediatrics*. 2009; 21:000.
- (26) Escudier E, Dusquenoy P, Papon JF, Amselem S. Ciliary defects and genetic of primary ciliary dyskinesia. *Paediatr Respir Rev*. 2009; 10:51-54.
- (27) Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S et al. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet*. 2006; 43:326-333.

- (28) Grenstone AR, Dewar AR, Mackay I, Cole PJ. Primary ciliary dyskinesia: citological and clinical features. *Q J Med.* 1988; 67(253):405-430.
- (29) Ballenger JJ. Acquired ultrastructural alterations of respiratory cilia and clinical disease. A review. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988; 97(3 Pt 1):253-258.
- (30) Sturgess JM, Chao J, Wong J, Aspin N, Turner JA. Cilia with defective radial spokes. *N Engl J Med.* 1979; 300:53-56.
- (31) Barlocco EG, Valetta EA, Canciani M, Lungarella G, Gardi C, De Santi M et al. Ultrastructural ciliary defects in children with recurrent infections of the lower respiratory tract. *Pediatr Pulmonol.* 1991; 10:11-17.
- (32) Niggemann B, Muller A, Nolte A, Schnoy N, Wahn U. Abnormal lenght of cilia--a cause of primary ciliary dyskinesia--a case report. *Eur J Pediatr.* 1992; 151(1):73-75.
- (33) longh RU, Rutland J. Ciliary defects in healthy sublechts, bronchiectasis and primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151(5):1559-1567.
- (34) Afzelius BA. Ciliary structure in health and disease. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54(3):287-291.
- (35) Cole P. Pathofisiology and treatment of airway mucociliary clearance. *Minerva Anesthesiol.* 2001; 67(4):206-209.
- (36) Carlén B, Lindberg S, Stenram U. Absence of nexin links as a possible cause of primary ciliary dyskinesia. *Ultrastruct Pathol.* 2003; 27:123-126.
- (37) Bush A. Primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54(3):317-24. Review.
- (38) Felix H, Holzmann D. Function and ultrastructure of cilia in primary ciliary dyskinesia. *Schweiz Med Wochenschr.* 2000; 130(19):699-704.
- (39) Jorissen M, Willems T, Verbeken E, De Boek K. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54:343-356.
- (40) Rutman A, Cullinan P, Woodhead M, Cole PJ, Wilson R. Ciliary disorientation: a possible variant of primary ciliary dyskinesia. *Thorax.* 1993; 48(7):770-771.
- (41) Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Cole PJ, Wilson R. Ciliary disorientation alone as a cause of primary ciliary dyskinesia syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153(3):1123-1129.

- (42) Longh RU, Rutland J. Random ciliary orientation. *N Engl J Med.* 1990; 323(24):1681-1684.
- (43) Biggart E, Pritchard K, Wilson R, Bush A. Primary ciliary dyskinesia syndrome associated with abnormal ciliary orientation in infants. *Eur Respir J.* 2001; 17(3):444-8.
- (44) Pritchard K, Wilson R, Bush A. Primary ciliary dyskinesia syndrome associated with abnormal ciliary orientation in infants. *Eur Respir J.* 2001; 17:444-448.
- (45) Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54:309-316.
- (46) Jorissen M, Bertrand B. Ciliary dyskinesia in the nose and paranasal sinuses. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 1997; 51:353-366.
- (47) Rossman CM, Newhouse MT. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management. *Pediatr Pulmonol.* 1988; 5:36-50.
- (48) Hogg C. Primary ciliary dyskinesia: when to suspect the diagnosis and how to confirm it. *Paediatr Respir Rev.* 2009; 10:44-50.
- (49) Chilvers MA, O'Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax.* 2003; 58:333-338(a).
- (50) Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112(3):518(b).
- (51) Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169:459-467.
- (52) Dudley JP, Welch MJ, Stiehm ER, Carney JM, Soderberg-Warner M. Scanning and transmission electron microscopic aspects of the nasal acilia syndrome. *Laryngoscope.* 1982; 92(3):297-9.
- (53) Bush A, O'Callaghan C. Primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child.* 2002; 87:363-365.
- (54) Ingels KJ, Kortman MJ, Nijziel MR, Graamans K, Huizing EH. Factors influencing ciliary beat measurements. *Rhinology.* 1991; 29(1):17-26.
- (55) Roth Y, Aharonson EF, Teichtahl H, Baum GL, Priel Z, Modan M. Human in vitro nasal and tracheal ciliary beat frequencies: comparison of sampling sites, combined effect of medication, and demographic relationships. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1991; 100(5 Pt 1):378-384.

- (56) Rossman CM, Lee RM, Forrest JB, Newhouse MT. Nasal ciliary ultrastructure and function in patients with primary ciliary dyskinesia compared with that in normal subjects and in subjects with various respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129(1):161-167.
- (57) Chilvers MA, McKan M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. The effect of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J.* 2001; 18:965-970.
- (58) Pifferi M, Cangioti AM, Ragazzo V, Baldini V, Cinti S, Boner AL. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis in children with inconclusive ultrastructural evaluation. *Pediatr Allergy Immunol.* 2001; 12:274-282.
- (59) Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol.* 2000; 120(2):291-295.
- (60) Chilvers M, O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax.* 2000; 55(4):314-317.
- (61) Sisson JH, Stoner JA, Ammons BA, Wyatts TA. All digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *Journal of Microscopy.* 2003; 211((Pt 2 august)):103-111.
- (62) Turner JA, Corkey CW, Lee JY, Levison H, Sturgess J. Clinical expression of immotile cilia syndrome. *Pediatrics.* 1981; 67(6):805-810.
- (63) Buchdahl RM, Reiser J, Ingram D, Rutman A, Cole PJ, Warner JO. Ciliary abnormalities in respiratory diseases. *Arch Dis Child.* 1988; 63:238-243.
- (64) Holzmann D, Felix H. Neonatal respiratory distress syndrome - a sign of primary ciliary dyskinesia. *Eur J Pediatr.* 2000; 159:857-860.
- (65) Toledo MF, Adde FV. Discinesia ciliar primária na infância. *J Pediatr (Rio J).* 2000; 76(1).
- (66) Santos JWA, Waldow A, Figueiredo CVC, Kleinubing DR, Barros SS. Discinesia ciliar primária. *J Pneumol.* 2001; 27(5):262-268.
- (67) Core ME, Meeks M, Morrison I, Buchdahl RM, Bush A. Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history. *Acta Paediatr.* 2002; 91:667-669.
- (68) Chin Gy, Karas DE, Kashgarian M. Correlation of presentation and pathologic condition in primary ciliary dyskinesia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128(11):1292-1294.

- (69) Holzmann D, Ott PM, Felix H. Diagnostic approach to primary ciliary dyskinesia: a review. *Eur J Pediatr*. 2000; 159:95-98.
- (70) Gersonj-Baruch R, Gottfried E, Pery M, Sahin A, Etzioni A. Imotile cilia syndrome including polysplenia, situs inversus, and extrahepatic biliary atresia. *Am J Med Genet*. 1989; 33:390-393.
- (71) Greenstone MA, Jones RWA, Dewar A, Neville BGR, Cole PJ. Hydrocephalus and primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child*. 1984; 59:481-482.
- (72) Jabourian Z, Lublin FD, Adler A, Gonzales C, Northrup B, Zwillenberg D. Hydrocephalus in Kartagener's syndrome. *Ear Nose Throat J*. 1986; 65(10):468-472.
- (73) Engesath VG, Warner JO, Bush A. New association of primary ciliary dyskinesia syndrome. *Pediatr Pulmonol*. 1993; 16:9-12.
- (74) Afzelius BA, Eliasson R. Male and infertility problems in the immotile cilia syndrome. *Eur J Respir Dis*. 1983; 64(suppl 127):144-147.
- (75) Blyth M, Wellesley D. Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia. *J Obstet Gynaecol*. 2008; 28(3):358.
- (76) McInnes RR, Michaud JL. Development biology: frontiers for clinical genetics. *Clin Genet*. 2009; 76:137-145.
- (77) Baker K, Beales PL. Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009; 151C(4):281-295.
- (78) Adams NA, Awaiden A, Toma HS. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic Genetics*. 2007; 28:113-125.
- (79) Klysik M. Ciliary syndromes and treatment. *Pathol Res Pract*. 2008; 204:77-88.
- (80) Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL et al. Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation*. 2007; 115:2814-2821.
- (81) Afzelius BA. Human syndrome caused by immotile syndrome. *Science*. 1976; 193:317-319.
- (82) Escudier E, Escalier D, Pinchon MC, Boucherat M, Bernaudin JF, Fleury-Feith J. Dissimilar expression of axonemal anomalies in respiratory cilia and sperm flagella in infertile men. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142:674-679.

- (83) Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A et al. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*. 1994; 49(7):684-687.
- (84) Afzelius BA. Immotile cilia syndrome: past, present and prospects for future. *Thorax*. 1998; 53:894-897.
- (85) Afzelius BA. Asymmetry of cilia and mice men. *Int J Dev Biol*. 1999; 43:283-286.
- (86) Sutherland MJ, Ware SM. Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009; 151C(4):307-317.
- (87) Handelsman DJ, Conway A, Boylan LM, Turtle JR. Young's syndrome. *N Engl J Med*. 1984; 310:3-9.
- (88) Smallman LA. Primary ciliary dyskinesia and Young's syndrome. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1989; 14(3):271-278.
- (89) Longh R, Ing A, Rutland J. Mucociliary function, cilia ultrastructure, and ciliary orientation in Young's syndrome. *Thorax*. 1992; 47:184-187.
- (90) Armengot M, Juan G, Carda C, Montalt J. Young's syndrome: a further cause of chronic rhinosinusitis. *Rhinology*. 1996; 34:35-37.
- (91) Balbani APS, Maroni SAM, Butugan O, Saldiva PHN. Síndrome de Young: infecções respiratórias de repetição e azoospermia. *Rev Ass Med Bras*. 2000; 46(1):88-90.
- (92) Bonneau D, Raymond F, Kremer C, Klossek JM, Kaplan J, Patte F. Usher syndrome type I associated with bronchiectasis and immotile nasal cilia in two brothers. *J Med Genet*. 1993; 30:253-254.
- (93) Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J*. 2009; 34(6):1264-1276.
- (94) Adde FV, Rozov T. Teste da sacarina em crianças. *J Pneumol*. 1997; 23(2):66-70.
- (95) Lundberg JON. Nitric oxide in the nasal airways. *Eur Respir Rev*. 1999; 9(68):241-245.
- (96) Lefevre L, Willems T, Lindberg S, Jorissen M. Nasal nitric oxide. *Acta Otorhinolaryngol Belg*. 2000; 54:271-280.
- (97) Karadag B, James AJ, Gültekin E, Wilson NM, Bush A. Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 1999; 13(6):1402-5.

- (98) Arnal JF, Flores P, Rami J, Murris-Spin M, Bremont F, Aguilla MPI et al. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *Eur Respir J*. 1999; 13:307-312.
- (99) Narang I, Ersu R, Wilson NM, Bush A. Nitric oxide in chronic airway inflammation in children: diagnostic use and pathophysiological significance. *Thorax*. 2002; 57:586-589.
- (100) James AJ, Gultekin E, Wilson NM, Bush A. Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 1999; 13:1402-1405.
- (101) Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. ERS task force report: exhaled and nasal nitric oxide measurements recommendations. *Eur Respir J*. 1997; 10:1683-1693.
- (102) American Thoracic Society, European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(8):912-930.
- (103) De Boeck K, Proesmans M, Mortelmans L, Van Billoen B, Willems T, Jorissen M. Mucociliary transport using 99mTc-albumin colloid: a reliable screening test for primary ciliary dyskinesia. *Thorax*. 2005; 60(5):414-417.
- (104) Marthin JK, Mortensen J, Pressler T, Nielsen KG. Pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2007; 132(3):966-976.
- (105) Armengot M, Escribano A, Carda C, Basterra J. Clinical and ultrastructural correlations in nasal mucociliary function observed in children with recurrent airways infections. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1995; 32(2):143-151.
- (106) MacCormick J, Robb I, Kovesi T, Carpenter B. Optimal biopsy techniques in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J Otolaryngol*. 2002; 31(1):13-17.
- (107) Rutland J, Cole PJ. Non invasive sampling of nasal cilia for measurement of beat frequency and study of ultrastructure. *Lancet*. 1980; 2(8194):564-565.
- (108) Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P. Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *J Clin Pathol*. 1982; 35(3):357-359.
- (109) Jorissen M, Van der Schueren B, Van der Berghe H. Ciliogenesis in cultured human nasal epithelium. *ORL*. 1990; 52:368-374.

- (110) Jorissen M, Willems T, Verbeken E. Secondary ciliary dyskinesia is absent after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54:333-342.
- (111) Jorissen M, Willems T. Success rates of respiratory epithelial cell culture techniques with ciliogenesis for diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000; 54(3):357-365.
- (112) Levison H, Mindorff CM, Chao J, Turner JA, Sturgess JM, Stringer DA. Pathophysiology of the ciliary motility syndromes. *Eur J Respir Dis Suppl.* 1983; 127:102-117.
- (113) Nadel HR, Stringer DA, Levison H, Turner JA, Sturgess JM. The immotile cilia syndrome: radiological manifestations. *Radiology.* 1985; 154(3):651-655.
- (114) Campfield AT, Ford KL. Aunt Minnie's corner. Kartagener's syndrome (immotile cilia syndrome). *J Comput Assist Tomogr.* 1999; 23(4):647.
- (115) Philips GE, Thomas S, Heather S, Bush A. Airway response of children with primary ciliary dyskinesia to exercise and beta agonist challenge. *Eur Respir J.* 1998; 11(6):1389-1391.
- (116) Kohn YY, Park Y, Jeong JH, Kim CK, Min YG, Chi JG. The effect of regular salbutamol on lung function and bronchial responsiveness in patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest.* 2000; 117(2):427-433.
- (117) Pifferi M, Bush A, DiCicco M, Pradal U, Ragazzo V, Macchia P et al. Heath-related quality of life and unmet needs in patients with primary ciliary dyskinesia. *ERJ Express.* 2009; Epub ahead of print.
- (118) Ellerman A, Bisgard H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 1997; 10:2376-2379.
- (119) Hadfield PJ, Rowe-Jones JM, Bush A, Mackay IS. Treatment of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997; 22(4):302-306.
- (120) Campbell RG, Birman CS, Morgan L. Management of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia: A literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009; Epub ahead of print.
- (121) Whalley S, McManus IC. Living with primary ciliary dyskinesia: a prospective qualitative study of knowledge sharing, symptom concealment, embarrassment, mistrust, and stigma. *BMC Pulm Med.* 2006; 6(25).
- (122) McManus IC, Stubbings GF, Martin N. Stigmatization, physical illness and mental health in primary ciliary dyskinesia. *J Health Psychol.* 2006; 11(3):467-482.

- (123) Smit HJ, Schreurs AJ, Van den Bosch JM, Westermann CJ. Is resection of bronchiectasis beneficial in patients with primary ciliary dyskinesia? *Chest*. 1996; 109(6):1541-1544.
- (124) Date H, Yamasita M, Nagahiro I, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Living donor lobar lung transplantation for primary ciliary dyskinesia. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71:2008-2009.
- (125) Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. *Bioestatística*. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1980.
- (126) Boek WM, Keles N, Graamans K, Huizing EH. Physiologic and hypertonic saline solutions impair ciliary activity in vitro. *Laryngoscope*. 1999; 109(3):396-9.
- (127) Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J*. 2005; 26(5):948-968.
- (128) Morris JF, Koski A, Johnson LC. Spirometric standards for healthy nonsmoking adults. *Am Rev Respir Dis*. 1971; 103(1):57-67.
- (129) Polgar G. Pulmonary function tests in children. *J Pediatr*. 1979; 95(1):168-170.
- (130) Knudson RJ, Lebowitz MD, Holberg CJ, Burrows B. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis*. 1983; 127(6):725-734.
- (131) Lund V, Kennedy DW. Staging for rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997; 117:S35-S40.
- (132) Doria Filho U. *Introdução à bioestatística para simples mortais*. São Paulo: 2001.
- (133) Rodrigues JC, Cardieri JMA, Bussamra MHCF, Nakaie CMA, Almeida MB, Silva Filho FVF. Provas de função pulmonar em crianças e adolescentes. *J Pneumol*. 2002; 28 (supl. 3):S207-21.
- (134) Carvalho BTC, Roxo Júnior P, Tavares FS. Quando pensar em imunodeficiência primária. *Sociedade Brasileira de Pediatria*. 2008.
- (135) Roxo Júnior P. Imunodeficiências primárias: aspectos relevantes para o pneumologista. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(10):1008-1017.
- (136) Welch JE, Hogan MB, Wilson NW. Ten-year experience using a plastic, disposable curette for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004; 93(2):189-192.
- (137) Caruso G, Gelardi M, Passali GC, Santi MM. Nasal scraping in diagnosis of ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol*. 2007; 21(6):702-705.

- (138) Stannard WA, Chilvers MA, Rutman AR, Williams CD, O'Callaghan C. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; Epub ahead of print.
- (139) van der Baan S, Veerman AJ, Bezemer PD, Feenstra L. Primary ciliary dyskinesia: quantitative investigation of the ciliary ultrastructure with statistical analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1987; 93(3 Pt 1):264-72.
- (140) Barnes C. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Paediatric Nurs*. 2009; 21(7):24-27.
- (141) Plesec TP, Ruiz A, McMahon JT, Prayson RA. Ultrastructural abnormalities of respiratory cilia: a 25-year experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2008; 132(11):1786-91.
- (142) Carson JL, Hu SS, Collier AM. Computer-assisted analysis of radial symmetry in human airway epithelial cilia: assessment of congenital ciliary defects in primary ciliary dyskinesia. *Ultrastruct Pathol*. 2000; 24(3):169-74.
- (143) Carlén B, Stenram U. Primary ciliary dyskinesia: a review. *Ultrastruct Pathol*. 2005; 29(3-4):217-20.
- (144) Sirvanci S, Seda Uyan Z, Ercan F, Karadag B, Ersu R, Karakoc F et al. Quantitative analysis of ciliary ultrastructure in patients with primary ciliary dyskinesia. *Acta Histochem*. 2008; 110(1):34-41.
- (145) Bush A, Chodhari R, Collins N, Copeland F, Hall P, Harcourt J et al. Primary ciliary dyskinesia: current state of the art. *Arch Dis Child*. 2007; 92(12):1136-40.
- (146) Herzon FS, Murphy S. Normal ciliary ultrastructure in children with Kartagener's syndrome. *Ann Otol*. 1980; 89:81-83.
- (147) Armengot Carceller M, Carda Batalla C, Escribano A, Samper GJ. Study of mucociliary transport and nasal ciliary ultrastructure in patients with Kartagener's syndrome. *Arch Bronconeumol*. 2005; 41(1):11-5.
- (148) Dell SD. Primary ciliary dyskinesia: Myths and realities. *Paediatr Child Health*. 2008; 13(8):668-670.
- (149) O'Callaghan CO, Chetcuti P, Moya E. High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a british asian population. *Arch Dis Child*. 2009; Epub ahead of print.
- (150) Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, Boucherat M, Roger G, Tamalet A et al. A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2009; Epub ahead of print.

- (151) Lie H, Ferkol T. Primary ciliary dyskinesia: recent advances in pathogenesis, diagnosis and treatment. *Drugs*. 2007; 67(13):1883-92.
- (152) Jain K, Biggart E, Padley SP, Goldstraw EJ, Kidd SJ, Hogg C et al. Primary ciliary dyskinesia in the paediatric population: range and severity of radiological findings in a cohort of patients receiving tertiary care. *Clinical Radiology*. 2007; 62(10):986-993.
- (153) Kennedy MP, Leigh MW, Noone PG, Zariwala MA, Minnix SL, Knowles MR et al. High-resolution CT of patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Roentgenol*. 2007; 188:1232-1238.
- (154) Santamaria F, Montella S, Tiddens HA, Guidi G, Casotti V, Maglione M et al. Structural and functional lung disease in primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2008; 134(2):351-7.
- (155) Bhalla M, Turcios N, Aponte V, Jenkins M, Leitman BS, McCauley DI et al. Cystic fibrosis scoring system with thin-section CT. *Radiology*. 1991; 179:783-788.
- (156) Majithia A, Fong J, Hariri M, Harcourt J. Hearing outcomes in children with primary ciliary dyskinesia - a longitudinal study. *Int J Pediatr Otorhinolaringol*. 2005; 69:1061-1064.