



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado 3139 de Medicina

Departamento de Patología

Facultat de Medicina i Odontologia

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE BIOPSIAS NASALES EN PACIENTES CON DISCINESIA CILIAR PRIMARIA

Rosana Blanco Máñez

Directores

Prof. Dr. Francisco J. Vera-Sempere

Prof. Dr. Miguel Armengot Carceller

Valencia, noviembre 2022

INFORME DIRECTORES PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: **Vera-Sempere, Francisco José**, N.I.F: **22094976A**,

Departamento/Instituto: Departamento de Patología, Universitat de València;

Centro: Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Servicio de Anatomía Patológica, Facultat de Medicina i Odontologia

2.- Apellidos y nombre: **Armengot Carceller, Miguel**, N.I.F: **18910729Z**,

Departamento/Instituto: Departamento de Cirugía, Universitat de València. BMCG, CIBERES;

Centro: Facultat de Medicina i Odontologia. Hospital Universitari i Politècnic la Fe, Servicio de Otorrinolaringología

Directores de la tesis doctoral: **“CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE BIOPSIAS NASALES EN PACIENTES CON DISCINESIA CILIAR PRIMARIA”**

de Dña. **Rosana Blanco Máñez**, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina (RD99/2011)** en Medicina de la Universitat de València, emiten informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 21 septiembre 2022

Fdo.:

FRANCISCO
JOSE|VERA|
SEMPERE

Director

Firmado digitalmente por FRANCISCO JOSE|VERA|SEMPERE
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=FRANCISCO JOSE|VERA|SEMPERE,
serialNumber=22094976A,
givenName=FRANCISCO JOSE, sn=VERA
SEMPERE, ou=CIUDADANOS, o=ACCV,
c=ES
Fecha: 2022.09.21 09:06:59 +02'00'

Fdo.:

MIGUEL|
ARMENGOT
|CARCELLER

Director

Firmado digitalmente
por MIGUEL|
ARMENGOT|CARCELLER
Fecha: 2022.09.27
11:38:06 +02'00'

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**“...no hay cuestiones agotadas,
sino hombres agotados en determinada cuestión“**

—Santiago Ramón y Cajal

Fundamentos Racionales y Condiciones Técnicas de la Investigación Biológica

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Vera, por depositar su confianza en mí y permitirme hacer uso y disfrute del microscopio electrónico; su ejemplo y sus valiosos consejos me han guiado a lo largo de este trabajo y han contribuido a consolidar mi predilección por la Anatomía Patológica.

Al profesor Armengot, por introducirme en el desconocido pero apasionante mundo de esa singular organela que son los cilios; por su apoyo, por sus sabios consejos, por contar conmigo.

A los pacientes, origen y fin de este trabajo.

A mis compañeras de trabajo, por estar ahí y preguntarme de vez en cuando cómo lo llevo, por levantarme cuando me han visto caer.

A Isabel y Cristina, por estar conmigo aún sin vernos.

A Pablo, por perseverar y conseguir que navegue con él.

A mi hermano, siempre tras su estela, y a mi hermana, siempre presente.

A mis Padres, Teodoro y Adela, por ellos soy lo que soy.

Y aunque no son todos los que están, sí están todos los que son, gracias infinitas por contribuir a este sueño cumplido.

Rosana

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
BED	Brazos externos de dineína
BID	Brazos internos de dineína
CC	Complejo central
CMC	Célula multiciliada
CRN-D	Complejo regulador nexina-dineína
DCP	Discinesia ciliar primaria
DCS	Discinesia ciliar secundaria
DNAAF	del inglés <i>Dynein Axonemal Assembly Factor</i>
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
HSVA	del inglés <i>High-speed Video Microscopy Analysis</i>
ICC	Índice de clínica compatible
IF	Inmunofluorescencia
IFT	del inglés <i>Intraflagellar Transport</i>
kV	kilovoltios
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MT	Microtúbulos
NGS	del inglés <i>Next-Generation Sequencing</i>
ONn	Óxido nítrico nasal
RS	Rotura de simetría axonemal
SI	<i>Situs inversus</i>
UE	Ultraestructural

ÍNDICE DE FIGURAS

(Las micrografías del presente trabajo, incluyendo las que aparecen en la Introducción, han sido realizadas en su totalidad por la autora).

Introducción

Figura 1. Micrografía de un cilio.....	3
Figura 2. Esquema de la estructura básica de un cilio	7
Figura 3. Micrografías de secciones ciliares	9
Figura 4. Representación de las partes de un cilio y detalle de la zona de transición	10
Figura 5. Micrografías del cilio a nivel del cuerpo basal.....	11
Figura 6. Representación del sistema de transporte intraflagelar	13
Figura 7. Micrografía del epitelio respiratorio.....	18
Figura 8. Micrografía de una biopsia de epitelio nasal	19
Figura 9. Micrografías de células ciliadas	20
Figura 10. Micrografía de los microvilli.....	21
Figura 11. Detalle de la zona apical de una célula ciliada	22
Figura 12. Diagrama de un ciclo de batida ciliar normal	27
Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células epiteliales nasales ciliadas.....	29
Figura 14. Secciones ciliares de las anomalías ultraestructurales más prevalentes en la DCP	33
Figura 15. Representación esquemática del axonema ciliar con sus componentes.....	35
Figura 16. Diagrama estructural de los dobletes periféricos de MT	36
Figura 17. Micrografía de sección transversal de un cilio con el CC visible .	37
Figura 18. Representación esquemática de la unidad de repetición axonemal	39
Figura 19. Micrografías que muestran defectos de fijación en una biopsia nasal.....	41

Figura 20. Secciones ciliares de una célula ciliada.....	42
Figura 21. Micrografía de un conjunto de secciones ciliares	42
Figura 22. Grupo de secciones ciliares con desorganización de los MT	43
Figura 23. Micrografía de cilios compuestos.....	44
Figura 24. Axonema ciliar.....	44
Figura 25. Secciones transversales de la región distal del cilio.....	45
Figura 26. Panorámica de un grupo de células de un raspado nasal.....	46
Figura 27. Visualización BID en axonemas ciliares	47
Figura 28. Ejemplos de defectos ciliares secundarios.....	51
Figura 29. Ausencia total o parcial de los BED	53
Figura 30. Sección ciliar con ausencia de BID y BED.....	54
Figura 31. Secciones ciliares de pacientes con desorganización MT combinado con ausencia de BID	56
Figura 32. Defecto en los brazos radiales	58

Material y métodos

Figura 33. Visualización microscópica de la muestra.....	76
Figura 34. Imagen de la interfaz del software SAVA.....	77
Figura 35. Ultramicrotomía	80
Figura 36. Examen al microscopio óptico de los cortes semifinos.....	80
Figura 37. Microscopio electrónico de transmisión	81
Figura 38. Interfaz del software de visualización y captura de imágenes del MET	82

Resultados

Figura 39. Resultados estudio axonemas, imágenes representativas	93
Figura 40. Defectos ciliares secundarios encontrados	96
Figura 41. Defectos secundarios en MT periféricos	97
Figura 42. Características de las biopsias no viables (I).....	99

Figura 43. Características de las biopsias no viables (y II)	101
Figura 44. Imágenes representativas de axonemas ciliares con zonas electrondensas submembranosas.....	102
Figura 45. Imágenes representativas de axonemas ciliares con dobletes oscuros.....	103
Figura 46. Simetría axonemal.....	103
Figura 47. Rotura de simetría axonemal	104
Figura 48. Axonema normal vs rotura de simetría axonemal	105
Figura 49. Biopsia nasal de ultraestructura conservada	112
Figura 50. Biopsia nasal con defectos ciliares secundarios.....	113
Figura 51. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado I	114
Figura 52. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado II.....	115
Figura 53. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado II (cont).....	117
Figura 54. Daño celular grave	118
Figura 55. Sistema de membranas	121
Figura 56. Axonemas intracitoplasmáticos	122
Figura 57. Microorganismos (I).....	123
Figura 58. Microorganismos (II)	124
Figura 59. Microorganismos (y III).....	125
Figura 60. Metaplasia escamosa.....	126
Figura 61. Cilios cortos	127
Figura 62. Gránulos electrondensos en cuerpos basales.....	127
Figura 63. Hiperplasia células caliciformes	128
Figura 64. Cuerpos mielínicos o lamelares extracelulares.....	128
Figura 65. Raicillas estriadas deslocalizadas	129
Figura 66. Inclusión ciliar.....	130
Figura 67. Quiste ciliar	130
Figura 68. Cuerpos lamelares intracelulares	131

Discusión

Figura 69. Ejemplo de imágenes de secciones ciliares a distintas magnificaciones.....	147
Figura 70. Captura de pantalla del software del MET	148
Figura 71. Secciones ciliares con discontinuidad en los MT.....	151
Figura 72. Estructuras bacterianas junto a células escamosas	156
Figura 73. Interfaz de <i>ImageJ</i> para la medición de ángulos	160
Figura 74. Modelo de interacción del brazo externo de dineína de un túbulo A con el túbulo Badyacente.....	163
Figura 75. Secciones ciliares de tres pacientes con mutación en genes de factores de ensamblaje citoplásmico de dineina axonemal	167

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Tipos de cilios	6
Tabla 2. Tabla resumen de las principales ciliopatías	16
Tabla 3. Genes implicados en la DCP según localización de la proteína afectada.....	31
Tabla 4. Clasificación defectos UE según la Guía Consenso y en detalle.....	83
Tabla 5. Características clínicas de los pacientes DCP	87
Tabla 6. Resultados del estudio de movilidad ciliar	88
Tabla 7. Resultados detallados del estudio de movilidad ciliar	88
Tabla 8. Genes con variantes patológicas detectadas.....	90
Tabla 9. Estudios UE completados.....	91
Tabla 10. Clasificación defectos UE según Consenso y en detalle	92
Tabla 11. Defectos UE minoritarios	94
Tabla 12. Hallazgos comunes en las biopsias ciliares no viables.....	98
Tabla 13. Proporción de RS por paciente, y su correspondiente ausencia de BED	107
Tabla 14. Correlación rotura de simetría (RS) vs índice de clínica compatible (ICC) en pacientes no DCP con RS superior al 38%.....	108
Tabla 15. Resultados estudio UE detallado según Consenso vs rotura de simetría.....	110
Tabla 16. Biopsias nasales: hallazgos ultraestructurales específicos	120
Tabla 17. Relaciones entre genotipo y defecto UE.....	134
Tabla 18. Relaciones entre genotipo y patrón de movilidad	136
Tabla 19. Relaciones entre defecto UE y patrón de movilidad	137
Tabla 20. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron DRN	139

Tabla 21. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron bronquiectasias	140
Tabla 22. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron defectos de lateralidad.....	141
Tabla 23. Resultados estudio estadístico descriptivo respecto al defecto UE encontrado	142
Tabla 24. Sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos de la DCP..	146
Tabla 25. Resultados preliminares del estudio sobre la inclinación de los dobletes periféricos	161
Gráfica 1. Resultados estudio genético.....	89
Gráfica 2. Resultados del estudio UE.....	91
Gráfica 3. Correlación entre la ausencia de los brazos externos de dineína (aBED) y la rotura de simetría (RS).....	110

RESUMEN

El estudio para el diagnóstico de la discinesia ciliar primaria (DCP) tradicionalmente incluye, entre otras pruebas diagnósticas, la evaluación ultraestructural de los axonemas ciliares mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Sin embargo, la identificación de variantes genéticas de DCP con ultraestructura conservada o de cambios sutiles, junto con el desarrollo de nuevas modalidades de diagnóstico para la DCP que permiten la evaluación estructural de los cilios, como el análisis de inmunofluorescencia y una mayor disponibilidad de pruebas genéticas, hace que se cuestione el papel contemporáneo de la MET en el diagnóstico de la DCP. Por otra parte, los estudios de correlación fenotipo ciliar-genotipo-fenotipo clínico permiten ampliar el conocimiento de la fisiopatología de esta entidad.

El objetivo de esta tesis reside, por una parte, en poner en valor el papel de la MET como método diagnóstico de la DCP, y por otra identificar posibles asociaciones entre los defectos ultraestructurales axonemales, la movilidad ciliar y el genotipo respecto al fenotipo clínico de pacientes con DCP.

Nuestro análisis electronmicroscópico axonemal se enmarca dentro de un estudio unicéntrico, observacional, de carácter prospectivo y retrospectivo llevado a cabo sobre una serie de 117 pacientes reclutados entre 2018 y 2021, en el que la observación minuciosa ultraestructural de repetidas secciones ciliares se ha correlacionado con las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes, con los datos obtenidos en el examen de la movilidad ciliar y así mismo con los resultados del estudio genético practicado en estos mismos pacientes.

El estudio llevado a cabo nos ha proporcionado la obtención de una amplia base de datos y resultados, que en su análisis nos ha permitido identificar un nuevo defecto axonemal, presente en todos los pacientes DCP, y que previamente no aparece descrito en la literatura.

Los resultados de este estudio señalan el defecto en los brazos de dineína como la alteración axonemal más prevalente en nuestra serie de pacientes DCP, destacando el *DNAH5* como el gen más frecuentemente afectado.

Por otra parte, los estudios de correlación que llevamos a cabo confirmaron la existencia de ciertas correlaciones entre fenotipo clínico-genotipo-fenotipo ciliar, si bien otras asociaciones aún deben ser bien definidas.

El análisis ultraestructural detallado y exhaustivo que realizamos sobre las biopsias nasales resultó de gran utilidad para el reconocimiento e identificación de los cambios ciliares secundarios, alteraciones inespecíficas que suelen interferir en el correcto diagnóstico ultraestructural de esta entidad.

Por último, consideramos que la disposición modificada de los dobletes periféricos detectada mediante MET en la totalidad de pacientes DCP de nuestro estudio, y a la que denominamos “rotura de simetría axonemal”, puede aportar otro punto de vista sobre la patogénesis subyacente a esta entidad, y proponemos sea introducida como un nuevo defecto ultraestructural a considerar en el diagnóstico de la DCP.

Con todo ello, confirmamos la relevancia de la MET dentro del algoritmo diagnóstico de la DCP así como la necesidad de más estudios de correlación que permitan aumentar el conocimiento de esta entidad, y remarcamos las interesantes posibilidades que aún puede ofrecer el estudio morfológico ultraestructural de las muestras biópsicas en Patología.

ABSTRACT

The study for the diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) traditionally includes, among other diagnostic tests, ultrastructural evaluation of ciliary axonemes by transmission electron microscopy (TEM). However, the identification of genetic variants of PCD with preserved ultrastructure or subtle changes, together with the development of new diagnostic modalities for PCD that allow structural evaluation of cilia, such as immunofluorescence analysis and increased availability of genetic tests, raises questions about the contemporary role of TEM in the diagnosis of PCD. On the other hand, ciliary phenotype-genotype-clinical phenotype correlation studies allow to expand the knowledge of the pathophysiology of this entity.

The aim of this thesis is, on the one hand, to highlight the role of TEM as a diagnostic method for PCD and, on the other hand, to identify possible associations between axonemal ultrastructural defects, ciliary motility and genotype with respect to the clinical phenotype of patients with PCD.

Our axonemal electronmicroscopic analysis is part of a single-center, observational, prospective and retrospective study carried out on a series of 117 patients recruited between 2018 and 2021, in which the detailed ultrastructural observation of repeated ciliary sections has been correlated with the clinical manifestations present in the patients, with the data obtained in the examination of ciliary motility and also with the results of the genetic study performed in these same patients.

The study carried out has provided us with an extensive database and results, which in its analysis has allowed us to identify a new axonemal defect, present in all DCP patients, and which has not been previously described in the literature.

The results of this study point to the defect in the dynein arms as the most prevalent axonemal alteration in our series of PCD patients, highlighting *DNAH5* as the most frequently affected gene.

On the other hand, the correlation studies we conducted confirmed the existence of certain clinical phenotype-genotype-ciliary phenotype correlations, although other associations have yet to be well defined.

The detailed and exhaustive ultrastructural analysis we performed on nasal biopsies was very useful for the recognition and identification of secondary ciliary changes, nonspecific alterations that often interfere with the correct ultrastructural diagnosis of this entity.

Finally, we consider that the modified arrangement of the peripheral doublets detected by TEM in all the PCD patients in our study, which we call "axonemal symmetry break", may provide another point of view on the pathogenesis underlying this entity, and we propose that it would be introduced as a new ultrastructural defect to be considered in the diagnosis of SCD.

With all this, we confirm the relevance of TEM within the diagnostic algorithm of PCD as well as the need for more correlation studies to increase the knowledge of this entity, and we highlight the interesting possibilities that can still offer the ultrastructural morphological study of biopsy samples in Pathology.

Abreviaturas.....	v
Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas y gráficas.....	xii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvii

I. Introducción

1.1 Cilios	3
1.1.1 Definición	3
1.1.2 Tipos de cilios y función.....	4
1.1.3 Estructura y formación del cilio	7
1.1.4 Ciliopatías.....	14
1.2 Discinesia ciliar primaria	17
1.2.1 Concepto y fisiopatología	17
1.2.1.1 Epitelio respiratorio	16
1.2.1.2 Células ciliadas	17
1.2.1.3 Aclaramiento mucociliar	22
1.2.2 Manifestaciones clínicas.....	23
1.2.3 Métodos diagnósticos.....	25
1.2.3.1 Medición del óxido nítrico nasal exhalado	26
1.2.3.2. Análisis de la frecuencia y patrón de batida ciliar mediante videomicroscopía de alta resolución y alta velocidad.....	26
1.2.3.3 Inmunofluorescencia	28
1.2.3.4 Estudio genético	30
1.2.3.5 Estudio de la ultraestructura ciliar mediante MET	32
1.2.4 Pronóstico y tratamiento	34
1.3 Ultraestructura ciliar	35
1.3.1 Dobletes de MT periféricos y brazos de dineína	36
1.3.2 Par central y sus proyecciones: Complejo central.....	37
1.3.3 Brazos radiales.....	38
1.3.4 Complejo regulador nexina-dineína	38
1.4 Estudio de la ultraestructura ciliar	39
1.4.1 Laboratorio de microscopía electrónica	40
1.4.2 Estudio inicial de las muestras ciliares.....	41
1.4.3 Estudio de los axonemas ciliares.....	44

1.4.4 Defectos ultraestructurales secundarios	48
1.5 Defectos ultraestructurales de la DCP	52
1.5.1 Ausencia total o parcial de los BED	52
1.5.2 Ausencia combinada de BED y BID.....	54
1.5.3 Desorganización MT con ausencia de los BID.....	55
1.5.4 Desorganización MT.....	57
1.5.5 Defecto del CC	57
1.5.6 Localización errónea de los cuerpos basales con oligocilia o ausencia de cilios.....	59
1.5.7 Formas específicas de DCP con ultraestructura normal	60
II. Justificación del estudio.....	63
III. Hipótesis de trabajo y objetivos	69
IV. Material y métodos	
4.1 Diseño del estudio	73
4.2 Pacientes	74
4.2.1 Aspectos éticos	74
4.2.2 Recogida de datos clínicos	74
4.3 Análisis de la movilidad ciliar mediante videomicroscopía de alta resolución y alta velocidad	75
4.3.1 Toma de muestra	75
4.3.2 Visualización microscópica de la muestra	75
4.3.3 Grabación del cilio	76
4.3.4 Análisis de la movilidad	77
4.4 Estudio genético	78
4.4.1 Toma de muestra y procesado	78
4.5 Estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica de transmisión	79
4.5.1 Toma de muestra y fijación.....	79
4.5.2 Procesado y preparación de la muestra	79
4.5.3 Estudio general de la muestra	82
4.5.4 Análisis de los axonemas	83
4.6 Análisis estadístico	84

V. Resultados

5.1 Consideraciones generales de la muestra	87
5.2 Estudio de movilidad ciliar	88
5.3 Estudio genético	89
5.4 Estudio ultraestructural de los axonemas ciliares	90
5.4.1 Defectos ultraestructurales diagnósticos	91
5.4.2 Defectos minoritarios.....	94
5.4.3 Defectos secundarios.....	95
5.4.4 Estudios no completados.....	98
5.4.5 Defectos de significado desconocido.....	102
5.4.5.1 Zona electrondensa	102
5.4.5.2 Dobletes oscuros.....	102
5.4.5.3 Rotura de simetría	103
5.5 Estudio ultraestructural de las biopsias nasales	111
5.5.1 Hallazgos comunes	111
5.5.2 Hallazgos específicos.....	119
5.6 Estudios de correlación	132
5.6.1 Relación genotipo-fenotipo ciliar ultraestructural	132
5.6.2 Relación genotipo-fenotipo ciliar funcional.....	134
5.6.3 Relación fenotipo ciliar ultraestructural-funcional.....	136
5.6.4 Relación fenotipo clínico-fenotipo ciliar-genotipo	138
5.6.5 Estudio estadístico	141

VI. Discusión

6.1 La MET como técnica diagnóstica de la DCP	145
6.1.1 Defectos ultraestructurales axonemales en la DCP	149
6.1.2 Defectos ultraestructurales secundarios	151
6.1.3 Hallazgos ultraestructurales específicos.....	153
6.1.4 DCP con ultraestructura conservada. Rotura de simetría como defecto axonemal y su contribución en el diagnóstico de la DCP.....	158
6.2 Estudio de correlaciones genotipo-fenotipo clínico y ciliar	164

VII. Conclusiones 175**Bibliografía**..... 179**Anexo 1** 199**Anexo 2** 203

I. Introducción

1.1 Cilios

1.1.1 Definición

La presencia de orgánulos cubiertos por membrana y con una funcionalidad específica es una de las características propias de las células eucariotas. Uno de esos orgánulos son los cilios, una estructura compleja y dinámica que está presente en casi todos los tipos celulares del organismo.

De este modo los cilios se conforman como orgánulos especializados, que se extienden desde la superficie celular hacia el medio externo, formados por un citoesqueleto de microtúbulos y cubiertos por la prolongación de la membrana celular, desempeñando funciones sensoriales, motoras y de transducción de señales (**Figura 1**).

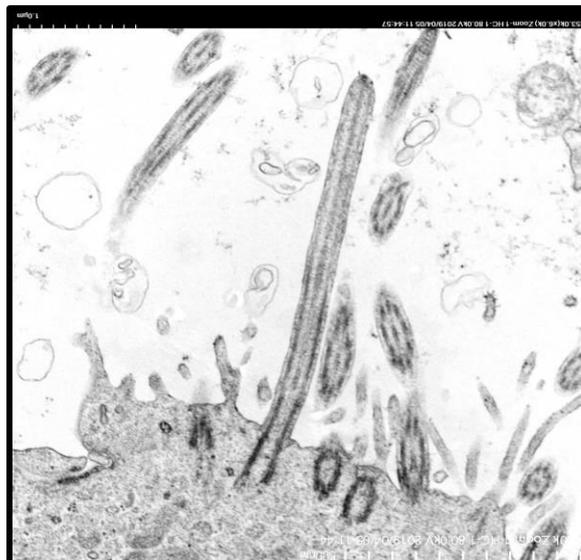


Figura 1. Micrografía de un cilio. Zona apical de una célula multiciliada del epitelio respiratorio en la que puede apreciarse la sección longitudinal de una estructura ciliar (Micrografía, x53.000).

Es una organela evolutivamente muy conservada, que se cree que ya estaba presente en el LECA, último ancestro eucariótico común (Mitchell, 2007) y que se mantiene tanto en eucariotas unicelulares como en células diferenciadas de

organismos multicelulares, incluidos los seres humanos, con más de mil millones de años de historia evolutiva (Wan y Jékely, 2019).

Esta preservación estructural a lo largo de la evolución ha permitido utilizar organismos modelo para realizar análisis detallados a nivel molecular y bioquímico. En este sentido los organismos más utilizados para el estudio ciliar son el alga verde biflagelada *Chlamydomonas reinhardtii* o el protozoo *Tetrahymena thermophila* (Poprzeczko *et al.*, 2019). Como resultado de los análisis en *Chlamydomonas* se han detectado más de 600 proteínas en su axonema, entre otras, las proteínas motoras, las necesarias para la transducción de señales y las proteínas de membrana (Ishikawa, 2017).

1.1.2 Tipos de cilios y función

En general se distinguen tres tipos de cilios en el organismo:

***Cilios móviles:** propulsan fluidos y partículas extracelularmente a lo largo de la superficie de células epiteliales especializadas -conocidas como células multiciliadas (CMC)- mediante ondas metacronales, a través de las cuales cada cilio se mueve de manera no recíproca en una dirección definida y con la misma frecuencia que los cilios vecinos, pero en una fase diferente según su posición. Estas ondas son capaces de conducir un flujo de fluido estable a lo largo de la superficie del epitelio ciliado (Blake y Sleight, 1974). Los espermatozoides poseen en su cola una única estructura axonemal idéntica, por lo que también se les incluye como cilios móviles.

En las vías aéreas los cilios móviles de las CMC son los responsables del aclaramiento mucociliar en el epitelio respiratorio (Fahy y Dickey, 2010). Las células endoteliales multiciliadas que tapizan los ventrículos cerebrales generan igualmente el flujo endotelial del fluido cerebroespinal, necesario para la homeostasis del cerebro y la migración de neuroblastos (Sawamoto *et al.*, 2006). Los cilios que tapizan el epitelio tubárico colaboran en el transporte del embrión temprano desde el oviducto hacia la cavidad uterina (Lyons *et al.*, 2006) y propulsan al espermatozoide en su trayecto hasta la interacción con el ovocito en el istmo del oviducto (Inaba y Mizuno, 2015).

***Cilios inmóviles o sensoriales:** Son también denominados cilios primarios, dado que cronológicamente aparecen primero en el desarrollo celular, ejerciendo en ellas funciones sensoriales (Pazour *et al.*, 2003). Estos cilios primarios funcionan como receptores especializados (cilio conector de fotorreceptores en retina; cilios olfatorios en epitelio nasal; kinocilio en oído interno), como mecanorreceptores (cilios primarios en células epiteliales de túbulos renales y de conductos biliares y pancreáticos, que detectan y regulan el flujo luminal) o participando en numerosas vías de señalización, responsables del desarrollo y la homeostasis de diversos tejidos, tales como las vías de señalización de Hedgehog, de EGFR o de Wnt (Christensen *et al.*, 2008; Satir *et al.*, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2011; Mitchison y Valente, 2017).

***Cilios nodales:** Durante el desarrollo embrionario temprano (~7,5 días después del coito), el movimiento de rotación de los cilios nodales de las células del polo ventral del embrión crea un flujo de fluido hacia la izquierda. Este flujo nodal es necesario para el establecimiento de la asimetría izquierda-derecha en los órganos del embrión en desarrollo (Nonaka *et al.* 1998).

Además de la movilidad y la función sensorial se ha descrito otra función adicional que pueden llevar a cabo tanto los cilios móviles como los inmóviles: la secreción de vesículas bioactivas desde la membrana ciliar, de forma que pueden secretar ectosomas que contienen entre otros, enzimas y moléculas señalizadoras (Wood *et al.* 2013; Long *et al.* 2016).

A modo de resumen, en el organismo pueden distinguirse por lo tanto hasta 8 tipos de cilios (Afzelius, 2004) que se presentan en la siguiente tabla:

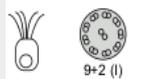
TIPO CILIAR	PATRÓN ESTRUCTURAL	LONGITUD (25µM Ø)	FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN
Propulsores de moco	9+2 	6µm	Móvil	Epitelio de vías aéreas altas y bajas, oído medio
Propulsores de fluido	9+2 	10-15µm	Móvil	Epéndimo de ventrículos cerebrales, conductos eferentes de testículo, oviducto
Nodales	9+0 	5µm	Móvil	Embrión, a los 7,5 días postcoito
Cilios primarios	9+0 	2-3µm	Sensorial	Túbulos renales y ductos colectores de riñón, conducto biliar, páncreas exocrino, cerebro, sistema esquelético
Olfatorios	9+2 	2-3µm	Sensorial	Epitelio olfatorio
Fotorreceptores	9+0 	2-3µm	Sensorial	Segmento externo en retina
Flagelo espermático	9+2 	45µm	Móvil	Espermatozoide
Kinocilios	9+2 	2-3µm	Sensorial	Oído interno

Tabla 1. Descripción de los tipos de cilios.

1.1.3 Estructura y formación del cilio

El cilio puede dividirse fundamentalmente en tres partes o componentes estructurales a analizar: la membrana ciliar, el axonema y el cuerpo basal (**Figura 2**).

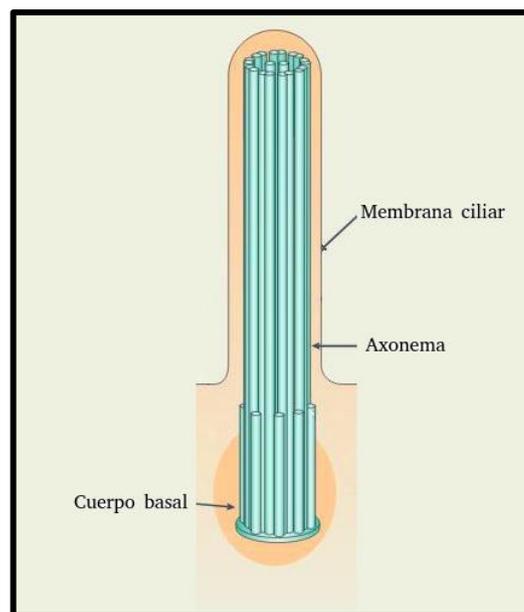


Figura 2. Esquema de la estructura básica de un cilio.

Membrana ciliar

Se conforma como una extensión de la membrana plasmática, formada por la elongación del axonema, pero con una composición única de lípidos y proteínas, incluyendo canales iónicos y receptores especializados, que permiten al cilio detectar una amplia variedad de señales extracelulares, tales como flujo de fluidos, estímulos lumínicos y hormonas sexuales entre otros, y transducirlas al interior de la célula (Rohatgi y Snell, 2010). Esta función, de carácter sensorial, no se restringe sólo a los cilios primarios, ya que la presencia de receptores en cilios móviles para detectar cambios fisicoquímicos ambientales se ha descrito asimismo en los cilios del oviducto, que tras la ovulación aumentan su actividad para favorecer el transporte del ovocito, y tras la fertilización para su transporte a la cavidad uterina (Verhage *et al.*, 1979). De igual forma, los cilios del epitelio respiratorio regulan la frecuencia de su batida

ciliar en función de la viscosidad de la capa de fluido apical (Johnson *et al.*, 1991).

La membrana de los cilios primarios posee además receptores que intervienen en la regulación de las vías de señalización mediante morfógenos (SHH -sonic Hedgehog-, Wnt) necesarios para regular la organogénesis (Christensen *et al.*, 2008). Es por ello, que los cambios mutacionales en los genes que son expresados en los cilios sensoriales desembocan en diversos síndromes que incluyen defectos en la formación del tubo neural, de los órganos sensoriales (retina, oído interno) o de la estructura ósea (Jain *et al.*, 2012).

Se sabe que no sólo los cilios primarios poseen receptores sensoriales, ya que se ha comprobado que los cilios móviles de las células epiteliales ciliadas de las vías aéreas expresan en su membrana receptores para el sabor amargo idénticos a los del epitelio lingual. Estos receptores detectan componentes amargos en el aire inspirado, con los que se activa el batido ciliar para eliminar el agente nocivo (Shah *et al.*, 2009). Es por esta función sensorial por lo que algunos autores consideran a los cilios como una verdadera “*antena celular*” (Ishikawa y Marshall, 2011).

En general, las mutaciones en los genes que codifican todas estas proteínas de membrana son las que dan lugar a la mayoría de ciliopatías: riñones poliquísticos, ceguera o diversos síndromes.

Por último, localizado en la membrana de la base del cilio se encuentra el denominado *collar ciliar*: un conjunto circunferencial de partículas intramembrana, que se cree que contribuye en la regulación de entrada y salida de proteínas entre el citoplasma celular y el cilio (Satir y Christensen, 2007; Reiter *et al.*, 2012).

Axonema

Constituye el armazón del cilio. Es una estructura cilíndrica de microtúbulos (MT) organizados en un anillo de 9 dobletes que rodean a un par central extra en el caso de los cilios con patrón 9+2 (**Figura 3.A**), o sin par central, en aquellos 9+0. Hacia la punta ciliar sólo elonga el par central y los dobletes

periféricos van desapareciendo (Rautiainen *et al.*, 1984). Esto debe tenerse en cuenta en observación ultraestructural de secciones del axonema, ya que las secciones de la zona de la punta ciliar aparecen con ausencia de MT de los dobletes, lo cual no corresponde con ninguna anomalía.

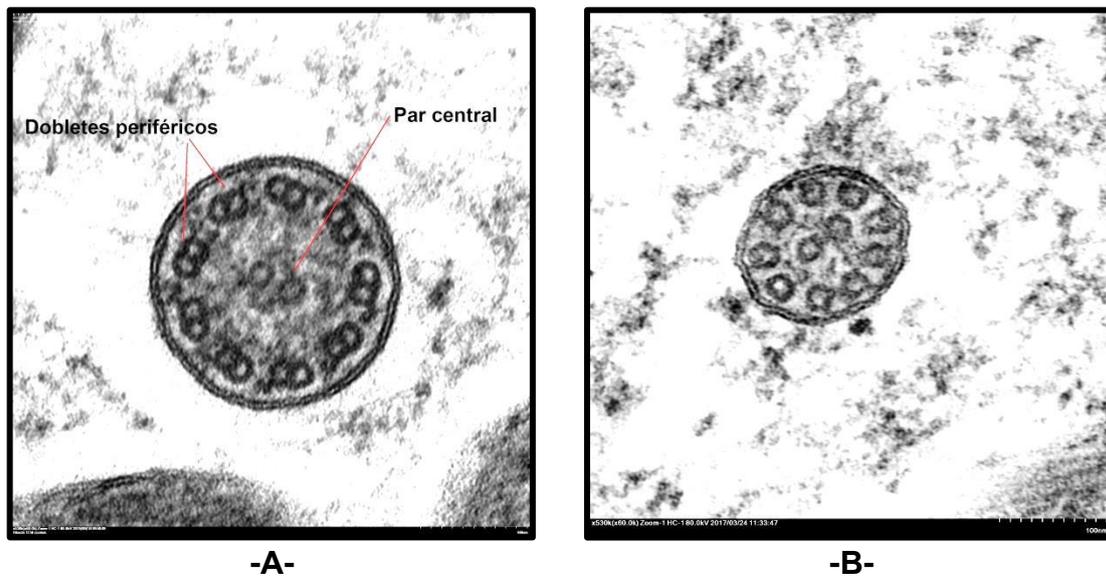


Figura 3. Micrografías de secciones ciliares. (A) Sección ciliar a nivel del cuerpo ciliar en la que se aprecia la configuración 9+2 del axonema: 9 dobletes periféricos que rodean al par central. (B) Sección ciliar a nivel de la punta o ápice ciliar, donde los dobletes se transforman en singletes mientras que el par central se mantiene. (Micrografías, x530.000)

Hacia la base ciliar, cerca de la unión con la membrana plasmática celular, los dobletes periféricos se encuentran unidos a la membrana ciliar mediante unas uniones con forma de Y que se corresponden en la parte externa de la membrana con el *collar ciliar*. Las uniones Y junto con el collar ciliar forman la *zona de transición*, una barrera selectiva de la base del cilio que actúa como una puerta que regula la composición de proteínas y lípidos del compartimiento ciliar. En esta zona de transición encontramos también las fibras de transición, que unen el cuerpo basal a la membrana celular (Goç Alves y Pelletier, 2017) (Figura 4).

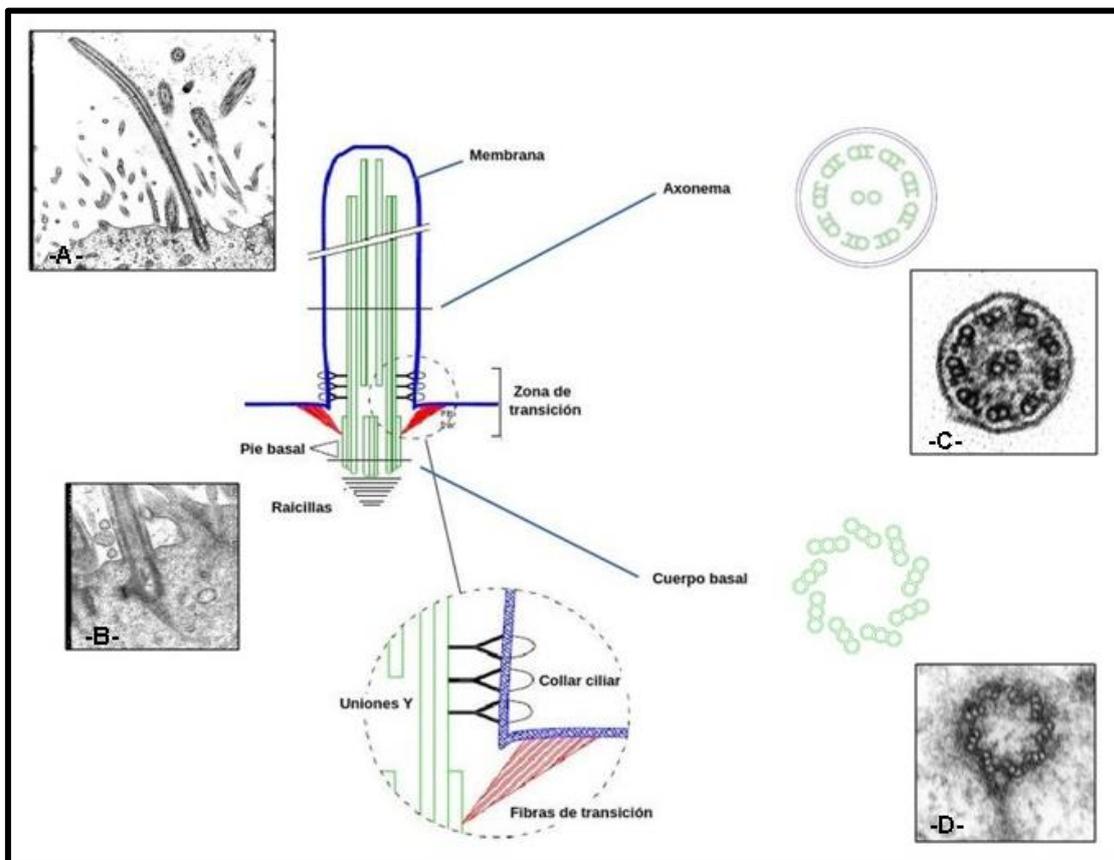


Figura 4. Representación de las partes de un cilio y detalle de la zona de transición.
Figura principal: Esquema de las partes de un cilio: membrana (azul), axonema y cuerpo basal (verde). *Punteado:* Detalle de la zona de transición formada por: uniones Y submembranosas, collar ciliar en la superficie, y fibras de transición (en rojo) que unen el cuerpo basal a la membrana celular. *Micrografías:* (A) Sección longitudinal de un cilio (x53.000); (B) Sección longitudinal a nivel del cuerpo basal, donde se aprecia el pie basal y las raicillas estriadas (x180.000); (C) Sección transversal a nivel del axonema (x530.000); (D) Sección transversal a nivel del cuerpo basal (x440.000).

Cuerpo basal

Es la estructura mediante la cual el cilio se encuentra anclado a la célula. Se trata de una estructura con forma de barril, constituido por un anillo de 9 tripletes de MT, denominados A, B y C (**Figura 5**).

En la zona distal del cuerpo basal se encuentran las *fibras de transición*, que irradian del MT B del triplete hacia la membrana plasmática donde queda fijado. Estas fibras de transición constituyen la región funcional del cuerpo basal, ya que estas fibras poseen espacios inter-fibra demasiado pequeños para permitir el paso de vesículas. Por esta razón, las fibras de transición puede

considerarse que forman parte de la zona de transición, porque contribuyen en la regulación del transporte de proteínas y lípidos entre citoplasma y cilio (Reiter *et al.*, 2012).

El cuerpo basal se encuentra además fijado a la célula mediante las *raicillas estriadas*, (**Figura 5.A**) unas estriaciones de bandas gruesas y finas que emergen de la base del cuerpo basal. Forman un pequeño ángulo respecto al eje del cilio y probablemente funcione como estructura de anclaje o estabilización de cilio móvil (Yang *et al.*, 2005).

Otro de los apéndices del cuerpo basal es el *pie basal* (**Figura 5**), que se postula que juega un papel crítico en la regulación de la polarización del cuerpo basal bajo el control de las proteínas centrales de la polarización celular planar (Kunimoto *et al.*, 2012). Esta estructura también es visible mediante la observación ultraestructural.

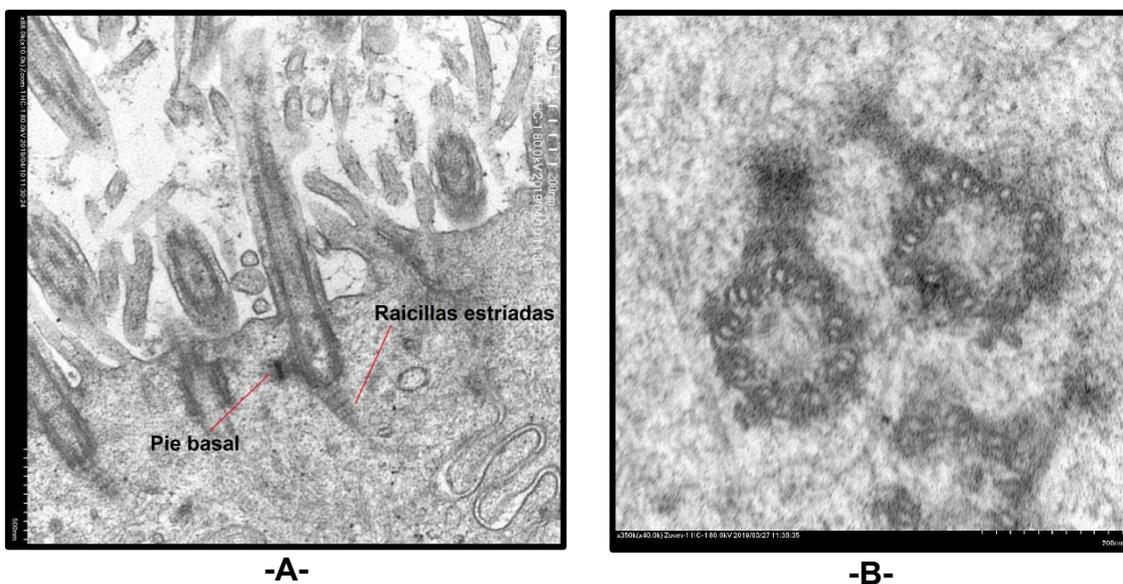


Figura 5. Micrografías del cilio a nivel del cuerpo basal. (A) Sección longitudinal. El cuerpo basal se fija a la célula mediante el pie basal (estructura electrodensa a la izquierda del cuerpo basal) y las raicillas estriadas (estriaciones que emergen de la base) (x88.000). **(B)** Sección transversal donde se aprecian los 9 tripletes de MT y el pie basal, la proyección mediante la cual se fijan a la célula (x350.000). (Micrografías)

Ciliogénesis

La ciliogénesis es el proceso mediante el cual se generan los cilios en las células multiciliadas de los epitelios de las vías respiratorias, endodermales, del oído medio y del oviducto. Este proceso se inicia cuando las CMC nacientes inician un programa transcripcional específico para expresar cientos de genes ciliares en su proceso de diferenciación durante la embriogénesis. Los cilios son estructuras posmitóticas que están presentes mientras las células están en G0/G1 y el comienzo de la fase S, antes de que se necesiten los centriolos para organizar el huso mitótico. Es importante destacar que el estrecho vínculo entre la formación/desmontaje de los cilios y la progresión del ciclo celular no solo se basa en la disponibilidad de centriolos, sino que también está respaldado por la actividad específica de las proteínas centrosómicas que participan en el control de la ciliogénesis (Cardenas-Rodriguez y Badano, 2009).

En la ciliogénesis se distinguen varias fases o periodos (Satir y Christensen, 2007), en todas las cuales se han descrito alteraciones o defectos que conllevan una alteración en la estructura o función del cilio.

El proceso de la ciliogénesis comienza en la semana 11 del desarrollo embrionario, cuando la tráquea se recubre de un epitelio columnar.

***Generación de centriolos:** En la semana 12 aproximadamente, del desarrollo embrionario, aparecen unas masas fibrogranulares en el citoplasma, que posteriormente desarrollan unos elementos centrales, los *deuterosomas*, alrededor de los cuales hay un desarrollo explosivo de cientos de centriolos. Esta replicación de los centriolos está controlada por el factor *MCIDAS*, cuya mutación produce células ciliadas con un reducido número de cilios móviles (Boon *et al.*, 2014). Además, la maduración de los centriolos depende de la ciclina O (*CCNO*) cuya mutación se traduce en un menor número de cilios (Wallmeier *et al.*, 2014)

***Migración de centriolos:** los centriolos maduros migran a la membrana apical de la célula.

***Formación del cuerpo basal:** una vez migrado, se forma el cuerpo basal y sus estructuras asociadas (el pie basal y las raicillas, entre otros), mediante las cuales se ancla a la membrana y al cuerpo celular.

***Elongación del axonema:** Se produce la adición de subunidades de tubulina al extremo distal del cuerpo basal, que nuclea el crecimiento de los microtúbulos (MT) axonemales. El collar ciliar se desarrolla conforme el axonema comienza a elongarse.

Debido a que el compartimiento ciliar carece de maquinaria para la síntesis proteica, la elongación del cilio requiere de la importación selectiva de las proteínas ciliares, desde el aparato de Golgi y su transporte hasta la punta ciliar, donde se ensamblan los dobletes externos.

El transporte de las proteínas ciliares necesario para su ensamblaje y mantenimiento se realiza mediante el denominado "*transporte intraflagelar*" (IFT), un sistema de movimiento bidireccional de partículas a lo largo de la longitud del cilio que utilizan los dobletes exteriores como vías (Pedersen y Rosenbaum, 2008) Este sistema transporta las proteínas a su lugar de ensamblaje en la punta flagelar y retorna las proteínas usadas al cuerpo celular para su degradación o reciclaje (**Figura 6**).

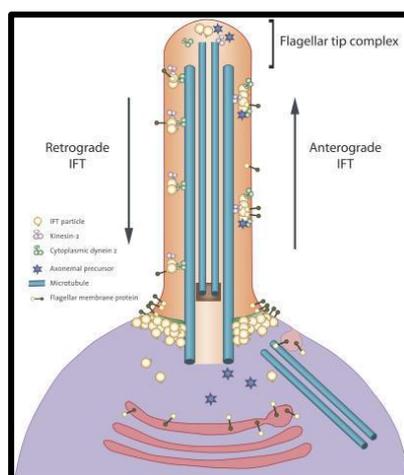


Figura 6. Representación del sistema de transporte intraflagelar (IFT). Las partículas IFT y la carga asociada requerida para el ensamblaje del cilio se acumulan alrededor de la región del cuerpo basal, donde se asocian entre sí para su viaje más allá de la zona de transición. Son transportados por IFT anterógrado hacia la punta ciliar impulsados por la proteína motora kinesina-2. En la punta ciliar se descarga la carga anterógrada, se recoge la carga retrógrada y

se activa la dineína-2 para impulsar el viaje de regreso al citoplasma (Tomado de Sloboda y Rosenbaum, 2007).

La construcción del cilio depende del buen funcionamiento de todo este proceso de transporte. Se han descrito numerosos genes que codifican proteínas que intervienen en el pre-ensamblaje de las proteínas ciliares en el citoplasma, y otros que intervienen en su transporte hasta la punta ciliar, cuya mutación deriva en defectos estructurales y por tanto funcionales del cilio.

*Después de 24 semanas, el borde ciliado está aparentemente maduro, las raicillas elongadas y los cilios correctamente orientados (Gaillard, 1989).

1.1.4 Ciliopatías

Las ciliopatías son un grupo de trastornos superpuestos cuya etiología radican en una estructura y función defectuosas de los cilios.

La diversa distribución y funciones ciliares hacen que los defectos ciliares puedan causar una amplia gama de síntomas de enfermedad, afectando a órganos individuales o presentarse como trastornos multisistémicos.

Son el resultado de mutaciones perjudiciales en los genes que codifican proteínas que intervienen en:

- Ciliogénesis
- Pre-ensamblaje de proteínas ciliares en el citoplasma de la célula ciliada
- Estructura axonemal y de membrana ciliar
- Transporte intraflagelar

Se han determinado al menos 187 genes implicados en 35 ciliopatías establecidas, y otros 241 genes que se han asociado con estructuras y/o funciones ciliares que podrían resultar en ciliopatías nuevas o ya conocidas (Reiter y Leroux, 2017).

Dependiendo del tipo de cilio afectado se distinguen:

***Ciliopatías no móviles o sensoriales:** Los fenotipos debidos a defectos en el ensamblaje o función de los cilios primarios varían desde enfermedad renal quística y ceguera hasta fenotipos neurológicos, obesidad y diabetes.

Las mutaciones en genes expresados en los cilios primarios son responsables de formaciones quísticas en riñón (Adamiok-Ostrowska y Piekiełko-Witkowska, 2020), distrofia de retina (Bujakowska *et al.*, 2017) y polidactilia (Serra, 2008), entre otros.

Estas alteraciones suelen englobarse en síndromes como el de Bardet-Biedl (BBS), la distrofia torácica asfixiante Jeune (JATD), y el síndrome Meckel-Gruber (MKS) (Faus-Pérez *et al.*, 2015) (**Tabla 2**).

***Ciliopatías móviles:** La entidad más representativa de la disfunción de los cilios móviles es la **discinesia ciliar primaria** (DCP): discinesia, del griego “dificultad de movimientos” y primaria para distinguir este desorden genético de aquellos defectos secundarios o adquiridos.

Enfermedad	Fenotipo	Genes descritos	Función celular	Localización
Síndrome de Ålstrom	Retinitis, obesidad, diabetes mellitus	<i>ALMS1</i>	Ciliogénesis	Cuerpo basal
Síndrome de Senior-Loken	Nefronoptosis, enfermedad ocular progresiva	<i>NPHP1, NPHP4, NPHP5, NPHP6</i>	Desconocida	Cilio, cuerpo basal
Riñón poliquístico	Infecciones del trato urinario, quistes pancreáticos y hepáticos	<i>PKD1, PKD2</i>	Mecanosensorial	Cilio
Discinesia ciliar primaria	Bronquiectasia, sinusitis crónica, infertilidad, Situs inversus	<i>DNH1, DNH5</i>	Motilidad ciliar	Brazos externos dineína
Síndrome de Bardet-Biedl	Obesidad, enfermedad retiniana, riñón poliquístico	<i>BBS1-12</i>	Ciliogénesis	Cuerpo basal, IFT
Síndrome de Meckel-Gruber	Malformaciones cerebrales, polidactilia, riñón poliquístico	<i>MIKS1, MIKS3</i>	Ciliogénesis	Cuerpo basal, membrana ciliar
Síndrome oral-facial-digital	Malformaciones craneofaciales, polidactilia, riñón poliquístico	<i>OFD1</i>	Ciliogénesis	Cuerpo basal
Nefronoptosis		<i>NPHP-9</i>	Desconocida	Axonema, cuerpo basal
Retinitis pigmentosa		<i>RPGR</i>	Transporte retinal	Cuerpo basal

Tabla 2. Tabla resumen de las principales ciliopatías

1.2 Discinesia ciliar primaria (DCP)

1.2.1 Concepto y fisiopatología

La DCP es una enfermedad de transmisión genética, heredada principalmente de forma autosómica recesiva, en la que, tal y como definió Afzelius en 1989, los cilios presentan una “*incapacidad innata para moverse o ejecutar movimientos normales o coordinados*”, a causa de alteraciones funcionales, estructurales, o ambas. Puede definirse pues como un defecto congénito de la ultraestructura y/o función ciliar. Su prevalencia estimada es de 1/15.000- 1/30.000 nacidos vivos (Orpha.net), aunque probablemente esta prevalencia esté subestimada debido a diversos factores, como son: la gran heterogeneidad clínica y genética de la enfermedad, que implica una amplia diversidad en la forma y edad de presentación de los síntomas; el solapamiento de los síntomas con otras patologías respiratorias crónicas comunes; el desconocimiento de esta patología por muchos médicos internistas (Requena-Fernández *et al.*, 2020), así como la necesidad de servicios diagnósticos especializados, entre otros factores. Los genes implicados en la DCP son aquellos que codifican proteínas involucradas en la ciliogénesis, o bien en el ensamblaje, estructura y función ciliar. Mediante técnicas de secuenciación masiva de alto rendimiento (NGS), es posible identificar mutaciones causantes de esta patología en un 80% de los individuos afectados (Fassad *et al.*, 2020). La principal consecuencia de la disfuncionalidad ciliar provocada por cambios mutacionales es un aclaramiento mucociliar poco eficiente que conduce a la aparición de inflamación e infecciones crónicas y recurrentes de vías respiratorias altas y bajas.

1.2.1.1 Epitelio respiratorio

El epitelio respiratorio forma un revestimiento continuo y bastante regular de la luz de las vías respiratorias ejerciendo una función protectora frente a agentes ambientales inhalados, incluidos agentes alérgenos, contaminantes y agentes patógenos (Yuksel y Turkeli, 2017). Dentro de las vías aéreas se pueden considerar dos zonas: la zona conductora y la zona respiratoria. En la zona con-

ductora, el aire inhalado se humedece, calienta y limpia antes de llegar a la zona respiratoria inferior, donde tiene lugar el intercambio de gases y se oxigena la sangre. La zona conductora comprende las cavidades nasales, faringe, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos, mientras que la zona respiratoria incluye bronquiolos respiratorios terminales, conductos alveolares y sacos alveolares. La mayor parte de las vías aéreas se encuentran revestidas por un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con abundantes células caliciformes, el denominado *epitelio respiratorio* (**Figura 7**). Este epitelio tapiza las fosas nasales, senos paranasales, nasofaringe, parte de laringe, tráquea, bronquios y porción inicial de bronquiolos, que cambia paulatinamente a un epitelio cilíndrico simple, ciliado o no.



Figura 7. Micrografía del epitelio respiratorio. Se observa la disposición de las células en forma de pseudoestrato, con predominio de las células columnares ciliadas (Micrografía, x6.200).

En el epitelio respiratorio se distinguen al menos ocho tipos de células epiteliales morfológicamente distintas (Knight y Holgate, 2003), aunque según criterios ultraestructurales, funcionales y bioquímicos, se pueden clasificar de forma agrupada en tres categorías de tipos celulares: células basales, células ciliadas y células secretoras. De forma diferenciada se detectan células

epiteliales columnares ciliadas (representan más del 50% de todas las células epiteliales), células caliciformes, serosas, basales y células de Clara, además de células neuroendocrinas e inmunitarias (mastocitos, linfocitos y macrófagos) (Figura 8).



Figura 8. Micrografía de una biopsia de epitelio nasal. Se observan varias células ciliadas de morfología alargada con el borde apical ciliado, dos células caliciformes con el citoplasma repleto de vesículas de mucina, de apariencia electrolúcida, y varios núcleos a distintas alturas (Micrografía, x6.200).

El epitelio de las vías aéreas contribuye significativamente a la función barrera de las vías aérea. El sistema de aclaramiento mucociliar, los complejos de unión apical intercelular y los péptidos antimicrobianos secretados por las células epiteliales son los tres componentes principales de la función barrera de las vías respiratorias (Ganesan *et al.*, 2013). Estos tres componentes actúan de manera cooperativa para eliminar los patógenos inhalados, los alérgenos y las partículas sin inducir inflamación, manteniendo la homeostasis tisular. Por lo tanto, el deterioro de uno o más de estos componentes esenciales de la función de barrera puede aumentar la susceptibilidad a la infección promoviendo respuestas inmunes innatas exarcebadas y prolongadas frente a factores ambientales diversos, que incluyen alérgenos y patógenos que provocan inflamación crónica.

1.2.1.2 Células ciliadas

Las células ciliadas son el elemento celular predominante de las vías aéreas. Se trata de células epiteliales especializadas que pueden presentar varios cientos de cilios en su superficie apical. Se trata de células columnares, con unos 200-300 cilios en la superficie luminal, y asimismo con un número aproximadamente la mitad de microvillis. Son células de morfología alargada, de núcleo prominente en posición basal, aparato de Golgi bien desarrollado, numerosas mitocondrias apicales, una cantidad moderada de retículo endoplásmico y pocos lisosomas (**Figura 9**).

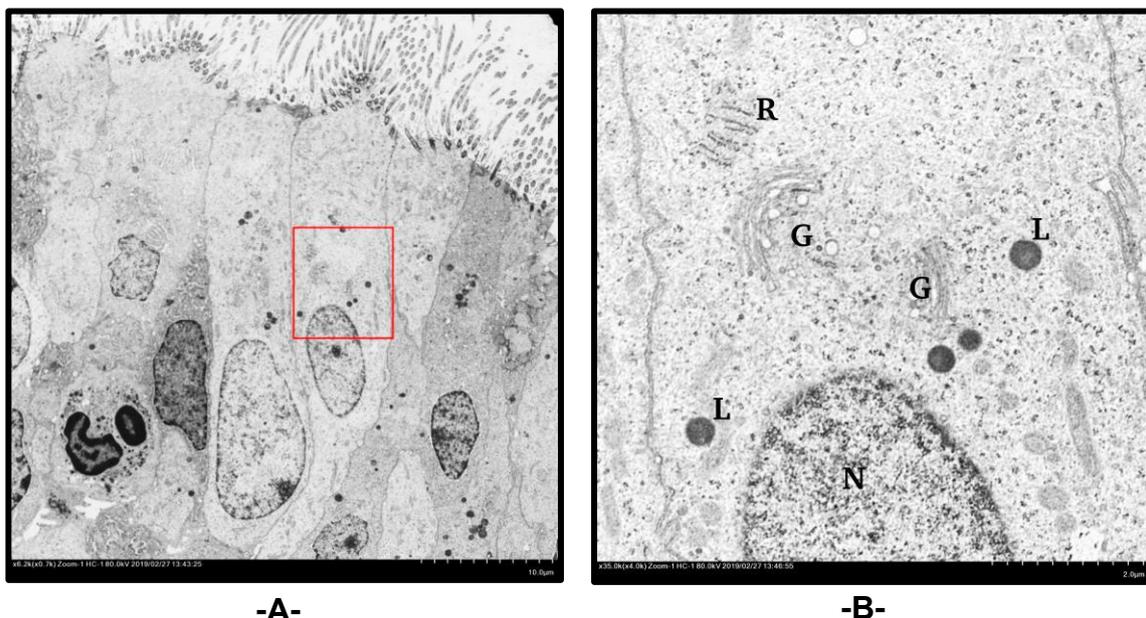


Figura 9. Micrografías de células ciliadas. (A) Células ciliadas, con clara polarización apical-basal mostrando el borde ciliado. En la parte inferior izquierda, un neutrófilo integrado en el epitelio (x6.200). **(B)** Detalle de **(A)**. Citoplasma con el núcleo basal (N), varios lisosomas (L) y un aparato de Golgi bien desarrollado (G) junto al retículo endoplásmico (R) (Micrografías, x35.000)

Estas células se encuentran ancladas a la membrana basal del epitelio mediante hemidesmosomas y hacia la zona apical se encuentran adheridas mediante tight junctions o uniones estrechas que sellan la superficie epitelial, entre otros sistemas de unión intercelular (Chang *et al.*, 2008). Los cilios que emergen de su superficie apical tienen un diámetro de 0,25 micrómetros y unos 6 micrómetros de longitud en las vías aéreas proximales (Busuttill *et al.*, 1977).

Los microvilli, por su parte se observan interpuestos, entre la base de los cilios (**Figuras 10 y 11**), estando formados por un manojito de filamentos de actina, que aparecen simples o ramificados, considerándose que intervienen en el movimiento transepitelial de fluidos (Tilley *et al.* 2015).

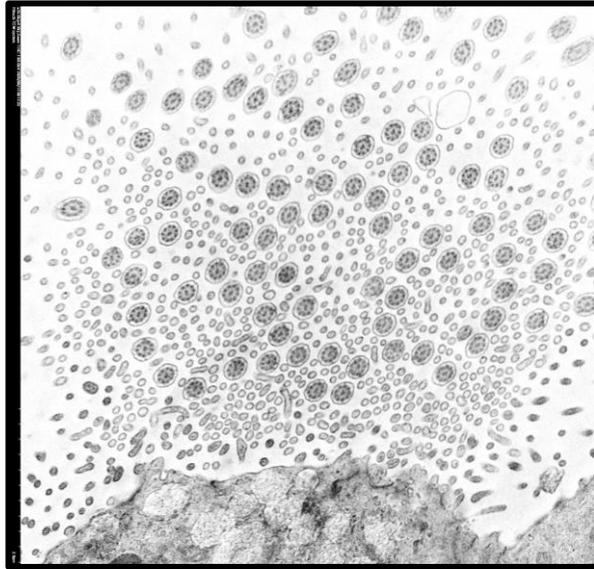


Figura 10. Micrografía de los microvilli. Sección transversal a nivel de la base ciliar, donde se observan las secciones ciliares rodeadas por secciones de microvilli, de menor tamaño y en mayor proporción (Micrografía, x35.000).

En la porción celular subapical se localizan todos los cuerpos basales de cada uno de los cilios, e inmediatamente por bajo justo se concentran numerosas mitocondrias (**Figura 11**), que son las que proporcionan el ATP necesario para el movimiento de los cilios, la batida ciliar, que posibilita el aclaramiento mucociliar, función principal de las células ciliadas.

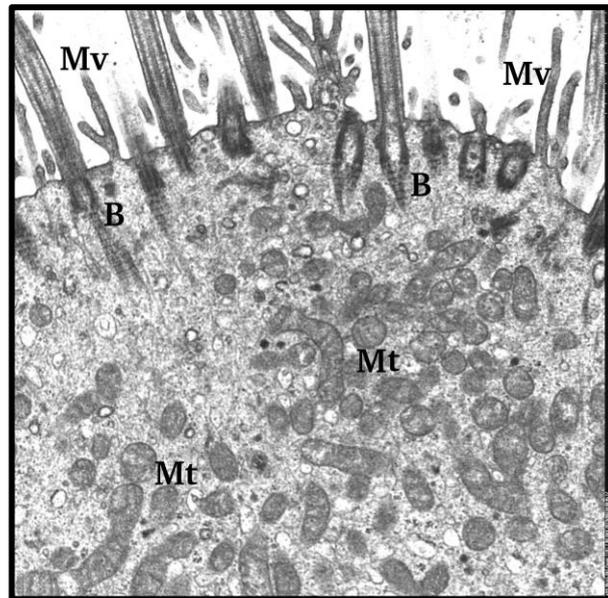


Figura 11. Detalle de la zona apical de una célula ciliada. Se aprecian gran número de mitocondrias (Mt) próximas a los cuerpos basales de los cilios (B) y los microvillios (Mv) entre la base de los cilios (Micrografía, x14.000).

1.2.1.3 Aclaramiento mucociliar

La superficie epitelial del aparato respiratorio está continuamente expuesta a partículas orgánicas e inorgánicas, que pueden ejercer acciones potencialmente nocivas sobre el epitelio. Los mecanismos de defensa frente estas agresiones ambientales, incluyen mecanismos de barreras anatómicas, cambios aerodinámicos, secreción de moco, el reflejo tusígeno, y a los propios macrófagos alveolares, si bien el mecanismo principal de defensa es el aclaramiento mucociliar (Bustamante-Marin y Ostrowski, 2017).

La superficie de las vías aéreas está tapizada por células epiteliales ciliadas de donde emergen los cilios, que interactúan con una fina capa de fluido que cubre la superficie apical celular. Esta capa superficial posee dos componentes: una porción o capa mucosa, que atrapa partículas inhaladas y patógenos, y una capa periciliar de baja viscosidad, que lubrica la superficie y facilita el batido ciliar para un aclaramiento mucoso eficiente (Knowles y Boucher, 2002). Así pues, la función de los cilios en el tracto respiratorio consiste en realizar un movimiento de batido que genera ondas metacronales, las cuales impulsan el

moco y las sustancias atrapadas en dirección craneal hasta la faringe, donde serán deglutidas o bien emitidas a través de la expectoración. Este mecanismo de aclaramiento mucociliar puede verse obstaculizado o interrumpido por dos principales razones: por un aumento en la viscosidad de la capa de moco, ya sea por deshidratación del moco o por aumento en su producción. Al aumentar la viscosidad el movimiento de los cilios se vuelve ineficaz, modelos lesionales de esta alteración es lo que acontece en la fibrosis quística (mucoviscidosis) y en el asma bronquial (Fahy y Dickey, 2010); o por disfunción de los cilios, ya sea de forma temporal e indirecta causada por agentes externos, como infecciones bacterianas, víricas o el consumo de tabaco o por contaminantes ambientales (Mitchison y Shoemark, 2017) o bien por una disfunción ciliar congénita o discinesia ciliar primaria, por ocurrir defectos estructurales ciliares que conllevan a un movimiento ineficaz.

1.2.2 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la DCP son a menudo inespecíficas, variadas, crónicas y de distinta gravedad, aunque la infección de vías respiratorias altas y bajas es un rasgo clínico casi constante ya que es donde se localizan la gran mayoría de células epiteliales ciliadas del organismo, y por tanto es el sistema orgánico más afectado. Los síntomas a menudo comienzan desde el momento del nacimiento: un 80% de los pacientes presentan distrés respiratorio neonatal, ya que la función ciliar normal es crítica para el aclaramiento del líquido amniótico del pulmón fetal (Noone *et al.*, 2004; Lobo *et al.*, 2015). Casi la totalidad de pacientes presentan tos productiva y rinorrea crónicas, de aparición antes de los seis meses de vida (Leigh *et al.*, 2009), rinosinusitis y otitis media crónicas (Davis *et al.*, 2015), así como episodios recurrentes de neumonía y bronquitis que desembocan, en ocasiones de forma precoz, en el desarrollo de bronquiectasias, dilatación permanente de los bronquios como consecuencia de la inflamación crónica (Shapiro *et al.*, 2016).

Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan la existencia de un *situs inversus totalis* (SI) (Afzelius, 1976), es decir una localización invertida (“imagen en espejo”) de los órganos torácicos y abdominales, y un 12% presentan otros defectos de lateralidad que van desde la heterotaxia clásica [*situs ambiguus* (defecto en localización de órganos abdominales) junto con defecto cardíaco congénito] hasta defectos más sutiles (Shapiro *et al.*, 2014). La tríada clínica formada por sinusitis crónica, bronquiectasias y SI constituye el denominado, de forma eponémica, síndrome de Kartagener, descrito por este autor en 1933 y asociado posteriormente en su patogénesis con alteraciones ciliares por Björn Afzelius (1976). Todos estos síntomas se producen fundamentalmente durante la infancia temprana y la adolescencia, y en adultos las manifestaciones clínicas son similares, aunque el desarrollo y las manifestaciones propias de las bronquiectasias aumenta con la edad (Noone *et al.*, 2004).

La infertilidad se presenta a menudo en muchos varones con DCP, ya que los cilios y el flagelo espermático pueden presentar el mismo defecto ultraestructural y funcional. Sin embargo, esto no se produce en todos los pacientes varones con DCP, ya que el axonema de cilios y flagelos se encuentra regulado por grupos de genes, tanto de carácter común como diferentes (Escudier *et al.*, 1990), y por tanto existen diferencias en los componentes estructurales de los brazos de dineína y en el ensamblaje (Sironen *et al.*, 2020). En mujeres, la función defectuosa de los cilios del epitelio oviductal pueden llevar a la existencia de una subfertilidad o a un mayor riesgo de embarazos ectópicos (Halbert *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2006). Un estudio analizando 167 adultos, concluyó que la DCP conlleva un riesgo de padecer problemas de fertilidad, tanto en hombres como en mujeres y en proporciones similares, ya que el defecto del flagelo espermático en los hombres, o de los cilios del epitelio del oviducto en las mujeres, depende de un mismo gen implicado y del defecto ultraestructural que éste genere (Vanaken *et al.*, 2017).

1.2.3 Métodos diagnósticos

La DCP se caracteriza por una extensa heterogeneidad genética y una gran variabilidad clínica, y dada la ausencia de un único test diagnóstico de referencia estándar, resulta necesario realizar diversas pruebas o aproximaciones diagnósticas para poder llegar a un diagnóstico fiable de la enfermedad. El diagnóstico debe basarse en la presencia de un fenotipo consistente con la enfermedad, es decir, el paciente debe presentar el *fenotipo clínico clásico* (Knowles *et al.*, 2016): distrés respiratorio neonatal, síntomas crónicos y persistentes del tracto respiratorio superior e inferior y defectos de la lateralidad, y una confirmación mediante una combinación de *varios test diagnósticos* (Mirra *et al.*, 2017; Lucas *et al.*, 2017). Las pruebas requeridas para el diagnóstico para la DCP son altamente especializadas, requieren de equipos costosos y personal experimentado en su manejo. Se han publicado diversos estudios en los que se exponen una serie de factores predictivos de la DCP que ayudan a identificar a los pacientes que requieren de la realización de pruebas diagnósticas, como es por ejemplo el índice PICADAR, basado en 7 parámetros clínicos predictivos (Behan *et al.*, 2016). En el estudio de Mallowney y cols. se concluye que un neonato que haya presentado distrés respiratorio, atelectasias (colapso pulmonar lobar) y haya requerido oxigenoterapia por más de dos días, debe considerarse como altamente sugestivo de padecer DCP (Mallowney *et al.*, 2014). En este mismo sentido, Armengot y cols. realizaron un estudio con 476 pacientes del que se desprende que la combinación de *situs inversus*, atelectasias, rino-rea, tos productiva crónica, bronquiectasias, neumonías recurrentes y otitis, en el mismo paciente, determina un alta probabilidad de padecer DCP (Armengot *et al.*, 2020).

Los test diagnósticos que pueden utilizarse para el diagnóstico de la DCP son:

- Medición del óxido nítrico nasal exhalado (ONn)
- Análisis de la frecuencia y patrón de batida ciliar mediante videomicroscopía de alta resolución digital y alta velocidad (HSVA)
- Estudio genético
- Localización subcelular de proteínas ciliares mediante inmunofluorescencia (IF)
- Estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

1.2.3.1 Medición del óxido nítrico nasal exhalado (ONn)

Esta prueba se utiliza principalmente como test de cribado. Los pacientes con DCP presentan unos valores muy bajos de ONn, del orden de un 90% por debajo de los valores normales (Moreno-Galdó *et al.*, 2010). La medición del ONn exhalado se realiza mediante un dispositivo, que a través de un sistema de quimioluminiscencia determina la concentración de este gas en el aire espirado por el paciente (Wodehouse *et al.*, 2003). Es una técnica rápida, de elevada especificidad y sensibilidad en pacientes con síntomas compatibles con DCP (Corbelli *et al.*, 2004). Sin embargo, una baja concentración de ON se produce también en otras entidades como la fibrosis quística (Balfour-Lynn *et al.*, 1996), y además resulta complicado poder llevarla a cabo en niños menores de 5 años, porque se requiere de su colaboración en las maniobras respiratorias. Por estas razones, siempre es necesario realizar otras pruebas para confirmar el diagnóstico de DCP.

1.2.3.2 Análisis de la frecuencia y patrón de batida ciliar mediante videomicroscopía de alta resolución digital y alta velocidad

El análisis mediante videomicroscopía de alta velocidad (High Speed Video microscopy Análisis (HSVA)), es la técnica de visualización *ex vivo* (fuera del organismo y con las mínimas alteraciones en comparación con las condiciones naturales) de los cilios del epitelio respiratorio bajo un microscopio óptico sien-

do grabado en vídeo la motilidad ciliar mediante una cámara de alta velocidad. De este modo pueden realizarse mediciones de la frecuencia de la batida ciliar, y reproduciendo las imágenes a cámara lenta puede determinarse el tipo o patrón de batida ciliar (Armengot *et al.*, 2012). Para ello se obtiene una muestra de la mucosa nasal del paciente mediante curetaje o cepillado de la mucosa del cornete medio y/o meato nasal inferior. El paciente debe encontrarse libre de infección respiratoria aguda al menos 6 semanas, ya que como se verá posteriormente, las infecciones producen alteraciones ciliares secundarias. Inmediatamente se introduce la muestra en un medio de cultivo y se realiza el análisis antes de los 30 minutos posteriores a la toma de la muestra, a una temperatura próxima a la nasal (Blanchon *et al.*, 2020). La frecuencia normal de batida ciliar en individuos sanos oscila entre 9 y 15 Hz (ciclos por segundo) (De longh y Rutland, 1995). Para determinar la frecuencia pueden utilizarse sistemas como el SAVA (Sisson-Ammons Video Analysis), que calcula la frecuencia de batida por variaciones en la intensidad de la luz en un punto determinado de la muestra (Sisson *et al.*, 2003). Para evaluar el patrón de batida los cilios se observan desde tres planos diferentes a cámara lenta. Los cilios batan generalmente en un plano, con pequeñas desviaciones del eje longitudinal, generando un movimiento planar en dos fases diferenciadas y coordinadas (Raidt *et al.*, 2014). El patrón de batida normal puede describirse según la siguiente figura:

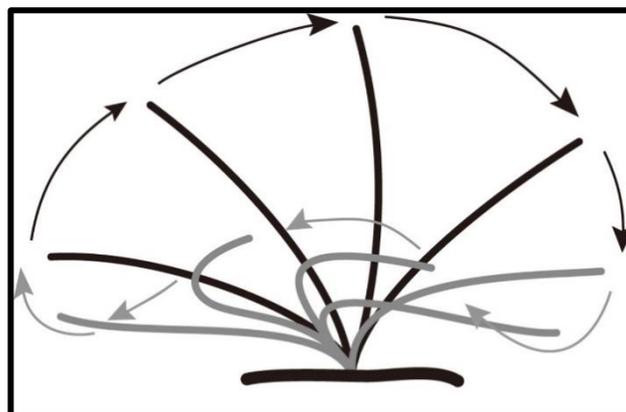


Figura 12. Diagrama de un ciclo de batida ciliar normal. Un ciclo de batida ciliar normal se caracteriza por un golpe fuerte efectivo (en negro) seguido por un golpe de recuperación (en gris). En el golpe efectivo los cilios están en posición recta, mientras que el golpe de recuperación se inicia con el plegamiento del axonema proximal. Los cilios batan generalmente en un solo plano, con ligeras desviaciones del eje longitudinal (Tomado de Raidt *et al.*, 2014).

Basándose en este ciclo de batida normal pueden darse varias alteraciones en el patrón, cuya definición depende de la interpretación del observador. Así por ejemplo, según Chilvers *et al.* (2003) se distinguen: 1) patrón de batida ciliar normal; 2) movimiento muy rígido discinético; 3) movimiento rígido de avance con amplitud reducida; y 4) movimiento rotatorio circular con frecuencia normal ; y de otra parte Raidt *et al.* (2014) describen: 1) golpe de avance y recuperación reconocibles; 2) cilios estáticos; 3) cilios estáticos casi en su totalidad con movimientos mínimos; 3) batida rígida por una amplitud de plegado reducida; y 4) batida circular. La videomicroscopía es una técnica de gran sensibilidad y especificidad para detectar anomalías en el patrón y frecuencia de la batida ciliar, proporcionando un resultado preciso el mismo día de la prueba, con capacidad de detectar casos diagnosticados como negativos por microscopía electrónica, sobre todo cuando se combina con la determinación de ONn (Rubbo *et al.*, 2019). Sin embargo, esta metodología presenta ciertas limitaciones, como son la falta de estandarización del protocolo entre los distintos centros diagnósticos (método de toma de la muestra, temperatura durante el análisis, equipamiento, software utilizado) y de parámetros cuantitativos que describan las anomalías en el patrón de batida, por lo que el resultado depende de la interpretación visual del observador. Es por esto por lo que esta técnica es diagnóstica para DCP, pero un resultado de movilidad ciliar normal no excluye el diagnóstico de la enfermedad.

1.2.3.3 Inmunofluorescencia (IF)

La IF en células del epitelio respiratorio permite la localización y visualización de proteínas a lo largo del axonema ciliar, así como en la zona de transición y cuerpo basal. Estas proteínas ciliares se detectan mediante anticuerpos marcados con un fluorocromo bajo un microscopio de fluorescencia confocal (Omran y Loges, 2009) (**Figura 13**).

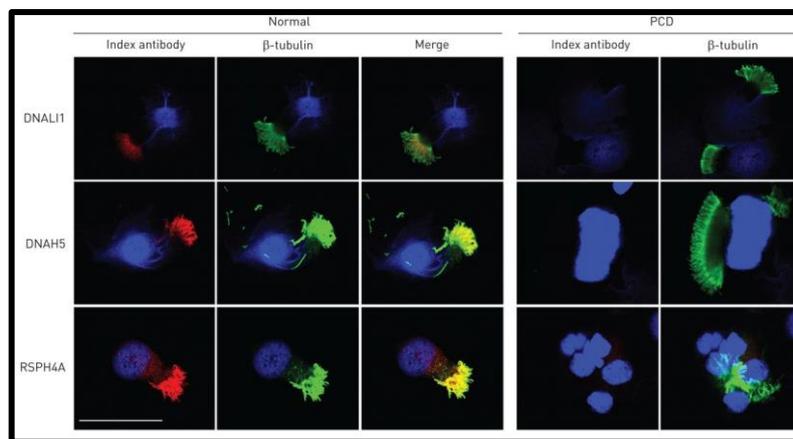


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células epiteliales nasales ciliadas. Puede observarse la presencia (Normal) o ausencia (PCD) (ejemplo de pacientes con DCP) de proteínas ciliares. En rojo: marcaje con anticuerpos frente a *DNALI1* (brazo interno de dineína), *DNAH5* (brazo de externo dineína) y *RSPH4A* (cabeza de brazo radial). En verde: la β -tubulina usado como un marcador de cilio consistente (aparece a lo largo de todo el cilio) (verde) y en azul: los núcleos celulares (contrateñidos –tinción basal - con DAPI). Barra de escala = 40 μ m (Tomado de Rumman *et al.*, 2017)

La toma de la muestra se realiza de igual forma que para la técnica HSVA, mediante raspado nasal. Las células epiteliales se colocan en un portaobjetos, donde son fijadas e incubadas con anticuerpos frente a proteínas ciliares no implicadas en la DCP, como es la tubulina del axonema, combinados con anticuerpos de interés, marcados con distintos fluorocromos, para determinar la presencia o ausencia de, por ejemplo, las proteínas motor de la dineína (Lucas *et al.*, 2017). Este método permite identificar alteraciones estructurales que no pueden ser detectadas por microscopía electrónica, y que además presentan cambios sutiles en el patrón de batida ciliar, como es el caso de los defectos en los brazos radiales por mutación en *RSPH9*, *RSPH4A* y *RSPH1* (Frommer *et al.*, 2015). Se trata de una técnica precisa, basada en la presencia o ausencia de la proteína a estudiar y que por tanto puede contribuir a definir el defecto específico de la DCP y mejorar su diagnóstico. Sin embargo, no puede utilizarse como única herramienta para descartar la DCP, porque en ocasiones los resultados pueden ser no concluyentes debido a la presencia de moco o sangre en la muestra, y además hasta el momento no se dispone de anticuerpos para todas las proteínas ciliares defectuosas implicadas en la DCP (Shoemark *et al.*, 2017).

1.2.3.4 Estudio genético

Hasta la fecha, se han identificado más de 40 genes causantes de DCP (Lucas *et al.*, 2020), siendo la mayoría heredados de forma autosómica recesiva, aunque también se ha descrito herencia ligada al cromosoma X, como la mutación del gen *RPGR* (Moore *et al.*, 2006) o del *OFD1* (Budny *et al.*, 2006), y casos con herencia autosómica dominante, como el *FOXJ1* (Wallmeier *et al.*, 2019).

Los genes conocidos hasta el momento como causantes de DCP se reflejan en la tabla 3, ordenados según la localización de la proteína afectada.

La determinación de la mutación de alguno de estos genes se realiza en pacientes con síntomas consistentes con la DCP y confirmado mediante microscopía electrónica o HSVA, o con una alta sospecha de padecer la enfermedad. Es probable que en un futuro, con el descubrimiento de nuevos genes, el test genético se convierta en la prueba de referencia, siempre que la sospecha clínica indique su realización. Las pruebas genéticas se realizan mediante técnicas de secuenciación de ADN, mediante secuenciación tipo Sanger o tras secuenciación de nueva generación (NGS) (Rodríguez-Santiago y Dulcet, 2012). Para ello se toma una muestra de sangre periférica del paciente, se realiza la extracción del ADN y a continuación se lleva cabo la secuenciación NGS dirigida a un panel de genes DCP conocidos (Baz-Redón *et al.*, 2021).

Según las guías para el diagnóstico de la European Respiratory Society y la American Thoracic Society, una mutación patogénica bialélica (es decir, heredada de ambos progenitores) o una mutación hemiciigótica ligada al cromosoma X en un gen conocido DCP, es confirmatoria del diagnóstico (Lucas *et al.*, 2017; Shapiro *et al.*, 2018). Alrededor del 65-70% de los casos de DCP portan mutaciones bialélicas en alguno de los genes DCP conocidos (Horani y Ferkol, 2018). Sin embargo, la secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica (inserciones, deleciones, duplicaciones, translocaciones, etc), por lo que en pacientes con estas variantes de significado desconocido se requiere confirmación del diagnóstico mediante pruebas funcionales y estructurales (HSVA, IF y MET).

Localización de la proteína	Gen codificante
Brazos de dineína	<i>DNAH5</i>
	<i>DNAH11</i>
	<i>DNAH9</i>
	<i>DNAI1</i>
	<i>DNAI2</i>
	<i>DNAL1</i>
	<i>NME8</i> <i>TXNDC3</i>
	<i>TTC25</i>
	<i>CCDC114</i>
	<i>ARMC4</i>
	<i>CCDC151</i>
	<i>CCDC103</i>
	Citoplasmática
<i>DNAAF1</i> ; <i>LRRC50</i> ; <i>ODA7</i>	
<i>DNAAF2</i> ; <i>C14orf104</i> ; <i>KTU</i>	
<i>DNAAF3</i> ; <i>C19orf51</i> ; <i>PF22</i>	
<i>DNAAF4</i> ; <i>DYX1C1</i>	
<i>DNAAF5</i> ; <i>HEATR2</i>	
<i>SPAG1</i>	
<i>ZMYND10</i>	
<i>CFAP298</i> ; <i>C21orf59</i>	
<i>PIH1D3</i>	
<i>CFAP300</i> ; <i>C11orf70</i>	
Par central	<i>HYDIN</i>
	<i>STK36</i>
Brazos radiales	<i>RSPH4A</i>
	<i>RSPH9</i>
	<i>RSPH1</i>
	<i>RSPH3</i>
	<i>DNAJB13</i>

Complejo regulador nexina-dineína (CRN-D)	<i>CCDC65</i>
	<i>DRC1</i>
	<i>CCDC164</i>
	<i>GAS8</i>
Organizador ciliar	<i>CCDC39</i>
	<i>CCDC40</i>
Citoplasma apical (replicación de centriolos)	<i>CCNO</i>
Núcleo (co-regulador de la transcripción)	<i>MCIDAS</i>
Zona de transición	<i>RPGR</i>
Centriolo	<i>OFD1</i>

Tabla 3. Genes implicados en la DCP según localización de la proteína afectada

1.2.3.5 Estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)

El análisis y valoración de la ultraestructura ciliar para el diagnóstico de la DCP se realiza mediante MET. Para ello se toma una muestra de mucosa nasal que puede proceder de la misma toma obtenida para la HSVa. El paciente debe estar libre de infección respiratoria aguda al menos 6 semanas antes, ya que podrían encontrarse alteraciones ciliares secundarias (De longh y Rutland, 1995). La muestra se introduce en fijador y se procesa para incluirla en un bloque de material plástico. A partir de este bloque se realizan secciones muy finas, del orden de 80 nm, que tras ser contrastadas con metales pesados se introducen en el MET, donde los electrones se transmiten a través de la muestra y se forma una imagen. De cada paciente se analizan entre 50 y 100 secciones, de donde posteriormente se extrae la proporción de axonemas defectuosos y tipo de defecto detectado. Tras el estudio axonemal, un 30% del total de pacientes DCP mostrarán una ultraestructura ciliar normal (Knowles *et al.*, 2013; Boon *et al.*, 2014b) (**Figura 14.A**), por lo que será necesaria la realización de pruebas adicionales. Por otro lado, los pacientes con DCP que presentan un defecto ultraestructural detectable por MET muestran en su mayoría (28%) un defecto en los brazos externos de dineína, seguido de un defecto combinado de brazos externos e internos (26%) y desorganización microtubular

combinado con ausencia de los brazos internos (10%) (Kouis *et al.*, 2017) (Figura 14. B-D).

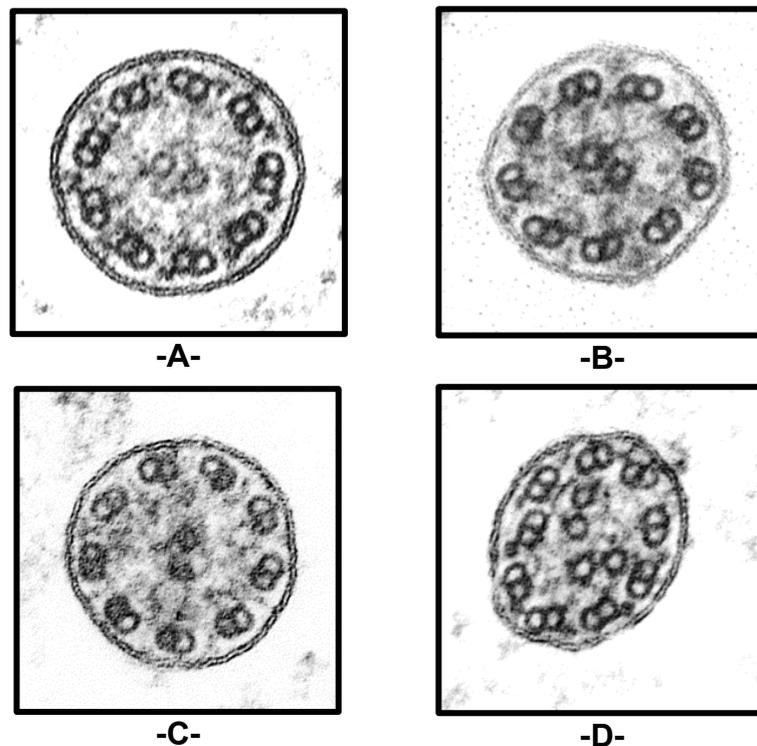


Figura 14. Secciones ciliares de las anomalías ultraestructurales más prevalentes en la DCP: (A) Axonema ciliar normal; (B) Ausencia total de brazos externos de dineína; (C) Ausencia combinada de brazos internos y externos; (D) Desorganización microtubular con ausencia de los brazos internos (Micrografías, x530.000).

En la Guía de Consenso Internacional para el Diagnóstico de la DCP por MET del año 2020 (en adelante: Guía Consenso) se describen, entre otras cuestiones, dos clases de defectos ultraestructurales y su relevancia diagnóstica: la clase 1 o defectos distintivos de carácter diagnóstico, que coinciden con los defectos más prevalentes, y la clase 2, que indican un diagnóstico de DCP con necesidad de otra evidencia de apoyo, ya que son defectos menos frecuentes y aparecen en la muestra de los pacientes en una menor proporción (Shoemark *et al.*, 2020).

Todas las peculiaridades de este estudio de la ultraestructura ciliar, mediante MET, se desarrollarán con detalle en un capítulo aparte.

1.2.4 Pronóstico y tratamiento de la DCP

El aclaramiento mucociliar inefectivo de la DCP genera un depósito de moco y detritus celulares no expulsados que favorece la colonización pulmonar por agentes infecciosos. En este contexto el patógeno más frecuentemente aislado es la *Pseudomonas aeruginosa*, que coloniza a casi la mitad de los pacientes con DCP (Alanin *et al.*, 2015), y que además se relaciona con una peor evolución de la función pulmonar (Pifferi *et al.*, 2020). La inflamación e infección crónicas de las vías respiratorias bajas conducen al desarrollo de atelectasias y bronquiectasias, que van evolucionando conforme avanza la edad del paciente, pudiendo llegar a requerir cirugía para eliminar los lóbulos pulmonares afectados e incluso trasplante pulmonar en los casos más graves (Wang *et al.*, 2020). Aquellos pacientes en los que se ha determinado un defecto ultraestructural, mediante MET, consistente con la ausencia de brazos internos de dineína junto a desorganización de los microtúbulos, defecto que aparece asociado sobre todo con mutación bialélica en los genes *CCDC39* y *CCDC40*, presentan una peor función pulmonar que aquellos otros que expresan un defecto en los brazos externos (Davis *et al.*, 2019). Además, este defecto en los microtúbulos ciliares también se relaciona con un peor índice de aclaramiento pulmonar (Irving *et al.*, 2018). Por otro lado, cuando el defecto genético se encuentra en el *RSPH1* puede observarse una función ciliar residual, que da lugar a un fenotipo clínico más leve y unos niveles de ONn más elevados (Knowles *et al.*, 2014). De esta forma, un diagnóstico completo (basado en el análisis ultraestructural y genético) adecuadamente interpretado de la DCP proporciona información valiosa sobre la evolución que va a presentar el paciente.

La DCP se manifiesta como una enfermedad respiratoria crónica, por lo que el objetivo del tratamiento será restaurar o mantener la función pulmonar normal en la medida de lo posible, detectando y tratando las complicaciones que puedan aparecer, en la evolución de los pacientes. Así pues, el tratamiento de la DCP debe incluir medidas para mejorar el aclaramiento de las vías respiratorias, con una vigilancia regular de la función pulmonar y del status microbiológico

respiratorio mediante el cultivo de esputos, para un uso racional de antibióticos, dirigidos al posible patógeno causante de la infección, cuando ésta se establezca (Knowles *et al.*, 2013). Así mismo, será necesario tratar la rinosinusitis crónica, que es un factor decisivo en la evolución de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores, y las distintas formas de otitis media crónica que se dan en estos pacientes, junto con la hipoacusia consecuente. La hipoacusia en los niños con DCP condiciona una dificultad en el aprendizaje y desarrollo intelectual del niño que habrá que abordar caso a caso (Reula *et al.*, 2020).

1.3 Ultraestructura ciliar

El axonema ciliar constituye la estructura esquelética del cilio móvil, le confiere su forma alargada y abarca casi toda su longitud. Esta estructura se compone de 9 dobletes de MT periféricos que rodean a 2 MT centrales sencillos, los motores moleculares (dineínas) y las estructuras responsables de la regulación de la movilidad ciliar (**Figura 15**).

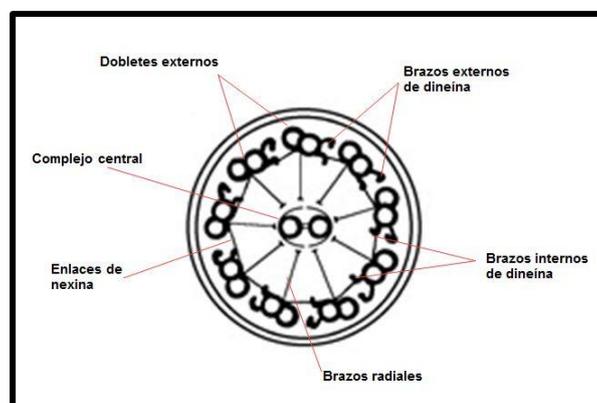


Figura 15. Representación esquemática del axonema ciliar con sus componentes: dobletes externos y par central, brazos de dineína y estructuras asociadas.

Las anomalías en la estructura del axonema ciliar caben ser analizadas morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión, que constituye una de las técnicas esenciales para el diagnóstico de la DCP y en la que recae la base de este trabajo de tesis.

Componentes estructurales del axonema ciliar
Dobletes de MT periféricos y brazos de dineína
Par central y sus proyecciones: Complejo central
Brazos radiales
Complejo regulador nexina-dineína

1.3.1 Dobletes de MT periféricos y brazos de dineína

Los microtúbulos se forman a partir de unidades monoméricas de α y β -tubulina, dispuestos en un patrón helicoidal de protofilamentos. Cada doblete de MT periféricos del axonema está formado por un anillo completo de 13 protofilamentos (el túbulo A) y un anillo incompleto de 10 protofilamentos (el túbulo B) (Ma *et al.*, 2019) (Figura 16).

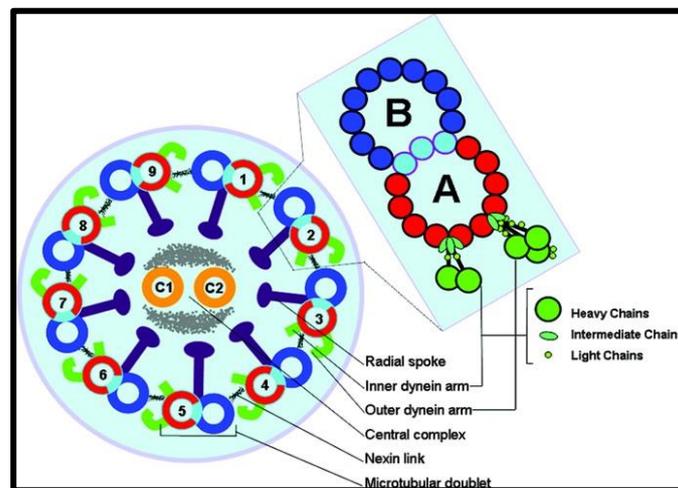


Figura 16. Diagrama estructural de los dobletes periféricos de MT: Los dobletes de MT periféricos del axonema están formados por el túbulo B (en azul) y túbulo A (en rojo), del que emergen los brazos de dineína, internos y externos (en verde) (Tomado de Leigh *et al.*, 2009).

Los motores de dineína responsables de la movilidad se organizan a lo largo de los dobletes externos en dos filas de brazos: externos (BED) e internos (BID). Estos brazos de dineína son complejos proteicos grandes, cada uno compuesto por varias cadenas pesadas que contienen el dominio motor, y por cadenas ligeras e intermedias (Mohri *et al.*, 2012). Las dineínas axonemales están ancladas al túbulo A de cada doblete y caminan a lo largo del túbulo B del

doblete vecino mediante hidrólisis de ATP, generando un movimiento deslizante local entre los dobletes. Las estructuras que restringen el deslizamiento, como los enlaces de nexina que conectan los dobletes externos entre sí, transforman el deslizamiento MT en flexión axonemal (Summer y Gibbons, 1971; Heuser *et al.*, 2009).

Se han identificado varias proteínas denominadas DNAAFs (dynein axonemal assembly factors), necesarias para el ensamblaje en el citoplasma de los brazos de dineína, las cuales actúan como co-chaperonas, es decir, que ayudan en su plegamiento. Son proteínas no axonemales, que no forman parte de la estructura del axonema, pero su ausencia por mutación en los genes que las codifican puede alterar igualmente la estructura del cilio y por tanto su función.

1.3.2 Par central y sus proyecciones: Complejo central

El par de MT centrales y sus proyecciones proteicas asociadas se denominan en conjunto complejo central (CC) (**Figura 17**). Estos MT del CC son estructural y bioquímicamente distintos, y se conocen como C1 y C2, y sus proyecciones proteicas también presentan diferencias estructurales, por lo que se distinguen C1a-C1f y C2a-C2e (Loreng y Smith, 2017). Estas proyecciones no son siempre visibles en las imágenes tomadas por microscopía electrónica.

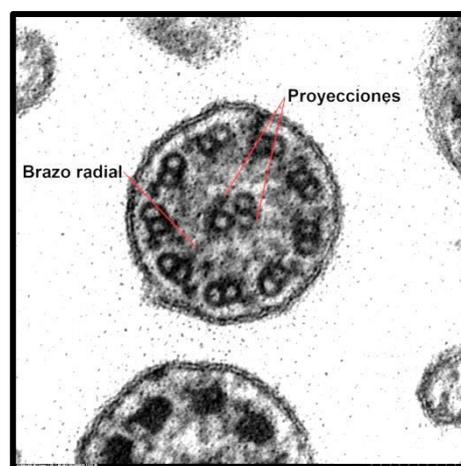


Figura 17. Micrografía de sección transversal de un cilio con el complejo central visible: Se visualizan las proyecciones mayores del par central de MT y algún brazo radial (Micrografía, x530.000).

1.3.3 Brazos radiales

Los dobletes periféricos y el par central de MT están conectados a su vez mediante los brazos radiales, complejos proteicos que funcionan como transductor mecanoquímico entre el complejo central y los dobletes de microtúbulos periféricos (**Figura 17**). Se distinguen 3 tipos: RS1, RS2 y RS3, con distinta forma y composición. Los brazos radiales contribuyen en la regulación de la actividad de los motores de dineína y, por lo tanto, en la motilidad ciliar (Pigino y Ishikawa, 2012).

1.3.4 Complejo regulador nexina-dineína (CRN-D)

Los dobletes adyacentes de MT periféricos se encuentran conectados entre sí por los motores de dineína y por el complejo regulador nexina-dineína, un complejo de múltiples proteínas que coordina la actividad de las dineínas y controla la batida ciliar (Heuser *et al.*, 2009).

Todos estos elementos que componen el axonema ciliar se organizan en complejos multisubunidades conocidos como “complejos axonemales” (Ma, 2019), una superestructura dispuesta a lo largo de todo el axonema que genera una batida ciliar coordinada y autopropagante.

Estos complejos forman un patrón específico de unidades repetitivas cada 96nm (**Figura 18**) que constituye la unidad fundamental de la motilidad del flagelo eucariota (Imhof *et al.*, 2019).

En esos 96nm de largo, cada complejo axonemal contiene:

- 4 BED de dos dominios motor cada uno
- 7 BID, uno de dos dominios motor (*f/11*), y 6 simples (*a,b,c,d,e,g*)
- 3 brazos radiales
- 1 CRN-D

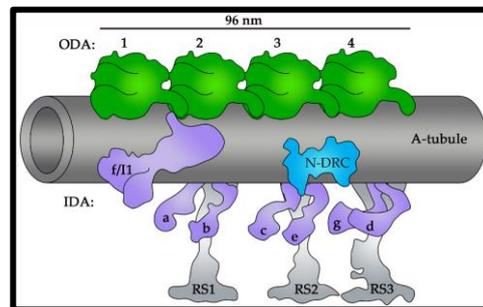


Figura 18. Representación esquemática de la unidad de repetición axonemal. Cada 96nm se encuentran 4 brazos externos de dineína (verde), 7 brazos internos (morado), 1 complejo regulador nexina-dineína (azul), y 3 brazos radiales (gris) (Tomado de Osinka et al, 2019).

Esta característica distribución de los complejos axonemales viene determinada por unas proteínas identificadas como *CCDC39* y *CCDC40*, que establecen su longitud y reclutan las subunidades que lo componen. La mutación en los genes que las codifican supone el 12% de los casos de DCP, causando defectos ultraestructurales que resultan en desorganización axonemal y ausencia de brazos internos de dineína (Antony *et al.*, 2013).

1.4 Estudio de la ultraestructura ciliar

En 1976 Björn Afzelius, biólogo sueco, publicaba en la revista Science el artículo “A human syndrome caused by immotile cilia” (Afzelius, 1976), un trabajo en el que describía mediante microscopía electrónica en tres pacientes la ausencia de brazos de dineína en los cilios del epitelio respiratorio y en el flagelo espermático de varones infértiles, que además padecían bronquitis, sinusitis y situs inversus (síndrome de Kartagener). Puede considerarse así la primera descripción ultraestructural de la DCP, si bien es cierto que el propio Afzelius y ya desde la década de los años 50 había realizado numerosos estudios sobre la ultraestructura ciliar y sobre las maneras de optimizar la observación ultraestructural en diferentes áreas de estudio. Ya en el siglo XXI, y según se señala en las guías para el diagnóstico de la American Thoracic Society y la European Respiratory Society, el diagnóstico de la DCP se confirma de forma concluyente mediante la valoración de la ultraestructura ciliar por MET y/o la determina-

ción de mutaciones bialélicas en genes DCP conocidos (Lucas *et al.*, 2017; Shapiro *et al.*, 2018). De esta forma, y aunque han sido muchos los avances en la determinación de los genes causantes de la DCP, el análisis de la ultraestructura ciliar mediante MET permanece como una herramienta fundamental para su diagnóstico.

El estudio de los axonemas ciliares se realiza a partir de una muestra de células ciliadas del epitelio respiratorio. Para ello se realiza una toma de mucosa nasal que se obtiene mediante cepillado del cornete nasal inferior, y se introduce inmediatamente en glutaraldehído, fijador de elección para estudios ultraestructurales (Graham y Orestein, 2007). El estudio de los cilios puede realizarse de igual forma a partir de una biopsia bronquial, pero este método se descarta en la práctica clínica ya que se requiere un procedimiento costoso e invasivo, y los resultados que se obtienen con respecto al porcentaje de cilios alterados y el principal defecto ultraestructural son similares a los obtenidos a partir del estudio de la mucosa nasal (Verra *et al.*, 1993).

1.4.1 Laboratorio de microscopía electrónica

Para el procesado de las muestras cada laboratorio emplea su propio protocolo, adaptado a partir de un procedimiento estándar de microscopía electrónica para muestras biológicas. Este procedimiento consiste básicamente en incluir la biopsia en bloques de un material suficientemente duro del que puedan obtenerse cortes muy finos, y que además resista las condiciones de radiación del interior del MET. Los materiales más utilizados para ello son las resinas epoxi o la araldita. Se realizan cortes ultrafinos de la biopsia incluida en esos bloques con una cuchilla de diamante, se colocan en rejillas de cobre y se tiñen con soluciones de metales pesados (acetato de uranio y citrato de plomo). Estos metales pesados, junto al tetraóxido de osmio utilizado como segundo fijador, proporcionan el contraste adecuado de la ultraestructura ciliar que permite obtener una imagen al MET (Graham y Orestein, 2007).

1.4.2 Estudio inicial de las muestras ciliares

El estudio de axonemas ciliares requiere de una búsqueda metódica de secciones ciliares apropiadas a lo largo de toda la muestra.

Al iniciar el estudio de MET se realiza una valoración del estado de las células ciliadas a bajo aumento (x 4.400), ya que un error en la fijación o en el procesado puede generar defectos o artefactos que invalidan la muestra, como la pérdida de integridad de las membranas ciliares (**Figura 19**).

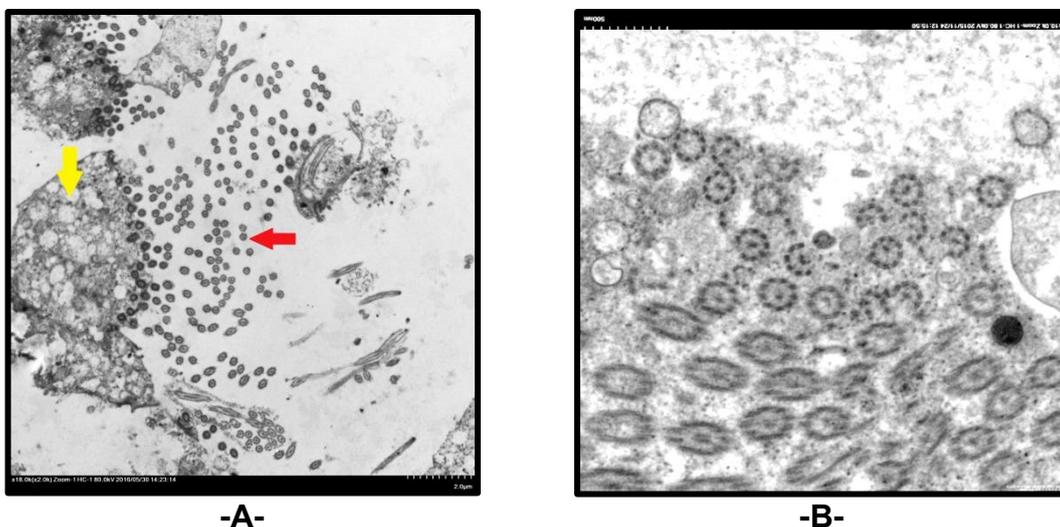


Figura 19. Micrografías que muestran defectos de fijación en una biopsia nasal. (A) Degeneración vacuolar en las células ciliadas, con tumefacción mitocondrial (flecha amarilla) y pérdida de membranas ciliares (flecha roja) (x18.000). **(B)** Detalle de un grupo de axonemas sin membrana ciliar (x10.000). (Micrografías)

A estos aumentos también puede apreciarse la presencia de células inflamatorias pudiéndose además estimar el número de cilios que va a ofrecer la muestra en su conjunto.

Una vez comprobado el buen estado y preservación celular, se localiza la zona apical de las células ciliadas. En esta zona se encuentran los cilios seccionados en diferentes orientaciones, dado que *in vivo* se encuentran en continuo movimiento, y durante el proceso de fijación de la biopsia se forma la imagen del momento del ciclo de batida en el que se encontraban. Así pues, podemos encontrar secciones ciliares perfectamente transversales, cilios en sección longitudinal, y todas las secciones intermedias oblicuas (**Figura 20**).

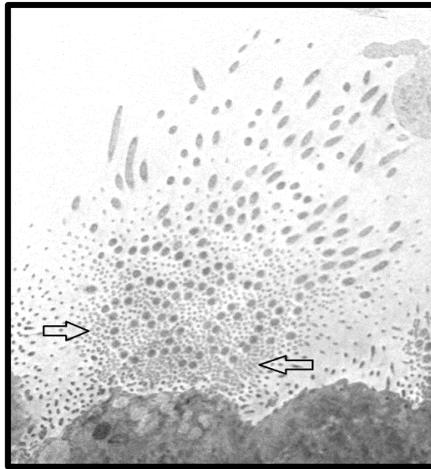


Figura 20. Secciones ciliares de una célula ciliada. Las secciones ciliares de una misma célula pueden aparecer transversales, oblicuas o longitudinales. La zona más proximal a la célula presenta las secciones ciliares embebidas en secciones de los microvilli, que aparecen como un punteado fino (flechas). (Micrografía, tamaño original x8.800)

Esta zona de secciones ciliares a medio aumento (x88.000) nos permite localizar axonemas adecuados para su estudio, ya que sólo una minoría de las secciones se encuentran en el ángulo adecuado, es decir, sólo unas pocas se encuentran orientadas perpendicularmente al eje axial del cilio (McEwen, 1986). Esta posición es la que ofrece un óptimo detalle de la estructura axonemal y de los brazos de dineína (**Figura 21**).

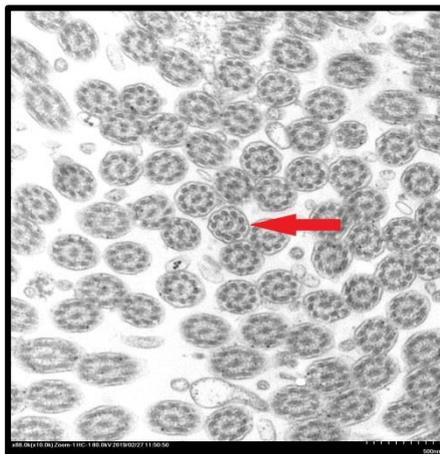


Figura 21. Micrografía de un conjunto de secciones ciliares. Únicamente la sección situada en el centro de la imagen (flecha) es la adecuada para su estudio. Nótese la ausencia de nitidez de las secciones circundantes. (Micrografía, x88.000)

A partir de estos aumentos, puede comenzar el análisis de las axonemas, dado que es posible observar la disposición de los MT en un grupo de secciones ciliares, es decir, que puede determinarse si los axonemas presentan una disposición simétrica de 9+2. De esta forma puede detectarse la existencia de un defecto de desorganización microtubular (**Figura 22**) que constituye, como se describe más adelante, un defecto axonemal distintivo.

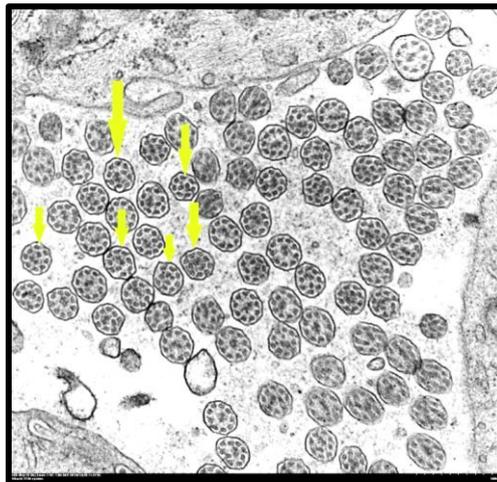


Figura 22. Grupo de secciones ciliares con desorganización de los MT. Puede apreciarse el predominio de una pérdida de organización axonemal. (Micrografía, x88.000)

Otro defecto detectable a mediano aumento es la existencia de cilios compuestos, es decir, un grupo de secciones axonemales delimitadas por una misma membrana ciliar (**Figura 23**). Esta anomalía ciliar corresponde a una alteración secundaria que se da, entre otras causas, cuando existe una infección respiratoria aguda vírica o bacteriana (Dixon y Shoemark, 2017), aunque también pueden aparecer por un defecto en la ciliogénesis (Hagiwara *et al.*, 2000). Los defectos ciliares secundarios que pueden detectarse en una biopsia nasal serán, más tarde, desarrollados junto a los defectos axonemales.

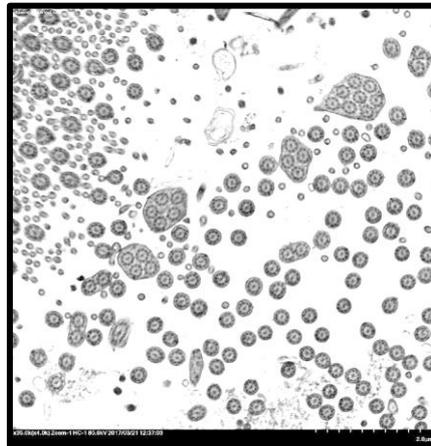


Figura 23. Micrografía de cilios compuestos. Se observan varios axonemas agrupados dentro de una sola membrana ciliar junto a secciones ciliares de disposición normal (Micrografía, x35.000).

1.4.3 Estudio de los axonemas ciliares

Para poder determinar la existencia de un defecto ciliar ultraestructural en la muestra de un paciente en estudio es necesario analizar las secciones ciliares a gran aumento, es decir a partir de x250.000. A esta magnitud se realiza la valoración de los brazos de dineína, que junto con la disposición de los MT nos proporcionará la determinación del defecto existente.

Un axonema de cilio móvil normal presenta 9 pares de MT periféricos, cada uno con un par de brazos de dineína, conectados por los brazos radiales a un par central de MT (patrón 9+2) (**Figura 24**).

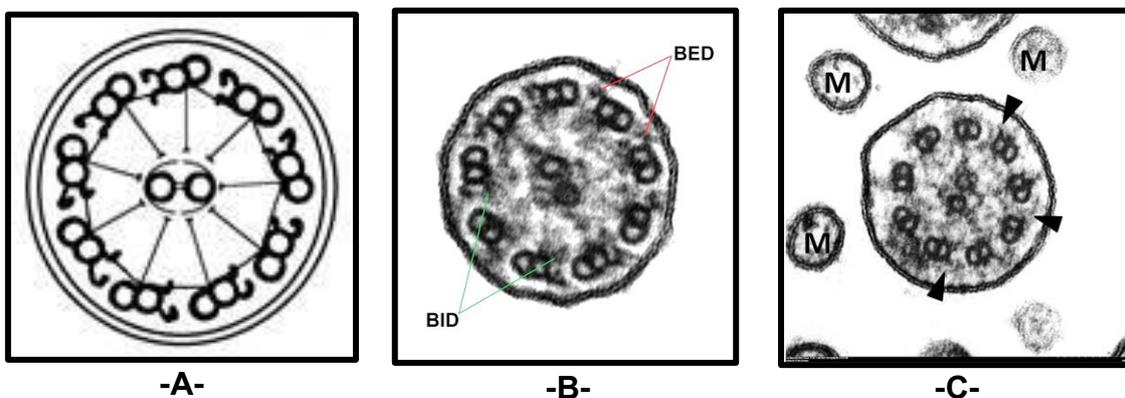


Figura 24- Axonema ciliar (página siguiente)

Figura 24- Axonema ciliar (página anterior) (A) Esquema de una axonema ciliar con todos sus componentes y estructura completa: 9 dobletes periféricos, un par central, brazos radiales y enlaces de nexina; (B) Micrografía de una sección ciliar en la que se aprecian todos los brazos externos de dineína (BED) y alguno interno (BID) (x530.000); (C) Sección a nivel de la base ciliar, la zona del cilio más próxima a la célula. La sección aparece rodeada de secciones de microvilli (M) que envuelven a los cilios en esa zona. En este caso puede observarse además que los brazos externos de dineína (punta de flecha) son de menor tamaño en la mayoría de los dobletes del axonema (x530.000). (Micrografías)

Para el estudio ultraestructural de una muestra ciliar deben tomarse imágenes de un mínimo de 50 secciones ciliares, que en su mayoría serán a nivel del cuerpo ciliar (**Figura 24.B**), aunque también son válidas aquellas secciones cerca de la base (aunque no muy próximas a ella), en las que se distingue un mayor espacio entre el axonema y la membrana ciliar, y aparecen además las secciones de los microvilli de la célula ciliada (**Figura 24.C**). Las secciones de la punta ciliar sin embargo no son adecuadas para el estudio ya que hacia el ápice ciliar los dobletes se vuelven singletes y los brazos de dineína desaparecen (Rautiainen *et al.*, 1984) (**Figura 25**).

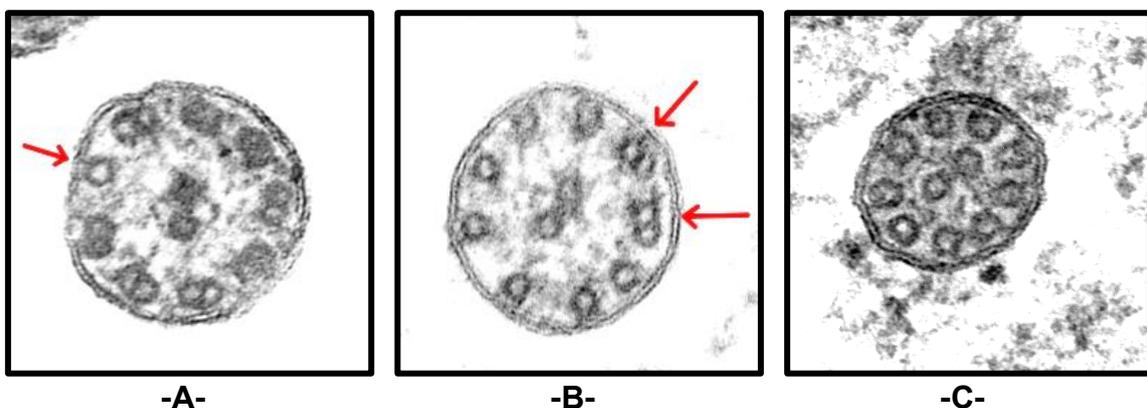


Figura 25. Secciones transversales de la región distal del cilio. (A) Sección ciliar que conserva todos los dobletes periféricos excepto uno que ya es singlete (flecha). (B) Hacia la punta ciliar, los dobletes (flechas) se van sustituyendo por singletes. (C) Sección del ápice ciliar, donde sólo se observan MT sencillos periféricos, sin brazos de dineína, y el par central (Micrografías, x530.000).

De esta forma, del total de células ciliadas que se obtienen mediante el cepillado nasal, se deben estudiar al MET unas 50 células de cada biopsia, con aproximadamente 3000 perfiles ciliares adecuados para un primera valoración general (**Figura 26**). De éstos, unos 300 permiten estudiar la estructura

microtubular, y de éstos, tan sólo el 5% son adecuados para el estudio de los brazos de dineína (Rutland *et al.*, 1982).

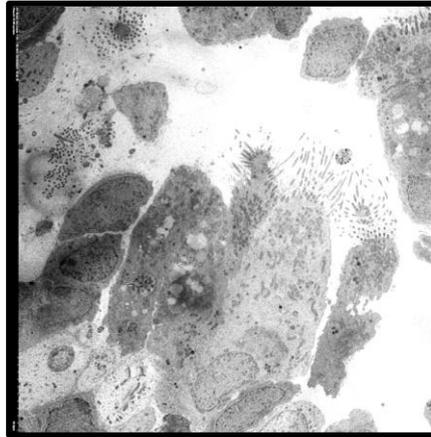


Figura 26. Panorámica de un grupo de células de un raspado nasal. Las células ciliadas pueden mostrar más o menos cantidad de cilios, y éstos pueden encontrarse en diferentes orientaciones. A la izquierda de las células ciliadas, células caliciformes y epiteliales no ciliadas, entre otras (Micrografía, x4.400).

Visualización de los BID

El mayor reto que se plantea al valorar las imágenes de los axonemas ciliares reside en la pobre visualización de los brazos internos, dificultada en parte por el bajo contraste que ofrecen al MET (Ferkol *et al.*, 2006a) y por su distribución asimétrica a lo largo del axonema (Bui *et al.*, 2009). En un individuo sano pueden visualizarse en sus axonemas entre 7 y 9 brazos externos de dineína y tan sólo 3 brazos internos (Knowles *et al.*, 2013), que además por su bajo contraste aparecen difuminados. En la valoración cuantitativa de las secciones ciliares se determina la presencia de los brazos internos por la existencia de una zona ligeramente más electrodensa en la parte interna del MT completo A de los dobletes externos (**Figura 27**).

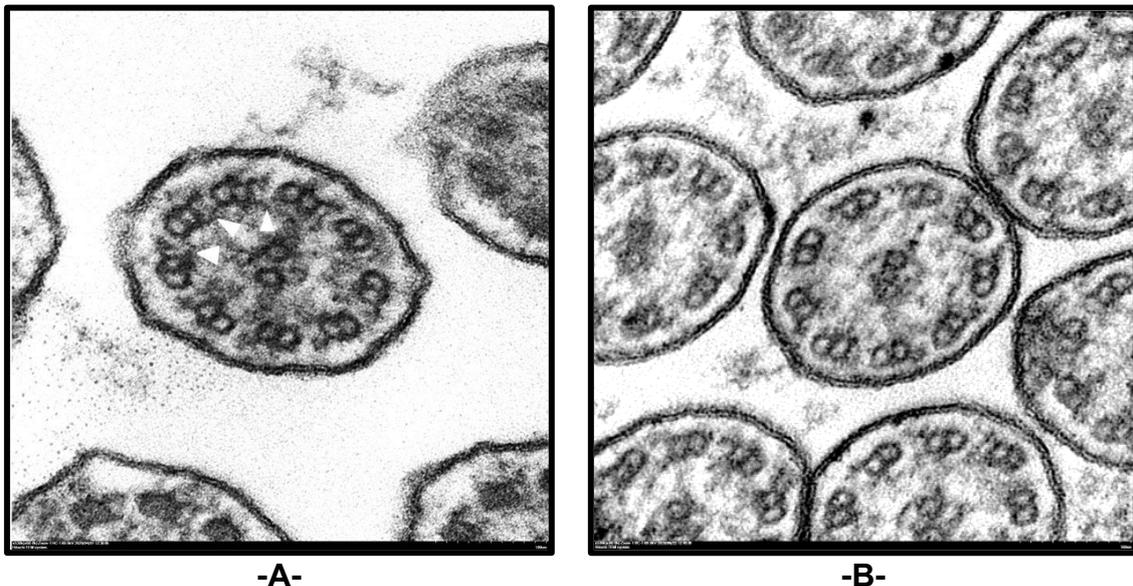


Figura 27. Visualización brazos internos de dineína en axonemas ciliares. (A) Visualización aceptable (punta de flecha). **(B)** La presencia de los brazos internos es cuestionable (Micrografías, x530.000).

En el estudio ultraestructural (UE) para el diagnóstico de la DCP es necesario poder visualizar y valorar adecuadamente los BID, ya que su ausencia forma parte de defectos ultraestructurales diagnósticos, como son la desorganización MT junto con ausencia de BID, o la ausencia combinada de BED y BID. Se han planteado varios métodos de mejora de la imagen obtenida al MET con el fin de determinar de forma más precisa la presencia o ausencia de los brazos internos de dineína en casos dudosos. Estos métodos se basan en la superposición computerizada de imágenes de una misma sección axonemal (Escudier *et al.*, 2002) o en herramientas informáticas de procesamiento de imágenes y métodos de reconocimiento de objetos para reducir el ruido de fondo de la imagen (Funkhouser *et al.*, 2014).

Otro método descrito para aumentar el contraste de los BID es el uso de ácido tánico, un mordiente para los metales pesados que se utilizan en la tinción de los cortes ultrafinos que se estudian en el MET. El ácido tánico mejora la visualización de los brazos de dineína, pero esta mejora debe depender de variables como el procedimiento de procesamiento de la muestra, porque no siempre es eficaz su empleo (Schroeder, 2017).

1.4.4 Defectos ultraestructurales secundarios

Durante el estudio de las muestras para el diagnóstico de DCP es común encontrar defectos ciliares secundarios, es decir, anomalías ultraestructurales que no son causadas por la mutación de un gen ciliar.

Estas alteraciones adquiridas pueden dar lugar a la denominada discinesia ciliar secundaria (DCS), con cambios de movilidad ciliar asociados a una batida ciliar más lenta y desordenada (Demarco *et al.*, 2013). Los cambios ultraestructurales que pueden encontrarse son consecuencia del daño recurrente al epitelio ciliado que producen entre otros, las infecciones respiratorias agudas, de origen vírico o bacteriano, el consumo de tabaco, la contaminación ambiental, o inflamaciones como la rinosinusitis crónica (Dixon y Shoemark, 2017). En el caso de un paciente sospechoso de DCP con una infección respiratoria aguda, se recomienda realizar la toma de la biopsia nasal para el estudio UE al menos 3 semanas después desde el comienzo de la infección, ya que es el tiempo estimado para que el epitelio se recupere (Rautiainen *et al.*, 1992). En caso de una infección de larga duración el tiempo necesario para la recuperación epitelial es mayor, por lo que las alteraciones secundarias pueden aparecer durante meses de evolución (Torkkeli *et al.*, 1997).

Durante el estudio UE de una biopsia nasal con DCS pueden encontrarse estas alteraciones tan sólo en un 5% del total de cilios analizados (Plesec *at al.*, 2008; Demarco *et al.*, 2013), a diferencia de los defectos congénitos que suelen afectar a casi la totalidad de ellos.

En individuos sanos se detectan alteraciones ciliares secundarias en un 4-10% de los cilios estudiados (de longh y Rutland, 1995), porcentaje que además aumenta de forma natural con la edad (Dixon y Shoemark, 2017). Son por tanto un hallazgo a tener en cuenta en el análisis UE de biopsias nasales ya que pueden dificultar el diagnóstico.

Estos cambios secundarios son inespecíficos, transitorios y reversibles, e incluyen entre otros, la formación de cilios compuestos, la desorientación ciliar,

protusiones de la membrana ciliar y alteraciones microtubulares, pero también pueden encontrarse ausencia de los brazos de dineína, desorganización de los MT y adiciones y deleciones (Dixon y Shoemark, 2017) (**Figura 28**).

Los cilios compuestos están constituidos por un grupo de varias estructuras axonemales englobadas por una misma membrana ciliar (**Figura 28.A y B**). Este tipo de cilios compuestos se clasifican como de tipo I cuando se forman por la fusión de membranas ciliares en presencia de agentes irritantes (Carson *et al.*, 1987), y como tipo II cuando se produce un defecto en la ciliogénesis a consecuencia de una infección respiratoria aguda (Hagiwara *et al.*, 2000).

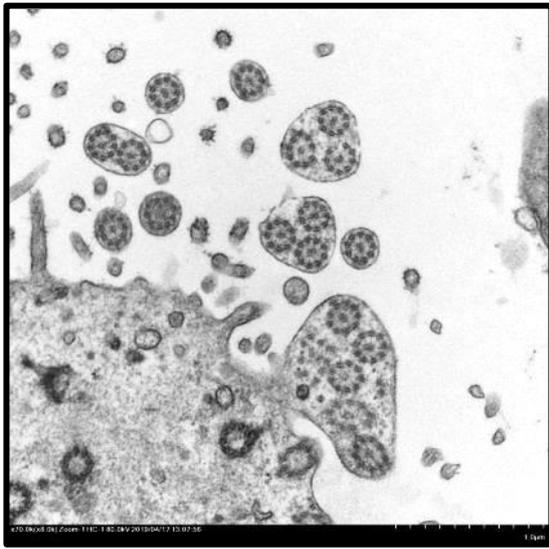
Se determina que existe desorientación ciliar (**Figura 28.C**) cuando el ángulo que forma el eje de un cilio (línea que atraviesa los MT centrales) con respecto al eje de orientación del resto de cilios de una misma célula es superior a 20° (de Longh y Rutland, 1989; Roomans *et al.*, 2006). Aunque esta variación en la orientación ciliar fue postulada en un principio como causa única de DCP (Rayner *et al.*, 1996), si bien hoy se considera como un cambio adicional a los ya existentes, que aparece como consecuencia de la inmovilidad ciliar y cuando se da una gran proporción de cambios ciliares secundarios (Jorissen y Willems, 2004).

Dentro del grupo de alteraciones microtubulares se describen varios defectos (**Figura 28.E-G**), como la adición o deleción de MT, ya sea periféricos o centrales, o la ausencia de dobletes externos entre otros. Se describe además la desorganización de los MT e incluso la ausencia del par central, defectos que se consideran secundarios siempre y cuando la proporción de secciones ciliares alteradas y el análisis de la movilidad ciliar no indiquen un defecto mayor (Stannard *et al.*, 2004).

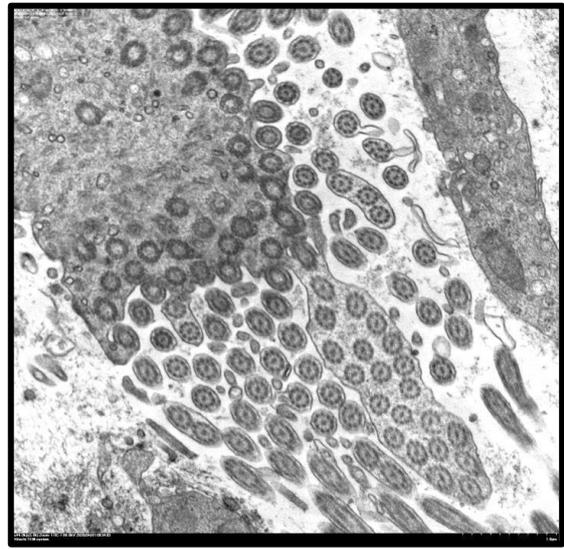
Un método eficaz para reducir las alteraciones secundarias que aparecen por daño epitelial, consiste en realizar el análisis UE tras el cultivo de células epiteliales respiratorias procedentes de la biopsia original (Jorissen *et al.*, 2000b; Hirst *et al.*, 2010). De esta forma, tras la ciliogénesis en cultivo las anomalías secundarias están prácticamente ausentes, lo cual facilita el estudio

y el diagnóstico ultraestructural de las biopsias, sobre todo en casos que imitan defectos primarios, como son la ausencia del par central y la desorganización de los MT (Jorissen *et al.*, 2000a).

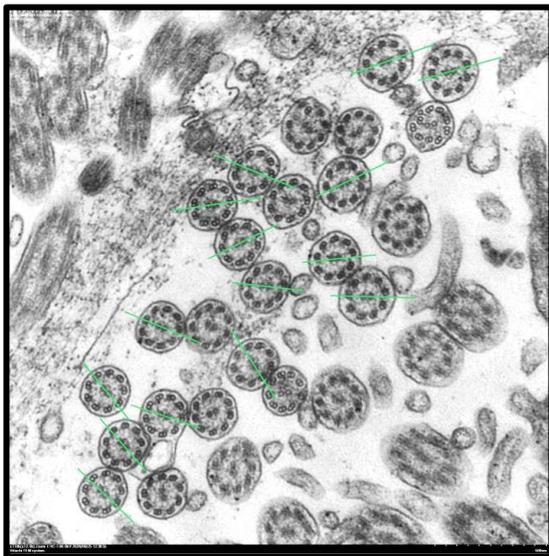
Figura 28. Ejemplos de defectos ciliares secundarios. (*Página siguiente*) **(A)** Cilios compuestos. Zona apical de una célula ciliada con 4 grupos de axonemas rodeados por la misma membrana, junto a axonemas normales (x70.000); **(B)** Cilio compuesto que emerge de célula ciliada. Consta de 21 axonemas rodeados por una sola membrana ciliar (x44.000); **(C)** Desorientación ciliar. Se determina la variación de los ejes ciliares de una misma célula entre sí (x110.000); **(D)** Protusión de la membrana ciliar. Se da sobre todo en infecciones respiratorias agudas (x530.000); **(E)** Sección ciliar con dos MT centrales adicionales (x530.000); **(F)** Sección ciliar con delección de un doblete periférico (x530.000); **(G)** Secciones ciliares con MT periféricos adicionales (x530.000). (Micrografías).



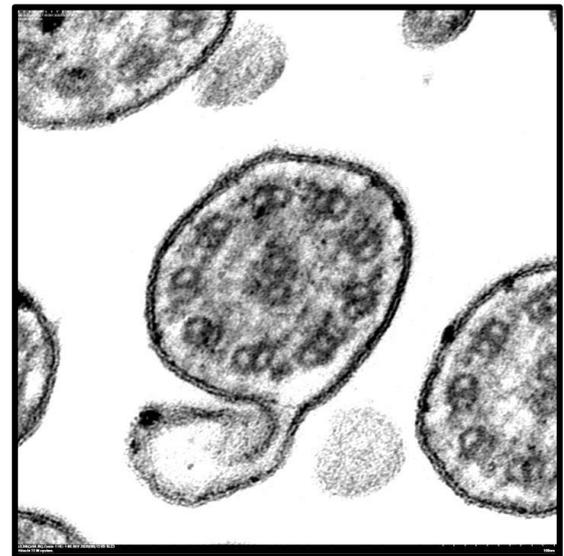
-A-



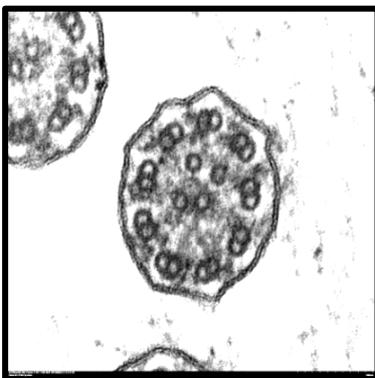
-B-



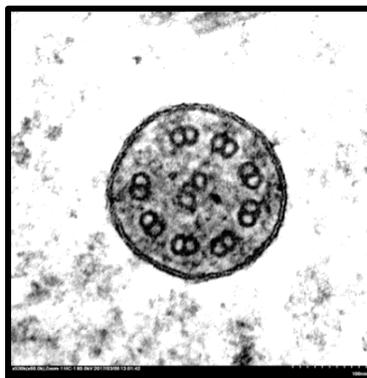
-C-



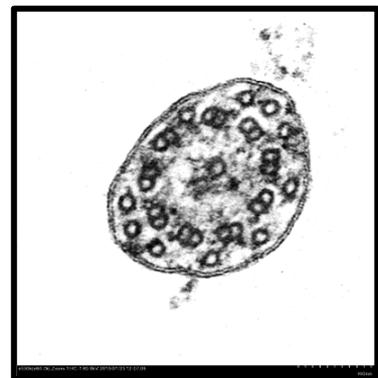
-D-



-E-



-F-



-G-

Figura 28. Ejemplos de defectos ciliares secundarios (página anterior).

1.5 Defectos ultraestructurales de la DCP

Se han identificado más de 40 genes causantes de DCP cuya mutación ocasiona alteraciones en la biogénesis, estructura y función ciliar. En la mayoría de los casos de DCP, esas mutaciones se reflejan en una serie de defectos ultraestructurales específicos que pueden determinarse mediante MET.

Los defectos ultraestructurales que se valoran en el análisis de las secciones ciliares para el diagnóstico de la DCP son los siguientes:

- Ausencia total o parcial de los BED
- Ausencia combinada de BID y BED
- Desorganización de MT y ausencia de BID
- Defecto del CC: ausencia del par central con o sin transposición de un doblete periférico
- Localización errónea de los cuerpos basales con oligocilia o ausencia de cilios

1.5.1 Ausencia total o parcial de los BED

Es el defecto ultraestructural que más frecuentemente se detecta en la DCP (Carlen y Stenram, 2005; Noone *et al.*, 2004).

Las secciones ciliares se caracterizan, en el caso de la ausencia total de los BED, por la ausencia completa de toda la estructura de los BED (**Figura 29.A**), y en el caso de la ausencia parcial, por la ausencia de gran parte de la estructura que conforma los brazos externos, lo que también se conoce como “brazos cortos” (**Figura 29.B**).

Los BED se encuentran anclados a la parte exterior de los dobletes periféricos, y son los responsables de generar la fuerza mecánica principal que se requiere para producir el doblamiento del cilio.

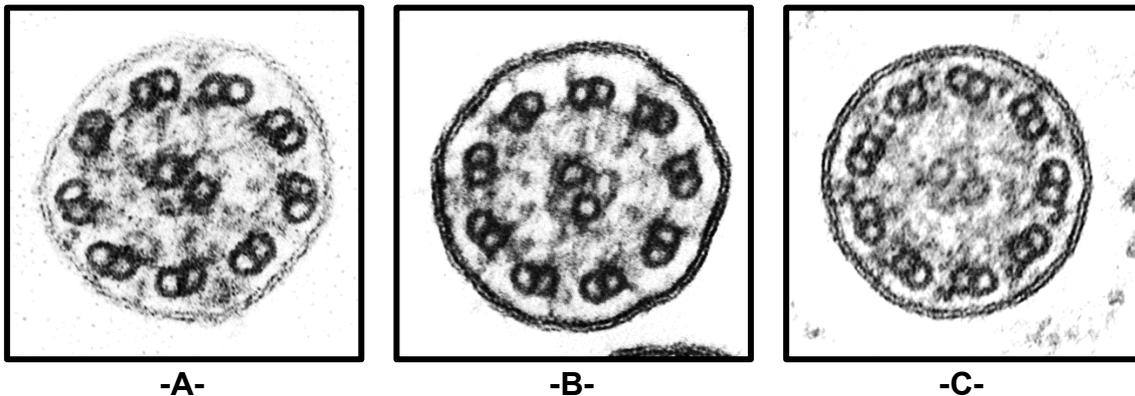


Figura 29. Ausencia total o parcial de los BED. (A) Sección ciliar con ausencia de toda la estructura de los BED. En los dobletes externos se distingue el perfil externo de los MT de manera nítida. (B) Sección ciliar con ausencia parcial de los BED o brazos externos cortos. En la parte externa de los dobletes se observa una zona más electrodensa que corresponde con parte de la estructura de los brazos externos. (C) Sección ciliar sin defectos axonemales (Micrografías, x530.000).

Las mutaciones que pueden afectar a la estructura de los BED y por tanto generar un defecto ultraestructural detectable por MET son aquellas que afectan a los genes que codifican las subunidades que componen su estructura (*DNAH5*, *DNAH9*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *NME8*) y las proteínas que forman parte del complejo de anclaje de los BED a los dobletes periféricos (*CCDC114*, *ARMC4*, *CCDC151*, *TTC25*, *CCDC103*, *LRRC56*, *MNS1*) (Poprzeczko *et al.*, 2019). En el análisis de la movilidad, la ausencia total o parcial de los BED se refleja en unos cilios inmóviles o con un movimiento residual muy rígido (Olbrich *et al.*, 2002). Este grupo de proteínas constituye la base genética de la mayoría de casos de DCP.

En el caso de la mutación de *DNAH9*, la ausencia de los BED se detecta en aquellas secciones ciliares que correspondan con la parte distal del cilio, ya que es ahí donde se localiza la proteína *DNAH9*. Por esta razón, en el estudio UE se detectará este defecto en menos del 50% de las secciones ciliares. El análisis de la movilidad detecta sólo una alteración sutil de la batida ciliar, por lo que los pacientes que portan esta mutación manifiestan una clínica más leve (Loges *et al.*, 2018).

Este defecto ultraestructural limitado a la zona distal del cilio también ocurre cuando la mutación se da en *CCDC103*. En las biopsias ciliares de los pacientes con esta mutación, el análisis de la movilidad ciliar muestra varios patrones, que van desde cilios móviles, con amplitud reducida o pérdida de coordinación, hasta la inmovilidad ciliar total (Panizzi *et al.*, 2012).

1.4.2 Ausencia combinada de BID y BED

Las secciones ciliares con este defecto ultraestructural muestran los perfiles de los dobletes periféricos nítidos en toda su circunferencia, sin zonas electrodensas que puedan cuestionar la presencia de brazos de dineína tanto externos como internos (**Figura 30**).

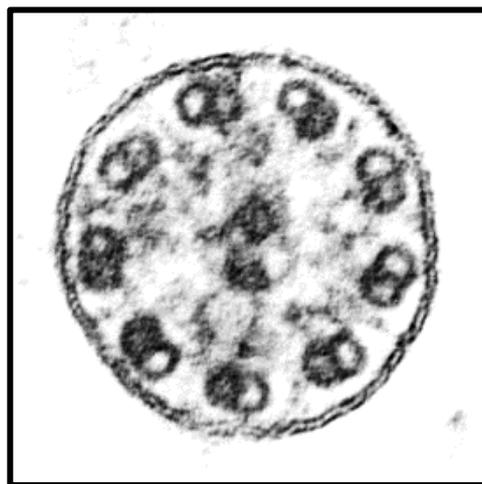


Figura 30. Sección ciliar con ausencia de brazos internos y externos de dineína. (Micrografía, x530.000)

Los componentes estructurales de los brazos de dineína son sintetizados y preensamblados en el citoplasma para su posterior transporte desde la célula hasta su lugar de anclaje en el axonema ciliar, por lo que la mutación en los genes que codifican para las proteínas que intervienen en los procesos de preensamblaje citoplasmático resultará en defectos tanto de los brazos internos de dineína como los externos.

Estas proteínas son los llamados *Factores de ensamblaje de las dineínas axonemales* (DNAAF): *DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DNAAF4* (*DYX1C1*), *DNAAF5* (*HEATR2*), *LRRC6*, *ZMYND10*, *SPAG1*, *C21ORF59*, *DNAAF6* (*PIH1D3*) y *CFAP300* (*C11orf70*).

Dada la ausencia de los brazos de dineína, muchas de estas mutaciones muestran cilios inmóviles en el estudio HSVA, o con movimientos muy rígidos de poca amplitud (Chilvers *et al.*, 2003). En el caso de *DNAAF2* y *DNAAF4* puede observarse cierta movilidad residual debido a una ensamblaje parcial de los brazos de dineína (Lucas *et al.*, 2020).

1.5.3 Desorganización de MT y ausencia de BID

Este defecto axonemal se compone de la ausencia de los BID acompañada de una desorganización de la disposición de los MT 9 + 2 (**Figura 31**). Esta desorganización se expresa de forma variable en el total de secciones ciliares estudiadas. Se estima que al menos un 12% de todos los casos DCP poseen este defecto UE (Chilvers *et al.*, 2003; Shoemark *et al.*, 2012; Papon *et al.*, 2010).

En el estudio UE se detecta la ausencia de los BID asociada con una variedad de disposiciones microtubulares dentro de una misma muestra ciliar, como son uno o varios dobletes periféricos mal colocados con desplazamiento del par central (**Figura 31.B y C**), desplazamiento de un doblete periférico al centro (**Figura 31.E**), desorganización de los dobletes con ausencia del par central (**Figura 31.F y G**) y transposición de uno de los dobletes a posición central (**Figura 31.H**)

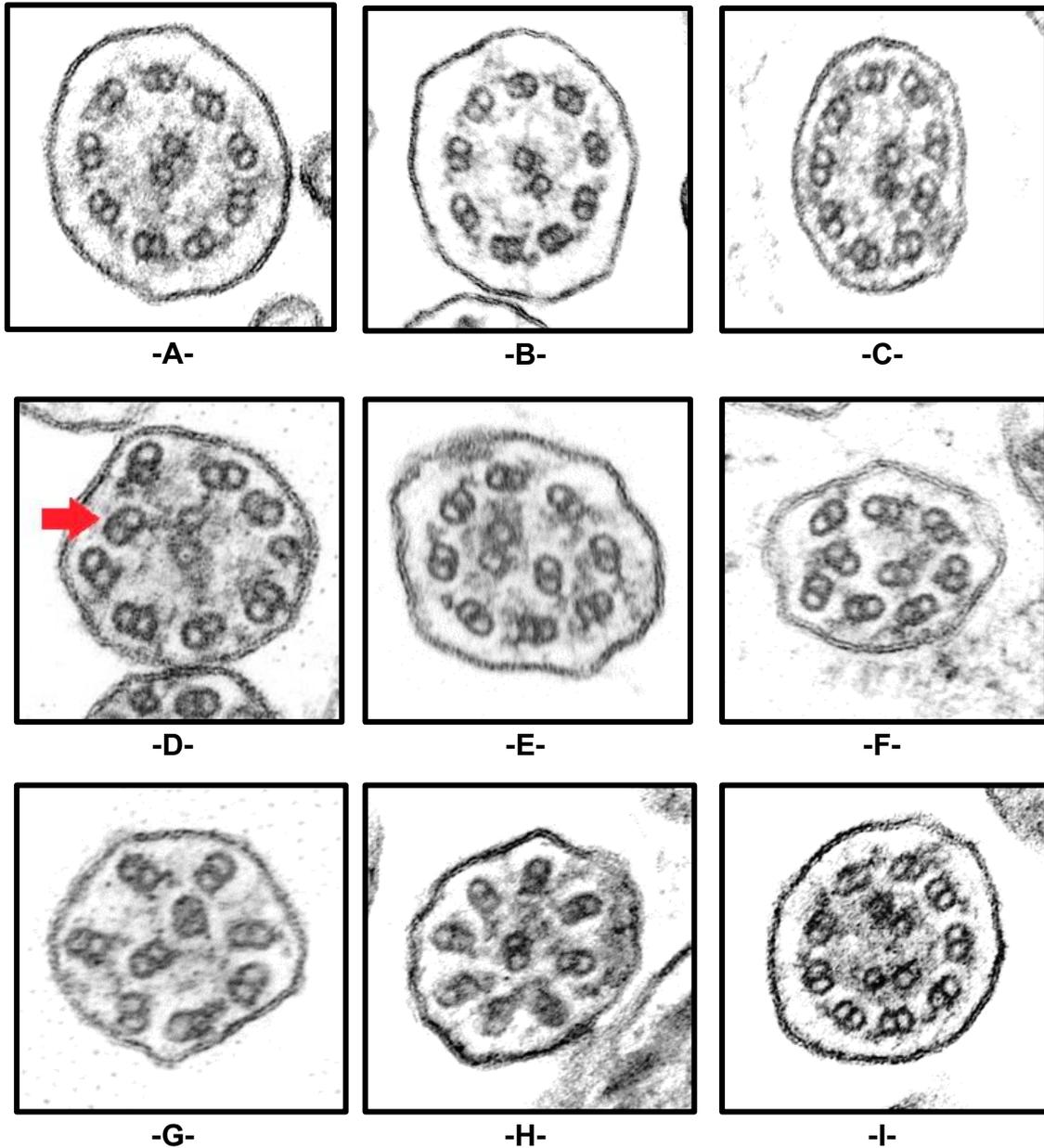


Figura 31. Secciones ciliares de pacientes con distintos niveles de desorganización MT combinado con ausencia de los BID. Puede observarse la ausencia de los brazos internos de dineína en todas las secciones ciliares, asociada con una variedad de otros defectos heterogéneos: ausencia de los BID sin desorganización aparente (A), desplazamiento del par central (B y C), desorganización axonemal con dobletes periféricos mal localizados asociado con un desplazamiento del par central (flecha) (D), desplazamiento de unos de los dobletes periféricos al centro (E), desorganización axonemal con ausencia del par central (F y G), transposición de un doblete periférico a posición central (H), y pares centrales supernumerarios (I). (Micrografías, x530.000)

Las proteínas *CCDC39* y *CCDC40* son las responsables de la correcta disposición de los elementos que constituyen la unidad de repetición axonemal cada 96nm, a lo largo del axonema ciliar (BID, brazos radiales y CRN-D), y su mutación origina la pérdida de los complejos BID y CRN-D, lo cual se refleja ultraestructuralmente en la ausencia de los BID (Antony *et al.*, 2013). La desorganización de los MT ciliares es probablemente un efecto secundario como consecuencia del defecto en los CRN-D y los brazos radiales (Poprezcko *et al.*, 2019).

En el análisis de la movilidad se detecta una movilidad ciliar residual que puede explicarse por la actividad de los brazos externos de dineína presentes, con cilios rígidos que muestran una amplitud reducida junto a cilios inmóviles (Chilvers *et al.*, 2003).

1.5.4 Desorganización de MT

Se distingue del defecto anterior porque en este caso no se detecta una desorganización MT patente, sino un desalineamiento sutil de los dobletes periféricos, que además se produce en una pequeña proporción de las secciones ciliares estudiadas (un 25%), y no se detecta ausencia de los BID. Este defecto ultraestructural se produce en caso de mutación de alguna de las proteínas que conforman el CRN-D, como son *CCDC164*, *CCDC65* y *GAS8*. La movilidad ciliar puede mostrar una batida ciliar de mayor frecuencia, con amplitud ligeramente reducida, con cilios rígidos e hipercinéticos (Wirschell *et al.*, 2013; Horani *et al.*, 2013), y en el caso de mutación en *GAS8* puede detectarse una movilidad ciliar normal (Olbrich *et al.*, 2015).

1.5.5. Defecto del CC

Las secciones ciliares con este defecto muestran ausencia de uno o ambos MT centrales (disposición 9+1 y 9+0), en una proporción de alrededor del 20% del total de secciones estudiadas al MET (**Figura 32.A y B**). También pueden detectarse axonemas con pares centrales dobles (disposición 9+4),

translocación de un doblete periférico a la región central (disposición 8+1) (**Figura 32.C**) y cierta desorganización MT.

Estos defectos axonemales vienen dados por la mutación en los genes que codifican las proteínas de los brazos radiales *RSPH1*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *RSPH3*, y *DNAJB13* (El Khouri *et al.*, 2016; Onoufriadis *et al.*, 2014; Castleman *et al.*, 2009).

El análisis de la movilidad ciliar puede mostrar una frecuencia y amplitud reducida, y un patrón de batida rotatorio (Chilvers *et al.*, 2003).

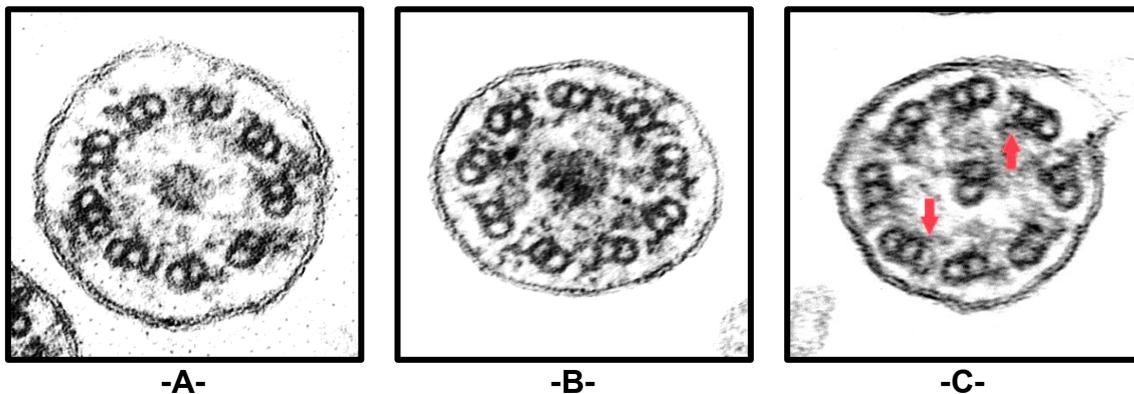


Figura 32. Defecto en los brazos radiales. (A y B) Secciones ciliares con ausencia del par central. Queda una zona electrodensa en su lugar. (C) Defecto de transposición: un doblete periférico se desplaza para sustituir el par central ausente. Nótese la presencia de los BID (flechas). (Micrografía, x530.000)

La translocación de uno de los dobletes periféricos a la posición central se produce en la región media de los cilios, probablemente para compensar la ausencia del par central (Bautista Harris *et al.*, 2000). Es por esto que en el estudio UE la proporción de axonemas 9+0 y 8+1 detectados depende de la procedencia de la sección ciliar, correspondiendo la disposición 9+0 (ausencia del par central) en su mayoría a la región proximal mientras que 8+1(translocación) prevalece en la región distal (Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

1.5.6 Localización errónea de los cuerpos basales con oligocilia o ausencia de cilios

En ocasiones, la biopsia nasal de un paciente con sospecha de DCP no muestra cilios, o muestra muy poca cantidad, lo cual puede deberse a que la biopsia nasal esté formada por células epiteliales no ciliadas (principalmente células intermedias), o que presente células ciliadas pero el paciente tenga una capacidad reducida de generar múltiples cilios móviles. Este trastorno se produce por la mutación en *MCIDAS* y *CCNO*, y ha sido propuesto como una entidad nueva, denominada “trastorno congénito del aclaramiento mucociliar con generación reducida de múltiples cilios móviles” (RGMC) (Wallmeier *et al.*, 2015). Un número reducido de cilios requiere de un análisis detallado de las células epiteliales ciliadas, en especial de su zona apical.

Cuando se da la mutación en *MCIDAS*, en el análisis UE de la biopsia nasal resulta difícil encontrar secciones ciliares para estudiar los axonemas. El estudio se centra entonces en las células ciliadas, ya que *MCIDAS* se describe como un importante regulador de la ciliogénesis, y su mutación genera un reducido número de cuerpos basales y algunos de ellos no están acoplados a la superficie apical de la célula.

De esta forma, en el análisis UE encontraremos células epiteliales desprovistas de cilios o tal vez unos pocos. Además, los cilios ensamblados son inmóviles y carecen de proteínas ciliares clave como *CCDC39* y *DNAH5*, de forma que este defecto podría clasificarse como una nueva variante de DCP (Boon *et al.*, 2014a).

CCNO por su parte es responsable de la amplificación de los cuerpos basales durante la ciliogénesis y de su posterior acoplamiento a la membrana, por lo que su mutación da como resultado un número muy reducido de cilios en las células ciliadas. En el estudio UE encontramos poca cantidad de cilios, y cuerpos basales mal localizados en el citoplasma. Los cilios residuales presentan una ultraestructura normal y su análisis de movilidad ciliar muestra un patrón de batida ciliar conservado (Wallmeier *et al.*, 2014).

1.5.7 Formas específicas de DCP con ultraestructura normal

En el estudio UE de una biopsia nasal de un paciente sospechoso de padecer DCP puede en ocasiones concluirse la ausencia de defectos ultraestructurales en sus axonemas ciliares, lo cual no excluye de forma categórica el diagnóstico de DCP ya que aproximadamente un 30% de los pacientes con DCP presentan una ultraestructura ciliar normal (Leigh, 2011; Boon, 2014b). Estos fenotipos sin defectos ultraestructurales detectables por MET se producen por la mutación de varios genes –de una creciente lista- que han sido determinados como causantes de DCP, como son:

-*STK36*, una proteína necesaria para la formación del par central y la orientación de los cilios (Edelbusch *et al.*, 2017)

-*HYDIN*, que forma parte de la proyección C2b del complejo central (Olbrich *et al.*, 2012),

-*GAS2L2*, una proteína localizada en los cuerpos basales, y cuya mutación produce la desorientación de éstos y una batida ciliar desordenada (Bustamante-Marin *et al.*, 2019),

-*LRRC56*, que forma parte del sistema IFT (Bonneyoy *et al.*, 2018).

-*DNAH11*, que codifica una cadena pesada de los brazos externos de dineína en la zona proximal del cilio. Se estima que la mutación en *DNAH11* es la causa de un 6-9% de los casos DCP, y se corresponde con el 22-72% de los casos de DCP con ultraestructura normal (Knowles *et al.*, 2012).

II. Justificación del estudio

La confirmación de un diagnóstico de presunción de una DCP constituye un desafío, ya que los cambios mutacionales genéticos - que subyacen en este trastorno - en los genes codificantes de más de 250 proteínas que constituyen el axonema ciliar, dan lugar a diferentes fenotipos clínicos y ciliares. Por esta razón, no existe en el momento actual una única prueba diagnóstica que pueda ser considerada el estándar de oro para detectar todas las formas conocidas en las que se presenta la DCP. Por ello actualmente, el diagnóstico certero de la DCP requiere de la realización concurrente de varias pruebas técnicamente exigentes, entre las que se incluyen el análisis de la movilidad ciliar mediante vídeomicroscopía de alta resolución y alta velocidad, la medición del óxido nítrico nasal exhalado, el estudio de proteínas ciliares mediante inmunofluorescencia, el estudio genético y el análisis de la ultraestructura axonemal mediante microscopía electrónica de transmisión.

Históricamente, la microscopía electrónica de transmisión ha sido la herramienta fundamental en el diagnóstico de la DCP, permitiendo describir los defectos ultraestructurales axonemales, causantes de alteraciones en la movilidad ciliar. Sin embargo, el avance en las técnicas del diagnóstico genético y molecular, ligadas fundamentalmente a la tecnología de secuenciación masiva, ha permitido el conocimiento de formas de DCP que presentan una morfología ultraestructural ciliar normal o bien de carácter no diagnóstico, hasta el punto de estimarse que el 30% de los pacientes con DCP no muestran defectos ultraestructurales ciliares, al menos conocidos. Por contrapartida los cambios mutacionales de los 40 genes actualmente conocidos como posibles causantes de DCP explican tan solo el 65-70% de los casos considerados como DCP. Por lo tanto, más de una cuarta parte de los pacientes aún no disponen de una causa genética establecida de forma definitiva.

Gran parte de los avances más substanciales en el conocimiento de la DCP han surgido de estudios previos de correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo y fenotipo ciliar en ciertos subtipos de DCP. Estos estudios, sin duda, continúan siendo necesarios para una mejor comprensión de la patogénesis de

la DCP, que permita resolver la problemática diagnóstica de carácter ambivalente que antes mencionábamos, desde la perspectiva ultraestructural y genética.

Muy probablemente en un futuro próximo los avances en el campo de la genética, y el descubrimiento de nuevos genes asociados a la DCP, generará la necesidad de una nueva caracterización diagnóstica de esos pacientes, es decir, será preciso redefinir, entre otros, los defectos de movilidad y de ultraestructura ciliar para establecer nuevos parámetros diagnósticos, que hoy desconocemos.

Los defectos ciliares, por otra parte, a menudo son muy sutiles y pueden ser difíciles de detectar, planteándose la necesidad de llevar a cabo un estudio detallado de las alteraciones ultraestructurales que pueden encontrarse en pacientes con DCP, incluyendo aquellas de significado desconocido.

De este modo ambas vías de estudio, junto con el establecer correlaciones entre el fenotipo clínico, el genotipo, la movilidad ciliar y los defectos ultraestructurales (tanto los de carácter predominante como los de significado desconocido) podrían proporcionar más información sobre la patogénesis de este trastorno.

Así pues, el objetivo principal de este proyecto consiste en poner en valor el papel de la MET como método diagnóstico de la DCP y su contribución a una mejor comprensión de la fisiopatología de la DCP.

Por todo ello, en este proyecto planteamos realizar un exhaustivo estudio ultraestructural de biopsias nasales de pacientes con sospecha clínica de DCP determinando el defecto predominante, si lo hubiere, pero también describiendo otros hallazgos ultraestructurales de significado aún desconocido, para establecer posibles correlaciones de los defectos encontrados con el genotipo, la movilidad ciliar y las manifestaciones clínicas. Así mismo se llevara a cabo una revisión de todos los datos clínicos y de pruebas diagnósticas de todos los pacientes abordados, buscando la adecuada correlación estadística que nos permita alcanzar resultados válidos, como base de certeras conclusiones.

El conjunto de datos generado a partir de este tipo de estudio permitirá la categorización de los pacientes por defecto estructural ciliar y, por lo tanto, facilitará los estudios paralelos que surgen con cada nuevo gen DCP descubierto.

III. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Los defectos axonemales que se producen por la mutación de alguno de los genes DCP conocidos causan alteraciones en el patrón de movilidad ciliar y por tanto se dificulta el aclaramiento mucociliar de las vías aéreas. Por esta razón, cabe esperar que puedan existir asociaciones entre el fenotipo morfológico y funcional ciliar, el genotipo y las manifestaciones clínicas en cada subtipo de DCP.

Objetivos

Los principales objetivos de nuestro estudio son:

1. Evaluar la eficacia diagnóstica de la microscopía electrónica de transmisión en una amplia muestra de pacientes con sospecha clínica de DCP
2. Identificar asociaciones entre los defectos ultraestructurales, la movilidad ciliar y el genotipo con respecto al fenotipo clínico de los pacientes con DCP.

Para ello, los objetivos secundarios que se plantean son:

- Detectar alteraciones ciliares a nivel ultraestructural en las biopsias nasales de pacientes con sospecha de padecer DCP, concretadas en detectar defectos en los brazos de dineína, desorganización de microtúbulos, defectos secundarios, así como en la posible detección de alteraciones de significado actualmente desconocido.
- Determinar la viabilidad del estudio mediante microscopía electrónica de transmisión de las biopsias nasales.
- Analizar las alteraciones ultraestructurales no ciliares de las biopsias nasales presentes en los pacientes con sospecha de DCP.

IV. Material y métodos

4.1 Diseño del estudio

Estudio unicéntrico observacional de cohortes en pacientes con sospecha clínica de discinesia ciliar primaria. Se realizará un estudio ultraestructural de las biopsias nasales de estos pacientes para establecer posibles correlaciones de los defectos ultraestructurales encontrados con el genotipo, la movilidad ciliar y las manifestaciones clínicas. Se realizará el estudio ultraestructural en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, a partir de biopsias nasales de los sujetos de estudio procedentes del Servicio de Otorrinolaringología (ORL) del Hospital La fe de Valencia, entre los años 2018 y 2021.

Se revisarán los historiales clínicos mediante el visor de historias clínicas MIZAR 4.0 y se recogerán aquellos datos relevantes para el estudio.

Se incluirán todos aquellos pacientes remitidos al servicio de ORL, tanto adultos como pediátricos, con manifestaciones clínicas predictivas de DCP a los que se les haya realizado estudio de movilidad ciliar y estudio genético. Se excluirán aquellos con pruebas diagnósticas de resultados incompletos o no concluyentes.

Se recogerán en todos los pacientes del estudio las siguientes variables:

-Datos personales: edad y sexo (hombre/mujer)

-Características clínicas sugestivas o compatibles con DCP (sí/no): distrés respiratorio neonatal, rinorrea habitual mucopurulenta, tos productiva crónica, otitis de repetición, neumonía, bronquiectasia, atelectasia, inicio precoz de la clínica (desde el nacimiento o los primeros meses), evolución perenne de la misma.

-Resultado de pruebas diagnósticas: Estudio ultraestructural de biopsias nasales mediante MET, análisis de la actividad ciliar mediante video-microscopía de alta resolución y alta velocidad, y estudio genético.

4.2 Pacientes

4.2.1 Aspectos éticos

Este proyecto de investigación se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo en el Servicio de Otorrinolaringología del mismo hospital.

El proyecto cuenta con la aprobación de los Comités de Ética e Investigación del IIS La Fe (nº referencia: 2021-278-1, Anexo 1). Los participantes fueron informados sobre el proyecto, y firmaron el consentimiento (Anexo 1). Este consentimiento fue firmado por los representantes legales de los menores participantes.

4.2.2 Recogida de datos clínicos

Para la recogida de datos clínicos se revisaron los historiales clínicos mediante el visor de historias clínicas MIZAR 4.0 y se recogieron aquellos datos relevantes para el estudio.

La información se introdujo en una hoja de recogida de datos, donde se registraron los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, sexo, edad de comienzo de la clínica (años), problemas de fertilidad, antecedentes familiares de DCP o rinosinusitis crónica o bronquiectasias, y datos referentes a la situación clínico-patológica de los pacientes: presencia de tos productiva crónica, rinorrea mucopurulenta, atelectasias, bronquiectasias, asma, otitis, neumonías y defectos de lateralidad. Se estableció un índice de clínica compatible (ICC) correspondiente al % de síntomas compatibles respecto del total de síntomas del listado antes descrito, y obtenido mediante un sistema de puntuación adjudicando a cada síntoma compatible un punto.

Se incluyeron además los resultados obtenidos en las tres pruebas diagnósticas realizadas: el análisis de la movilidad ciliar mediante

videomicroscopía de alta resolución y alta velocidad, el estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica de transmisión, así como el estudio genético.

4.3 Análisis de la movilidad ciliar mediante videomicroscopía de alta resolución y alta velocidad

4.3.1 Toma de muestra

Para el estudio de la movilidad ciliar se obtuvieron células del epitelio nasal de los pacientes sospechosos de DCP mediante curetaje nasal. La cureta se introducía en la nariz del paciente, realizando un raspado superficial del cornete nasal medio. A continuación la muestra se sumergía en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), reconstituido con FBS 10%, L-glutamina y anfotericina B al 1%, y se trasladaba inmediatamente al laboratorio.

4.3.2 Visualización microscópica de la muestra

El estudio al vídeo-microscopio se realizaba entre 30 minutos y en un máximo de 3 horas tras la toma de las muestras. Una vez en el laboratorio la muestra se agitaba suavemente con una pipeta y se aplicaban 100 μ L sobre un porta gelatinizado.

Las muestras se visualizaron a temperatura ambiente (25°C) mediante un microscopio invertido Leica DMI3000B (Leica, Alemania) (**Figura 33**), utilizando una lente de objetivo de 63x que proporciona un aumento total de x630. Tras una revisión de la muestra se seleccionaron preferiblemente imágenes de células ciliadas aisladas, libres de moco y células no ciliadas, para obtener imágenes del movimiento de los cilios sin interferencias y poder realizar las mediciones.



Figura 33. Visualización microscópica de la muestra. La biopsia nasal en medio DMEM es estudiada mediante un microscopio invertido conectado a un ordenador con software específico para la grabación de imágenes.

4.3.3 Grabación del cilio

Las imágenes se registraron utilizando una cámara de vídeo digital Basler acA1300-200um con sensor CMOS ON Semiconductor PYTHON 1300 (Basler AG, Alemania) acoplada al microscopio.

Todas las grabaciones y el procesamiento de imágenes se realizaron con el sistema Sisson-Ammons Video Analysis (SAVA) (Sisson *et al.*, 2003) (**Figura 34**).

Se visualizaron grupos de células, descartando células aisladas, realizando el estudio del patrón de batida desde tres planos de visión: desde arriba, con la batida hacia el observador, y desde un lateral. Las imágenes se capturaron inicialmente en tiempo real a 203 fps (fotogramas por segundo) y se grabaron aproximadamente 3 segundos de vídeo para cada imagen.

Una vez grabados, los videoclips de cada paciente se reprodujeron en tiempo normal y a cámara lenta (hasta 1/8 de velocidad) para evaluar la calidad y analizar la frecuencia y el patrón de la batida ciliar.

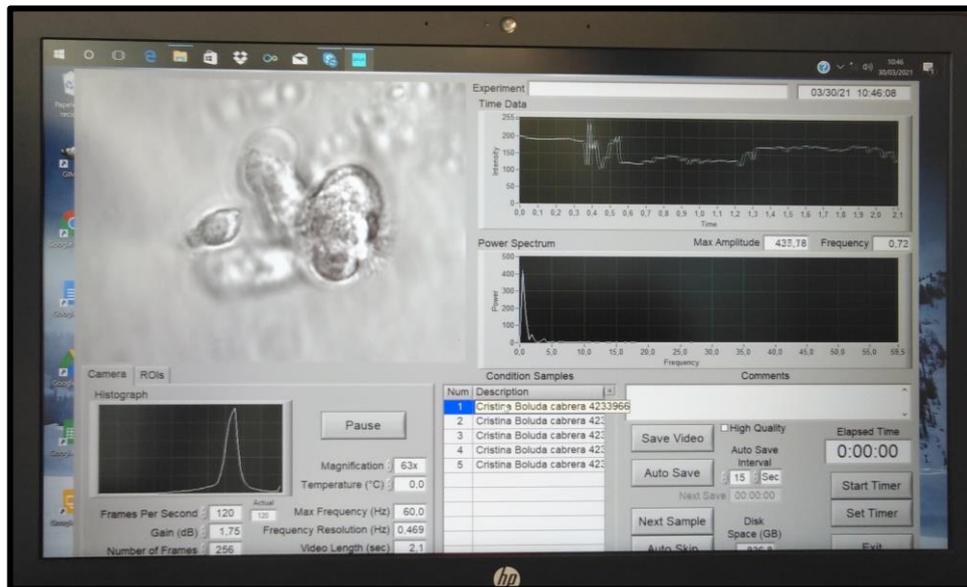


Figura 34. Imagen de la interfaz del software SAVA. A la izquierda ofrece la imagen en movimiento de las células de la muestra, junto con los datos y gráficas de la frecuencia de batida ciliar a la derecha.

4.3.4 Análisis de la movilidad

Para determinar el patrón de batida ciliar, se consideraron 4 modos diferentes de batida:

- Patrón de batida ciliar normal: Los cilios baten generalmente en un plano, con pequeñas desviaciones del eje longitudinal, generando un movimiento planar en dos fases diferenciadas y coordinadas: golpe efectivo y golpe de recuperación.
- Inmovilidad ciliar: Se detectan grandes áreas de cilios inmóviles. Cuando se observa movimiento ciliar, se describe como parpadeante lento, corto y rígido; lo denominamos también como movilidad residual.
- Patrón coordinado y rígido de batida ciliar: Se detecta una amplitud notablemente reducida de la batida ciliar.
- Patrón incoordinado vibrátil y rígido de batida ciliar: Los cilios baten en fases no metacrónicas.

Consideramos como patrón de movimiento vibrátil cuando la amplitud de batida ciliar está disminuida e incoordinado cuando los cilios baten en fases no metacrónicas.

Otros signos indirectos de actividad ciliar efectiva que fueron observados son el test de rotación celular (una célula ciliada girará sobre sí misma por el efecto de la batida ciliar) y test de arrastre (la batida ciliar efectiva arrastra a la célula ciliada en el campo de visión). Sin embargo, en algunas mutaciones estos signos indirectos de actividad ciliar pueden resultar “engañosos”. La sintomatología clínica típica siempre debería ser un punto de partida importante para completar los estudios diagnósticos antes de emitir un diagnóstico definitivo.

Tras el estudio mediante video-microscopía, y para facilitar el posterior estudio estadístico de las variables así como la representación en tablas de los resultados, los patrones de movilidad ciliar se redujeron a: cilios inmóviles, discinéticos (englobando los patrones de movimiento incoordinado, vibrátil y/o rígido) y normal (sin defecto aparente).

4.4 Estudio genético

4.4.1 Toma de muestra y procesado

Para el estudio genético se realizó una toma de muestra de sangre periférica de los pacientes, a partir de la cual se procedió a la extracción de ADN mediante un extractor automático de ácidos nucleicos QIASymphony (QIAGEN, Hilden, Alemania).

Se analizaron en detalle tanto los exones como las regiones intrónicas flanqueantes de los siguientes genes: *ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *CCNO*, *DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DNAAF5*, *DNAH1*, *DNAH11*, *DNAH5*, *DNAH8*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAJB13*, *DNAL1*, *DYX1C1*, *GAS8*, *LRRC6*, *MCIDAS*, *NME8*, *OFD1*, *PIH1D3*, *RPGR*, *RSPH1*, *RSPH3*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SPAG1*, y *ZMYND10*.

El estudio genético se llevó a cabo mediante secuenciación masiva (NGS) en un equipamiento Illumina (equipo NextSeq 500). Se empleó el panel de genes Custom Constitutional Panel 17 Mb (New Focused Exome v2), Agilent Technologies. La secuenciación mediante NGS fue realizada en la plataforma de genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

Las variantes patológicas identificadas fueron confirmadas posteriormente mediante secuenciación Sanger.

4.5 Estudio de la ultraestructura ciliar mediante microscopía electrónica de transmisión

4.5.1 Toma de muestra y fijación

La toma de muestra para el estudio ultraestructural se realizaba en el mismo acto de la toma mediante curetaje para el estudio de movilidad ciliar, y se introducía la muestra para su fijación, de forma inmediata, en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón Sörensen 0.1M pH 7.3, y la muestra así fijada almacenaba a 4°C hasta su posterior procesado.

4.5.2 Procesado y preparación de la muestra

Para realizar el análisis ultraestructural las muestras son incluidas en una resina plástica mediante un protocolo estandarizado para microscopía electrónica de transmisión.

Para ello, tras la fijación en glutaraldehído, las muestras son lavadas dos veces en tampón Sörensen y son sumergidas en una solución de tetra-óxido de osmio tamponado al 0.5% durante 2 horas. Posteriormente las muestras son lavados en agua destilada y se deshidratan a través de una serie de acetonas de gradación creciente. Se aclaran a continuación con óxido de propileno y se incluyen finalmente en una resina epoxi (Epon812, EMS), durante 24h a 40°C y 24h más a 60°C para su polimerización.

Los bloques resultantes con la muestra incluida en su interior fueron cortados en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (**Figura 35**), colocado en una mesa con dispositivo antivibratorio, empleando cuchillas de vidrio, para obtener secciones semifinas de 200nm de grosor sobre un portaobjetos.

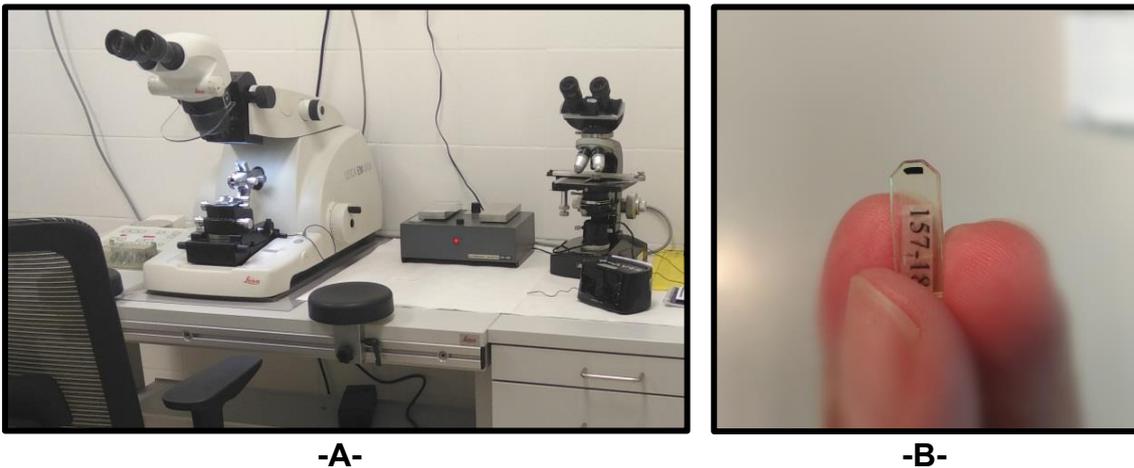


Figura 35. Ultramicrotomía. (A) Ultramicrotomo donde se realizan los cortes semifinos y ultrafinos a partir de los bloques de resina. (B) Biopsia nasal incluida en un bloque de resina Epon.

Estas secciones fueron teñidas con una solución de azul de toluidina al 0,1% y examinadas con un microscopio óptico con un objetivo de x40 para valorar principalmente la presencia de secciones ciliares transversales y el estado general de la muestra (**Figura 36**).

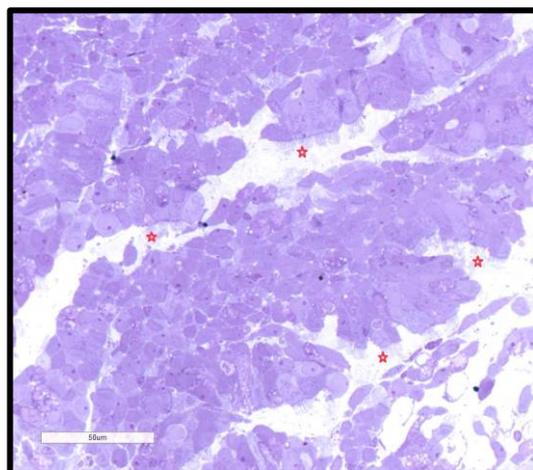


Figura 36. Examen al microscopio óptico de los cortes semifinos. A un aumento de x40 se aprecian grupos de células epiteliales columnares con penachos de cilios en su superficie apical (estrellas) (x40). (Azul de toluidina)

Tras seleccionar las áreas de interés a la hora de realizar el estudio ultraestructural se cortaron secciones ultrafinas de 75-80 nm de grosor con una cuchilla de diamante Diatome ultra 45° en el mismo ultramicrotomo Leica. Los cortes fueron recogidos y recuperados en rejillas de cobre de 100 mesh y se contrastaron con soluciones de acetato de uranilo al 4% durante 10 minutos, y citrato de plomo de Reynolds durante 2 minutos. Las cortes ultrafinos se examinaron a 80 kV con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi HT7700 (Hitachi, Japan) (**Figura 37**). Las imágenes se capturaron con una cámara CCD de 8Mpx integrada en el microscopio.

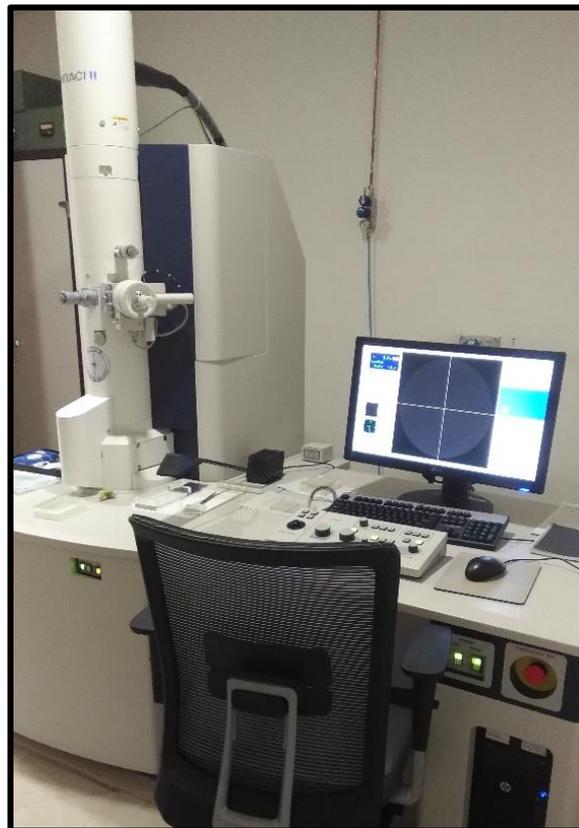


Figura 37. Microscopio electrónico de transmisión. El rayo de electrones que emite el filamento de tungsteno atraviesa la muestra colocada a mitad del cañón, y gracias al sistema de vacío y una serie de electroimanes, se forma una imagen de la muestra que aparece en la pantalla.

4.5.3 Estudio general de la muestra

En primer lugar se realizó una valoración general de la muestra a baja y media amplificación (x4.400-35.000), para evaluar la presencia de infección, o de defectos en el procesado que no se aprecian en los cortes semifinos, así como la existencia de defectos ciliares secundarios.

Posteriormente se tomaron imágenes de un mínimo de 50 secciones ciliares, en las que aparecía el axonema con su membrana ciliar intacta, a x530.000 aumentos, a partir de las cuales se realizó el análisis de la organización microtubular y de la presencia/ausencia de los brazos de dineína (**Figura 38**).

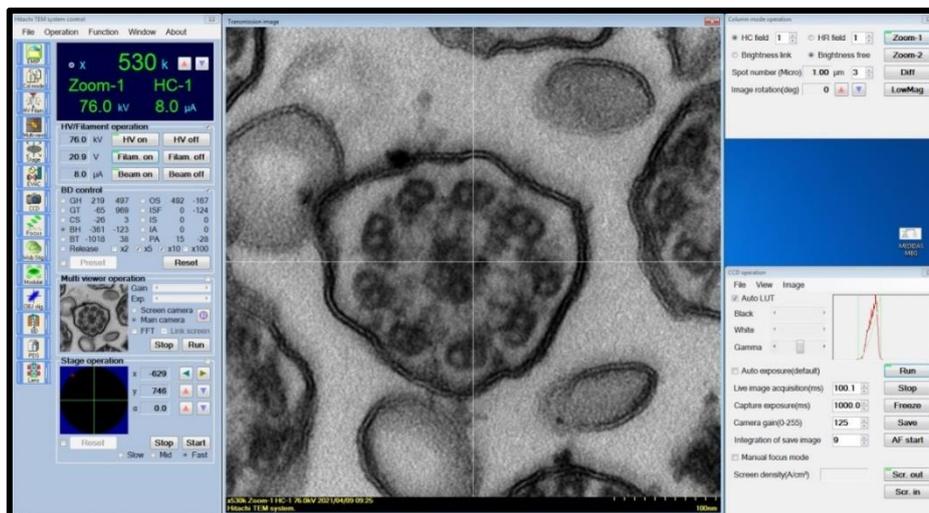


Figura 38. Interfaz del software de visualización y captura de imágenes del MET. En la imagen vemos una sección ciliar a 530.000 aumentos.

Se estudiaron las células ciliadas para la determinación de la presencia de una localización errónea de los cuerpos basales con ausencia o poca cantidad de cilios (pocos cilios en combinación con ausencia de la mayoría de cuerpos basales), y/o alteraciones en el citoplasma (imágenes de células ciliadas sin el patrón subcelular típico consistente en cuerpos basales submembranosos con estructuras asociadas (pie basal y raicillas estriadas) y numerosas mitocondrias apicales). Se anotaron y documentaron además la existencia de otras alteraciones, tales como la presencia de células inflamatorias y otros hallazgos de interés.

4.5.4 Análisis de los axonemas

Las imágenes se seleccionaron posteriormente en base a la nitidez, ruido de fondo y artefactos de tinción para un estudio óptimo.

Para determinar la proporción final de los defectos axonemales se elaboró una tabla de cálculo para cada muestra, para determinar la proporción de defectos ciliares con respecto al total de secciones ciliares.

Los resultados del estudio MET de las biopsias de pacientes DCP se clasificaron según la Guía Consenso (Shoemark *et al.*, 2020) y el defecto MET detallado según la siguiente tabla:

Defecto según Consenso	Defecto UE detallado
Clase 1 (defecto MET diagnóstico)	Defecto BED
	Ausencia BED+BID
	Desorganización MT + ausencia BID
Clase 2 (defecto que requiere de otra evidencia diagnóstica de apoyo)	Defecto CC
	Sin defecto aparente

Tabla 4. Clasificación defectos UE según la Guía Consenso y en detalle. Defecto BED (ausencia total o parcial de los brazos externos de dineína); Ausencia BED+BID (ausencia combinada de brazos internos y externos); Desorganización MT + ausencia BID (desorganización microtubular con ausencia de los brazos internos de dineína); Defecto CC (defecto del complejo central).

Para esta clasificación se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

***Defecto de los brazos externos de dineína (BED):** Ausencia total o de gran parte de los BED de la mayoría de dobletes (>5) de la mayoría (>50%) de secciones estudiadas.

***Ausencia combinada de brazos internos y externos de dineína (BED+BID):** Criterio anterior y ausencia total o de gran parte de los BID de la mayoría de dobletes (>7) de la mayoría (>50%) de secciones estudiadas.

***Desorganización de MT y ausencia de BID:** Desorganización de los MT en >25% de las secciones, combinado con ausencia total o de gran parte de los BID de la mayoría de dobletes (>7) de la mayoría (>50%) de secciones estudiadas.

***Defecto del CC:** Ausencia del par central con o sin transposición de doblete periférico. Uno o ambos MT centrales ausentes en >20%; MT centrales dobles o translocación (cerca del ápice ciliar); algo de desorganización MT.

***Ultraestructura conservada:** Consideramos una estructura axonemal normal cuando en la sección ciliar estudiada se observan los 9 dobletes periféricos y un par central de MT sencillos. Los dobletes periféricos deben presentar además un mínimo de 5 BED y 2 BID.

Se registraron además otro tipo de defectos no diagnósticos:

***Defectos minoritarios:** Los anteriormente descritos cuando aparecen en menos del 30% del total de axonemas estudiados y que por tanto no son considerados como defectos clave.

***Defectos secundarios:** MT supernumerarios (MT extra en la zona central o exterior del axonema), cilios compuestos (una sola membrana ciliar que contiene varios axonemas ciliares)

***Defectos sin definir:** desalineamiento de los dobletes periféricos, zonas electrodensas submembranas, dobletes oscuros.

4.6 Análisis estadístico

Se realizará un estudio estadístico descriptivo respecto al defecto MET encontrado mediante la media y desviación estándar y la mediana (1.er y 3.er cuartiles) en el caso de las variables numéricas y mediante la frecuencia absoluta (%) en el caso de las cualitativas. Con todos los datos obtenidos se realizará un análisis descriptivo para calcular la correlación y obtener concordancias entre las variables del estudio.

V. Resultados

5.1 Consideraciones generales de la muestra

Entre 2018 y 2021 fueron examinados en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitari i Politècnic La Fe un total de 117 pacientes sospechosos de DCP. Tras el estudio de movilidad ciliar, el estudio genético y el análisis de ultraestructura ciliar se descartaron para este diagnóstico 64 pacientes, 51 fueron por el contrario diagnosticados de DCP y 2 fueron calificados como pacientes con criterios diagnósticos no concluyentes.

Se incluyeron por tanto en nuestro estudio 51 pacientes diagnosticados de DCP, que mostraban una edad media de 20,95 años, con un rango de edades de 1-64 años.

Con respecto a la distribución por género, el grupo de pacientes DCP estuvo formado por 29 hombres y 22 mujeres, lo que supone un porcentaje de 56,86% y 43,13% respectivamente.

Las manifestaciones clínicas presentes en los 51 pacientes diagnosticados de DCP se muestran en la tabla 5.

Datos clínicos	Incidencia (nº de pacientes) y resultado porcentual de estos datos (%)
Distrés respiratorio neonatal	20 (39,21)
Rinorrea mucopurulenta habitual	41 (80,39)
Tos productiva crónica	43 (84,31)
Otitis de repetición	23 (45,09)
Bronquiectasias	26 (50,98)
Neumonías	24 (47,05)
Defectos lateralidad	13 (25,49)
Problemas fertilidad	10 de 16 adultos (62,5)

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes DCP. Resultados expresados como número de pacientes (%).

5.2 Estudio de movilidad ciliar

El estudio de movilidad ciliar llegó a ser completado en 48 de los 51 pacientes DCP, detectándose defecto de movilidad ciliar en 45 de ellos (45/48, 93,73%). Los resultados del patrón de movilidad ciliar general se muestran en la tabla 6:

Patrón de movilidad ciliar	Resultados (%)
Cilios inmóviles	25 (52,08)
Discinéticos (movimiento incoordinado, rotatorio y/o vibrátil)	20 (41,66)
Sin defecto aparente	3 (6,25)

Tabla 6. Resultados del estudio de movilidad ciliar. Resultados expresados como número de pacientes (%).

De forma detallada (tabla 7), tan sólo se detectaron 5 pacientes (5/45, 11,11%) cuyos cilios presentaban inmovilidad ciliar total, mientras que las biopsias ciliares del resto de pacientes presentaban un predominio de inmovilidad ciliar pero con cierta proporción de cilios con un movimiento residual. Dentro del grupo de patrón discinético, las batidas ciliares vibrátiles o rotatorias fueron las menos prevalentes (8.88% y 6.66% respectivamente).

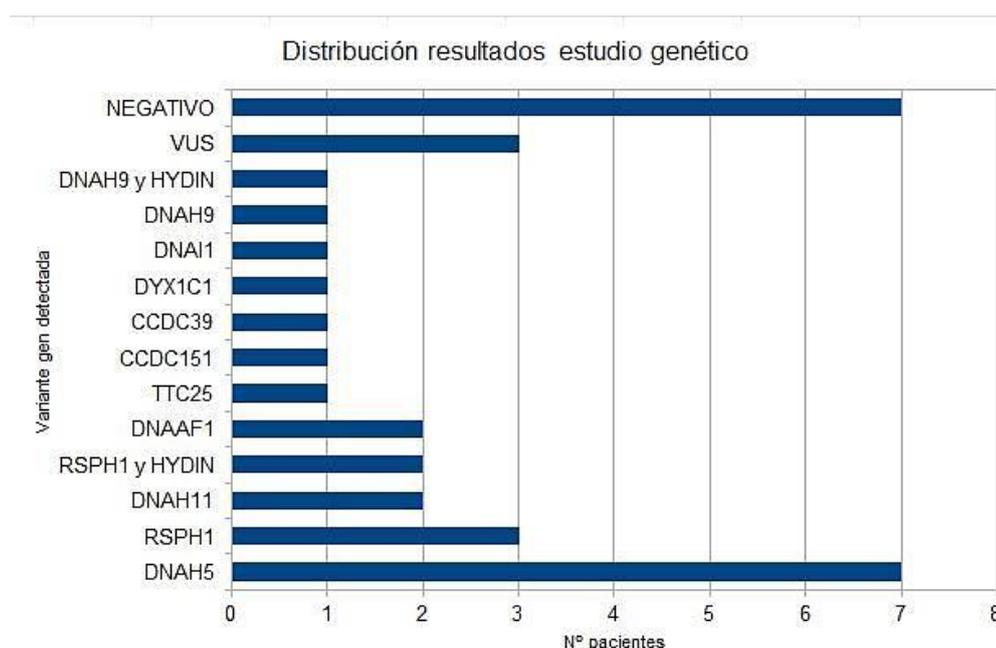
Patrón de movilidad ciliar detallado	Resultados (%)
Inmovilidad total	5 (11.11)
Predominio de inmovilidad con movimiento residual	20 (44.44)
Incoordinado	13 (28.88)
Rotatorio	3 (6.66)
Vibrátil	4 (8.88)

Tabla 7. Resultados detallados del estudio de movilidad ciliar. Resultados expresados como número de pacientes (%).

5.3 Estudio genético

El estudio genético se solicitó en 37 de los 51 pacientes, llegando a estar este estudio completado en 30 de ellos y quedando 7 estudios pendientes de resultado.

De los 30 estudios completados, se detectaron 23 pacientes (76,66%) que portaban variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes asociados a DCP. En 7 estudios no se detectaron variantes en los genes analizados (resultado negativo) y en 3 se identificaron alteraciones genéticas de significado clínico incierto (VUS) (Variants of Unknown Significance), en alguno de los genes DCP analizados (gráfica 1).



Gráfica 1. Resultados del estudio genético

Se detectaron variantes patológicas en *DNAH5* en un 30.43% (7/23) de los pacientes testados, constituyendo el gen con mayor prevalencia de mutaciones dentro del listado de 35 genes estudiados, seguido por *RSPH1*, detectado en 3 pacientes como alteración genética individual y en un paciente de forma combinada con *HYDIN* (17,39% en total), y *DNAH11* y *DNAAF1*, ambos en un 8,69% (2/23) de los pacientes analizados. En la tabla 8 se detalla la distribución de los resultados genéticos.

Variante patológica detectada	Resultados (%)
<i>DNAH5</i>	7 (30,43)
<i>RSPH1</i>	3 (13,04)
<i>DNAH11</i>	2 (8,69)
<i>RSPH1 y HYDIN</i>	2 (8,69)
<i>DNAAF1</i>	2 (8,69)
<i>TTC25</i>	1 (4,34)
<i>CCDC151</i>	1 (4,34)
<i>CCDC39</i>	1 (4,34)
<i>DYX1C1</i>	1 (4,34)
<i>DNAI1</i>	1 (4,34)
<i>DNAH9</i>	1 (4,34)
<i>DNAH9 y HYDIN</i>	1 (4,34)

Tabla 8. Genes con variantes patológicas detectadas. Resultados expresados como número de pacientes (%).

5.4 Estudio ultraestructural de los axonemas ciliares

El objetivo de estudio de la presente memoria de tesis versa sobre el estudio mediante MET de las biopsias nasales. El estudio ultraestructural (UE) de esta patología, al igual que ocurre en otras temáticas requiere de una adecuada preservación y representación de los tejidos a estudiar. Un cierto número de las muestras biópsicas, bien por la composición de la muestra o por el estado en el que se encuentre la mucosa nasal obtenida, no pudieron ser estudiadas incluso después de un procesamiento óptimo. Es decir, que en un determinado número de biopsias no pudieron obtenerse las 50 secciones ciliares mínimas para determinar la presencia o ausencia de un defecto de los axonemas ciliares. De este modo, del número total de pacientes DCP incluidos en nuestro estudio -51-, se consiguieron 38 análisis UE y quedaron 13 estudios sin llegar a ser completados, cuyas características se detallarán en el apartado 5.4.4.

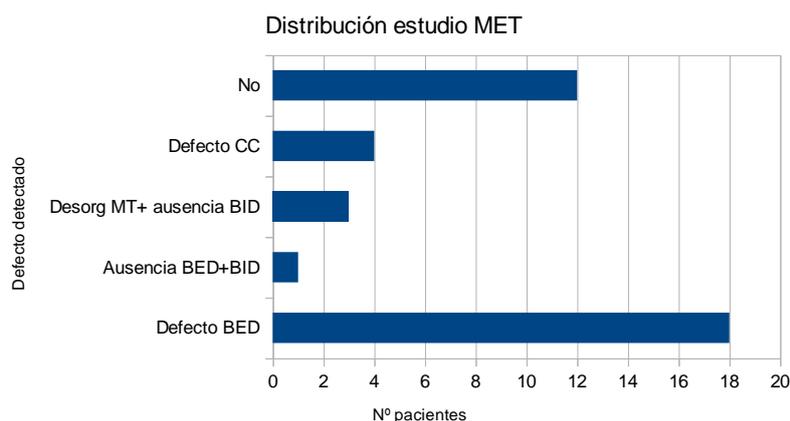
Cabe destacar que se realizó la valoración UE en 86 biopsias del total de participantes del estudio, de forma que se obtuvieron 38 estudios UE de pacientes DCP más 48 estudios adicionales completos de individuos exentos de DCP (tabla 9).

Procedencia biopsias	N.º estudios UE
Pacientes DCP	38
Pacientes no DCP	48
Total estudios UE	86

Tabla 9. Estudios UE completados. Resultados mostrados en valores absolutos.

5.4.1 Defectos ultraestructurales diagnósticos

Se realizaron 38 estudios UE de los 51 pacientes DCP, obteniéndose un resultado diagnóstico positivo en 26 de ellos (26/38, 68,42%). Los defectos UE diagnósticos que se encontraron quedan reflejados en la gráfica 2:



Gráfica 2. Resultados del estudio UE. Leyenda: No (sin defecto UE aparente); Defecto CC (defecto del complejo central); Desorg MT + ausencia BID (desorganización microtubular con ausencia de los brazos internos de dineína); Ausencia BED+ BED (ausencia combinada de brazos internos y externos); Defecto BED (ausencia total o parcial de los brazos externos de dineína).

De los 48 estudios UE de los pacientes exentos de DCP, los pacientes #P26 y #P72 mostraron elevadas proporciones de defecto en los BED. La valoración posterior del resto de la biopsia, junto con los resultados obtenidos en el estudio genético y en el de movilidad ciliar, permitió determinar estos resultados UE como falsos positivos.

En la tabla 10 se reflejan los resultados del estudio UE de las 38 biopsias de pacientes DCP, distinguiendo la clasificación de los defectos axonemales según la Guía Consenso (Shoemark et al., 2020) y el defecto UE detallado. Cabe destacar que casi la mitad de los pacientes mostraron defecto en los BED (18/38, 47,36%), constituyendo así el defecto UE más prevalente en nuestra cohorte de casos. Por otra parte, el 31,57% de los pacientes mostraron una ultraestructura ciliar aparentemente conservada.

Tipo de defecto según Consenso	Total (%) de los defectos	Defecto UE detallado	Resultado (%)
Clase 1	22 (57,89%)	Defecto BED	18 (47,36)
		Ausencia BED+BED	1 (2,63)
		Desorg MT+ ausencia BED	3 (7,89)
Clase 2	4 (10,52%)	Defecto CC	4 (10,52)
		Sin defecto aparente	12 (31,57)

Tabla 10. Clasificación defectos UE según Consenso y en detalle. Resultados expresados como número de pacientes (%). Leyenda: Clase 1 (defecto UE diagnóstico); Clase 2 (defecto que requiere de otra evidencia diagnóstica de apoyo); Defecto BED (ausencia total o parcial de los brazos externos de dineína); Ausencia BED+ BED (ausencia combinada de brazos internos y externos); Desorg MT+ ausencia BED (desorganización microtubular con ausencia de los brazos internos de dineína); Defecto CC (defecto del complejo central).

De esta forma, la MET ofreció resultados diagnósticos (clase 1) en el 57,89% (22/38) de las biopsias analizadas de los pacientes DCP.

Estos resultados se muestran en la iconografía ultraestructural de nuestra serie de casos, que se presentan a continuación (**Figura 39**):

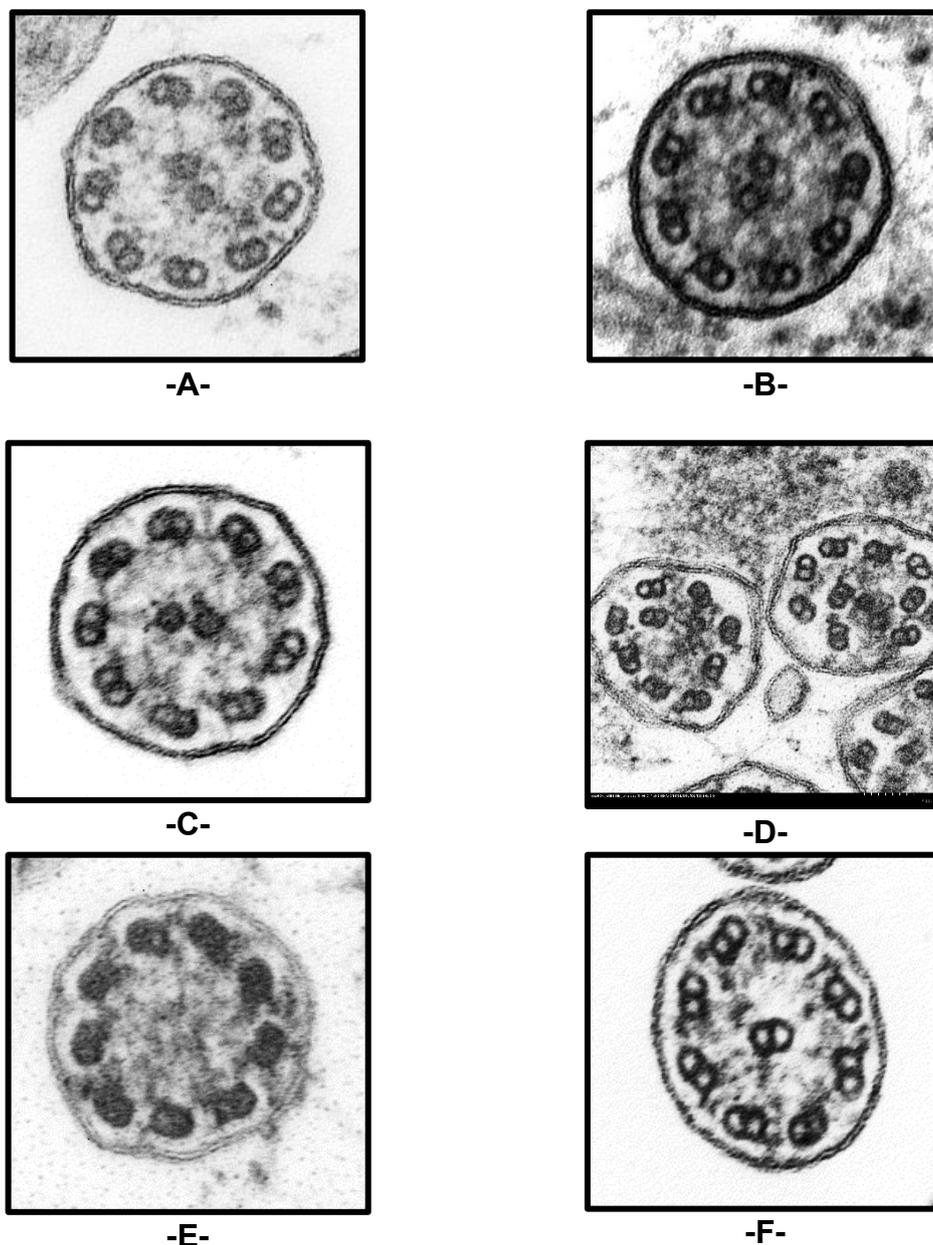


Figura 39. Resultados UE del estudio axonema ciliares, imágenes representativas de los resultados obtenidos. (A) Ausencia combinada de BID y BED; (B) Ausencia parcial BED (brazos cortos); (C) Ausencia total BED; (D) Desorganización microtubular con ausencia de los BID; (E) Defecto del CC: ausencia de par central; (F) Defecto del CC: transposición de doblete periférico al centro del axonema (Micrografías, x530.000).

5.4.2 Defectos minoritarios

El análisis minucioso de las 86 biopsias en las que pudieron estudiarse un mínimo de 50 secciones ciliares reveló la presencia de defectos ultraestructurales en 75 de ellas, tanto en proporciones consideradas para el diagnóstico como en proporciones inferiores. En estas proporciones inferiores o defectos minoritarios, el hallazgo más habitual fue la ausencia de los brazos externos de dineína, que osciló desde un 4% a un máximo de un 22%. Los participantes que mostraron defectos axonemales en más del 10% de sus axonemas se presentan en la tabla 11:

ID paciente	Defecto UE minoritario (%)
11	BED (14)
19	BED (20)
25	BED (22)
51	BED (10)
55	BED (16)
59	BED (16)
61	BED (14)
64	BED (20)
75	BED (16)
89	BED (14)
7	BID (18)
23	CC (18)
39	CC (10)
72	CC (14)
84	Desorg MT (14)
24	Desorg MT+ aus BID (14)
56	Desorg MT+ aus BID (26)
82	Desorg MT+ aus BID (16)

Tabla 11. Defectos UE minoritarios (página siguiente).

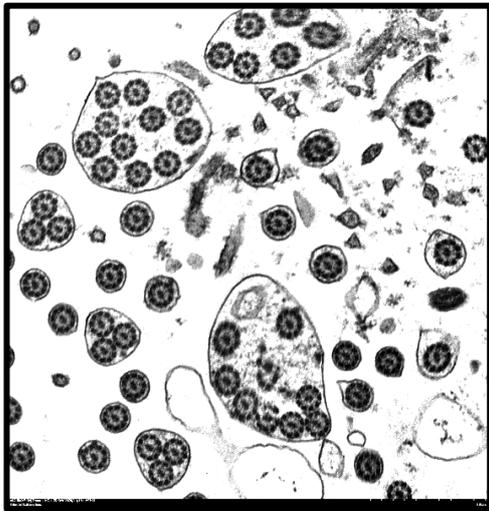
Tabla 11. Defectos UE minoritarios (*página anterior*). Expresados como proporción de secciones ciliares afectadas. Leyenda: BED (ausencia total o parcial de los brazos externos de dineína); BID (ausencia de brazos internos); Desorg MT+ aus BID (desorganización microtubular con ausencia de los brazos internos de dineína); CC (defecto del complejo central).

5.4.3 Defectos secundarios

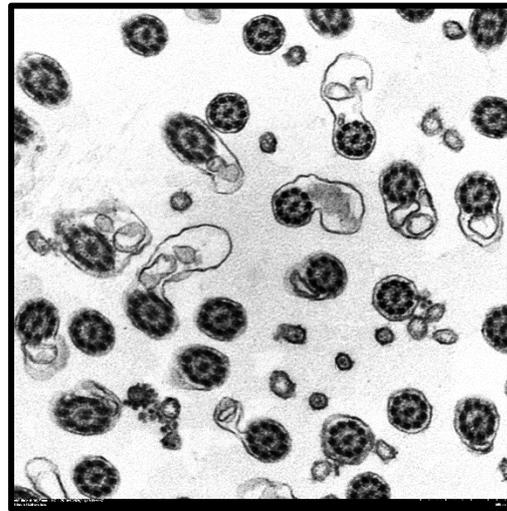
Se observó la presencia de defectos ciliares secundarios en casi la totalidad de muestras analizadas, tanto de pacientes DCP como de pacientes no-DCP (**Figura 40**). El defecto más prevalente fueron los cilios compuestos y las adiciones MT o MT supernumerarios, así como la desorganización de MT y algo menos frecuente las secciones ciliares con membrana ciliar rota o ausente.

Los defectos ciliares secundarios se encontraban de forma local, acompañados en ocasiones de alteraciones en la célula ciliada de la que procedían, y en otras ocasiones de forma aislada. Se detectaban principalmente en aquellas biopsias con signos de inflamación o infección moderada.

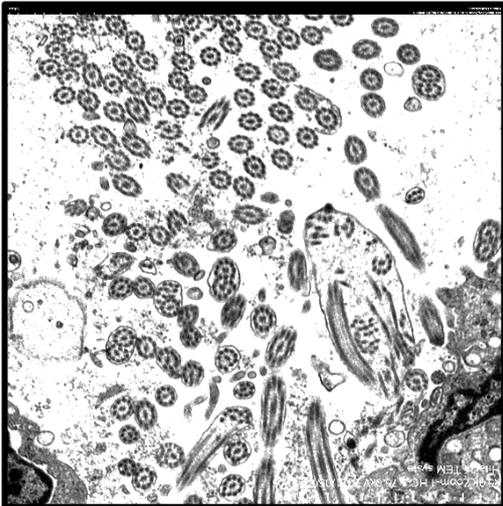
Figura 40. Defectos ciliares secundarios encontrados (*página siguiente*). **(A)** Cilios compuestos (x62.000); **(B)** Protusiones de la membrana ciliar (x88.000); **(C)** Combinación defectos: cilios compuestos, pérdida membrana ciliar (x44.000); **(D)** Delección de un doblete periférico (x530.000); **(E)** Fragmentos ciliares (x88.000); **(F)** Membranas ciliares rotas o ausentes (x180.000) (Micrografías).



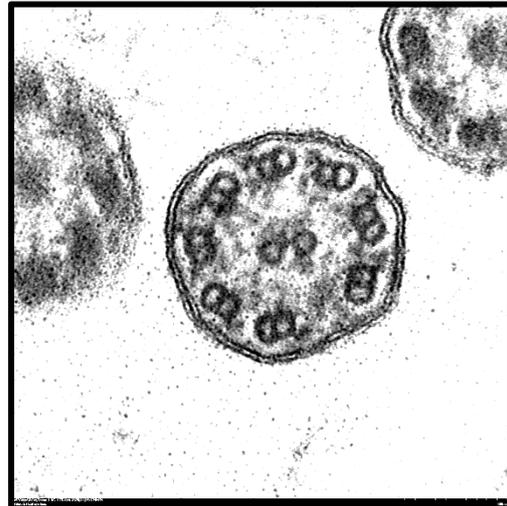
-A-



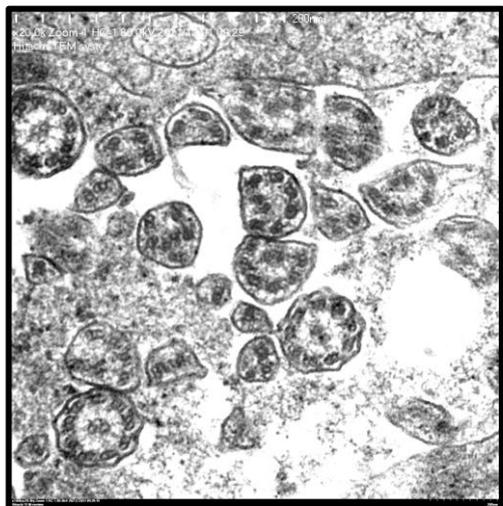
-B-



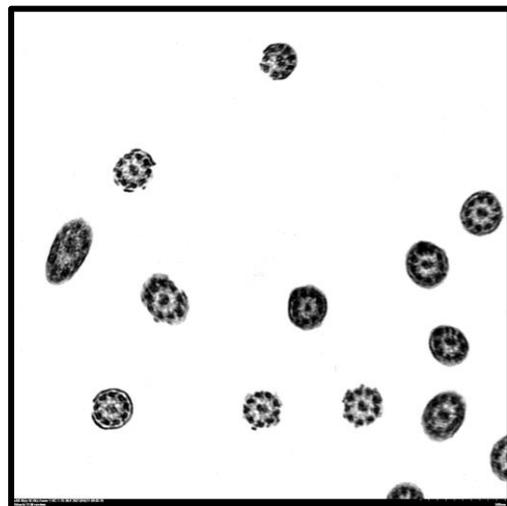
-C-



-D-



-E-



-F-

Figura 40. Defectos ciliares secundarios encontrados (página anterior).

Estos hallazgos fueron los más evidentes y de fácil identificación. Sin embargo también observamos defectos axonemales secundarios que afectan a los BED, el complejo central y la disposición de los MT periféricos. En estas biopsias algunos axonemas presentaban, de forma sutil, cierta deformación de los MT periféricos, incluso algo de dilatación de éstos (**Figura 41**).

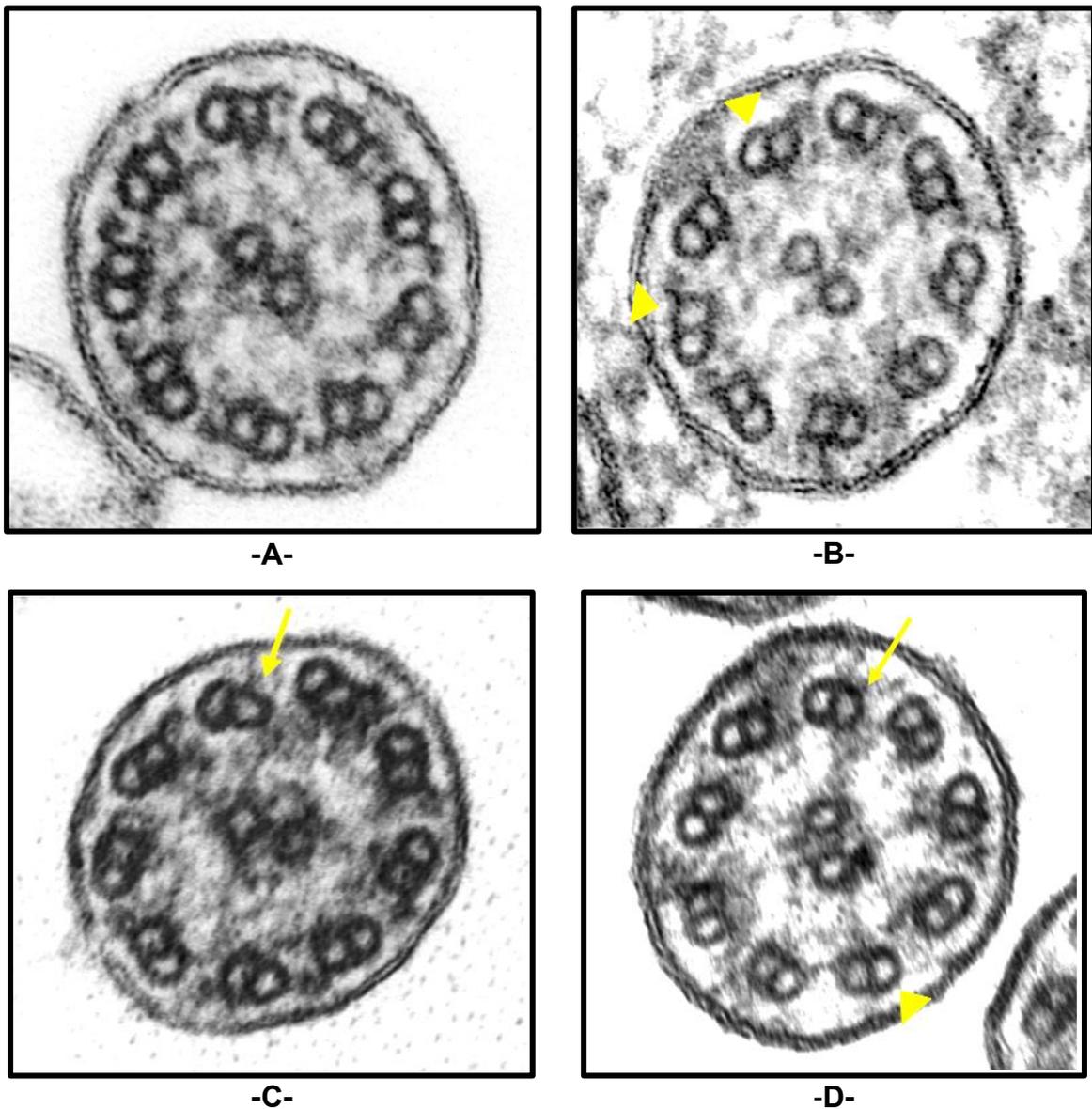


Figura 41. Defectos secundarios en MT periféricos. (A) Axonema conservado; (B) Axonema del #P20, con cierta desorganización de los dobletes periféricos y dilatación de alguno de los MT (triángulo); (C) Axonema del #P23, con cierta deformación de uno de los MT (flecha); (D) Axonema del #P84, con ausencia de los BED y dilatación de MT (triángulo) y deformación (flecha). (Micrografías, tamaño original x530.000)

5.4.4 Estudios no completados

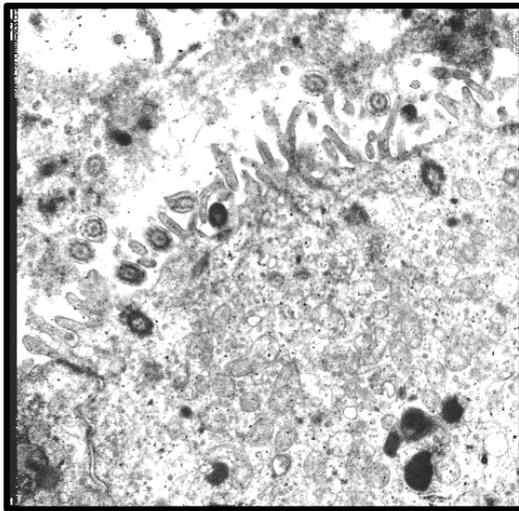
Del total de 117 participantes se completó el estudio UE en 83 pacientes. En los 31 pacientes en los que no se pudo completar, se repitió la toma de biopsia en otra visita clínica en 4 de ellos, consiguiéndose 3 estudios completados adicionales. De esta forma, el número total de estudios UE completados ascendió a 86 y por tanto en nuestro estudio la MET mostró una inviabilidad global de un 26,49% (31/117).

La principal causa que dificultó el estudio de los axonemas ciliares en estas biopsias fue la presencia de cambios reactivos por infección y/o inflamación en la muestra (tabla 12), con presencia de abundante moco y detritus celulares que impedían una adecuada visualización de los axonemas ciliares así como un número insuficiente de axonemas para estudio. Los hallazgos incluyeron: depleción de células ciliadas así como signos de ciliogénesis aberrantes, como son la presencia de células deciliadas, cuerpos basales o raicillas estriadas deslocalizadas o pseudoquistes ciliares (**Figura 42 y 43**).

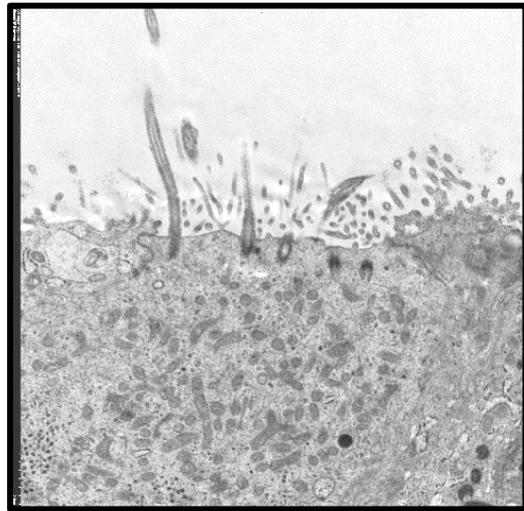
**Biopsias ciliares no viables:
cambios por infección/inflamación**

- Presencia de abundante moco y detritus celulares
- Depleción células ciliadas con predominio de células epiteliales intermedias
- Signos de neociliogénesis aberrantes: deciliación, deslocalización de cuerpos basales y raicillas estriadas, pseudoquistes ciliares en zona apical

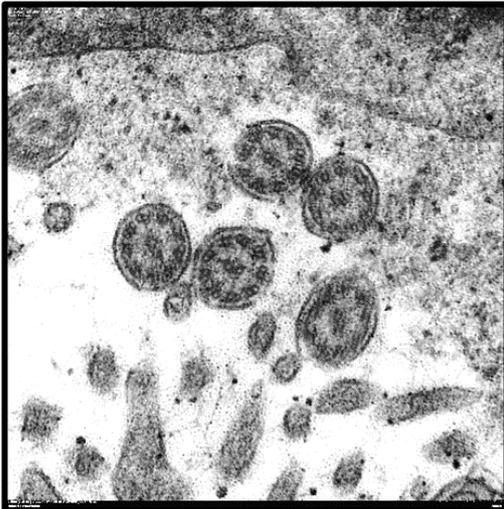
Tabla 12. Hallazgos comunes en las biopsias ciliares no viables.



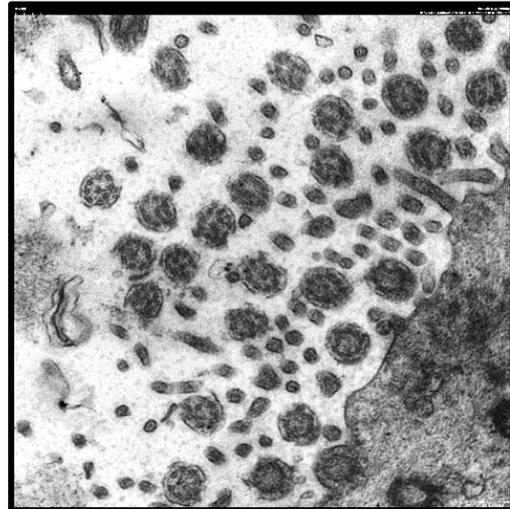
-A-



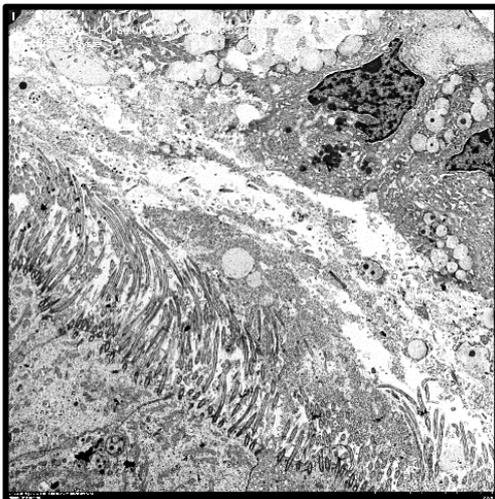
-B-



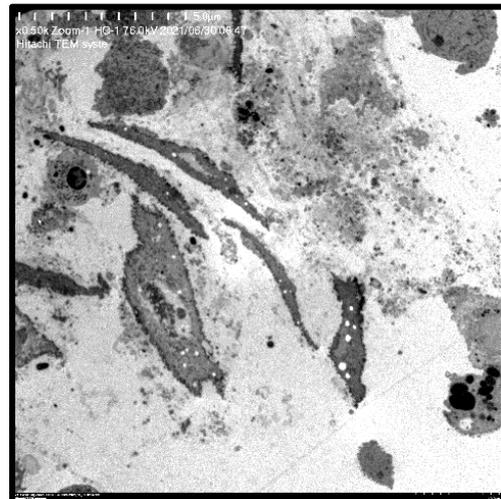
-C-



-D-



-E-



-F-

Figura 42. Características de las biopsias no viables (I) (página siguiente).

Figura 42. Características de las biopsias no viables (I) (*página anterior*). **(A)** Zona apical con membrana celular desflecada (x44.000); **(B)** Escasa estructuras ciliares en zona apical de célula ciliada (x6.200); **(C y D)** Rotura membranas ciliares y axonemas poco nítidos (x180.000 y x88.000) **(E)** Abundante moco y detritus celulares (x6.200); **(F)** Metaplasia escamosa (x4.400). (Micrografías)

Figura 43. Características de las biopsias no viables (y II) (*página siguiente*). **(A)** Zona apical con cuerpos basales deslocalizados y cilios aberrantes (x26.000); **(B)** Conjunto de secciones ciliares con cambios secundarios: desorganización de MT, ausencia del par central, adiciones y deleciones de MT estructuras ciliares en zona apical de célula ciliada (x88.000); **(C)** Zona apical deciliada, donde solo se observan dos estructuras ciliares pero de corta longitud, y algunos cuerpos basales sin su axonema correspondiente (x22.000); **(D)** Zona apical con pequeñas vesículas ciliares con cuerpos basales que no han elongado el axonema. En la parte superior se observa un cuerpo basal con raicilla estriada bifurcada. Rotura membranas ciliares y axonemas poco nítidos (x44.000); **(E)** Zona apical con axonemas intracitoplasmáticos. A la izquierda se observan secciones ciliares libres en el citoplasma Abundante moco y detritus celulares (x18.000); **(F)** Detalle de **(E)** en el que puede observarse la estructura ciliar con su cuerpo basal y el axonema incluidos en el citoplasma (x62.000). (Micrografías)

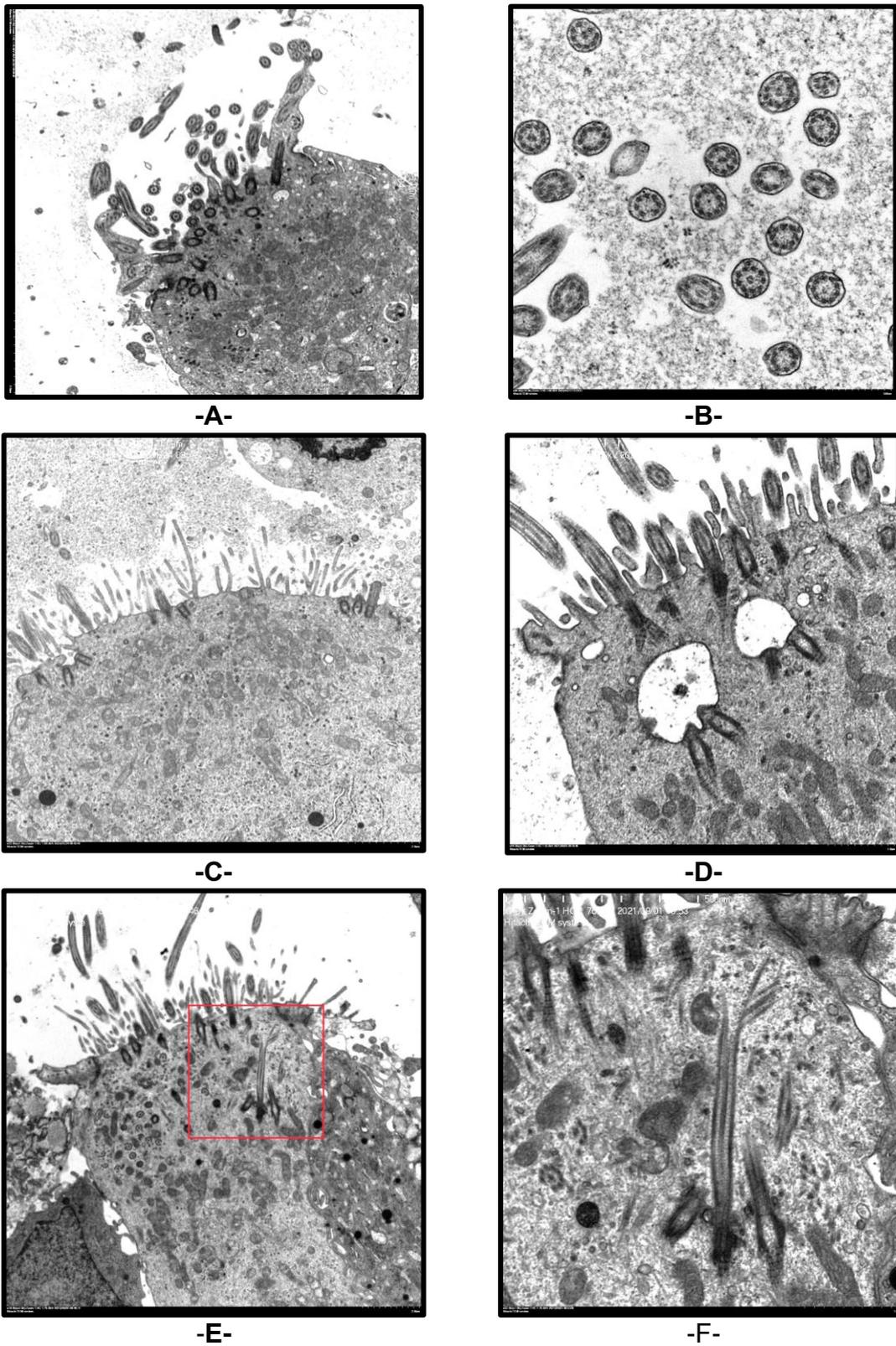


Figura 43. Características de las biopsias no viables (y II) (página anterior).

5.4.5 Defectos de significado desconocido

En el estudio de MET de los axonemas ciliares, se detectaron algunos otros defectos o alteraciones en las secciones ciliares, que no están descritas en la literatura, hasta el momento actual, y que se señalan como de significado desconocido.

5.4.5.1 Zona electrondensa

Se detectó la presencia de zonas electrondensas submembranosas (**Figura 44**) con independencia del tipo de defecto ultraestructural predominante así como de la ausencia o presencia de defecto diagnóstico. Estas zonas en muchas ocasiones aparecían como pequeñas protusiones de la membrana, ocupando un espacio entre el axonema y la membrana ciliar.

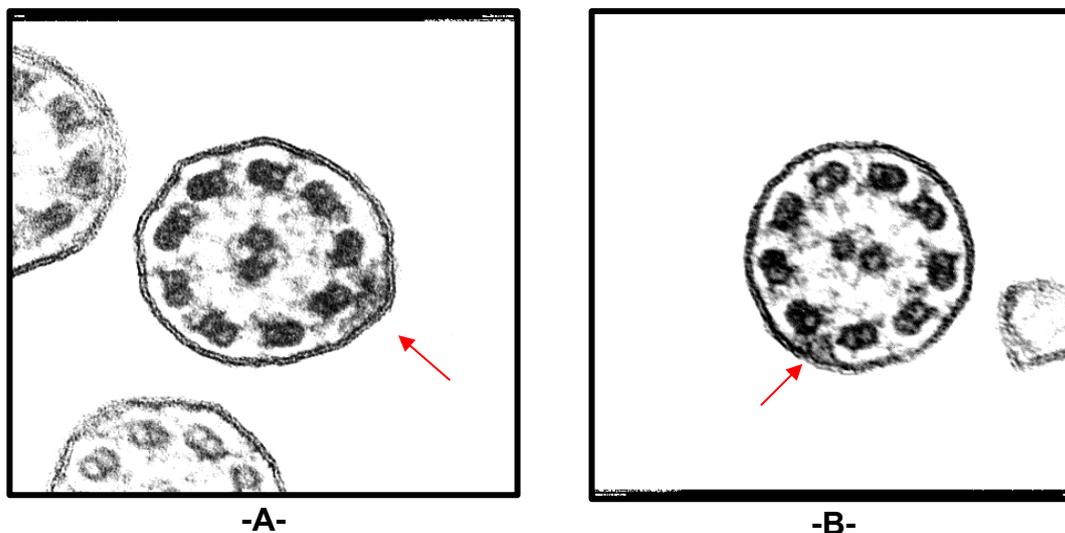


Figura 44. Imágenes representativas de axonemas ciliares con zonas electrondensas submembranosas. (A) La zona electrondensa protuye ligeramente; (B) Axonema con ausencia de BED y zona electrondensa, sin protusión (Micrografías, x530.000).

5.4.5.2 Dobletes oscuros

La presencia de dobletes oscuros (**Figura 45**) fue más limitada, y sin relación aparente con la presencia o ausencia de defecto ultraestructural.

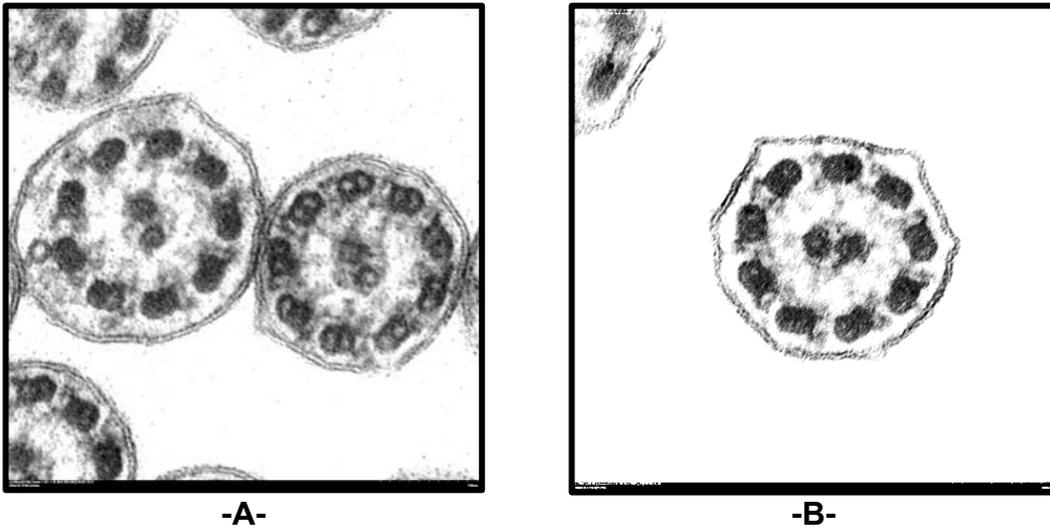


Figura 45. Imágenes representativas de axonemas ciliares con dobletes oscuros. (A) Sección ciliar con dobletes oscuros junto a otra en la que se aprecia la estructura de ambos MT en los dobletes; **(B)** Sección ciliar con dobletes oscuros (Micrografías, x530.000).

5.4.5.3 Rotura de simetría

Durante el examen de los casos en los que prevalece la ausencia de los BED, se observó un predominio de secciones ciliares en los que el axonema perdía su simetría, de forma que los dobletes periféricos aparecían desviados de la circunferencia axonemal, formada por la unión del centro de los MTA de cada doblete (**Figura 46**).

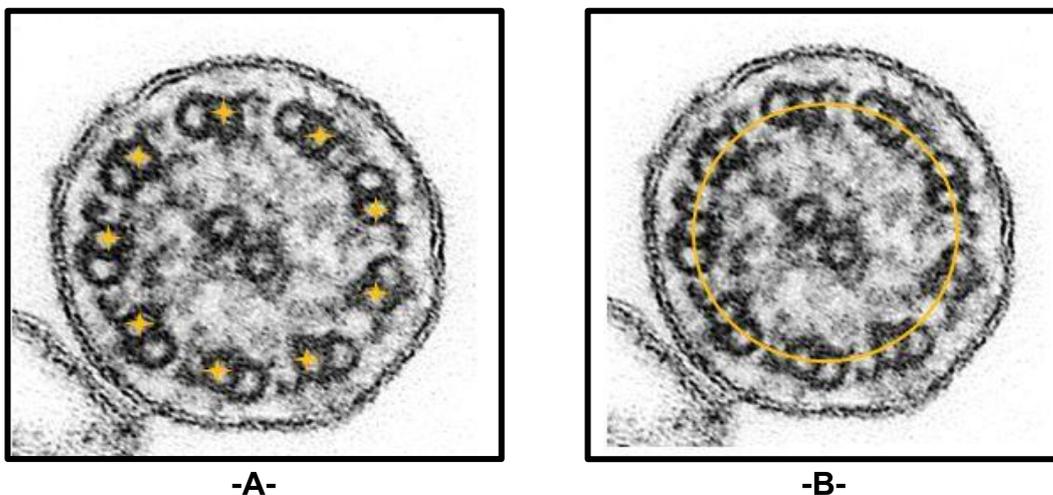


Figura 46. Simetría axonemal. (A) Cada doblete periférico consiste en un MTA completo (estrella) y otro incompleto, el MTB; **(B)** La línea que une todos los puntos centrales de cada MTA forma la circunferencia axonemal. (Micrografías, x530.000)

En este sentido hemos definido la rotura de simetría (RS) cuando un axonema presenta más de 3 dobletes periféricos inclinados o desviados, entendiendo la desviación como la rotación del MTB respecto del MTA, y que por tanto queda fuera de la circunferencia axonemal (**Figura 47**).

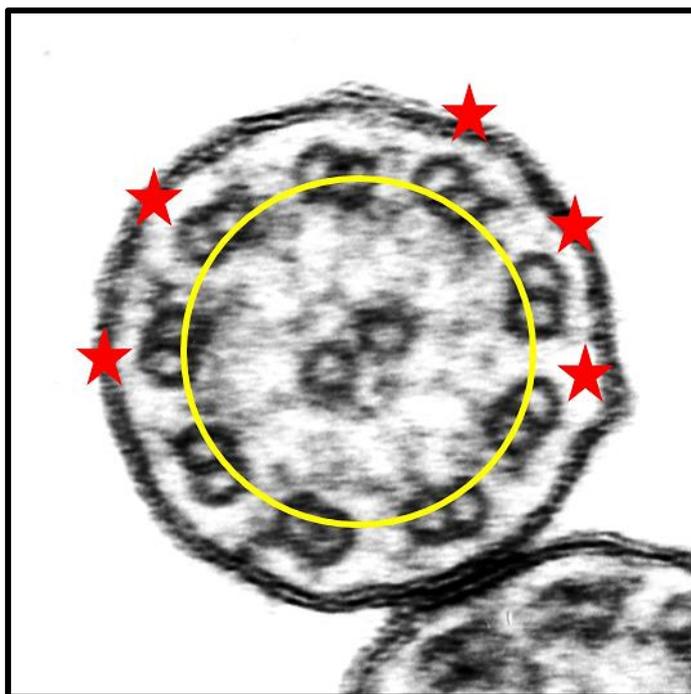


Figura 47. Rotura de simetría axonemal. Tomando como referencia la circunferencia axonemal (en amarillo), en las secciones ciliares con RS pueden observarse más de 3 dobletes inclinados o desviados (estrellas), es decir, cuyo MT-B queda fuera de dicha circunferencia.

Como consecuencia de este hallazgo, no señalado previamente por ningún autor, se revisaron de manera retrospectiva todas las fotografías de los casos ya estudiados, tanto de pacientes DCP como de aquellos excluidos del diagnóstico, y de forma paralela se incluyó esta nueva variable a estudiar en el análisis de los axonemas de los casos restantes.

Se descartaron los casos en los que el estudio ultraestructural indicaba un defecto del CC y aquellos con desorganización MT ya que, tal y como se detalló en el capítulo 5.1 de esta memoria, estos defectos axonemales implican un cierto grado de desorganización de los dobletes, y por tanto podrían suponer un sesgo en la detección de rotura de simetría axonemal.

Así pues, se realizó el análisis de la simetría axonemal de aquellos casos en los que se detectó ausencia de los BED, así como de todos aquellos en los que no se detecta un defecto axonemal aparente.

La **figura 48** muestra imágenes representativas que se obtuvieron del estudio RS.

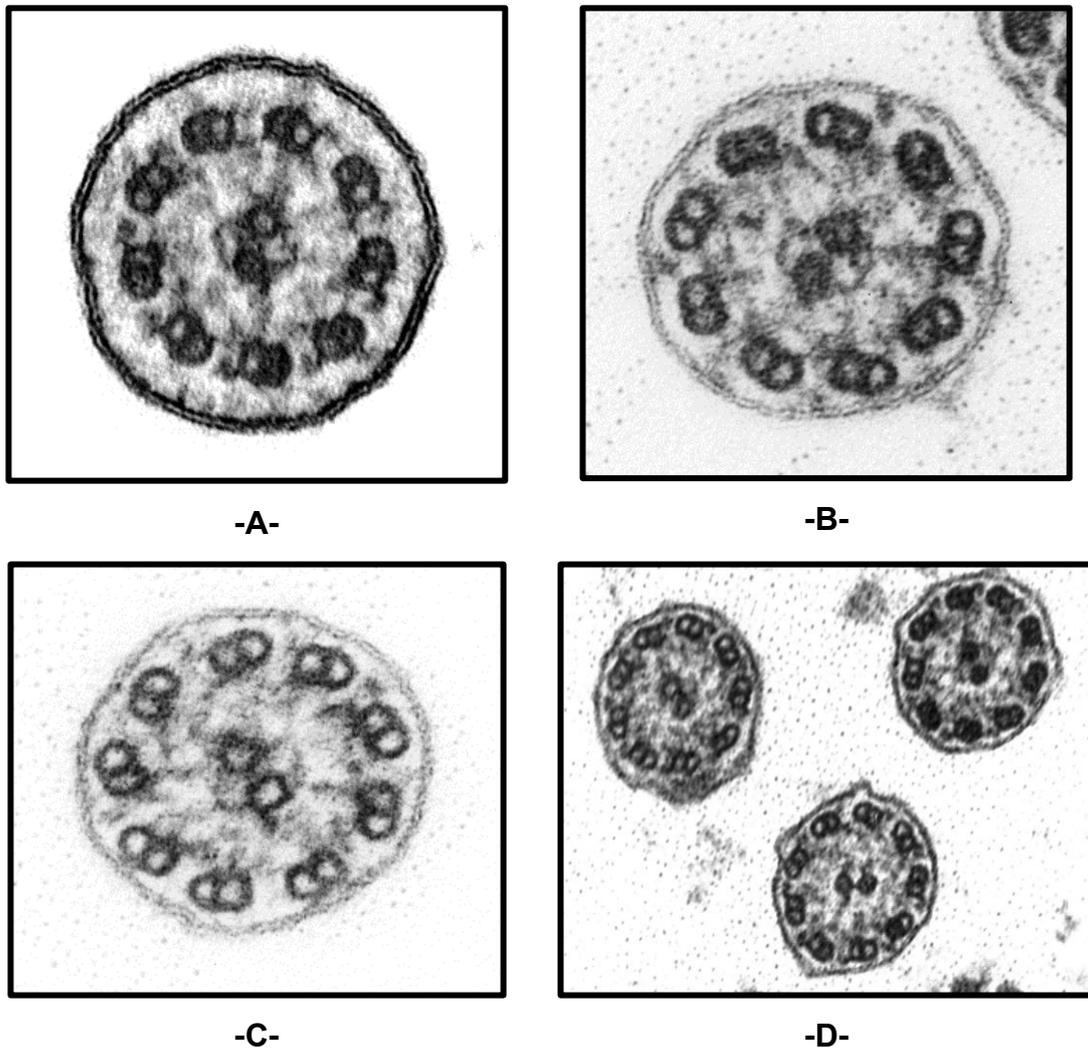


Figura 48. Axonema normal vs rotura de simetría axonemal. (A) Imagen de un axonema con sus dobletes periféricos integrados en la circunferencia axonemal; (B y C) Imágenes de axonemas con ausencia de BED y rotura de simetría: se aprecia de forma evidente la inclinación de los dobletes; (D) Imagen de axonemas sin defecto UE aparente, pero con rotura de simetría (Micrografías, x530.000)

Los resultados del estudio de la RS axonemal se muestran en la tabla 13:

Resultados

ID paciente	RS (%)	BED (%)	ID paciente	RS (%)	BED (%)
78	2	0	74	40	82
66	8	0	83	40	98
2	9	0	84	40	10
69	12	4	117	40	0
73	12	8	90	42	4
43	14	2	26	42	30
68	14	2	27	42	94
70	14	4	33	42	92
99	14	0	44	42	100
28	18	0	77	42	0
36	18	0	111	42	100
67	18	8	106	44	0
85	18	0	20	44	2
86	18	2	25	44	22
107	20	0	47	44	96
58	22	0	55	44	16
34	24	0	4	46	98
104	24	2	19	46	20
52	26	0	51	46	10
79	26	4	6	48	0
88	26	4	14	48	4
109	26	0	32	48	98
110	28	2	71	48	100
42	29	2	80	48	6
82	30	8	91	48	0
9	32	2	93	48	92
65	32	0	11	49	14
40	34	2	81	50	4

89	34	14	97	50	100
113	34	0	7	54	0
75	36	16	24	54	6
98	36	6	22	56	100
23	38	4	16	58	100
35	38	2	39	58	0
62	38	74	45	58	10
64	38	20	59	63	18
76	38	51	3	64	98
105	38	0	92	66	0
56	40	14	21	68	100
72	40	14	114	70	96

Tabla 13. Proporción de RS por paciente, y su correspondiente ausencia de BED. En gris, pacientes no DCP; en rojo, pacientes DCP; RS: Rotura de la simetría axonemal expresada en proporción (%) de axonemas con más de 3 dobletes desviados respecto de la circunferencia axonemal; BED: Ausencia de los brazos externos de dineína, expresada en proporción (%) de axonemas con menos de 5 brazos externos en su axonema.

La rotura de simetría axonemal en los pacientes DCP osciló entre un 38 y un 70%, mientras que los pacientes excluidos del diagnóstico mostraron una asimetría axonemal inferior de forma general. Observamos un grupo de pacientes no DCP que mostraron una RS superior al 38%, con un máximo de un 63%.

Si analizamos el ICC de este grupo de pacientes no DCP podemos distinguir a su vez dos subgrupos: con una RS inferior al 40%, su ICC medio era de 35,71, mientras que con una RS superior, su ICC medio era de 54,28 (tabla 14).

ID paciente	RS (%)	ICC	ICC medio
35	38	50	35,71
64	38	30	
76	38	30	
115	38	30	
56	40	40	
72	40	40	
84	40	30	
26	42	50	54,28
106	44	70	
25	44	40	
11	49	50	
7	54	70	
24	54	40	
59	63	60	

Tabla 14. Correlación rotura de simetría (RS) vs índice de clínica compatible (ICC) en pacientes no DCP con RS superior al 38%. Los pacientes no-DCP con mayor RS presentaron a su vez mayor proporción de clínica compatible.

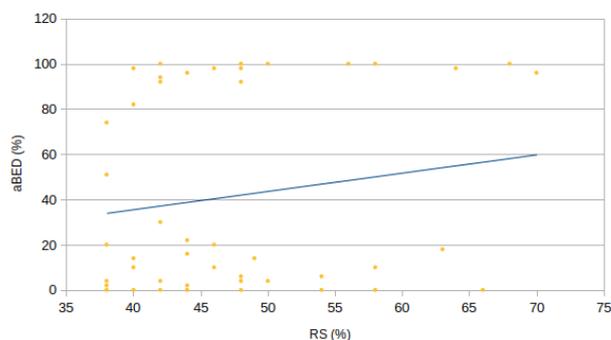
Destaca la presencia de asimetría axonemal en ese 31,57% de pacientes diagnosticados con DCP mediante el análisis de movilidad ciliar y/o estudio genético pero cuyos axonemas resultaron de apariencia normal según el análisis ultraestructural según Consenso (tabla 15, en azul). Todos ellos presentaron rotura de simetría axonemal, entre un mínimo de 38% y un máximo de 66%.

ID paciente	Defecto UE	RS (%)
23	No	38
62	Ausencia BED	38
74	Ausencia BED	40
83	Ausencia BED	40
117	No	40
90	No	42
27	Ausencia BED	42
33	Ausencia BED	42
44	Ausencia BED	42
77	Defecto CC	42
111	Ausencia BED	42
20	No	44
47	Ausencia BED	44
55	No	44
4	Ausencia BED+ BID	46
19	No	46
51	No	46
6	Defecto CC	48
14	Defecto CC	48
32	Ausencia BED	48
71	Ausencia BED	48
80	No	48
91	No	48
93	Ausencia BED	48
81	No	50
97	Ausencia BED	50
22	Ausencia BED	56
16	Ausencia BED	58

39	No	58
45	Defecto CC	58
3	Ausencia BED	64
92	No	66
21	Ausencia BED	68
114	Ausencia BED	70

Tabla 15. Resultados estudio UE detallado de todos los pacientes DCP según Guía Consenso vs rotura de simetría. BED: brazos externos de dineína; CC: complejo central. El 31.57% de los pacientes no presenta defecto UE según Consenso pero muestran RS en sus secciones ciliares.

Dado que la primera observación de la RS se realizó sobre aquellas secciones ciliares con ausencia de los BED, se realizó el análisis de correlación entre la ausencia de BED y la RS de los axonemas, obteniendo un resultado que indica una muy débil correlación entre ambas variables ($p=0.16$) (gráfica 3).



Gráfica 3. Correlación entre la ausencia de los brazos externos de dineína (aBED) y la rotura de simetría (RS). Puede observarse una ligera tendencia ascendente, pero la dispersión de los datos, indican una débil correlación entre ambas variables.

A modo de resumen, el porcentaje de axonemas ciliares con rotura de simetría observado en los pacientes DCP osciló entre un 38% y un 70%, con una media de 48,56%, mientras que el grupo control mostró entre un 2% y un 63% de axonemas ciliares afectados, con una media de un 29,9%. Por tanto, en general los pacientes DCP mostraron mayor proporción de RS que los pacientes con otras patologías respiratorias.

5.5 Estudio ultraestructural de las biopsias nasales

El epitelio nasal de las biopsias estudiadas contenía una mezcla de células ciliadas e intermedias, células caliciformes, leucocitos PMN y moco. Las células ciliadas aparecían aisladas o agrupadas en fragmentos de epitelio.

Estos componentes, en variable proporción, aparecen en todas las muestras con una morfología óptica similar, independientemente de si padecen DCP o no. Ocurre por lo tanto en la morfología óptica algo similar a lo que tiene lugar con las manifestaciones clínicas de la sintomatología respiratoria que no permite deslindar la existencia o no de DCP.

5.5.1 Hallazgos comunes

Los hallazgos ultraestructurales del conjunto de elementos que componen las biopsias nasales de nuestro estudio se clasificaron en 5 tipos: ultraestructura conservada, conservada con defectos secundarios, cambios ultraestructurales grados I (se detecta afectación de las organelas, con cambios en su conformación y/o estructura) y II (el daño ultraestructural afecta a la morfología celular en su conjunto y a la integridad de la membrana), y daño celular grave.

***Ultraestructura conservada (Figura 49):** Predominio de células ciliadas e intermedias, con células caliciformes en proporción aproximada de 1:50, y escasos polimorfonucleares. Ocasionales cilios compuestos.

***Ultraestructura conservada con defectos secundarios (Figura 50):** El incremento de defectos secundarios es evidente, principalmente cilios compuestos, pero también deleciones o adiciones MT en los axonemas.

***Cambios ultraestructurales grado I (Figura 51):** La presencia de cilios compuestos aumenta, así como las protusiones de la membrana ciliar y los axonemas sin membrana. Aumenta la presencia de células inflamatorias, así como la cantidad de moco en el fondo de la muestra. Algunas células ciliadas comienzan a mostrar lo que hemos denominado “caos apical”, o una configuración

desordenada de la región apical de la célula ciliada, caracterizado por cuerpos basales mal localizados y sin estructura axonemal asociada así como raicillas estriadas aisladas. Se observa disminución del número de estructuras ciliares en las células.

***Cambios ultraestructurales grado II (Figura 52 y 53):** Abundante moco que ocupa gran parte de la muestra y atrapa a grupos de cilios, detritus celulares y abundantes células inflamatorias. Los cilios compuestos adquieren aspecto aberrante, con axonemas desordenados, deformaciones y ausencia de membrana. El caos apical es más evidente, con pérdida total de la placa basal, proyecciones de la membrana celular y pérdida de integridad.

***Daño celular grave:** Tumefacción de orgánulos y rotura de la membrana celular (Figura 54).

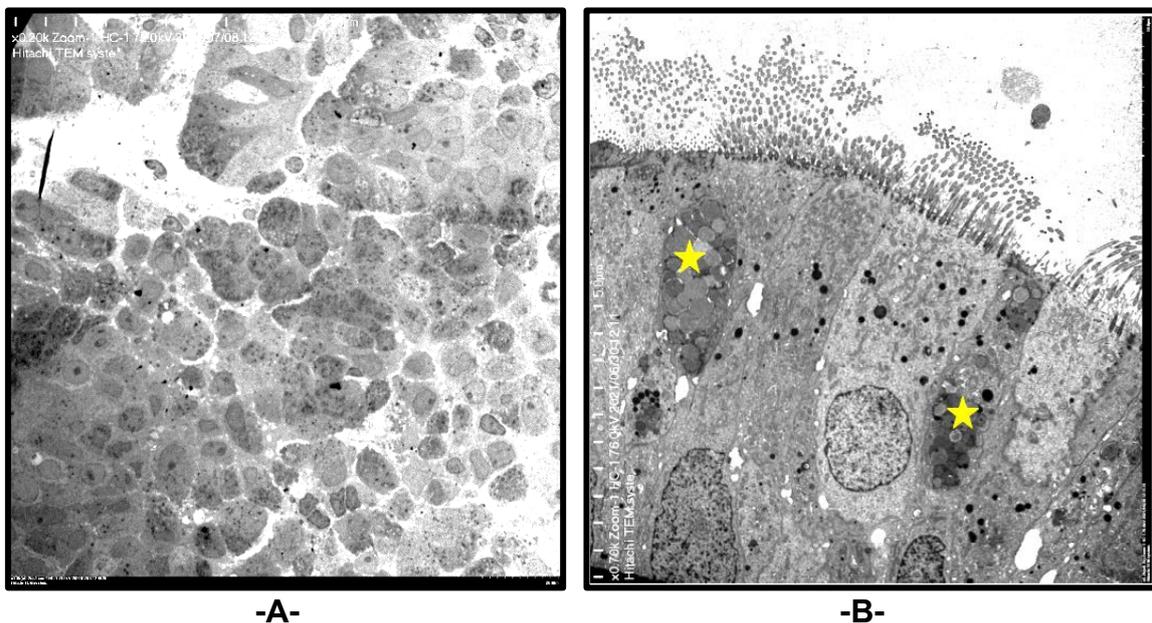


Figura 49. Biopsia nasal de ultraestructura conservada. (A) Imagen panorámica donde se observan grupos de células epiteliales (x1.800); (B) Detalle de un grupo de células ciliadas bien conservadas, con secciones ciliares en su superficie apical. Entre ellas, dos células caliciformes (estrella) (x6.200) (Micrografías).

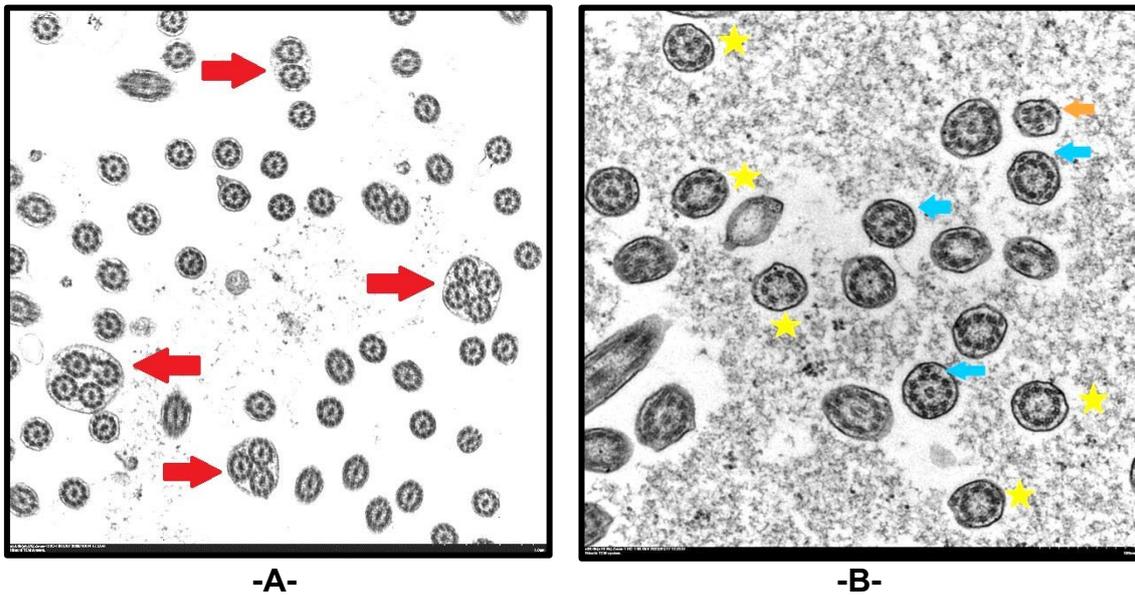


Figura 50 Biopsia nasal con defectos ciliares secundarios. (A) Cilios compuestos de pocos axonemas (x53.000); **(B)** Varios axonemas con defectos secundarios: deleciones (estrellas), adiciones (flecha azul) y desorganización microtubular (flecha naranja) (x88.000) (Micrografías)

Figura 51. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado I (página siguiente). (A) Sección ciliar con protusión de membrana (P) junto a otra con su membrana ciliar discontinua (estrella) (x440.000); **(B)** Membrana apical de célula ciliada con cilios compuestos de formas irregulares (x35.000); **(C)** Sección de un axonema libre, sin membrana (x220.000); **(D, E y F)** Imágenes de “caos apical”: **(D)** Los cuerpos basales aparecen desordenados sin estructura axonemal asociada, pero permanecen en la zona submembranosa (x35.000); **(E)** Se observan los cuerpos basales en una zona más profunda del citoplasma (flechas), en dirección de la célula contigua (C), en la que no se aprecian cuerpos basales (x35.000); **(F)** Se observa gran cantidad de microvilli (Mv). Algunos cuerpos basales aparecen rodeados por pseudovesículas (flechas) (x26.000). (Micrografías)

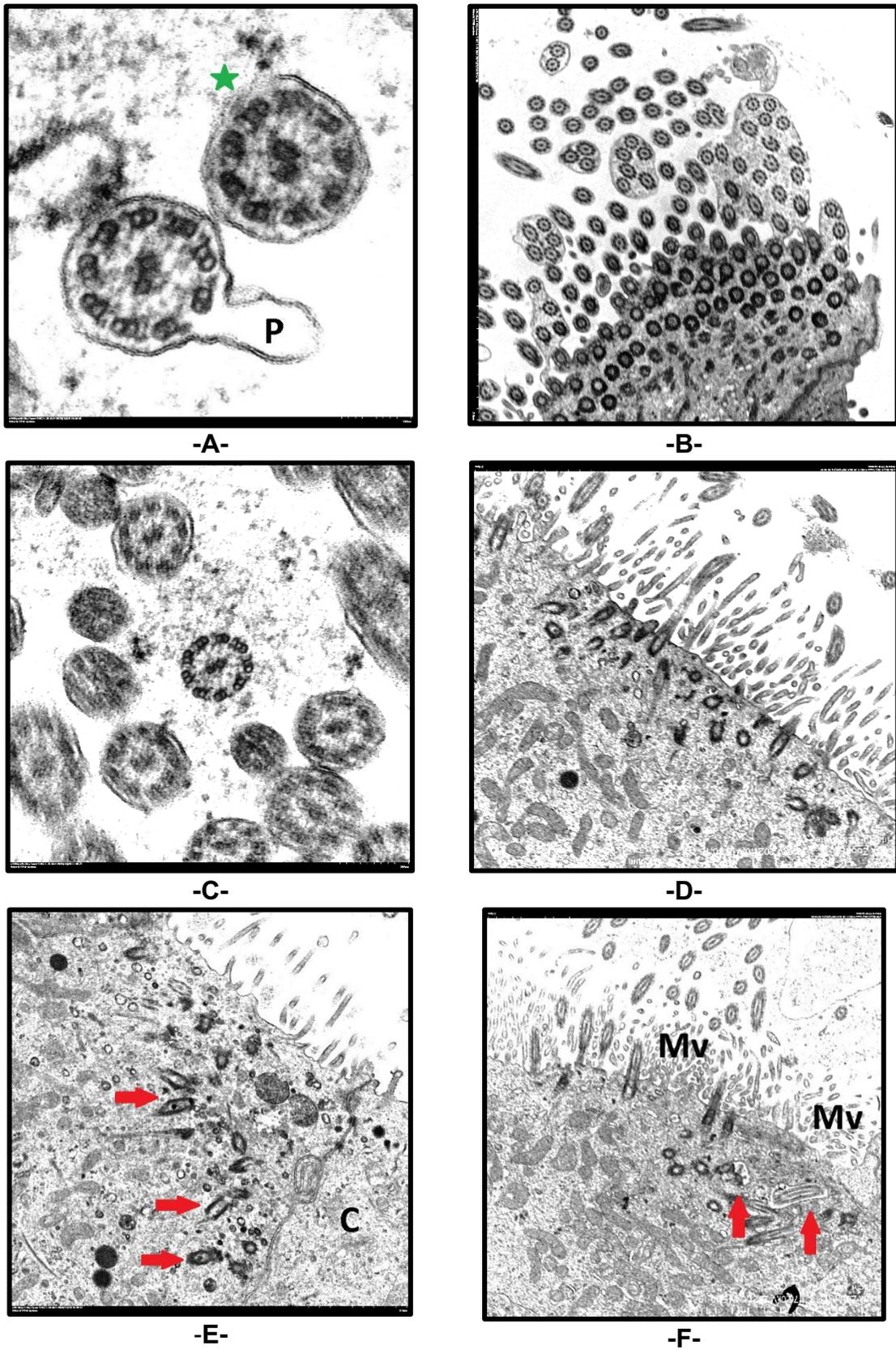
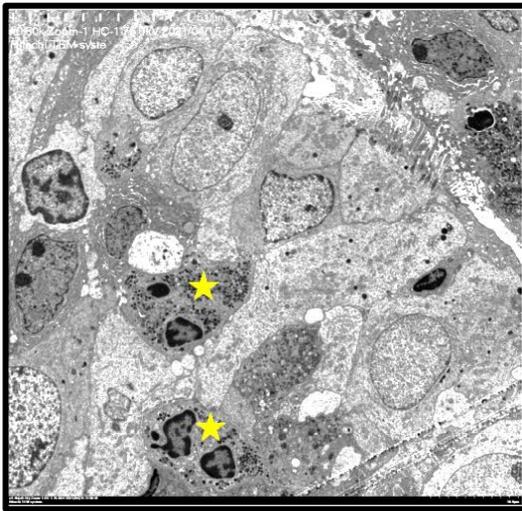
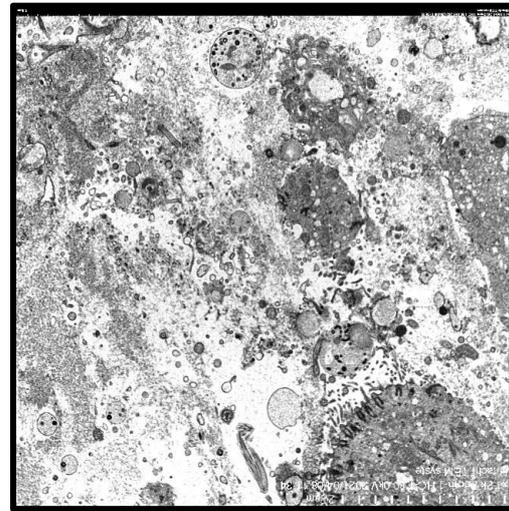


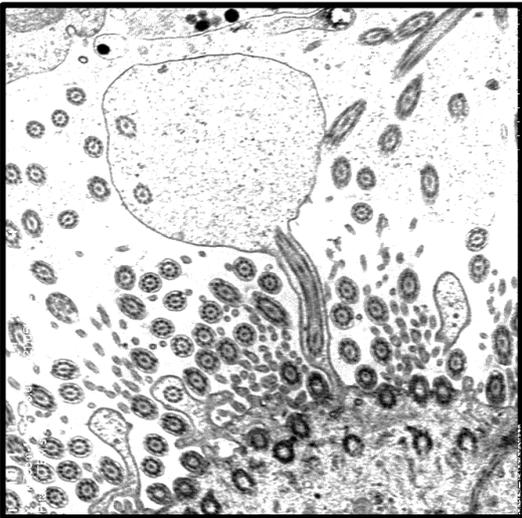
Figura 51. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado I (página anterior).



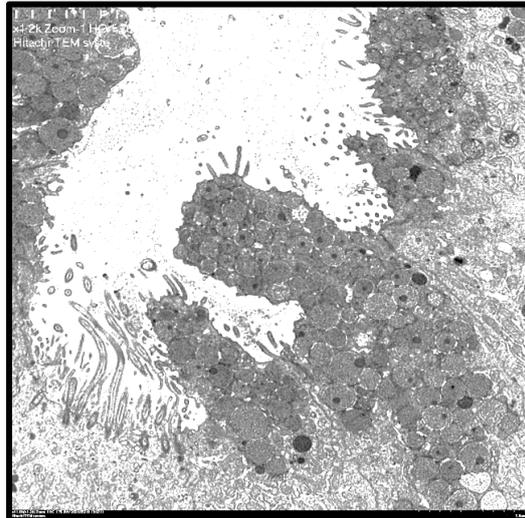
-A-



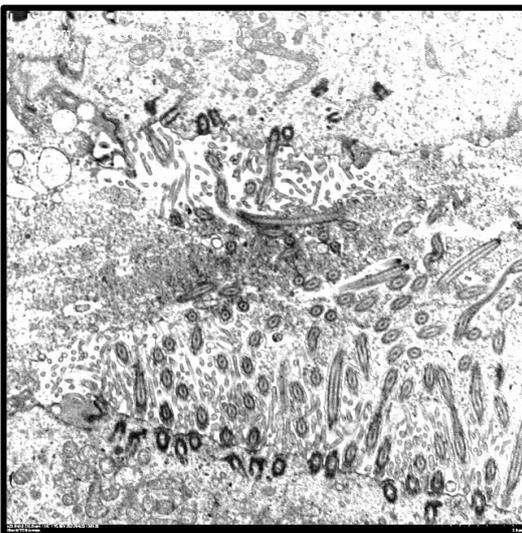
-B-



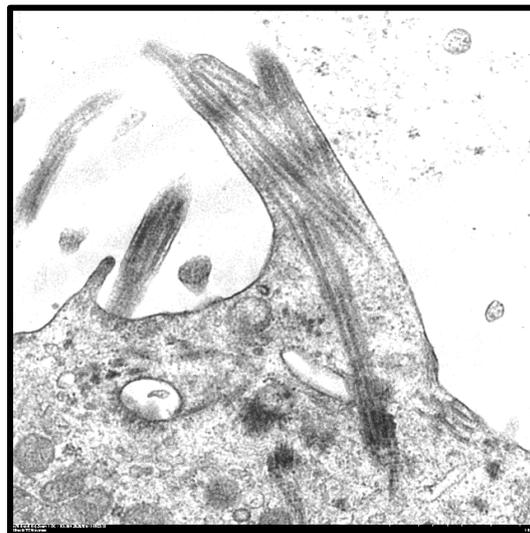
-C-



-D-



-E-

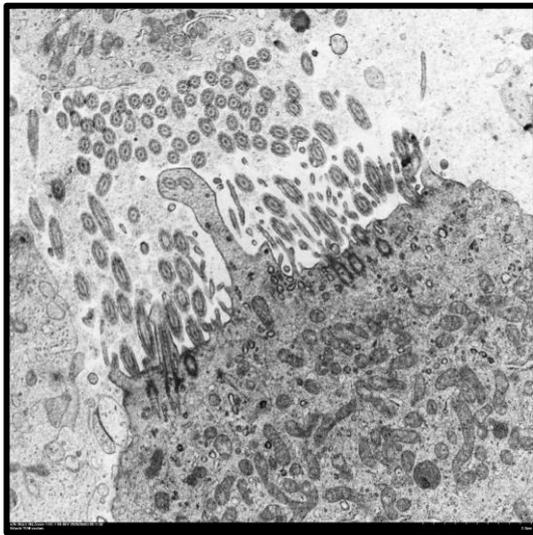


-F-

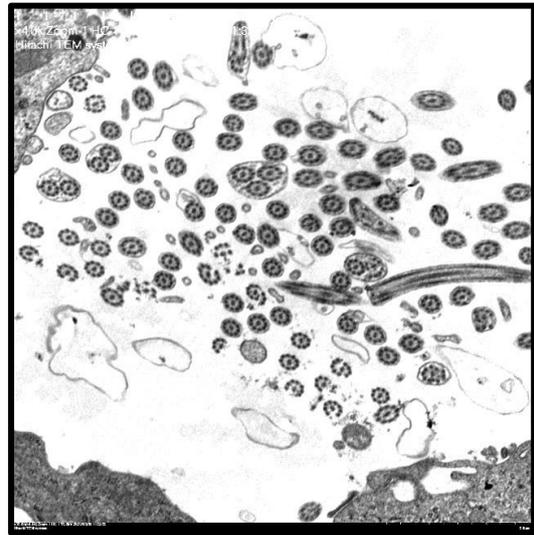
Figura 52. Cambios ultraestructurales grado II (página siguiente).

Figura 52. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado II (*página anterior*) **(A)** Epitelio infiltrado por células inflamatorias (estrellas) (x4.400); **(B)** Fondo de la muestra con abundantes detritus celulares y moco (x11.000); **(C)** Cilio compuesto con gran cantidad de citoplasma (x35.000); **(D)** Membrana apical de varias células donde se observan protusiones de membrana (x11.000); **(E)** Moco que atrapa a las estructuras ciliares (x22.000); **(G)** Detalle de cilio aberrante, con axonemas desorganizados y un solo cuerpo basal (x70.000). (Micrografías)

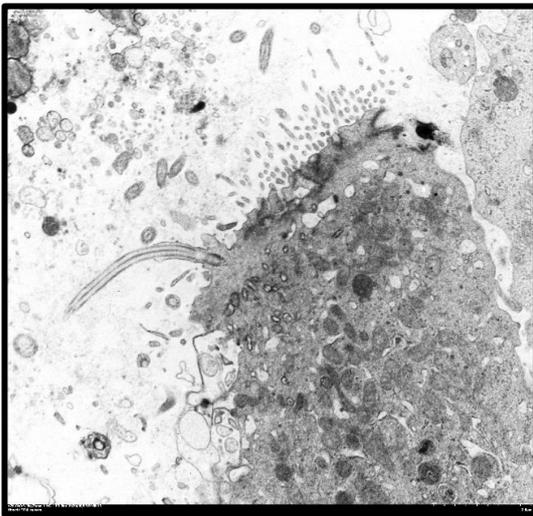
Figura 53. Biopsia nasal con cambios ultraestructurales grado II, continuación (*página siguiente*) **(A)** Región apical con protusión de la membrana celular englobando parte del citoplasma y dos axonemas ciliares (x26.000); **(B)** Defectos ciliares secundarios en una misma célula ciliada. Se observan axonemas sin membrana ciliar, axonemas incompletos, cilios compuestos, protusiones en membranas ciliares e incluso MT libres (x35.000); **(C)** Célula en la que se observa pérdida de la polaridad celular, vacuolización citoplasmática y mitocondrias distribuidas por el citoplasma, membrana celular irregular y un cilio aislado (x26.000).; **(D)** Detalle del caos apical, con un cuerpo basal entre las mitocondrias (flecha amarilla), dos cilios aislados y protusión de membrana con una estructura axonemal (flecha naranja) (x44.000); **(E)** Detalle de la región apical de una célula con pérdida de integridad de la membrana celular y cuerpos basales desordenados entre las mitocondrias (x62.000); **(F)** Región apical con cilios compuestos, protusiones de membrana y cuerpos basales superpuestos (x35.000). (Micrografías)



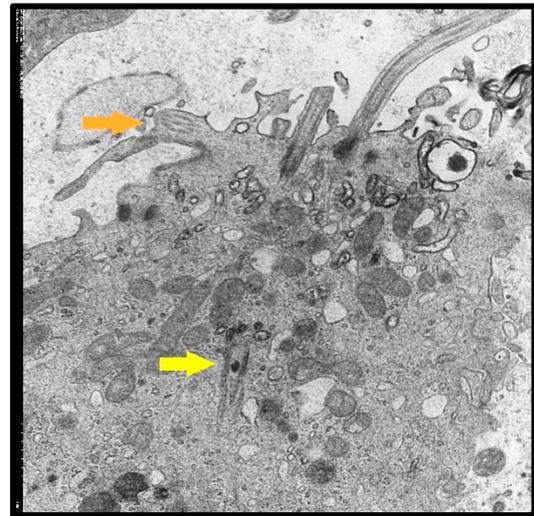
-A-



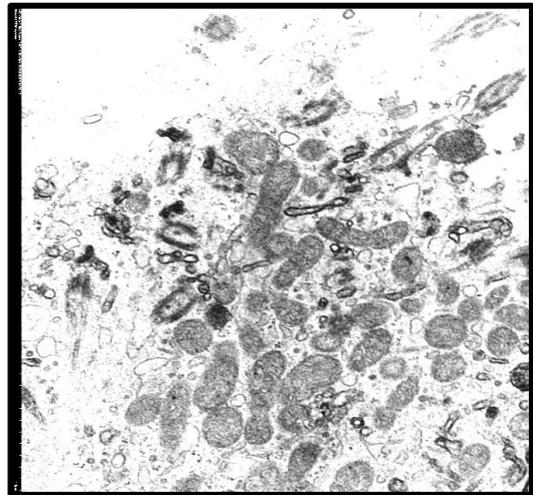
-B-



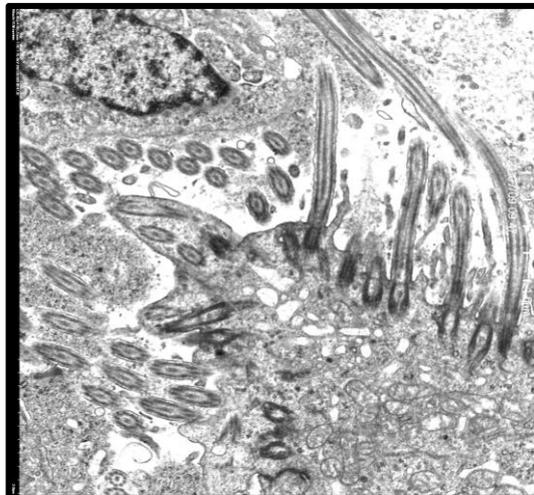
-C-



-D-



-E-



-F-

Figura 53. Cambios ultraestructurales grado II, continuación (página anterior)

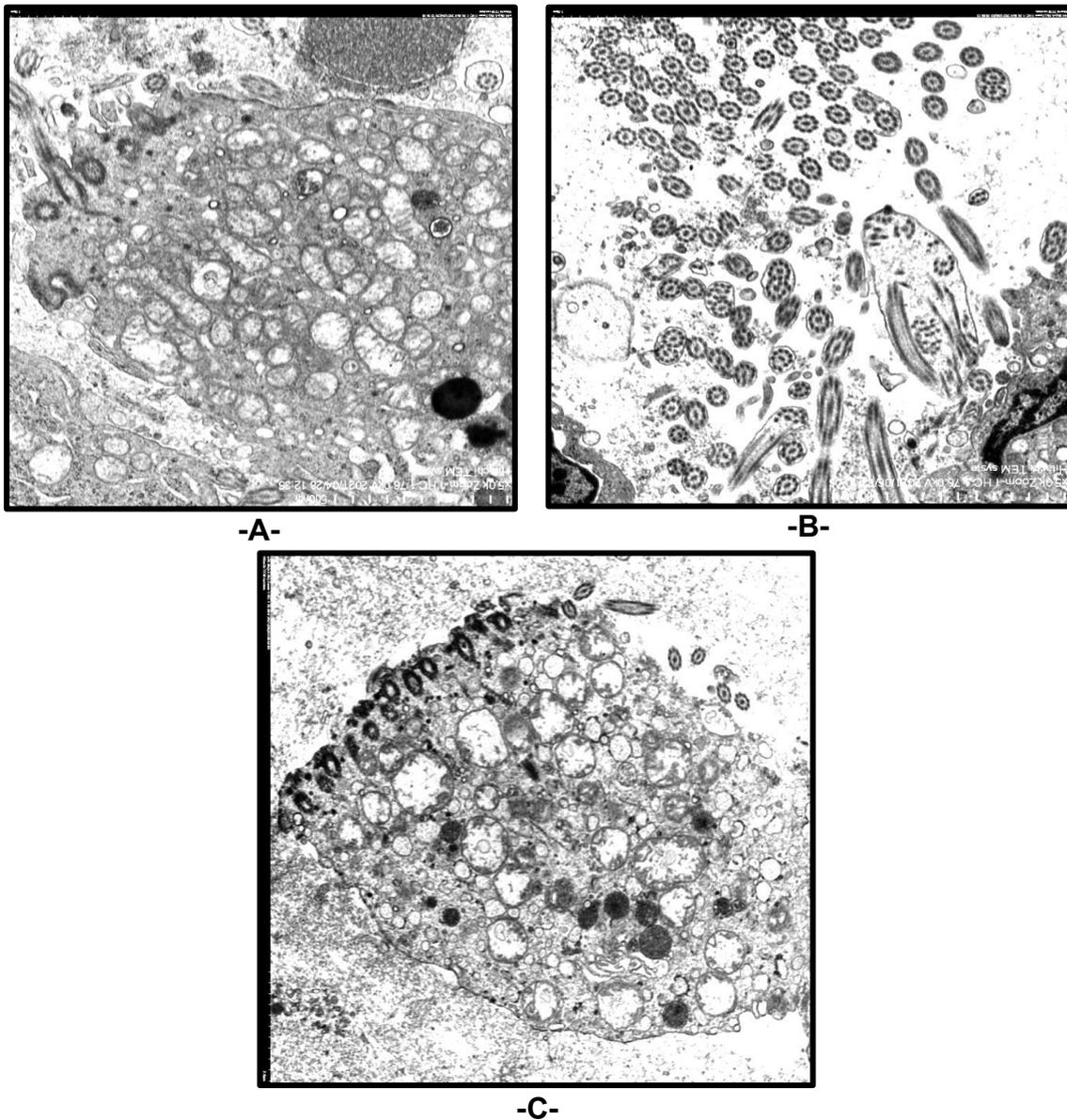


Figura 54. Daño celular grave. (A) Tumefacción mitocondrial (x44.000); (B) Estructuras axonemales sin membrana ciliar junto a cilios aberrantes de axonemas desordenados (x44.000); (C) Células ciliadas en fase de necrosis. Tumefacción de los orgánulos celulares, puede apreciarse la pérdida de las crestas mitocondriales y el refuerzo de los cuerpos basales. En la parte superior se observa la ausencia de membrana celular (x26.000). (Micrografías)

5.5.1 Hallazgos específicos

En la tabla 16 se muestra una selección de los hallazgos UE más destacables encontrados en las biopsias de toda nuestra serie de casos, junto con el resultado del estudio UE y la referencia de las figuras mostradas a continuación de la tabla. La identificación #Pxx corresponde con el paciente donde se localizó cada hallazgo.

Predominaron las alteraciones celulares secundarias a procesos infecciosos y/o inflamatorios, de forma que muchos de los estudios UE para la detección de defectos axonemales diagnósticos no pudieron ser completados por dichas alteraciones concomitantes.

En el caso del #P62, la presencia de cilios cortos como defecto secundario no impidió en este caso completar el estudio axonemal, detectándose globalmente una ausencia de los BED en un 74% de sus secciones ciliares, mientras que en otro grupo de participantes en los que encontramos distintas alteraciones en sus biopsias nasales el resultado de su estudio UE también pudo completarse, mostrando ultraestructura axonemal conservada en todos ellos.

Un hallazgo destacable del estudio de las biopsias nasales fue el del #P67, en el que detectamos la presencia de cuerpos lamelares intracelulares (**Figura 68**).

ID paciente	Hallazgo	Resultado estudio UE	Figura
13	Sistema de membranas	-	55
43	Sistema de membranas	Sin alteraciones	55
66	Axonemas intracitoplasmáticos	Sin alteraciones	56
67	Axonemas intracitoplasmáticos	Sin alteraciones	56
76	Microorganismos	Sin alteraciones	57
50	Microorganismos	-	58
116	Microorganismos	-	59
30	Metaplasia escamosa	-	60
18	Metaplasia escamosa	-	60
87	Metaplasia escamosa	-	60
60	Cilios cortos	-	61
62	Cilios cortos	Ausencia BED 74%	61
65	Gránulos en cuerpos basales	Sin alteraciones	62
15	Hiperplasia de células caliciformes	-	63
81	Cuerpos lamelares extracelulares	Sin alteraciones	64
05	Raicillas estriadas deslocalizadas	-	65
81	Raicillas estriadas deslocalizadas	Sin alteraciones	65
49	Inclusión ciliar	Sin alteraciones	66
57	Quiste ciliar	-	67
97	Cuerpos lamelares intracelulares	Ausencia BED 100%	68

Tabla 16. Biopsias nasales: hallazgos ultraestructurales específicos. (-): Estudio no completado.

*Sistema de membranas organizado en conjuntos paralelos de cisternas con pequeños anillos o ventanas a intervalos regulares. Encontrado en el citoplasma de células epiteliales intermedias (**Figura 55**).

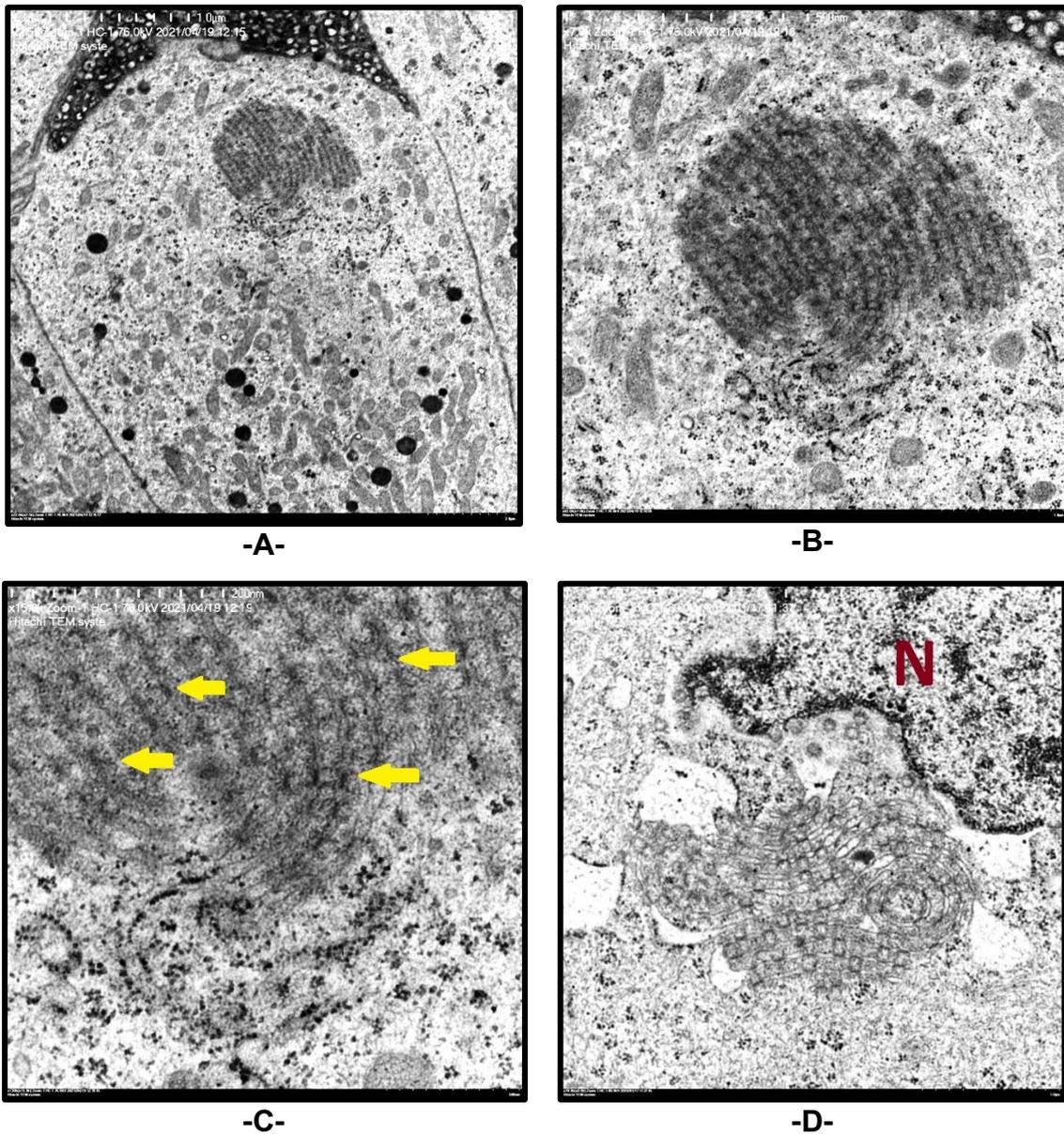


Figura 55. Sistema de membranas. (A) Citoplasma de célula epitelial con sistema de membranas apiladas con anillos o ventanas a intervalos regulares, #P13 (x22.000); (B) Detalle del sistema de membranas de (A) (x62.000); (C) Los anillos o ventanas se aprecian como pequeñas bandas electrondensas (flechas), #P13 (x130.000); (D) Sistema de membranas junto al núcleo celular (N), #P43 (x70.000). (Micrografías)

*Axonemas intracitoplasmáticos: Estructuras ciliares que no protuyen en la superficie apical de la célula, formados por el axonema y el cuerpo basal, y situados fuera de su localización submembranosa (**Figura 56**).

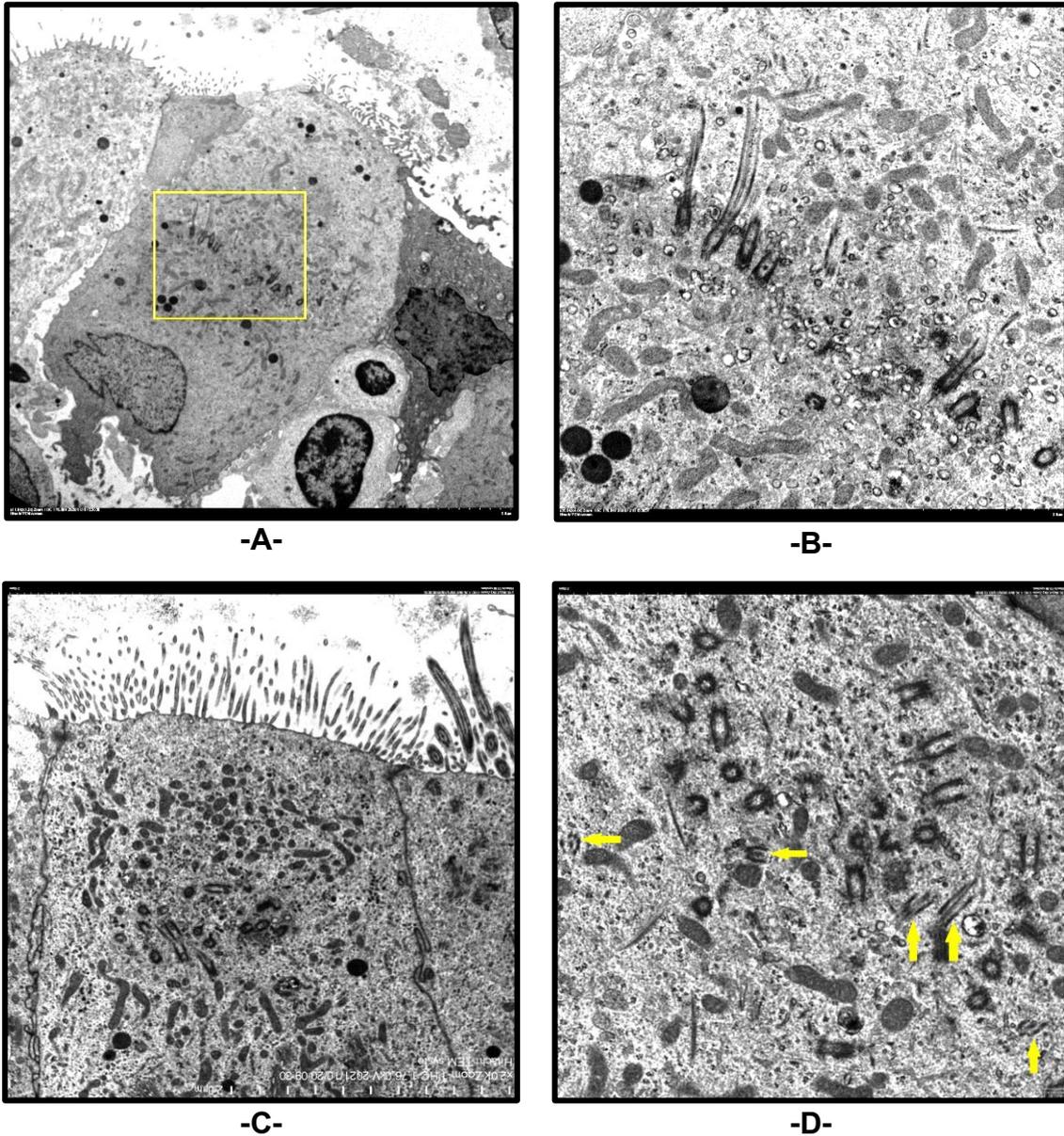


Figura 56. Axonemas intracitoplasmáticos. (A) Célula ciliada con una banda en el tercio medio de su citoplasma que corresponde con varios cuerpos basales alineados de los que emergen axonemas, #P66 (x11.000); (B) Detalle de (A): Axonemas ciliares con cuerpos basales asociados (x35.000); (C) Axonema ciliar de sección tangencial (flecha), junto a raicillas estriadas, #P67 (x35.000); (D) Citoplasma de célula ciliada con una agrupación de cuerpos basales junto a secciones de axonemas (flecha), #P67 (x35.000) (Micrografías).

*Microorganismos en #P76: Estructuras compatibles con microorganismos, de localización extracelular. Probable estructura bacteriana (**Figura 57**).

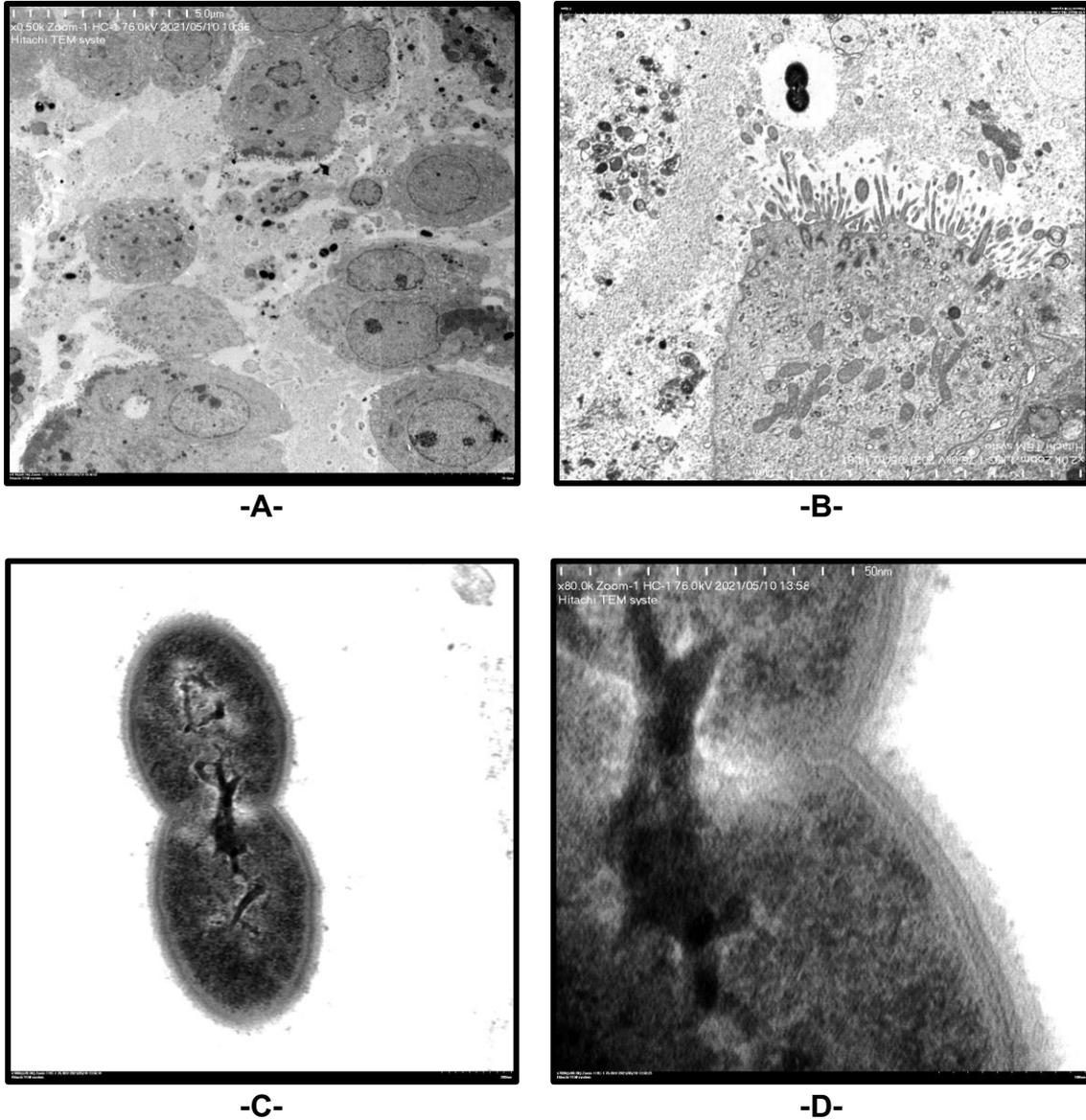


Figura 57. Microorganismos (I). (A) Panorámica de biopsia nasal de #P76 con estructuras de elevada electrodensidad en el fondo de la muestra (centro), entre moco y detritus celulares (x4.400); (B) Estructura electrodensa sobre célula ciliada (x18.000); (C) Detalle de (B): Probable estructura bacteriana en la que podrían distinguirse una cápsula bacteriana con prolongaciones y material genético en su interior (x180.000); (D) Detalle a gran aumento de (C) (x700.000) (Micrografías).

*Microorganismos en #P50: Abundantes estructuras compatibles con microorganismos, de localización extracelular y morfología similar al #P76. Probables estructuras bacterianas (**Figura 58**).

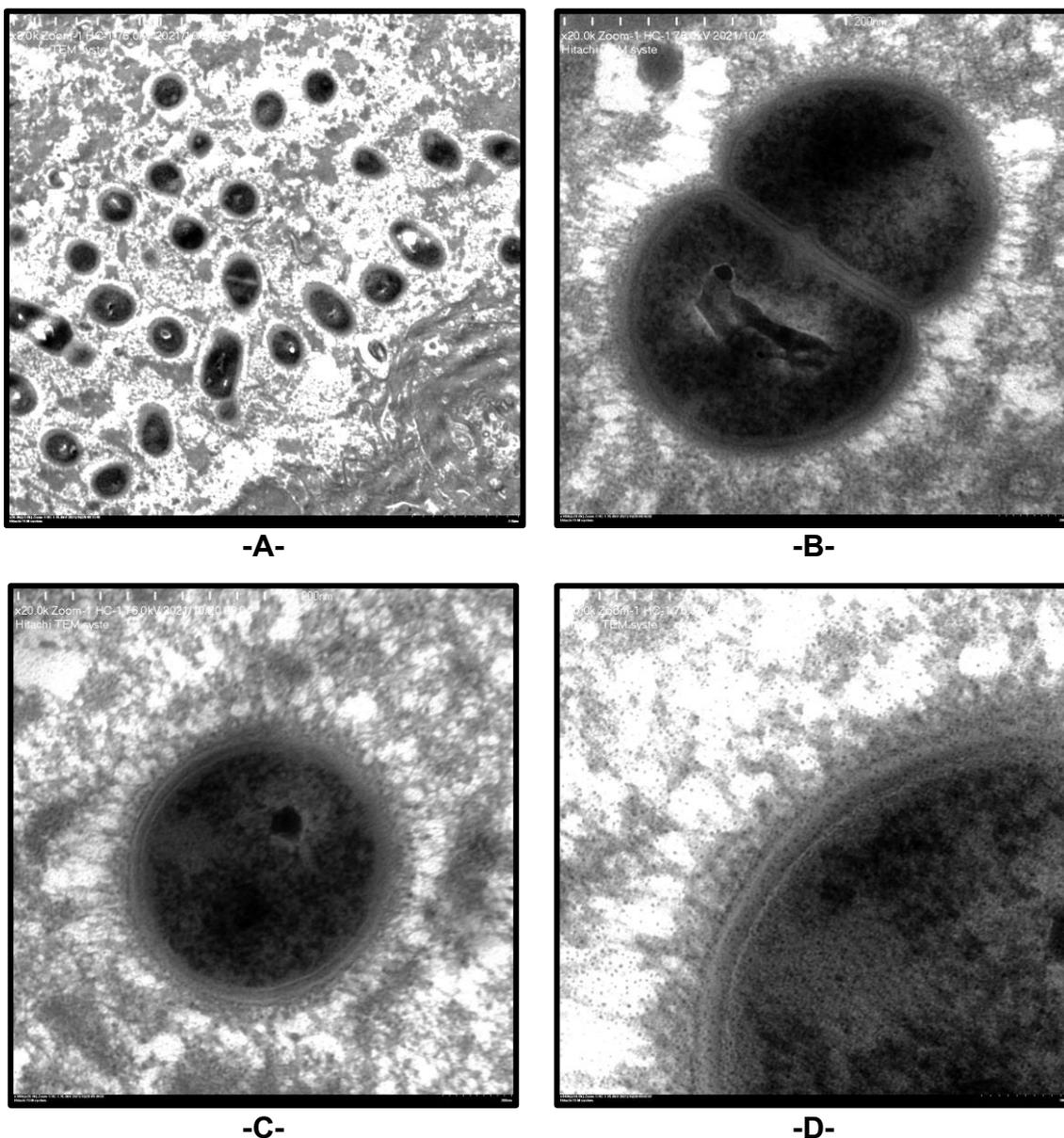


Figura 58. Microorganismos (II). (A) Panorámica de un grupo de estructuras compatibles con bacterias, embebidas en restos celulares (x26.000); (B) Detalle de una de las estructuras, de aspecto bilobulado y filamentos que proyectan de su superficie (x180.000); (C) Detalle de otra estructura, de aspecto redondeado (x180.000); (D) Detalle de (C), en la que puede apreciarse la configuración de la pared, con varias bandas en su estructura interna (x440.000) (Micrografías)

*Microorganismos en #P116: Estructuras compatibles con microorganismos, de localización extracelular y morfología diferente a las anteriores. Probables estructuras bacterianas (**Figura 59**).

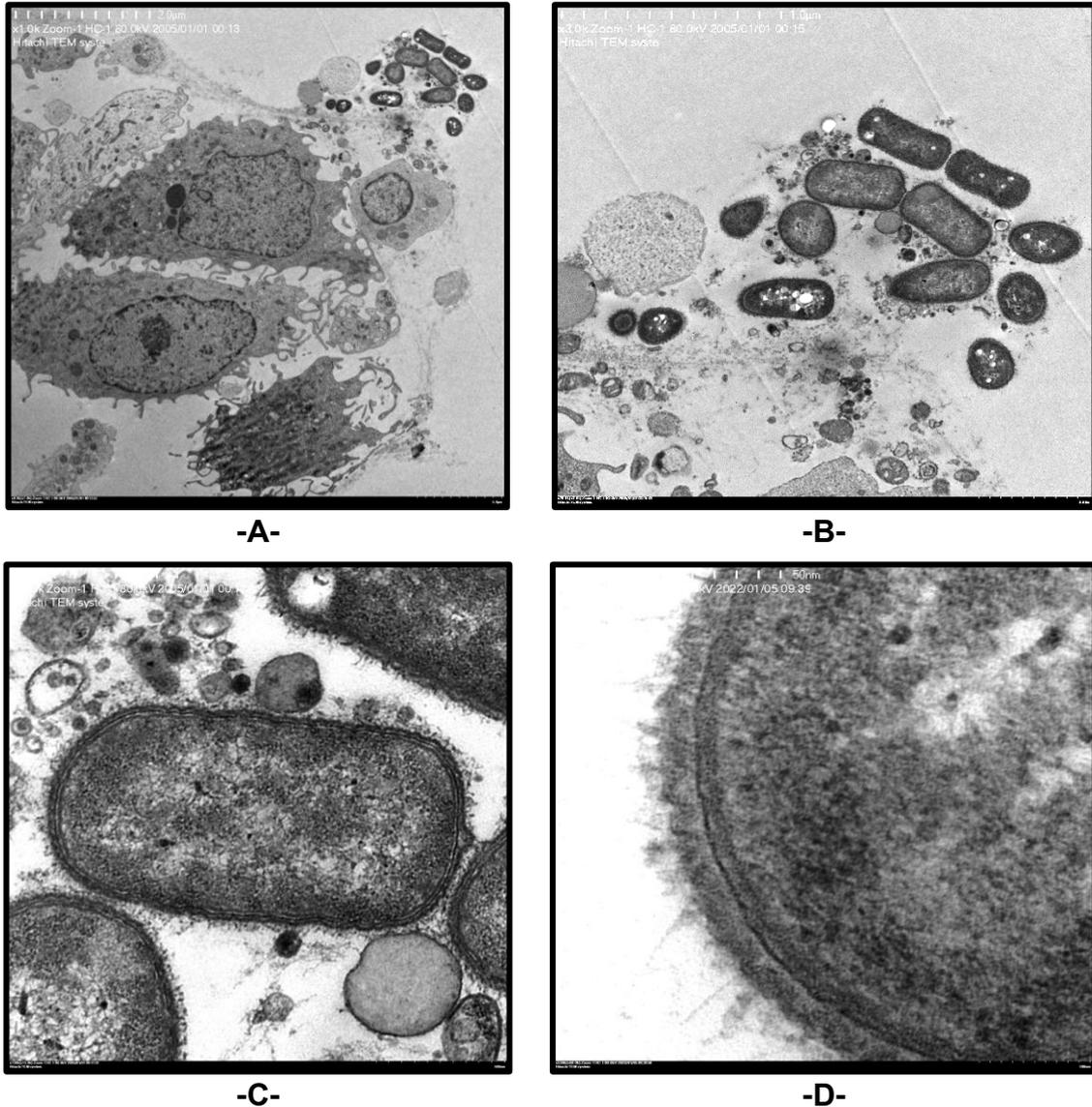


Figura 59. Microorganismos (y III). (A) Panorámica en la que se observan varias estructuras compatibles con bacterias junto a varias células epiteliales (x8.800); (B) Detalle del grupo de estructuras bacterianas (x26.000); (C) Detalle de una de las estructuras bacterianas, en la que se aprecian filamentos que proyectan desde su superficie (x130.000); (D) Detalle de (C), en la que se aprecia una capa superficial de superficie ondulada (x530.000) (Micrografías).

*Metaplasia escamosa: Presencia de células elongadas, de citoplasma denso y sin orgánulos, que aparecen descamadas del resto de grupos celulares de la biopsia (**Figura 60**).

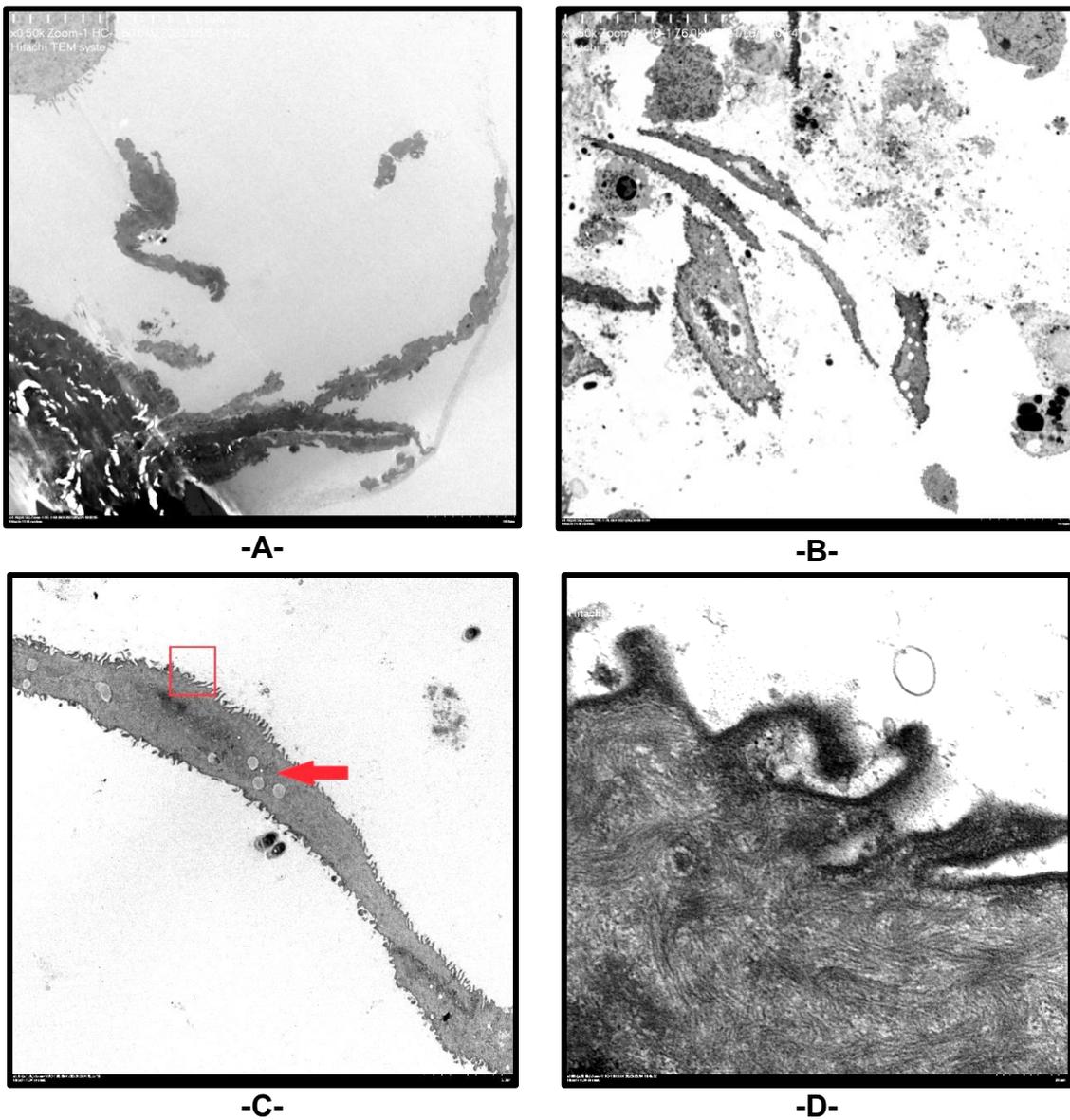


Figura 60. Metaplasia escamosa. (A) Panorámica del #P18, donde se observa un grupo de células epiteliales con cambios metaplásicos (x4.400); (B) Panorámica del #P30. Algunas células aún conservan restos del núcleo celular (x4.400); (C) Célula metaplásica del #P67, donde se observan pequeñas prolongaciones citoplasmáticas y alguna microvacuola en su interior (flecha) (x8.800); (D) Detalle de (C), pueden apreciarse las prolongaciones finas en su superficie y el citoplasma repleto de tonofilamentos (x180.000) (Micrografías).

*Hiperplasia de células caliciformes: Proliferación de células caliciformes en #P15 con reducción del número de células ciliadas (**Figura 63**).

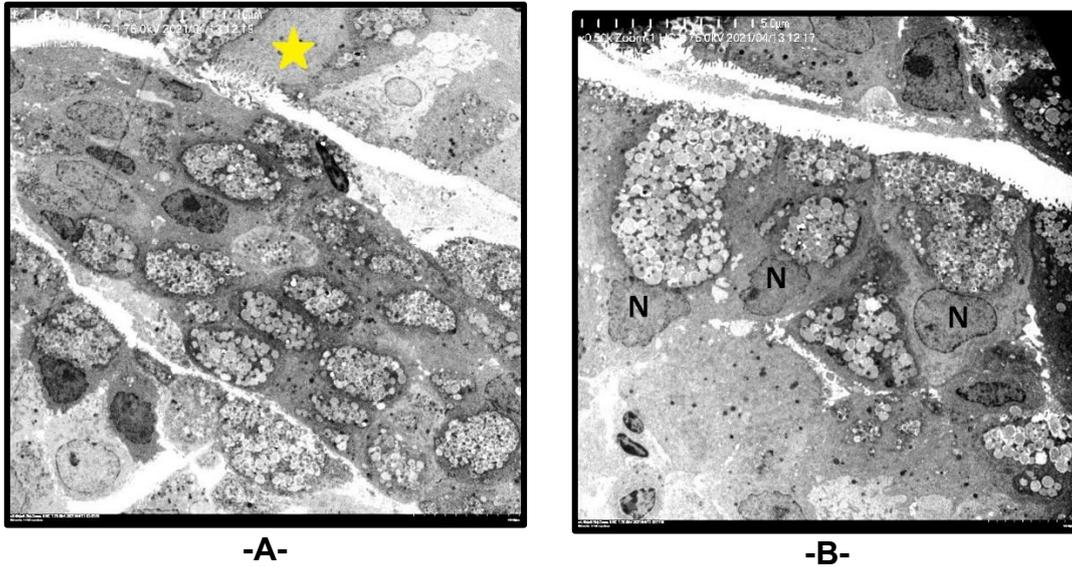


Figura 63. Hiperplasia células caliciformes. (A) Se observa gran cantidad de células caliciformes, y una sola célula ciliada (estrella) (x2.600); (B) Nótese el tamaño de los núcleos de estas tres células, con su citoplasma parcialmente repleto de vesículas de secreción (x4.400). (Micrografías)

*Cuerpos lamelares extracelulares en #P81: Estructuras multilaminadas extracelulares de apariencia similar al del surfactante pulmonar (**Figura 64**).

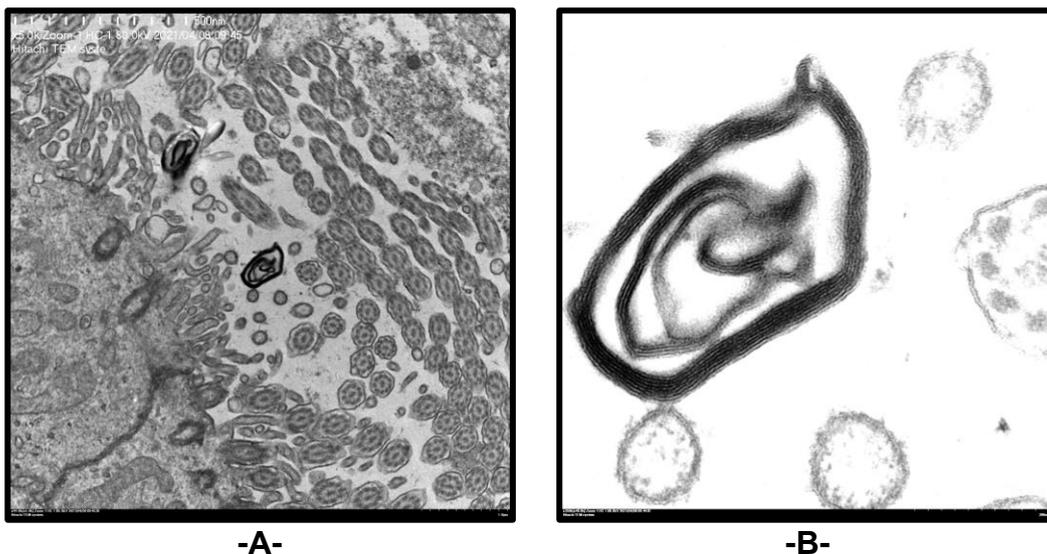


Figura 64. Cuerpos lamelares extracelulares. (A) Dos cuerpos lamelares extracelulares junto a secciones ciliares (x44.000); (B) Detalle de (A): A gran aumento pueden apreciarse las láminas concéntricas. (x350.000) (Micrografías).

*Raicillas estriadas deslocalizadas: Raicillas estriadas agrupadas de localización diversa, sin cuerpos basales asociados (**Figura 65**).

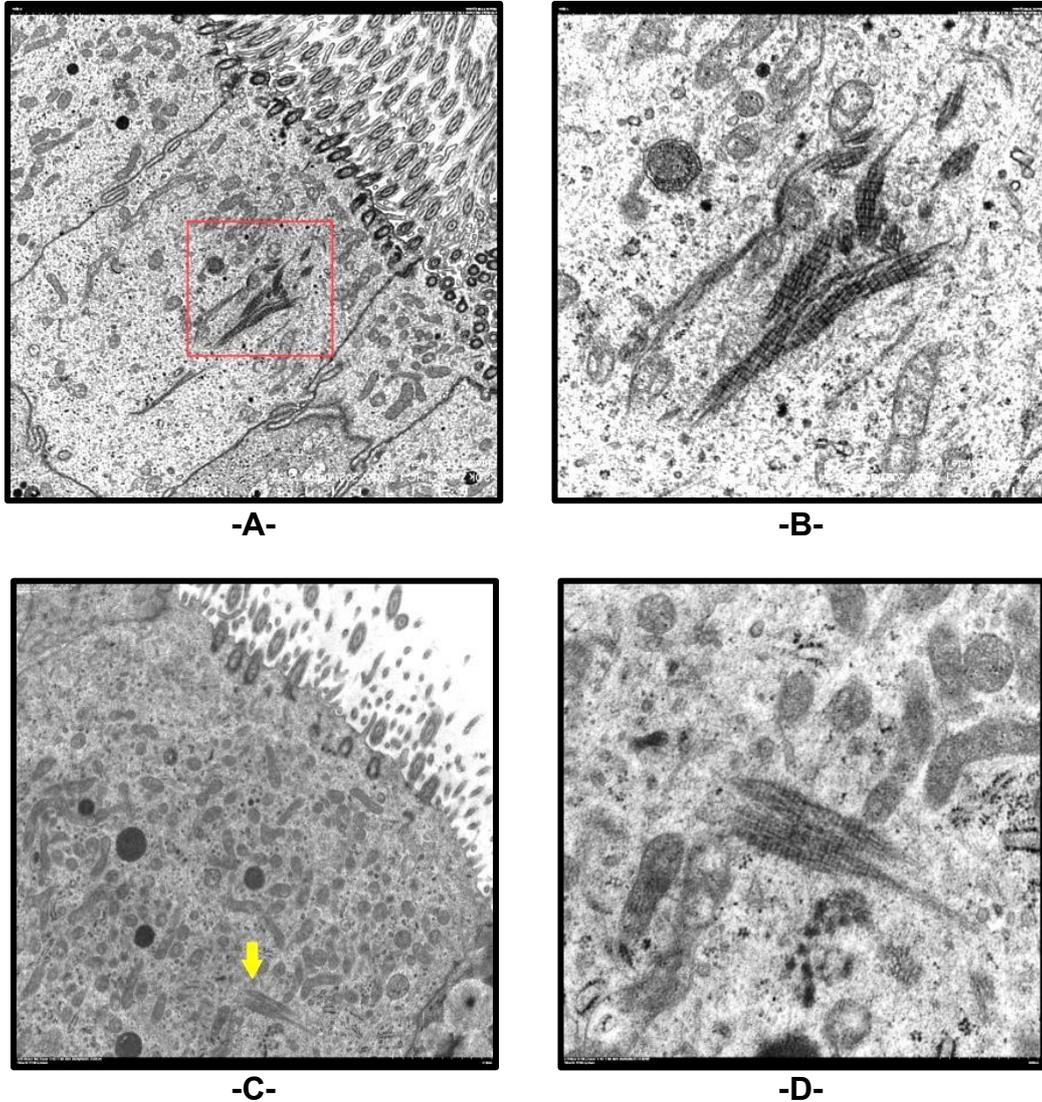
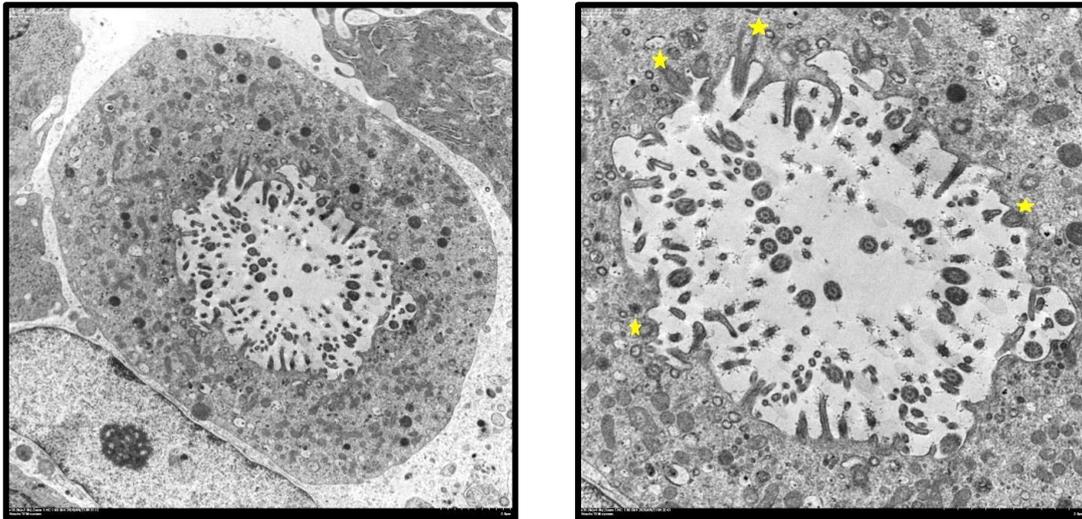


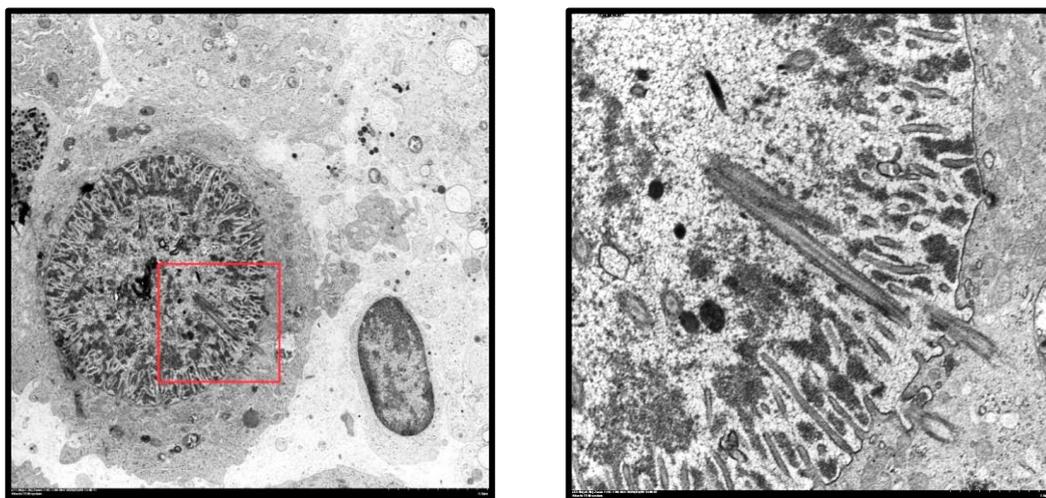
Figura 65. Raicillas estriadas deslocalizadas. (A) Célula ciliada en la que se distinguen varias raicillas estriadas aisladas, #P05 (x18.000); (B) Detalle de (A): Se contabilizan al menos 4 raicillas grandes y dos pequeñas (zona superior derecha), #P05 (x70.000); (C) Raicillas estriadas en zona citoplasmática profunda (flecha), #P81 (x26.000); (D) Detalle de (C): Dos raicillas estriadas aisladas, junto a varios cuerpos mitocondriales, #P81 (x110.000) (Micrografías).

*Inclusión ciliar: Inclusión intracitoplasmática en #P49 rodeada por una membrana simple continua, que incluye cilios con cuerpos basales, y microvilli (Figura 66).



-A- **-B-**
Figura 66. Inclusión ciliar. (A) Sección transversal de célula ciliada con una gran vesícula intracitoplasmática en las que se proyectan cilios y microvilli (x18.000); (B) Detalle de (A): Se observan varias secciones ciliares y de microvilli en la luz de la vesícula, además de cuerpos basales bajo la membrana (estrellas) (x35.000) (Micrografías)

*Quiste ciliar: Gran vacuola intracitoplasmática en #P57 con numerosos cilios y microvilli, de contenido granular y amorfo (Figura 67).



-A- **-B-**
Figura 67 Quiste ciliar. (A) Sección transversal de célula ciliada con una gran estructura intracitoplasmática (x11.000); (B) Detalle de (A): Se aprecian estructuras axonemas sin membrana y un contenido amorfo disperso en el interior de la cavidad (x53.000) (Micrografías)

*Cuerpos lamelares intracelulares en #P97: Presencia de múltiples vesículas con estructuras multilaminadas en el citoplasma de casi la totalidad de células de la biopsia. Se detectó en células ciliadas e intermedias, no así en células caliciformes (**Figura 68**).

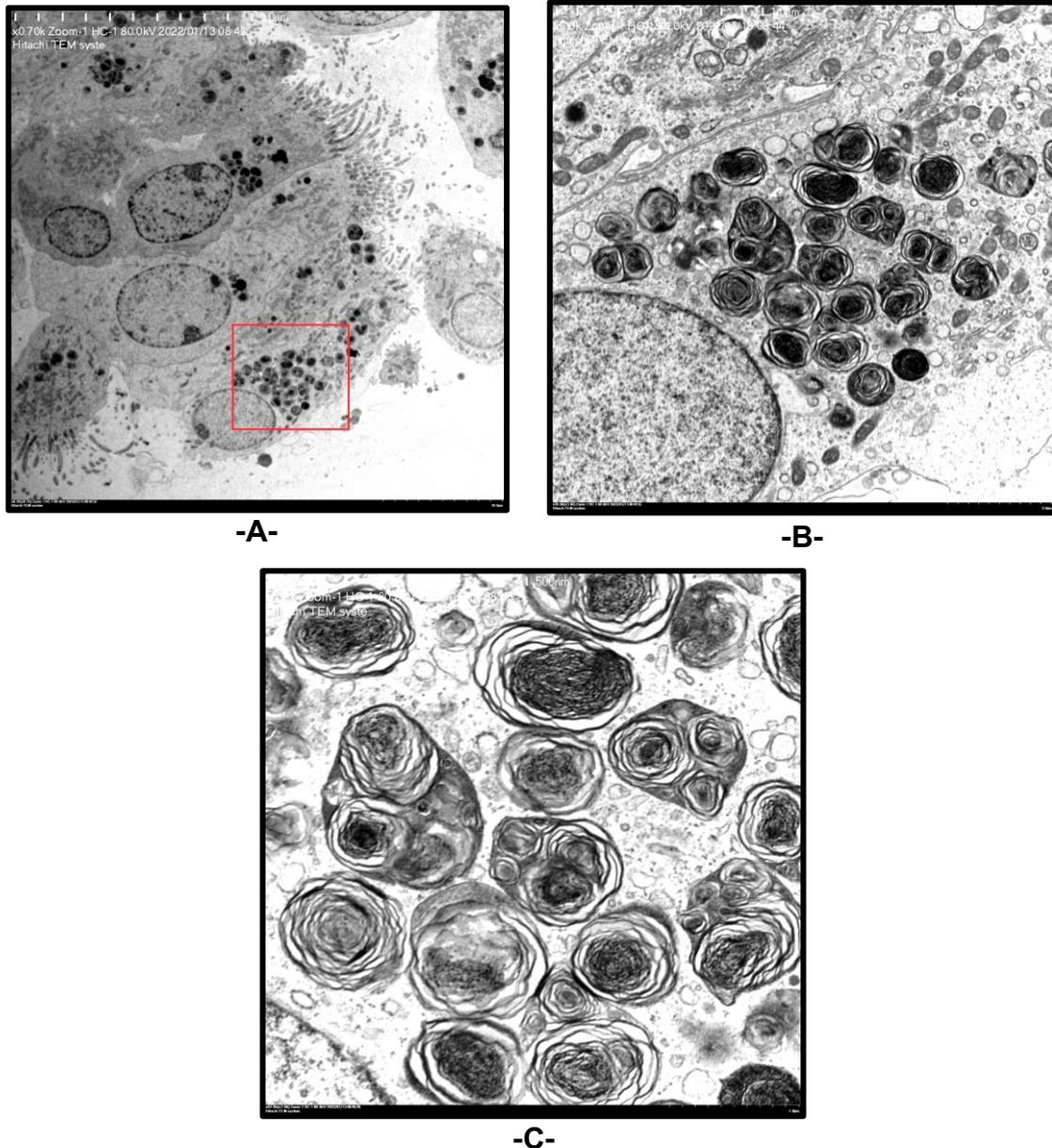


Figura 68. Cuerpos lamelares intracelulares. (A) Grupo de células ciliadas en las que se aprecian gránulos oscuros en sus citoplasmas (x6.200); (B) Detalle de (A): Se observan estructuras multilaminadas junto al núcleo (x26.000); (C) Detalle de (B): A más detalle se aprecia las múltiples capas de las estructuras incluidas en cada vesícula (x62.000) (Micrografías).

5.6 Estudios de correlación

5.6.1 Relación genotipo-fenotipo ciliar ultraestructural

El estudio UE de los axonemas ciliares de los pacientes DCP mostró por una parte que la alteración mutacional más prevalente (*DNAH5*) se expresó a nivel ultraestructural como ausencia de los BED, tanto de forma parcial como total.

En dos casos con mutación por *RSPH1* (#P16 y #P14), el defecto del CC quedó bien definido en sus axonemas, no así en otros dos casos con mutación bigénica de *RSPH1* y *HYDIN* (#P91 y #P92), en los que no se detectó defecto ultraestructural aparente.

En un caso con test genético negativo para los genes DCP (#P16) se determinó una ausencia total de los BED.

Dentro del grupo de pacientes sin defecto UE aparente, los resultados del test genéticos fueron diversos, detectándose variantes patogénicas en genes como *DNAH11* o *RSPH1*, incluidos en el subgrupo de variantes DCP con ultraestructura axonemal conservada, pero también se detectaron mutaciones en *DNAAF1* (#P20) y *DNAH9* con *HYDIN* (#P55).

DYX1C1, uno de los genes alterados detectados en nuestra cohorte, se describe como un factor citoplasmático que interviene en el ensamblaje de los brazos de dineína, y cuya mutación se manifiesta como ausencia tanto de BED como BID. Sin embargo, la biopsia nasal del #P32 -con variante patogénica de *DYX1C1* - muestra axonemas ciliares con brazos de dineína cortos, es decir, ausencia parcial, y presencia de los BID en casi la totalidad de los axonemas estudiados. El #P4, con variante patogénica de *DNAAF1*, otro factor de ensamblaje citoplasmático de los brazos de dineína- sí presentó axonemas con ausencia de los BED combinada con ausencia de los BID.

Los pacientes #P23, #P51 y #P80 exhibieron axonemas ciliares conservados y no se detectó ninguna variante patogénica en la lista de 35 genes testados, si bien desde otra perspectiva todos presentaron cilios discinéticos en el análisis de movilidad ciliar y una clínica compatible.

La tabla 17 muestra las relaciones entre las variantes genéticas detectadas y el defecto UE de los axonemas ciliares en nuestra cohorte de casos.

ID paciente	Variante detectada	Defecto UE
31	<i>CCDC151</i>	Ausencia BED
27	<i>DNAH5</i>	
47	<i>DNAH5</i>	
97	<i>DNAH5</i>	
21	<i>DNAH5</i>	
22	<i>DNAH5</i>	
74	<i>DNAH5</i>	
62	<i>DNAH9</i>	
71	<i>DNAI1</i>	
32	<i>DYX1C1</i>	
16	NEGATIVO	
44	<i>TTC25</i>	
83	<i>DNAH5</i>	
4	<i>DNAAF1</i>	Ausencia BED+ BID
14	<i>RSPH1</i>	Defecto CC
6	<i>RSPH1</i>	
53	<i>CCDC39</i>	Desorg MT+ aus BID
20	<i>DNAAF1</i>	No
117	<i>DNAH11</i>	
81	<i>DNAH11</i>	

55	<i>DNAH9 y HYDIN</i>	No
23	NEGATIVO	
51	NEGATIVO	
80	NEGATIVO	
91	<i>RSPH1 y HYDIN</i>	
92	<i>RSPH1 y HYDIN</i>	

Tabla 17. Relaciones entre genotipo y defecto ultraestructural. Leyenda: BED: Brazos externos de dineína; BID: Brazos internos de dineína; CC: Complejo central; Desorg MT+ aus BID: Desorganización microtubular combinada con ausencia de los brazos internos de dineína.

5.6.2 Relación genotipo-fenotipo ciliar funcional

Clasificando los pacientes por alteración mutacional, los resultados de movilidad obtenidos fueron de gran variabilidad, incluso entre aquellos que presentaron mutación en un mismo gen concreto (tabla 18).

El grupo de pacientes con test genético negativo mostraron en el análisis de movilidad tanto cilios inmóviles como discinéticos.

Del grupo de pacientes en los que se detectó variante patológica en algún gen DCP, los pacientes #P6 y #P117 con mutación en *RSPH1* y *DNAH11* respectivamente, presentaron un patrón de batida ciliar aparentemente normal.

ID paciente	Variante detectada	Patrón movilidad
47	<i>DNAH5</i>	DISCIN
74		DISCIN
27		INMOV
83		INMOV
97		INMOV+RES
21		INMOV+RES

22		INMOV+RES
13	<i>RSPH1</i> <i>RSPH1</i>	DISCIN
14		DISCIN
6		N
92	<i>RSPH1 y HYDIN</i>	DISCIN
91		DISCIN
62	<i>DNAH9</i>	DISCIN
55	<i>DNAH9 y HYDIN</i>	INMOV+RES
4	<i>DNAAF1</i>	INMOV
20		INMOV+RES
81	<i>DNAH11</i>	INMOV+RES
117		N
71	<i>DNAI1</i>	DISCIN
32	<i>DYX1C1</i>	INMOV
31	<i>CCDC151</i>	INMOV+RES
53	<i>CCDC39</i>	INMOV+RES
44	<i>TTC25</i>	INMOV+RES
23	NEGATIVO	DISCIN
57		DISCIN
80		DISCIN
15		DISCIN
51		DISCIN
16		INMOV+RES

54		INMOV+RES
5		INMOV+RES
29		INMOV+RES

Tabla 18. Relaciones entre genotipo y patrón de movilidad ciliar (página anterior). Leyenda: DISCIN: discinético; INMOV: inmovilidad ciliar total; INMOV+RES: Predominio de inmovilidad ciliar junto a movimiento ciliar residual; N: normal.

5.6.3 Relación fenotipo ciliar ultraestructural-funcional

El defecto UE más prevalente (defecto de los brazos externos de dineína) no mostró un defecto de movilidad uniforme entre los distintos pacientes que lo portaban (tabla 19). De igual forma, aquellos casos sin un defecto ultraestructural aparente también mostraron diversos patrones de movilidad.

El grupo de casos con defecto del CC destaca por ser el único que no presentó cilios inmóviles.

ID paciente	Defecto UE	Patrón movilidad ciliar
3	Ausencia BED	DISCINÉTICO
47	Ausencia BED	
71	Ausencia BED	
74	Ausencia BED	
62	Ausencia BED	
14	Defecto CC	
77	Defecto CC	
45	Defecto CC	
12	Desorg MT+ aus BID	
90	No	
23	No	
92	No	
80	No	
51	No	

91	No	
27	Ausencia BED	INMOVILIDAD TOTAL
32	Ausencia BED	
111	Ausencia BED	
83	Ausencia BED	
4	Ausencia BED+ BID	
44	Ausencia BED	
16	Ausencia BED	PREDOMINIO INMOVILIDAD CON MOVIMIENTO RESIDUAL
21	Ausencia BED	
22	Ausencia BED	
33	Ausencia BED	
97	Ausencia BED	
31	Ausencia BED	
53	Desorg MT+ aus BID	
100	Desorg MT+ aus BID	
55	No	
81	No	
19	No	
20	No	
39	No	
93	Ausencia BED	NORMAL
6	Defecto CC	
117	No	

Tabla 19. Relaciones entre defecto ultraestructural y patrón de movilidad ciliar. Leyenda: BED: Brazos externos de dineína; BID: Brazos internos de dineína; CC: Complejo central; Desorg MT+ aus BID: Desorganización microtubular combinada con ausencia de los brazos internos de dineína.

5.6.4 Relación fenotipo clínico-fenotipo ciliar-genotipo

Dado que el 93,3% de los pacientes de nuestra cohorte presentaron tanto tos productiva habitual como rinitis mucopurulenta, realizamos el estudio de relación genotipo-fenotipo ciliar respecto a síntomas menos prevalentes, como el distrés respiratorio neonatal (DRN), la presencia de bronquiectasias y los defectos de lateralidad.

5.6.4.1 Distrés respiratorio neonatal. Los pacientes que presentaron DRN presentaron principalmente cilios inmóviles (10/16, 62,50%) y ausencia de los brazos externos de dineína a nivel ultraestructural (9/16, 56,25%) (tabla 20).

ID paciente	Test genético	Patrón movilidad ciliar	UE
12	*	DISCIN	Desorg MT + aus BID
14	<i>RSPH1</i>	DISCIN	CC
77	*	DISCIN	CC
80	NEGATIVO	DISCIN	No
92	<i>RSPH1</i> y <i>HYDIN</i>	DISCIN	No
32	<i>DYX1C1</i>	INMOV	BED
83	<i>DNAH5</i>	INMOV	BED
16	NEGATIVO	INMOV+RES	BED
21	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
22	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
31	<i>CCDC151</i>	INMOV+RES	BED
33	*	INMOV+RES	BED
44	<i>TTC25</i>	INMOV+RES	BED

53	<i>CCDC39</i>	INMOV+RES	Desorg MT + aus BID
97	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
6	<i>RSPH1</i>	N	CC

Tabla 20. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron distrés respiratorio neonatal. Leyenda: *: No disponible; DISCIN: discinético; INMOV: inmovilidad ciliar total; INMOV+RES: predominio de inmovilidad ciliar junto a movimiento ciliar residual; N: normal; BED: ausencia brazos externos de dineína; BID: ausencia brazos internos de dineína; CC: defecto complejo central; Desorg MT+ aus BID: desorganización microtubular combinada con ausencia de los brazos internos de dineína.

5.6.4.2 Bronquiectasias. Los pacientes con bronquiectasias presentaron en general cierta proporción de cilios discinéticos pero móviles (44,4%), con tan sólo un caso con inmovilidad ciliar total. Respecto al estudio UE, predominó el defecto en los brazos externos de dineína (50%), pero también una proporción moderada de ultraestructura conservada (33,3%) (tabla 21):

ID paciente	Test genético	Patrón movilidad	Estudio UE
74	<i>DNAH5</i>	DISCIN	BED
14	<i>RSPH1</i>	DISCIN	CC
77	*	DISCIN	CC
23	NEGATIVO	DISCIN	No
92	<i>RSPH1</i> y <i>HYDIN</i>	DISCIN	No
32	<i>DYX1C1</i>	INMOV	BED
19	*	INMOV+RES	BED
21	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
33	*	INMOV+RES	BED
44	<i>TTC25</i>	INMOV+RES	BED
55	<i>DNAH9</i> y <i>HYDIN</i>	INMOV+RES	BED

97	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
20	<i>DNAAF1</i>	INMOV+RES	No
39	*	INMOV+RES	No
93	*	N	BED
6	<i>RSPH1</i>	N	CC
59	NEGATIVO	N	No

Tabla 21. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron bronquiectasias (página anterior). Leyenda: *: No disponible; DISCIN: discinético; INMOV: inmovilidad ciliar total; INMOV+RES: Predominio de inmovilidad ciliar junto a movimiento ciliar residual; N: normal; BED: ausencia brazos externos de dineína; BID: ausencia brazos internos de dineína; CC: defecto complejo central; Desorg MT+ aus BID: desorganización microtubular combinada con ausencia de los brazos internos de dineína.

5.6.4.3 Defectos de lateralidad. La ausencia de BED fue el defecto ultraestructural más prevalente, con patrones de movilidad variados, incluso dentro del grupo de pacientes con SI (situs inversus), el defecto de lateralidad de mayor prevalencia (tabla 22):

ID paciente	Defecto lateralidad	Test genético	Patrón movilidad	Estudio UE
4	SI	<i>DNAAF1</i>	INMOV	BED+BID
12	SI	*	DISCIN	Desorg MT+ aus BID
16	Dextrocardia	NEGATIVO	INMOV+RES	BED
22	Heterotaxia	<i>DNAH5</i>	INMOV+RES	BED
27	SI totalis	<i>DNAH5</i>	INMOV	BED
32	SI	<i>DYX1C1</i>	INMOV	BED
47	SI	<i>DNAH5</i>	DISCIN	BED
53	SI	<i>CCDC39</i>	INMOV+RES	Desorg MT+ aus BID

62	SI	<i>DNAH9</i>	DISCIN	BED
74	*	<i>DNAH5</i>	DISCIN	BED
93	SI	*	N	BED
111	SI	*	INMOV	BED
114	Heterotaxia	*	*	BED

Tabla 22. Parámetros diagnósticos de los pacientes que presentaron defectos de lateralidad. Leyenda: *: No disponible; SI: Situs inversus; DISCIN: discinético; INMOV: inmovilidad ciliar total; INMOV+RES: Predominio de inmovilidad ciliar junto a movimiento ciliar residual; N: normal; BED: ausencia brazos externos de dineína; BID: ausencia brazos internos de dineína; CC: defecto complejo central; Desorg MT+ aus BID: desorganización microtubular combinada con ausencia de los brazos internos de dineína.

5.6.5 Estudio estadístico

El análisis estadístico realizado sobre 35 pacientes DCP con todas las pruebas diagnósticas llevadas a cabo y completadas en sus resultados, no muestra resultados significativos (tabla 23).

	Clase 1 (n=19)	Clase 2 (n=5)	Sin defecto (n=11)	
Edad	18.53 (15.9)	22 (21.25)	30.18 (23.17)	Media (DE) / n (%)
	15 (8.5, 20)	13 (6, 33)	25 (8.5, 50.5)	Mediana (1er, 3er Q.)
ICC	57.37 (15.93)	56 (15.17)	50 (16.12)	Media (DE) / n (%)
	60 (45, 70)	50 (50, 60)	50 (45, 60)	Mediana (1er, 3er Q.)
Sexo				
Mujer	9 (47.37%)	2 (40%)	7 (63.64%)	Media (DE) / n (%)
Hombre	10 (52.63%)	3 (60%)	4 (36.36%)	Mediana (1er, 3er Q.)

Mutación			
<i>CDC151</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>CCDC39</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>DNAAF1</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>DNAH11</i>	0 (0%)	0 (0%)	1 (14.29%)
<i>DNAH5</i>	6 (46.15%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>DNAH9</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	1 (14.29%)
<i>DYX1C1</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativo	1 (7.69%)	0 (0%)	3 (42.86%)
<i>RSPH1</i>	0 (0%)	2 (100%)	2 (28.57%)
<i>TTC25</i>	1 (7.69%)	0 (0%)	0 (0%)
Patrón movilidad			
Discinético	5 (26.32%)	2 (50%)	6 (54.55%)
Inmóvil	13 (68.42%)	1 (25%)	5 (45.45%)
Normal	1 (5.26%)	1 (25%)	0 (0%)

Tabla 23. Resultados estudio estadístico descriptivo respecto al defecto UE encontrado.
(DE): Desviación estándar.

VI. Discusión

El estudio ultraestructural, núcleo central de la presente memoria de tesis, que hemos llevado a cabo sobre una amplia cohorte de pacientes con sospecha clínica de DCP, nos ha permitido identificar y describir los defectos axonemales, referidos hasta ahora como diagnósticos, así como los defectos no axonemales presentes, todo ello sobre una serie muy amplia de muestras biópsicas obtenidas en pacientes, adultos e infantiles, que han sido analizados de forma minuciosa en una planificada observación ultraestructural.

Nuestro análisis electronmicroscópico axonemal se enmarca dentro de un estudio unicéntrico, observacional, de carácter prospectivo y retrospectivo llevado a cabo sobre una serie de 117 pacientes reclutados entre 2018 y 2021, en el que la observación minuciosa ultraestructural de repetidas secciones ciliares se ha correlacionado con las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes, con los datos obtenidos en el examen de la movilidad ciliar y así mismo con los resultados del estudio genético practicado en estos mismos pacientes.

El estudio llevado a cabo nos ha proporcionado la obtención de una amplia base de datos y resultados, que en su análisis nos ha permitido identificar un nuevo defecto axonemal, presente en todos los pacientes DCP, y que previamente no aparece descrito en la literatura.

A continuación, pasaremos a comentar los aspectos conceptuales y metodológicos del estudio llevado a cabo, los resultados obtenidos individualizados por metodologías y los alcanzados tras el análisis de correlación efectuado. Para una mejor comprensión de estos comentarios, los exponemos a través de los siguientes epígrafes de discusión:

6.1 La MET como técnica diagnóstica de la DCP

El papel de la MET como método diagnóstico de la DCP reside en la valoración cuantitativa de los axonemas ciliares, de morfología ultraestructural no conservada, en la biopsia nasal de un paciente con sospecha diagnóstica de DCP. El resultado de este estudio axonemal, a nivel ultraestructural, es incluido en un algoritmo diagnóstico en el que se encuentran otras pruebas necesarias para

alcanzar un diagnóstico certero de esta enfermedad. A este respecto, la guía para el diagnóstico de la European Respiratory Society (Lucas *et al.*, 2017) recomienda que, ante una alta sospecha clínica de DCP, debe realizarse el estudio de movilidad ciliar y el análisis de los axonemas ciliares a nivel ultraestructural, así como el estudio genético y/o el estudio de las proteínas ciliares mediante inmunofluorescencia.

La necesidad de llevar a cabo esta combinación de pruebas diagnósticas surge por la inexistencia de una sola prueba con sensibilidad y especificidad suficiente para poder confirmar la sospecha diagnóstica de DCP. De esta forma la sensibilidad y especificidad de estas pruebas es variable (tabla 24), mientras que la sensibilidad y especificidad de la MET - según la guía para el diagnóstico de la ERS - se establece en torno a un 80% y un 100%, respectivamente.

Test diagnóstico	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Referencia
IF	68,8	100	Baz-Redón <i>et al.</i> , 2020
HSVA	100	96	Rubbo <i>et al.</i> , 2019
Estudio genético	81,1	100	Baz-Redón <i>et al.</i> , 2021
MET	80	100	Jackson <i>et al.</i> , 2016
ONn	98	99	Leigh <i>et al.</i> , 2013

Tabla 24. Sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos de la DCP. Abreviaturas: IF: Inmunofluorescencia; HSVA: Videomicroscopía de alta resolución y alta velocidad; MET: Microscopía electrónica de transmisión; ONn: Óxido nítrico nasal.

En nuestro análisis obtuvimos una sensibilidad de un 68,42% y una especificidad de un 95,83% para la MET, con una ligera diferencia frente a los datos antes referidos. Esta diferencia cabe atribuirla a la falta de criterios estandarizados en la detección de los defectos axonemales en los estudios publicados, dado que algunos de ellos incluyen la ausencia de los BID como defecto axonemal.

La Guía Consenso para informar los resultados de la MET en el diagnóstico de la DCP fue publicada en 2020, y ha sido la herramienta que hemos utilizado para clasificar los resultados de nuestro estudio, si bien serán necesarios en un futuro próximo establecer nuevos estudios basados en esta guía de consenso para poder establecer la sensibilidad y especificidad de la metodología ultraestructural de forma más precisa.

La estandarización en el protocolo de estudio de las secciones ciliares a nuestro juicio debería abordarse en las futuras actualizaciones de la Guía Consenso, dado que este aspecto representa una de las limitaciones de la MET como método diagnóstico de la DCP. En este sentido existe, por ejemplo, gran variabilidad en la magnificación aplicada en la visualización de las secciones ciliares en los distintos trabajos publicados, que oscila desde x60.000 (Carda *et al.*, 2005; Papon *et al.*, 2010; Theegarten y Ebsen, 2011; Lucas *et al.*, 2016), x110.000 (Ciancio *et al.*, 2015) hasta los x150.000-250.000 (Delongh *et al.*, 1995; Barlocco *et al.*, 1991; Demarco *et al.*, 2013) y este aspecto referido al número de aumentos que se emplea puede indudablemente influenciar los resultados como fácilmente puede constatarse en la **Figura 69**.

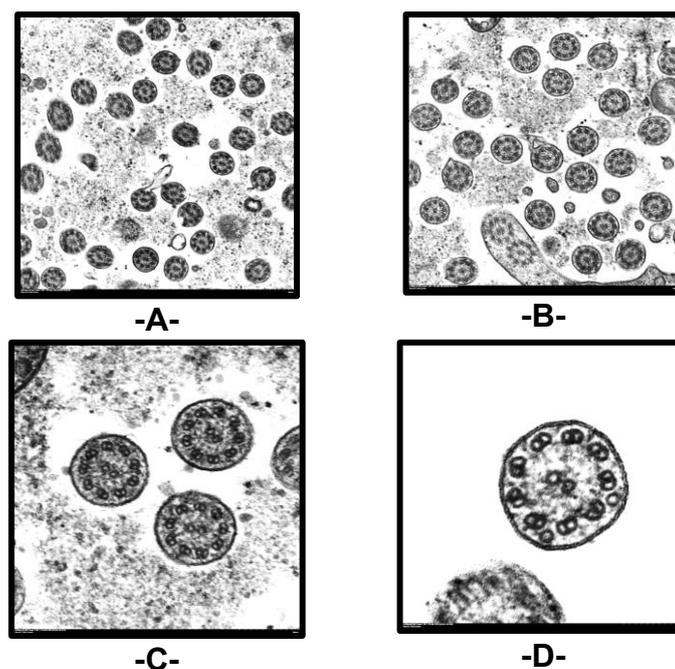


Figura 69. Ejemplo de imágenes de secciones ciliares a distintas magnificaciones. (A)x88.000; (B) x110.000; (C) x260.000; (D) x530.000. (Micrografías, tamaño original).

El manejo del MET es siempre una tarea técnica laboriosa, que probablemente en el caso de la DCP debe alcanzar sus niveles más altos de minuciosidad. Alcanzar esos aumentos de la imagen es en ocasiones dificultoso y la observación directa a menudo no es sencilla en su realización, por la cual se debe trabajar sistemáticamente con microfotografías electrónicas de cada una de las secciones ciliares realizadas a esa magnificación (**Figura 70**).

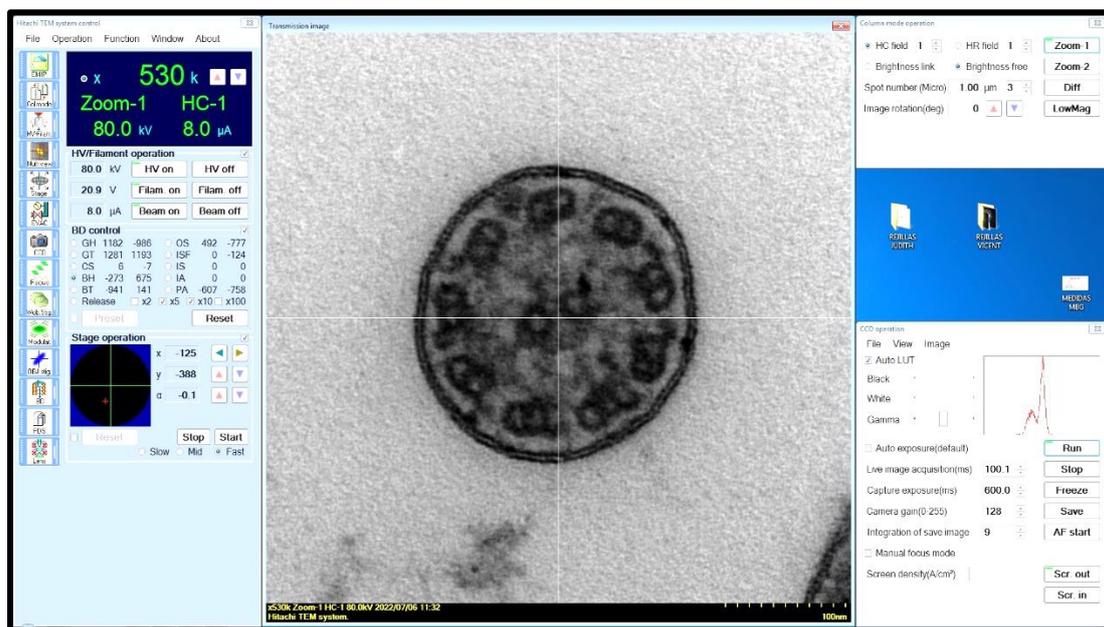


Figura 70. Captura de pantalla del software del MET. En la zona superior del panel lateral izquierdo aparece indicada la magnificación aplicada (x530k=x530.000); en el centro vemos la imagen obtenida.

Las secciones ciliares han de ser además cuidadosamente seleccionadas de entre las encontradas en la muestra, de manera que ofrezcan una óptima visualización de los brazos de dineína, pero también de los brazos radiales y de los enlaces de nexina en algunas de ellas.

Por otra parte, los equipos MET actuales están dotados de un sistema digital de captura de imágenes, que permiten crear un banco de imágenes de fácil acceso y consulta. Con esta metodología, al contrastar los resultados del análisis ultraestructural de los axonemas con los resultados del resto de tests diagnósticos, nos permite detectar casos falsos positivos y posibilita el revisar sus imágenes, tanto de las secciones ciliares originales como del estudio adicional

de nuevas muestras biópsicas (aspecto que abordaremos posteriormente en esta discusión), permitiendo establecer si los defectos ciliares encontrados son en realidad defectos secundarios por presencia de signos de infección en la muestra.

6.1.1 Defectos ultraestructurales axonemales en la DCP

Respecto a los defectos axonemales -diagnósticos o sugestivos- encontrados en nuestra serie de casos, el 50% de los pacientes con estudio UE mostraron un defecto en los brazos de dineína, resultando el defecto más prevalente, tal como recogen otros estudios de la literatura, con prevalencias de un 44,85% (Davis *et al.*, 2019), de un 45,6% (Guo *et al.*, 2020) e incluso de un 64,5% (Papon *et al.*, 2010). Estas diferencias entre los estudios podrían deberse, de nuevo, a la falta de estandarización en el análisis de los axonemas ciliares, sobre todo si consideramos que estos estudios son anteriores en su realización a la publicación del Consenso anteriormente referido.

El defecto en los brazos de dineína se describe en al menos 20 de los casi 50 genes señalados como causantes de DCP (Brennan *et al.*, 2021), destacando entre ellos *DNAH5* como el gen más frecuentemente afectado. En un estudio de Fassad y cols, se identificaron variantes patogénicas de *DNAH5* en un 37% de las familias europeas analizadas, constituyendo por tanto la mutación genética causante de DCP más común en la población europea (Fassad *et al.*, 2019). En nuestra serie, un 30,43% de los pacientes con test genético completado portaban una variante patogénica en este gen, situándose igualmente como la mutación más prevalente.

El defecto del CC fue detectado en un 10,52% de los pacientes de nuestra cohorte, constituyendo la segunda alteración axonemal más prevalente de nuestro estudio. A nivel ultraestructural, este defecto resulta más difícil de detectar, ya que se encuentra en una baja proporción de las secciones ciliares y en ocasiones de manera muy sutil (Knowles *et al.*, 2014). Por esta razón, se considera un defecto sugestivo de DCP y requiere del apoyo de otra prueba

diagnóstica para confirmar el diagnóstico. Este defecto presenta a su vez una dificultad adicional para su detección, ya que muchos de los defectos ciliares secundarios simulan los defectos del CC, y este es el caso de la ausencia del par central o de los MT extranumerarios (Dixon y Shoemark, 2017). En nuestra experiencia, el estudio repetido de la muestra o la obtención de muestras adicionales permite la distinción entre ambos tipos de defecto axonemal.

Por último, encontramos desorganización de los MT combinado con ausencia de los BID en un 7,89% de los pacientes. Este defecto combinado es fácilmente reconocible, siendo la ausencia de los BID el aspecto que reviste alguna mayor dificultad (Schroeder *et al.*, 2017). A pesar de todo ello, con la magnificación aplicada en el análisis de los axonemas y la experiencia adquirida a lo largo de nuestro estudio nos ha permitido soslayar esta dificultad, y aunque sólo se pudo confirmar el gen causante en uno de ellos (*CCDC39* en #P53), pudimos identificar 3 casos con este defecto combinado.

El resto de defectos axonemales encontrados fueron clasificados como defectos minoritarios, unos defectos que son contemplados por el grupo de la Guía Consenso pero con los que no pudo llegarse a un acuerdo y que por tanto deberán ser revisados en futuras y necesarias actualizaciones de este Consenso. En nuestra serie de casos los defectos minoritarios fueron en su mayoría ausencia de los BED (entre un 4% y un 22% del total de axonemas estudiados por paciente), y teniendo en cuenta que pueden tratarse de defectos secundarios, cabe subrayar que 5 de los 18 participantes que mostraron estos defectos minoritarios (27,77%) eran pacientes DCP, y 7 de los restantes (38,8%) fueron clasificados en principio como sugestivos de DCP. Es decir, que la presencia de estos defectos minoritarios podría ser - muy probablemente - consecuencia de las infecciones recurrentes que ocurren frecuentemente en todos esos pacientes. Sin duda, serán precisos más estudios a este respecto para considerar si estos defectos minoritarios son significativos o simplemente deben considerarse como defectos ciliares secundarios.

6.1.2 Defectos ultraestructurales secundarios

La distinción de los defectos ciliares secundarios es otra de las limitaciones que presenta la MET como método diagnóstico de la DCP (Lobo *et al.*, 2015). La interpretación de las imágenes de las secciones ciliares requiere del reconocimiento de los cambios inespecíficos que pueden darse a consecuencia de las infecciones recurrentes y crónicas de estos pacientes. Los cilios compuestos y la adición o delección de MT son defectos evidentes, pero existen otros más sutiles. En la literatura viene recogida la presencia de brechas en los MT como defecto secundario (Carson *et al.*, 1994), defecto que también observamos pero en una proporción mínima, razón por la cual no registramos su incidencia, si bien documentamos su presencia en la iconografía que fuimos obteniendo en las distintas observaciones (**Figura 71**).

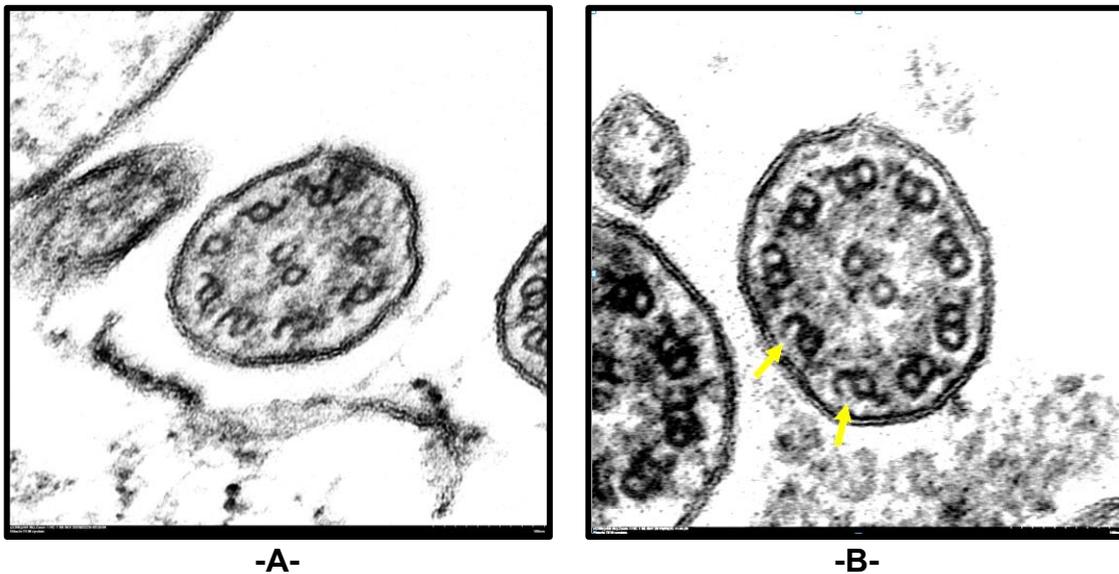


Figura 71. Secciones ciliares con discontinuidad en los microtúbulos. (A) Los dobletes periféricos parecen singletes con prolongaciones que corresponden con microtúbulos incompletos; (B) El axonema parece normal, pero dos de los dobletes periféricos aparecen incompletos (flechas) (Micrografías, x350.000).

A este respecto, detectamos en nuestra serie de casos estudiados ciertos cambios en una proporción mayor (datos cuantificados no recogidos) que las brechas en los MT que, aunque también sutiles, podrían contribuir a la detección de estos cambios secundarios. Estos cambios correspondían a deformaciones en alguno de los MT periféricos, e incluso dilataciones de los MT en biopsias

que presentaban de forma global cambios patentes atribuibles a procesos infecciosos y/o a manifestaciones inflamatorias (**Figura 41**). Sin embargo, estos defectos encontrados en nuestra serie de casos no aparecen reflejados en ninguno de los trabajos publicados previamente, y que entendemos deben ser interpretados como secundarios dado que el estudio en material adicional de las biopsias nos ha mostrado a menudo imágenes de células epiteliales rodeadas de gran cantidad de detritus celulares, otros defectos axonemales secundarios como cilios compuestos, e incluso la presencia de estructuras compatibles con microorganismos, muy manifiestos en uno de los pacientes de nuestra serie.

El grado más extremo de presencia de defectos secundarios nos conduce a aquellas muestras biópsicas que no pueden ser debidamente estudiadas y que clasificamos como estudios no completados. Esta condición es otro de los puntos que establecen limitaciones a la MET, dado que imposibilita un análisis cabal de los axonemas ciliares. En nuestro estudio encontramos esta inviabilidad en un 26,49% de las observaciones. En el estudio de Papon y cols, basado en 20 años de experiencia en estudios UE para DCP, calcularon una inviabilidad de un 28,6% (Papon *et al.*, 2010). Las infecciones recurrentes y crónicas de las vías respiratorias en estos pacientes es el factor que imposibilita el estudio de los axonemas ciliares, ya que en el momento de la toma de la biopsia el paciente puede encontrarse en una fase activa de la infección, resolución o convalecencia, y dado que la recuperación del epitelio tras una infección respiratoria se estima en un tiempo de unas 3 semanas (Chilvers *et al.*, 2001), sería recomendable repetir la toma de muestras biópsicas en otra ocasión, en la que presente una sintomatología más leve o un status que permita presumir no presencia de infección respiratoria. Otra opción podría consistir en realizar un cultivo de las células epiteliales, de forma que tras su crecimiento *in vitro* desaparezcan los defectos secundarios atribuibles a un proceso infeccioso (Jorissen *et al.*, 2000a). Sin embargo, el cultivo celular es una técnica en ocasiones de resultados limitados, que alarga el procedimiento diagnóstico de la funcionalidad y ultraestructura ciliar, por lo que se ha prodigado poco su empleo (Pifferi *et al.* 2009). La repetición de la biopsia es el procedimiento más factible, dado que

una primera biopsia puede tomarse en la primera visita del paciente a consulta clínica - tal como procedimos en nuestro estudio-, ya que este proceder se trata de un método poco invasivo y de rápida ejecución, que puede repetirse si es necesario en la siguiente visita. En nuestro estudio se repitió la obtención de cepillado nasal en cuatro pacientes, y de ellos en tres ocasiones el estudio UE pudo completarse de forma satisfactoria.

6.1.3 Hallazgos ultraestructurales específicos

El estudio adicional que llevamos a cabo en todas las biopsias recibidas nos permitió caracterizar las alteraciones que aparecen en las células epiteliales ciliadas en esas circunstancias de infección y/o inflamación crónica/aguda, así como del resto de componentes que conforman un cepillado nasal, como son las células caliciformes, células epiteliales intermedias, células inflamatorias, moco y restos celulares. Los cambios más destacables fueron aquellos que encontramos en las células ciliadas con signos de ciliogénesis aberrantes, una observación que se convirtió en una valiosa herramienta para poder distinguir los defectos ciliares secundarios.

En nuestro estudio detallado de las biopsias pudimos observar varios de estos fenómenos de ciliogénesis aberrantes descritos en la literatura. El análisis de la zona apical de las células ciliadas nos aportó información clave para poder determinar el carácter de los defectos ciliares encontrados. La presencia de protusiones de membrana fue un hallazgo frecuente en aquellas células o grupos de células que mostraban en conjunto alteraciones de su morfología, siendo esto propuesto además por O'Callaghan y cols como característica celular diagnóstica de DCP (O'Callaghan *et al.*, 2018). Estas protusiones se acompañaban de cilios compuestos, hinchados y/o de formas aberrantes, con varios axonemas entrecruzados. Las irregularidades en la membrana apical se observaron asociadas con la presencia de pequeñas vesículas que envolvían a los cuerpos basales, de las cuales no emergían axonemas, y que en ocasiones formaban inclusiones ciliares (**Figura 66**) o estructuras más organizadas, como

los quistes ciliares que encontramos en el paciente #P57 (**Figura 67**). Estos quistes ciliares se han descrito de forma fisiológica en el epitelio ciliado del oviducto, pero también como consecuencia de un proceso de ciliogénesis atípica (Hagiwara, 1994).

Otra consecuencia de la ciliogénesis anormal consiste en la no migración de los centriolos a la zona apical, que resulta en la aparición de cuerpos basales a nivel supranuclear o con axonemas elongados intracitoplasmáticos (**Figura 56**), o raicillas estriadas aisladas (**Figura 65**). Todos estos fenómenos están causados por una alteración en la diferenciación de los centriolos (Stockinger *et al.*, 1989; Hagiwara *et al.*, 2004). Estos defectos emulan un subtipo de DCP denominado en la Guía Consenso como “localización errónea de los cuerpos basales con oligocilia o ausencia de cilios”. Las características del resto de la biopsia, junto con los resultados del test genético, nos llevaron a descartar la presencia de esta variante de DCP en nuestra serie de pacientes DCP.

Las imágenes de cilios cortos se corresponden con fenómenos de deciliación que se producen en las primeras fases de la infección respiratoria (Stockinger *et al.*, 1989). Este desprendimiento de los cilios se produce a nivel del collar ciliar, en la base del cilio, y queda inmediatamente sellado por la membrana plasmática, dejando la imagen de “tapón” (**Figura 61**) que observamos sobre todo en aquellas biopsias con signos de proceso infeccioso agudo.

En dos participantes (#P13 y #P43) encontramos un sistema de membranas intracitoplasmáticas a nivel de las células epiteliales (**Figura 55**). Se trataba de un sistema organizado en conjuntos paralelos de cisternas con pequeños anillos o ventanas dispuestas a intervalos regulares, que identificamos como annulate lamellae. La función de esta organela no está bien definida, aunque se piensa que interviene en los procesos de crecimiento y diferenciación celular (Ghadially, 1988), y más recientemente se ha especulado con el papel que podría jugar en los fenómenos de replicación de ciertos agentes virales (Eymieux *et al.*, 2021). En nuestro estudio encontramos estas estructuras de manera muy

puntual, y pensamos que podría indicar una situación de renovación celular tras daño epitelial.

La hiperplasia de las células caliciformes que detectamos en alguna de las biopsias representa así mismo una respuesta tisular al estado inflamatorio crónico a nivel del epitelio respiratorio de estos pacientes (Chen *et al.*, 2018) de forma análoga a los que es posible detectar en pacientes asmáticos (Merigo *et al.*, 2002).

Los cuerpos lamelares extracelulares fueron un hallazgo poco común en nuestra serie, si bien también se ha descrito la presencia de vesículas con cuerpos lamelares en células ciliadas del epitelio nasal (Woodworth *et al.*, 2005). Encontramos estas estructuras a nivel extracelular en muestras con gran contenido en detritus celulares, por lo que estos gránulos formarían parte del contenido citoplasmático liberado.

En el estudio de Papon y cols se indica la presencia de metaplasia escamosa como la principal causa de inviabilidad de los estudios UE de biopsias ciliares, seguida de la ausencia de células ciliadas (Papon *et al.*, 2010). Probablemente la toma de la muestra en áreas preciliadas, como pueden ser la cabeza del cornete inferior y cualquier zona del vestíbulo nasal, incrementa el porcentaje de metaplasia escamosa, siendo una adecuada técnica de obtención de epitelio ciliado determinante para un análisis adecuado del mismo. En nuestro estudio detectamos la presencia de células escamosas tanto en biopsias que no pudieron completarse en su estudio como en otras en las que sí pudimos obtener las 50 secciones ciliares necesarias para el análisis de los axonemas. Estos elementos metaplásicos a menudo se aprecian como células descamadas de morfología elongada, con pequeñas prolongaciones en su superficie, sin núcleo ni organelas y con el citoplasma denso repleto de tonofilamentos (**Figura 60**).

En nuestro estudio así mismo encontramos pequeñas agrupaciones de células escamosas en biopsias con claros signos de infección, la cual se confirmaba por la presencia de microorganismos en la muestra. Estas estructuras bacteria-

nas a menudo se localizaban en zonas desnudas de revestimiento, con presencia de células descamadas (**Figura 72**).

En el momento actual, y gracias al avance de las técnicas en biología molecular, no se utiliza la MET para la identificación bacteriana en muestras biópsicas, y prueba de ello es que los trabajos publicados al respecto son escasos. Sin embargo, y dado que se trata de pacientes DCP, podemos acotar la búsqueda a aquellas especies bacterianas aisladas de forma habitual en estos pacientes, y que generalmente corresponden a *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* o *Pseudomona aeruginosa* (Møller *et al.*, 2017). Por otra parte, en nuestra serie no detectamos la presencia de partículas víricas.

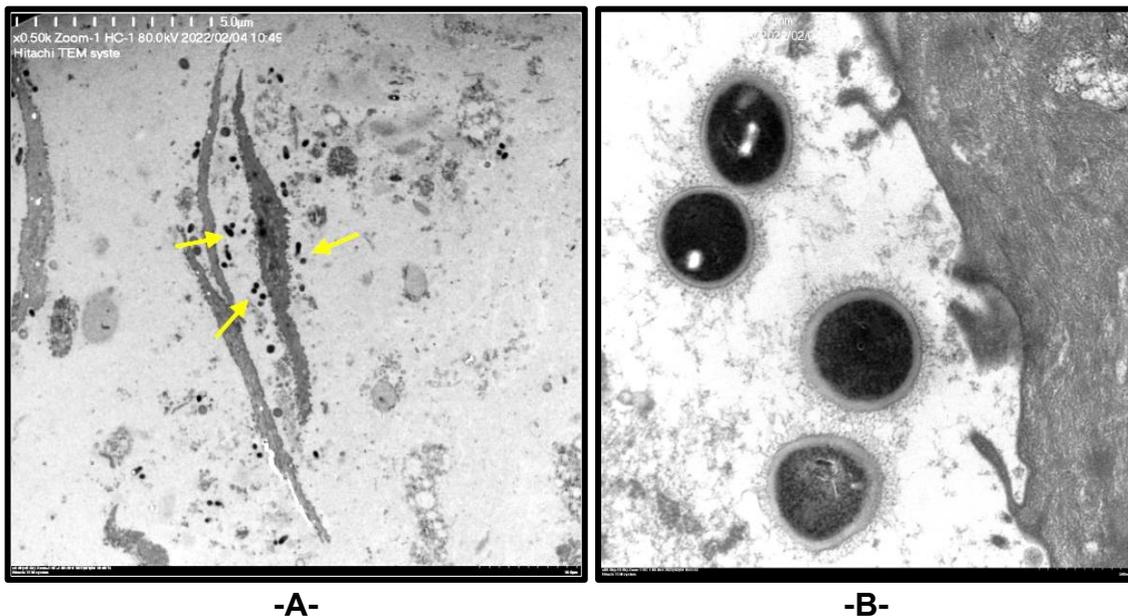


Figura 72. Estructuras bacterianas junto a células escamosas. (A) Un grupo de células escamosas, elongadas y sin núcleo, rodeadas de múltiples estructuras bacterianas (flechas) (x4.400); (B) Detalle de las bacterias situadas junto a una de las células escamosas (x88.000) (Micrografías).

Mencionar también la observación correspondiente al paciente # P97, en el que encontramos abundantes cuerpos lamelares -o imágenes tipo “cuerpos de cebra”- intracelulares en toda la extensión de la muestra remitida (**Figura 68**). Se trataba de un paciente confirmado de DCP, con mutación en *DNAH5* y cuya

biopsia ofreció suficientes secciones ciliares para su estudio, con un resultado de ausencia de los BED en el 100% de los cilios estudiados. Se revisó el historial médico y el paciente sólo presentaba síntomas respiratorios y el resto de pruebas diagnósticas se encontraban dentro de la normalidad. El depósito de estas estructuras se ha descrito en la enfermedad de Fabry y por efecto de fármacos como la hidroxiclороquina (Manabe *et al.*, 2021), pero también inducido por otras muchas sustancias químicas (Anderson y Borlak, 2006), que incluso podrían ser administradas como escipientes a través de algún tratamiento tópico.

Todos estos hallazgos específicos -que pudimos interpretar en su mayoría- junto con el estudio detallado de las células ciliadas resultaron de gran utilidad para el reconocimiento e identificación de los cambios ciliares secundarios. Consideramos por tanto, que esta limitación que presenta la MET podría reducirse con el análisis adicional de las células ciliadas y de la biopsia en conjunto. La Guía Consenso recoge en sus recomendaciones el registro de las alteraciones celulares y signos de inflamación o presencia de bacterias, pero sólo como puntos complementarios del informe diagnóstico.

En la literatura existente, en general, no se mencionan los defectos de significado desconocido que analizamos en el presente trabajo. Los dobletes de apariencia oscura (**Figura 45**) no guardaban relación aparente con ninguno de los parámetros diagnósticos, por lo que podría tratarse de algún tipo de artefacto en el procesamiento de la muestra. Respecto a las zonas electrondensas submembranas (**Figura 44**) tampoco pudo establecerse ningún tipo de correlación, aunque dado que se trataba de puntos localizados entre el axonema y la membrana ciliar, que en ocasiones incluso deformaban la sección ciliar, especulamos que se trataba de la imagen indirecta o incompleta del complejo de proteínas de IFT, que interviene en la formación y mantenimiento de la estructura ciliar (Ishikawa y Marshall, 2017). El tercero de los defectos, en principio de significado desconocido analizados en el presente trabajo se discutirá en el siguiente epígrafe discusivo.

6.1.4 DCP con ultraestructura conservada. Rotura de simetría como defecto axonemal y su contribución en el diagnóstico de la DCP.

Las variantes de DCP que presentan ultraestructura ciliar conservada constituyen otra de las grandes limitaciones de la MET como técnica diagnóstica de la DCP. El 31,57% de nuestra cohorte de pacientes mostraron axonemas ciliares aparentemente normales, siendo este dato similar a los señalados en trabajos previamente publicados (Werner *et al.*, 2015; Kouis *et al.*, 2017). Esta limitación se ve agravada ya que los últimos genes causantes de DCP, descritos en los últimos años, presentan defectos en el MET de carácter muy sutil. Tal es el caso de *LRRC56*, *GAS2L2*, *NEK10* o *TP73* (OMIM.org). De esta forma y dado el rápido avance de las técnicas de secuenciación masiva, la proporción de falsos negativos mediante MET cabe suponer que podría aumentar.

En este contexto cabe señalar la consecución de algunos avances en la microscopía electrónica como técnica diagnóstica de la DCP, que se ven plasmados en técnicas como la electro-tomografía o la crío-electromicroscopía (Ishikawa, 2015; Shoemark, 2017) que permiten el diagnóstico en determinadas variantes donde la MET convencional ofrece una imagen aparentemente conservada, como es el caso de los pacientes con mutación en *DNAH11* (Shoemark, 2018). Se trata, sin embargo, de técnicas de larga ejecución que requieren de automatización para poder ser aplicadas de forma masiva en el diagnóstico de rutina.

El estudio axonemal, a nivel ultraestructural, que se realiza de forma rutinaria dentro del algoritmo diagnóstico de la DCP podría verse optimizado con la determinación de la rotura de simetría, el tercero de los defectos de origen desconocido analizados en el presente trabajo. Este análisis no requiere de técnicas adicionales, ya que se incluye de forma paralela en el estudio diagnóstico de los axonemas. Los resultados del análisis de asimetría axonemal en nuestra cohorte de pacientes indican que se trata de un defecto presente en la totalidad de pacientes DCP, sin distinción por patrón de movilidad ciliar, defecto ultraes-

tructural clásico, genotipo ni clínica compatible. El resultado más relevante de nuestro estudio reside en ese 31,57% de pacientes que presentan una ultraestructura axonemal conservada según los parámetros diagnósticos convencionales pero que a su vez muestran rotura de simetría axonemal. De este modo, la sensibilidad de la MET como método diagnóstico de la DCP mediante el análisis de la RS en nuestro trabajo se establece en un 100%.

En este sentido, y dado que no existe una prueba “patrón de oro”, el cálculo de la eficacia de las pruebas diagnósticas disponibles para la DCP es aproximado. Los estudios realizados a este respecto indican la necesidad de realizar varias de estas pruebas para alcanzar un diagnóstico certero (tabla 24).

El contrapunto a la elevada sensibilidad obtenida en nuestro estudio de la asimetría axonemal viene dado por la reducción de la especificidad a causa de un grupo de pacientes no-DCP (todos ellos con una movilidad ciliar conservada) que mostraron una RS en el rango de los pacientes DCP. Este grupo constituye un 29,17% de resultados falsos positivos para la RS como test diagnóstico. Así mismo, observamos que los pacientes de este grupo no-DCP que mostraron los valores de RS más elevados (entre un 42% y un 63% de RS) presentaban a su vez un mayor ICC medio (tabla 14). Estos datos podrían indicar una correlación entre la RS y el cuadro clínico de estos pacientes no-DCP con sintomatología respiratoria. Este fenómeno, sin embargo, no se observa en el conjunto de pacientes DCP cuyo ICC no parece corresponderse con la proporción de rotura de simetría axonemal.

Serán necesarios más estudios para validar este hallazgo, pero nuestros resultados indican que la ausencia de asimetría axonemal podría ser de gran utilidad para excluir un diagnóstico de DCP. Los resultados obtenidos del estudio que realizamos en base al hallazgo de la RS han dado lugar a la publicación de un artículo en la revista *Diagnostics* (Q2) bajo el título “*Axonemal Symmetry Break, a New Ultrastructural Diagnostic Tool for Primary Ciliary Dyskinesia?*” y que incluimos en el Anexo 2.

Los trabajos publicados respecto a la ultraestructura axonemal no hacen referencia a la inclinación de los dobletes periféricos que puede observarse en las secciones ciliares de forma fisiológica. La única mención sobre esta característica de los axonemas de los cilios móviles la encontramos en un estudio sobre las diferentes geometrías que presentan los microtúbulos ciliares del epitelio ciliado en la tráquea de vaca. En ese trabajo determinan que la geometría axonemal se establece gradualmente, desde los 9 tripletes del cuerpo basal que forman un ángulo de 50° entre ellos, hasta los 9 dobletes del axonema ciliar que forman un ángulo de 27° (Greenan *et al.*, 2020). Frente a esta única referencia, realizamos mediciones de la inclinación de los dobletes periféricos mediante el programa *ImageJ* -herramienta de código abierto para el análisis de imágenes científicas (Schneider *et al.*, 2012)- en un estudio preliminar (no mostrado) en base a las imágenes obtenidas de las secciones ciliares de un grupo de seis pacientes DCP y un grupo control de otros seis pacientes con sintomatología respiratoria (**Figura 73**).

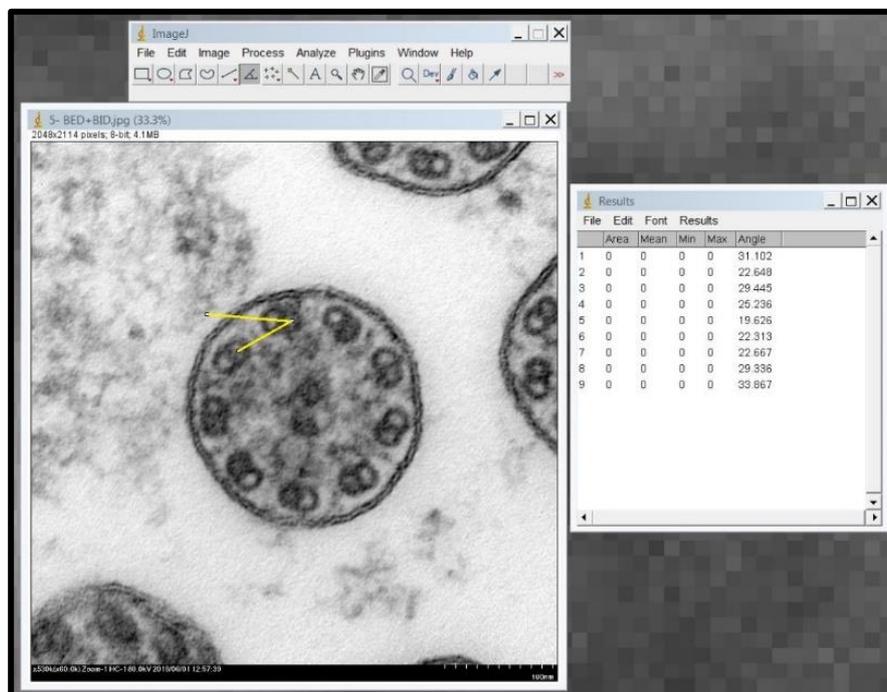


Figura 73. Interfaz de *ImageJ* para la medición de ángulos. Se realizó la medida del ángulo (en grados) formado por la posición de un doblete respecto al contiguo, en los 9 dobletes periféricos, mediante el software *Image J*. En la imagen se aprecian las líneas amarillas entre dos dobletes vecinos como puntos de referencia para realizar las medidas.

Los resultados obtenidos (tabla 25) mostraron que los dobletes periféricos del grupo control formaban un ángulo medio de 25°, frente a los 30° de angulación de los pacientes DCP.

No-PCD	#P1	#P2	#P3	#P4	#P5	#P6	Media global
Media	24.108	23.680	25.787	24.789	25.032	26.075	24.912
SD	4.621	3.432	4.364	7.812	5.827	2.527	
Mín	15.459	17.100	19.196	14.357	18.876	22.449	
Máx	28.838	28.488	30.437	38.562	33.800	30.263	
PCD	#P7	#P8	#P9	#P10	#P11	#P12	Media global
Media	30.639	31.299	27.167	30.427	26.952	33.292	29.963
SD	8.172	5.801	7.811	5.078	6.986	6.955	
Mín	16.816	23.916	16.219	24.180	18.938	24.146	
Máx	45.188	41.420	38.225	38.441	35.929	47.076	

Tabla 25. Resultados preliminares del estudio sobre la inclinación de los dobletes periféricos. En la tabla se muestran, en grados de desviación de un doblete respecto del doblete contiguo, los resultados de los 6 pacientes DCP (#P1-#P6) y del grupo control (#P7-#P12). Azul: valor mínimo; rojo: valor máximo, naranja: valor medio.

Esta mayor inclinación de los dobletes periféricos es la que, en principio, nos permite percibir visualmente la RS en un axonema ciliar.

Pueden proponerse varias hipótesis que expliquen el vínculo entre la asimetría axonemal y la disfuncionalidad ciliar de estos pacientes, basadas en la alteración estructural que podría conducir a una batida ciliar ineficaz. Esta anomalía podría localizarse a nivel del cuerpo basal, en algunos componentes axonémicos como los BED o el CRN-D, e incluso podría tratarse de otro defecto ciliar adquirido como los ya descritos.

Durante la última etapa de la ciliogénesis el axonema ciliar elonga a partir del cuerpo basal que ha migrado a la membrana apical de la célula ciliada, y este cuerpo basal proporciona la plantilla a partir de la cual se construye la estructura axonemal del cilio (Hagiwara *et al.*, 2004). Una alteración a nivel del cuerpo

basal proporcionaría una plantilla axonemal anormal y por tanto podría conducir a un axonema asimétrico.

Por otro lado, y considerando que el axonema debe experimentar una distorsión considerable durante el ciclo de batida ciliar (Lindemann *et al.*, 2007), la inclinación de los dobletes periféricos que observamos podría corresponderse con alguna fase de la batida ciliar. Sin embargo, el CRN-D -complejo proteico que conecta los dobletes adyacentes- proporciona cierta resistencia al deslizamiento de los microtúbulos durante la flexión ciliar y mantiene la alineación de los dobletes periféricos (Bower *et al.*, 2013). Además, los trabajos publicados sobre algunos de los defectos genéticos que codifican el CRN-D, como aquellos que afectan a *CCDC164*, *CCDC65* y *GAS8*, describen el análisis ultraestructural de los axonemas ciliares con dobletes periféricos mal alineados de manera ocasional a lo largo de toda la muestra estudiada (Merveille *et al.*, 2011; Austin-Tse *et al.*, 2013; Olbrich *et al.*, 2015). Sin embargo, en las imágenes que ofrecen estos trabajos no se ve representada la RS que aquí planteamos.

La primera apreciación de la RS en nuestra cohorte de pacientes se realizó sobre las secciones ciliares con defecto en los BED, principalmente en aquellas con una ausencia total de los brazos de dineína, en las que se aprecia claramente la inclinación de los dobletes periféricos. Teniendo en cuenta que las cadenas pesadas de un BED unido a un túbulo A parece conectarse a un protofilamento específico consecutivo en el túbulo B vecino (**Figura 74**) (Bui *et al.*, 2009), resultaría adecuado proponer un nuevo defecto en los BED como causante de esta rotura de simetría axonemal.

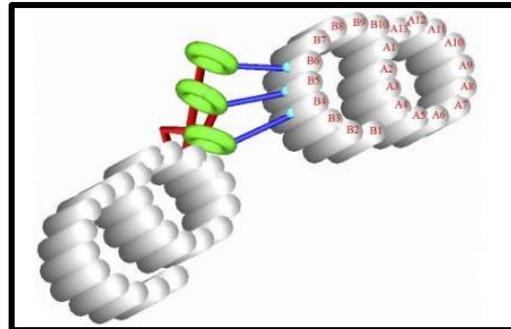


Figura 74. Modelo de interacción del brazo externo de dineína de un túbulo A con el túbulo B adyacente. Se muestran dos dobles tubos adyacentes. Rojo, verde y azul: componentes de las cadenas pesadas de un BED. (Tomado de Bui *et al.*, 2009)

Una última explicación para la ruptura de la simetría axonemal consistiría en un cambio ultraestructural secundario a la enfermedad respiratoria crónica de estos pacientes. La ciliogénesis alterada como consecuencia de infecciones recurrentes puede provocar anomalías ciliares (cilios hinchados, cilios compuestos, axonemas desorganizados, adición o eliminación de MT periféricos o pérdida de uno o ambos MT del par central), pero estos cambios están presentes en menos de 5–10% de los cilios examinados y en un área localizada (Demarco *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio sobre RS muestran que la característica que identifica la asimetría axonemal no representa un defecto ciliar secundario, sino que es un defecto distintivo presente en todos los pacientes con DCP y de distribución generalizada dentro de las muestras ciliares. Para establecer este nuevo defecto axonemal como una anomalía primaria, deberíamos alcanzar los criterios universales y permanentes descritos por Mierau y cols, es decir, demostrar la presencia de la misma anomalía en cilios procedentes de al menos un sitio adicional y al menos de un punto adicional en el tiempo (Mierau *et al.*, 1992).

En resumen, la disposición modificada de los dobles tubos periféricos detectada en nuestro estudio aporta otro punto de vista sobre la patogénesis subyacente de la DCP, y podría proporcionar un nuevo enfoque diagnóstico de esta condición.

6.2 Estudios de correlación

En los últimos años diversos estudios se han planteado el objetivo de establecer si existen correlaciones entre el fenotipo clínico, los hallazgos ultraestructurales, los patrones de movilidad ciliar del paciente DCP y las mutaciones genéticas (Kilinc *et al.*, 2021; Blanchon *et al.*, 2021; Pifferi *et al.* 2021). En general, estos estudios concluyen que las variantes patogénicas en los genes causantes de DCP están relacionadas con defectos ultraestructurales específicos, algunos de los cuales se asocian a su vez con determinados patrones aberrantes de batida ciliar (Raidt *et al.*, 2014). Sin embargo, el tipo de mutación detectado puede ser responsable de diferentes fenotipos y por tanto, para un mismo gen podemos encontrar diferentes patrones de batida ciliar y de ultraestructura axonemal (Blanchon *et al.*, 2020). Los estudios de correlación que hemos llevado a cabo en nuestra cohorte de pacientes mostraron, en consonancia con los trabajos publicados, por un lado la existencia de varias asociaciones genotipo-fenotipo ciliar, si bien otras asociaciones aún deben ser bien definidas, y que a continuación pasamos a detallar.

6.2.1 Relaciones genotipo-fenotipo ciliar

De entre todos los subtipos de DCP, las únicas correlaciones ampliamente descritas pueden observarse en los pacientes que presentan desorganización de los MT y ausencia de los BID, defecto ultraestructural frecuentemente asociado a la mutación en *CCDC39* o *CCDC40* (Antony *et al.*, 2013; Merveille *et al.*, 2011). En nuestra cohorte encontramos dos pacientes con mutación en *CCDC39* (#P53 y #P100), ambos con cilios de predominio inmóvil y con cierto movimiento residual, tal y como viene reflejado en la literatura (Raidt *et al.*, 2014; Blanchon *et al.*, 2020). Cabe destacar que #P53 se trataba de una mujer, y en su historial indicó que, dadas sus dificultades para concebir un hijo, se encontraba en tratamiento en la Unidad de Reproducción del mismo hospital donde realizamos el presente estudio. Cabría pensar que estos problemas de fertilidad podrían deberse a la mutación que porta la paciente en ese gen en con-

creto, ya que aunque el estudio de los axonemas ciliares en el epitelio tubárico está poco estudiado se sabe que la proteína *CCDC39* se expresa así mismo en dicho epitelio (Raidt *et al.*, 2015), y que los pacientes que portan mutación en *CCDC39* o *CCDC40* presentan mayor probabilidad de ser infértiles (Vanaken *et al.*, 2017). El otro paciente con esa mutación, #P100, no se conocían datos sobre su posible capacidad de fertilidad, dado que se trataba de un adolescente, con 14 años en el momento del estudio.

Otro importante grupo de proteínas cuya mutación proporciona defectos ciliares visibles a nivel ultraestructural corresponden con genes que codifican proteínas involucradas en el ensamblaje y estructura de los brazos de dineína (tabla 3). En nuestra serie de casos, la totalidad de pacientes con mutación en *DNAH5* presentaron ausencia total o parcial de los BED tal y como se describe en la literatura (Olbrich *et al.*, 2002), aunque en algunos trabajos se describe la ausencia combinada de brazos externos e internos en individuos con esta misma mutación (Boaretto *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2020). La proteína *DNAH5* forma parte de las cadenas pesadas que contienen el dominio motor de los brazos de dineína (Osinka *et al.* 2019), por lo que los defectos en su estructura causan graves alteraciones en la movilidad ciliar. A este respecto, en este grupo pudimos observar pacientes con cilios inmóviles, pero también con movimiento residual e incluso dos de ellos con movimiento discinético: uno rotatorio (#P47) y otro incoordinado (#P74). Estos resultados remarcan que la naturaleza exacta de la mutación en un gen dado puede tener un efecto distintivo en el ciclo de batida ciliar (Raidt *et al.*, 2014).

Por último reseñar que del total de pacientes testados genéticamente en nuestro estudio un 30,43% (7/23) presentaba mutación en *DNAH5*, dato concordante con los estudios publicados que constatan la mutación en este gen como la principal causa de DCP de forma general (Lucas *et al.*, 2020), con una prevalencia estimada de un 30-38% en la población DCP (Barbato *et al.*, 2009; Leigh *et al.*, 2009).

Por otra parte, el gen *DYX1C1* o *DNAAF4* se ha relacionado con la función de pre-ensamblaje de las dineínas en el citoplasma de las células epiteliales respiratorias, y su mutación produce un fallo en el ensamblaje de las subunidades de dineína que se refleja a nivel ultraestructural con una ausencia tanto de los brazos internos como de los externos (Tarkar *et al.*, 2013). En nuestra serie encontramos que el paciente #P32 portaba una variante patogénica en *DYX1C1*, y aunque su estudio de movilidad ciliar mostró cilios totalmente inmóviles, sus axonemas ciliares no presentaban una ausencia combinada de brazos internos y externos como cabría esperar. Su estudio ultraestructural reveló un defecto parcial de los BED, observándose brazos externos cortos con presencia de los BID (**Figura 75.A**). En este caso, cabría la posibilidad que el tipo de mutación detectado en este caso permita el ensamblaje parcial de los brazos de dineína y por esa razón ultraestructuralmente pudieron observarse acortados los brazos externos y también los internos.

Dentro de este grupo de proteínas involucradas en el ensamblaje de las dineínas axonemales, nos encontramos además con el caso de dos hermanos por parte de madre (#P4 y #P20) que portaban mutación en el mismo gen, el *DNAAF1* o *LRRC50*, y que de igual forma que en el caso anterior, deberían presentar a nivel ultraestructural defecto en ambos brazos de dineína (Loges *et al.*, 2009). Por una parte observamos en el #P4, con ausencia de ambos brazos de dineína en una gran proporción de sus secciones ciliares (**Figura 75.B**). Su análisis de movilidad ciliar mostró además que sus cilios eran totalmente inmóviles, de forma coherente al defecto ultraestructural que presentaba (Chilvers *et al.*, 2003). Su hermana por parte de madre (#P20) sin embargo, y aunque su análisis de movilidad ciliar mostró un predominio de cilios inmóviles con algunos cilios de movimiento vibrátil, presentó sus axonemas ciliares dentro de la normalidad, pudiendo observarse ambos brazos de dineína en la práctica totalidad de sus secciones ciliares estudiadas (**Figura 75.C**). En #P20 se detectó la mutación en heterocigosis, es decir, que sólo portaba una copia del gen mutado por parte de la madre.

De esta forma, podría tratarse de un efecto de la mutación más sutil a nivel ultraestructural como una posible explicación de esta diferencia fenotípica entre hermanos.

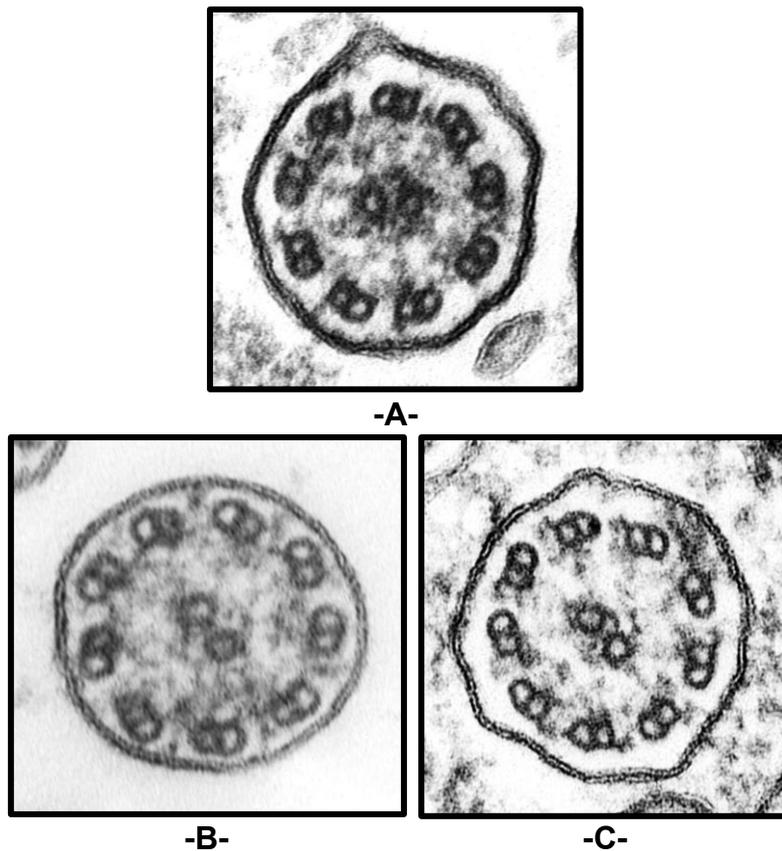


Figura 75. Secciones ciliares de tres pacientes con mutación en genes de factores de ensamblaje citoplásmico de dineína axonemal. (A) Paciente #P32, con mutación en *DNAAF4*, brazos externos de dineína cortos; (B) Paciente #P4, con mutación en *DNAAF1*. Puede observarse la ausencia de ambos brazos de dineína; (C) Paciente #P20, con mutación en *DNAAF1*. El paciente presentaba tanto los brazos internos como los externos (Micrografías, x350.000).

En el caso del paciente #P55, en su análisis genético se identificaron 2 cambios considerados como patológicos en 2 genes distintos, concretamente en *DNAH9* y *HYDIN*. Tal y como se describe en la literatura, la proteína *DNAH9* se localiza en los BED de la región distal del cilio, por lo que el que se detecte o no depende de la localización de las secciones ciliares estudiadas (Fassad *et al.*, 2018). De esta forma, el estudio ultraestructural de este paciente mostró una ausencia de BED en tan sólo un 16% del total de sus secciones ciliares,

sin otro cambio axonemal perceptible ya que con la mutación en *HYDIN* el análisis ultraestructural ofrece axonemas normales (Olbrich *et al.*, 2012). Sin embargo, ambos genes vienen descritos en la literatura como causantes de cambios sutiles en el patrón de batida ciliar, lo cual no concuerda con el predominio claro de inmovilidad observado en el análisis de movilidad ciliar de esta paciente. El efecto sinérgico de ambas mutaciones podría explicar este fenotipo ciliar particular.

Tras el grupo de proteínas implicadas en la estructura y ensamblaje de los brazos de dineína, el grupo genes que codifican las proteínas que componen los brazos radiales mostraron variantes en el 21,73% (5/23) de nuestra cohorte, en concreto *RSPH1*. La prevalencia de este defecto genético entre la población DCP no está bien establecida como ocurre con *DNAH5*. Sin embargo, resulta llamativa la elevada prevalencia en nuestra cohorte, ya que en diversos estudios realizados en distintos países, la mutación en *RSPH1* no pudo ser detectada. Tal es el caso de un estudio realizado en Reino Unido sobre 69 pacientes (Irving *et al.*, 2018), en Alemania sobre 66 pacientes (Raidt *et al.*, 2014) o uno en Estados Unidos sobre 205 pacientes (Leigh *et al.*, 2016), en los cuales se detectaron variantes patológicas principalmente en *DNAH5*, seguido de *CCDC39* y *DNAH11* de manera general, pero no en *RSPH1*. Las mutaciones en *RSPH4A*, otro gen que codifica componentes de los brazos radiales, sí que son detectadas en algunos de estos estudios, considerándose mutación fundadora en Puerto Rico -es decir que se detecta con una frecuencia elevada en una población específica y que desciende de uno o más antepasados portadores del gen alterado- (Daniels *et al.*, 2013), e incluso se señala como causa del 2-3% de los casos de DCP en Europa del este (Ziętkiewicz *et al.*, 2012).

El defecto ultraestructural detectado en pacientes con una variante patogénica en *RSPH1* se caracteriza por una proporción de secciones ciliares normales junto a secciones ciliares (normalmente más de un 20% del total) con uno o ambos MT centrales ausentes –patrón 9+1 o 9+0-; ocasionalmente puede observarse doble par central –patrón 9+4- o translocación de un doblete periférico al centro del axonema –patrón 8+1-, junto con cierta desorganización MT (Kott

et al, 2013). Esta reducida proporción de secciones ciliares afectadas conlleva que este defecto sea clasificado en muchas ocasiones como un subtipo de DCP con axonemas conservados (Brennan *et al.*, 2021). En nuestra serie de casos con variante patogénica en *RSPH1* pudo completarse el estudio ultraestructural en 4 individuos, detectando un defecto del complejo central en #P14 y #P6, mientras que otros dos pacientes -#P91 y #P92- mostraron ultraestructura axonemal conservada. Cabe destacar que en este grupo de pacientes con defecto en *RSPH1* ninguno de ellos presentaba defectos de lateralidad, lo cual está en línea con el reconocimiento de que los cilios del nodo embrionario "9 + 0" no contienen brazos radiales ni complejo central y por tanto no se ven afectados por esta clase de defectos genéticos (Satir y Christensen, 2007).

En referencia a la movilidad ciliar de este grupo de pacientes, y aunque en la bibliografía viene recogido el movimiento circular o vorticilar como defecto distintivo de la anomalía en los brazos radiales de la DCP (Chilvers *et al.*, 2003), los datos de varios trabajos indican que dicho movimiento no tiene por qué observarse necesariamente en este subtipo de DCP (Raidt *et al.*, 2014; Blanchon *et al.*, 2020). Ésta fue la observación que pudimos realizar en este grupo de pacientes, en el que todos presentaron cilios discinéticos, principalmente rígidos, pero no mostraron movimiento rotatorio.

En el grupo de pacientes con ultraestructura axonemal conservada encontramos, entre otros, dos pacientes con mutación en *DNAH11*, y otros tres en cuyo estudio genético no se detectó variante patogénica en ninguno de los genes DCP testados. Por un lado, el defecto en *DNAH11* se utiliza frecuentemente como ejemplo de ese 30% de casos de DCP que presentan ultraestructura aparentemente normal, ya que se manifiesta con una sutil pérdida del volumen de los BED en la región proximal del cilio (Schwabe *et al.*, 2008). En estos dos pacientes, ese cambio fue efectivamente imperceptible mediante el estudio de sus secciones ciliares y por tanto se determinó que presentaban axonemas normales.

Por otro lado, los tres pacientes DCP sin defecto genético conocido y ultraestructura conservada representan un conjunto de pacientes DCP cuyo diagnósti-

co supone un verdadero reto. Los tres presentaban en efecto cilios discinéticos y características clínicas compatibles, sin embargo la confirmación del diagnóstico requiere de la detección de un defecto genético patogénico en un gen DCP y/o de la presencia de un defecto axonemal distintivo (Lucas *et al.*, 2017; Shapiro *et al.*, 2018). Los avances en el campo de la biología molecular, y concretamente las técnicas de secuenciación masiva, es posible que puedan en un futuro próximo arrojar luz sobre la causa de la disfunción de los cilios móviles en este tipo de pacientes. Igualmente es muy probable que la descripción próxima de nuevos genes implicados en la DCP obligue a una nueva caracterización diagnóstica de estos pacientes, siendo entonces necesariamente obligado el redefinir los defectos de movilidad y ultraestructura ciliar para establecer nuevos parámetros diagnósticos.

6.2.2 Relaciones genotipo-fenotipo ciliar-fenotipo clínico

En general, el fenotipo clínico observado en nuestra cohorte se corresponde con los datos previamente publicados, es decir, síntomas crónicos y persistentes del tracto respiratorio superior e inferior, DRN y defectos de lateralidad entre otros (Knowles *et al.*, 2016).

Respecto al DRN, se establece que entre un 75 y un 85% de los pacientes pediátricos con DCP han presentado dificultad respiratoria neonatal no filiada (Noone *et al.*, 2004). Se considera un síntoma sugestivo de DCP, pero en su aparición intervienen otros factores y no está claro si la movilidad ciliar afecta directamente o es un mecanismo adicional para la eliminación de líquido pulmonar fetal (Ferkol y Leigh, 2006). En nuestra cohorte, un 39,21% de los pacientes presentaron distrés neonatal, un dato similar al 36,5% del estudio del grupo de Marthin realizado sobre 74 adultos y niños (Marthin *et al.*, 2010) o más cercano al 57% observado por el grupo de Hosie sobre 84 niños (Hosie *et al.*, 2015). Pocos estudios correlacionan este síntoma en particular con el fenotipo ciliar, pero los datos publicados señalan principalmente a los defectos a nivel de los brazos de dineína (Davis *et al.*, 2019; Emiralioglu *et al.*, 2019), y por

tanto un predominio de cilios inmóviles. Éste fue precisamente el fenotipo ciliar observado en nuestra cohorte.

Las bronquiectasias son el resultado final de la infección bronquial crónica que padecen los pacientes DCP, están relacionadas con la edad y no son una patología *per se* del síndrome (Suárez-Cuartin *et al.*, 2016). La asociación entre la presencia de bronquiectasias por el aclaramiento mucociliar ineficaz y un defecto ultraestructural específico no está bien establecida. Sin embargo en los estudios sobre DCP donde se incluyen las bronquiectasias como variable de correlación encontramos en general cierta asociación entre los pacientes con defecto en los brazos de dineína y un predominio de inmovilidad ciliar y la presencia de bronquiectasias (Emiralioglu *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020). En nuestra cohorte la mitad de los pacientes con bronquiectasias presentaba defecto en los BED, mientras que un 33% presentaba ultraestructura conservada, mostrando en conjunto cierta movilidad ciliar con tan sólo un caso de inmovilidad ciliar total. Estos resultados obtenidos en nuestra población no pueden ser interpretados de forma concluyente dado el reducido número de pacientes DCP con bronquiectasias y todas sus pruebas diagnósticas completadas.

El estudio de correlación que realizamos sobre los defectos de lateralidad tampoco fue concluyente. En este caso este análisis solo se pudo efectuar en 8 de los pacientes que tenían todos los test completados. La ausencia de los BED fue el defecto de mayor prevalencia en este grupo, con patrones de movilidad variados. De manera similar al distrés respiratorio neonatal, los defectos de lateralidad no pueden ser atribuidos únicamente a un movimiento ciliar defectuoso -en este caso, de los cilios del nodo embrionario- ya que, además del flujo nodal que genera el movimiento de estos cilios, intervienen otros muchos factores en el posicionamiento de los órganos durante el desarrollo embrionario (Pennekamk *et al.*, 2015).

Por último, el resultado del estudio de correlación realizado en base al tipo de defecto ultraestructural no fue estadísticamente significativo, indicándonos en términos globales que aquellos pacientes con un defecto clase 1 según los criterios de la Guía Consenso portaban variantes patogénicas en *DNAH5* y mos-

traban cilios inmóviles; aquellos con defecto clase 2, portaban variantes patogénicas en *RSPH1* y mostraban cilios discinéticos, y en aquellos con ultraestructura conservada no se detectó variante genética en ninguno de los genes DCP testados y mostraron cilios discinéticos. Estos datos son coherentes con todo lo expuesto previamente en esta Discusión. Sin embargo, y de igual forma que el resto de asociaciones analizadas en este trabajo, los datos deben interpretarse con cautela dado el reducido número de pacientes, siendo necesarios estudios de cohortes de mayor tamaño muestral para poder alcanzar conclusiones al respecto.

VII. Conclusiones

1. El estudio ultraestructural de las secciones ciliares de pacientes DCP ha permitido observar los defectos axonemales descritos para esta entidad, así como la identificación de un defecto axonemal no descrito previamente en la literatura, consolidando el papel de la MET como herramienta diagnóstica para la DCP.
2. El defecto en los brazos de dineína fue la alteración axonemal más prevalente en el estudio ultraestructural de las biopsias ciliares en pacientes DCP, y la alteración genética predominante fueron las variantes patogénicas en el gen *DNAH5*.
3. El análisis ultraestructural completo de la biopsia nasal posibilita el reconocimiento e identificación de cambios ciliares secundarios, fundamentalmente en base a los fenómenos de ciliogénesis aberrantes. Este aspecto es de notable interés por cuanto que limita los errores en el estudio de las secciones ciliares para el diagnóstico de la DCP.
4. Las alteraciones mutacionales encontradas en nuestra cohorte de pacientes DCP afectaban de manera global a proteínas estructurales de los brazos de dineína y los brazos radiales, mostrando cilios inmóviles y discinéticos respectivamente.
5. Algunos grupos de pacientes con variantes patogénicas en un mismo gen mostraron a su vez diversos patrones de batida ciliar y de ultraestructura axonemal. Estas diferencias posiblemente podrían atribuirse a la naturaleza exacta de la mutación existente y al efecto patogenético de la misma.

6. El distrés respiratorio neonatal y los defectos de lateralidad prevalecieron en los pacientes que mostraban anomalías en los brazos de dineína y predominio de inmovilidad ciliar. En presencia de bronquiectasias los pacientes mostraron además ultraestructura axonemal conservada y cierta movilidad ciliar.
7. Nuestro estudio de correlación entre el fenotipo ciliar y clínico y el genotipo en pacientes DCP sugiere que existe una proporción de individuos con ultraestructura conservada y cilios discinéticos que carecen de causa genética conocida. Este grupo de pacientes constituye un gran reto en el proceso diagnóstico de la DCP.
8. En base a los resultados obtenidos en nuestro estudio hemos propuesto que la rotura de simetría axonemal sea introducido como un nuevo defecto ultraestructural a considerar en el diagnóstico de la DCP. Consideramos que este nuevo parámetro puede ser una herramienta de gran utilidad en la aproximación diagnóstica electrono-microscópica de la DCP.

No obstante, consideramos que la validez de esta nueva aportación debe ratificarse con grupos muestrales de gran tamaño y a ser posible por distintos grupos o centros de estudio de la comunidad científica. De cualquier modo, entendemos que el análisis de la rotura de la simetría axonemal, además de proporcionar un nuevo enfoque diagnóstico de la DCP, posibilita la apertura de nuevas vías de estudio en correlación a los datos moleculares para mejor conocer la patogénesis subyacente en la DCP.

Bibliografía

- Adamiok-Ostrowska A, Piekietko-Witkowska A. 2020. Ciliary Genes in Renal Cystic Diseases. *Cells*. Apr 8;9(4)
- Afzelius BA. 1976. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*. 193(4250):317.
- Afzelius BA. 2004. Cilia-related diseases. *J Pathol*. 204(4):470-477.
- Alanin MC, Nielsen KG, von Buchwald C, et al. 2015. A longitudinal study of lung bacterial pathogens in patients with primary ciliary dyskinesia. *Clin Microbiol Infect*. 21(12):1093.e1-1093.e10937.
- Alford LM, Stoddard D, Li JH, et al. 2016. The nexin link and B-tubule glutamylation maintain the alignment of outer doublets in the ciliary axoneme. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 73(7):331-340.
- Anderson N, Borlak J. 2006. Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Lett*. Oct, 9;580(23):5533-40.
- Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, et al. 2013. Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms. *Hum Mutat*. Mar;34(3):462-72
- Armengot M, Bonet M, Carda C, et al. 2012. Development and validation of a method of cilia motility analysis for the early diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 63(1):1-8.
- Armengot-Carceller M, Reula A, Mata-Roig M, et al. 2020. Understanding Primary Ciliary Dyskinesia: Experience From a Mediterranean Diagnostic Reference Centre. *J Clin Med*. 9(3):810.
- Austin-Tse C, Halbritter J, Zariwala MA et al. 2013. Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Hum Genet*. Oct 3;93(4):672-86.
- Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. 2006. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 7:125-48.
- Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R. 1996. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 75(4):319-322.
- Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al. 2009. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J*. 34(6):1264-1276.
- Barlocco EG, Valletta EA, Canciani M et al. 1991. Ultrastructural ciliary defects in children with recurrent infections of the lower respiratory tract. *Pediatr Pulmonol*. 10(1):11-7.

- Bautista Harris G, Rodriguez Bermejo JC, Castillo Suarez M. 2000. Different frequency of cilia with transposition in human nasal and bronchial mucosa. A case of acquired ciliary dyskinesia. *Virchows Arch.* 437(3):325-330.
- Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Fernández-Cancio M *et al.* 2020. Immunofluorescence Analysis as a Diagnostic Tool in a Spanish Cohort of Patients with Suspected Primary Ciliary Dyskinesia. *J Clin Med.* Nov 9;9(11):3603.
- Baz-Redón N, Rovira-Amigo S, Paramonov I *et al.* 2021. Implementation of a Gene Panel for Genetic Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Arch Bronconeumol (Engl Ed).* Mar;57(3):186-194.
- Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, *et al.* 2016. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 47(4):1103-1112
- Blake JR, Sleight MA. 1974. Mechanics of ciliary locomotion. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Feb;49(1):85-125.
- Blanchon S, Legendre M, Bottier M, *et al.* 2020. Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet.* 57(4):237-244.
- Bloodgood RA. 2012. The future of ciliary and flagellar membrane research. *Mol Biol Cell.* Jul 1;23(13): 2407–2411.
- Boaretto F, Snijders D, Salvaro C, *et al.* 2016. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel: Molecular and Clinical Findings in Italian Patients. *J Mol Diagn.* 18(6):912-922.
- Bonnefoy S, Watson CM, Kernohan KD, *et al.* 2018. Biallelic Mutations in LRRC56, Encoding a Protein Associated with Intraflagellar Transport, Cause Mucociliary Clearance and Laterality Defects. *Am J Hum Genet.* 103(5):727-739.
- Boon M, Wallmeier J, Ma L, *et al.* 2014a. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun.* 5:4418.
- Boon M, Smits A, Cuppens H, *et al.* 2014b. Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. *Orphanet J Rare Dis.* 9:11.
- Bower R, Tritschler D, Vanderwaal K *et al.* 2013. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol Biol Cell.* Apr;24(8):1134-52.
- Brennan SK, Ferkol TW, Davis SD. 2021. Emerging Genotype-Phenotype Relationships in Primary Ciliary Dyskinesia. *Int J Mol Sci.* Jul 31;22(15):8272.

- Budny B, Chen W, Omran H, *et al.* 2006. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Hum Genet.* 120(2):171-178.
- Bui KH, Sakakibara H, Movassagh T, *et al.* 2009. Asymmetry of inner dynein arms and inter-doublet links in *Chlamydomonas* flagella. *J Cell Biol.* 186(3):437-446.
- Bujakowska KM, Liu Q, Pierce EA. 2017. Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Oct 3;9(10)
- Bukowy-Bieryłło Z, Ziętkiewicz E, Loges NT, *et al.* 2013. RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia. *Pediatr Pulmonol.* 48(4):352-363.
- Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. 2017. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Apr 3;9(4)
- Bustamante-Marin XM, Yin WN, Sears PR, *et al.* 2019. Lack of GAS2L2 Causes PCD by Impairing Cilia Orientation and Mucociliary Clearance. *Am J Hum Genet.* 104(2):229-245.
- Busuttill A, More IA, and McSeveney D. 1977. A reappraisal of the ultrastructure of the human respiratory nasal mucosa. *J Anat.* Nov;124(Pt 2): 445–458.
- Carda C, Armengot M, Escribano A, Peydró A. 2005. Ultrastructural patterns of primary ciliar dyskinesia syndrome. *Ultrastruct Pathol.* Jan-Feb;29(1):3-8.
- Cardenas-Rodriguez M, Badano JL. 2009. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* Nov 15;151C(4):263-80.
- Carlen B, Stenram U. 2005. Primary ciliary dyskinesia: a review. *Ultrastruct Pathol.* 29:217–20
- Carson JL, Collier AM, Fernald GW, Hu SC. 1994. Microtubular discontinuities as acquired ciliary defects in airway epithelium of patients with chronic respiratory diseases. *Ultrastruct Pathol.* May-Jun;18(3):327-32.
- Carson JL, Collier AM, Hu S, Smith CA, Stewart P. 1987. The appearance of compound cilia in the nasal mucosa of normal human subjects following acute, in vivo exposure to sulfur dioxide. *Environ Res.* 42(1):155-165.
- Castleman VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SC, Parker KA, *et al.* 2009. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *Am J Hum Genet.* 84(2):197-209.

- Chang, M.M.-J., Shih, L. and Wu, R. 2008. Pulmonary Epithelium: Cell Types and Functions. In *The Pulmonary Epithelium in Health and Disease*, D. Proud (Ed.).
- Chen ZG, Li YY, Wang ZN *et al.* 2018. Aberrant epithelial remodeling with impairment of cilia architecture in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Thorac Dis.* Mar;10(3):1753-1764.
- Chilvers MA, McKean M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. 2001. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J.* 18(6):965-970.
- Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. 2003. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol.* 112(3):518-524.
- Christensen ST, Pedersen SF, Satir P, Veland IR, Schneider L. 2008. The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Curr Top Dev Biol.* 85:261-301.
- Ciancio N, de Santi MM, Campisi R *et al.* 2015. Kartagener's syndrome: review of a case series. *Multidiscip Respir Med.* May 30;10(1):18.
- Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. 2014. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 44(6):1589-99.
- Corbelli R, Bringolf-Isler B, Amacher A, *et al.* 2004. Nasal nitric oxide measurements to screen children for primary ciliary dyskinesia. *Chest.* 126(4):1054-1059.
- Daniels MA, Leigh MW, Davis SD *et al.* 2013. Founder Mutation in RSPH4A Identified in Patients of Hispanic Descent with Primary Ciliary Dyskinesia. *Hum Mutat.* 34:1352–1356.
- Davis SD, Rosenfeld M, Lee HS, *et al.* 2019. Primary Ciliary Dyskinesia: Longitudinal Study of Lung Disease by Ultrastructure Defect and Genotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 199(2):190-198.
- Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, *et al.* 2015. Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 191(3):316-324.
- de longh RU, Rutland J. 1995. Ciliary defects in healthy subjects, bronchiectasis, and primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 151(5):1559-1567.

- Demarco RC, Tamashiro E, Rossato M, *et al.* 2013. Ciliary ultrastructure in patients with chronic rhinosinusitis and primary ciliary dyskinesia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 270(7):2065-2070.
- Didon L, Zwick RK, Chao IW, *et al.* 2013. RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir Res.* Jul 3;14:70.
- Dixon M, Shoemark A. 2017. Secondary defects detected by transmission electron microscopy in primary ciliary dyskinesia diagnostics. *Ultrastruct Pathol.* 41(6):390-398.
- Edelbusch C, Cindrić S, Dougherty GW, *et al.* 2017. Mutation of serine/threonine protein kinase 36 (STK36) causes primary ciliary dyskinesia with a central pair defect. *Hum Mutat.* 38(8):964-969.
- El Khouri E, Thomas L, Jeanson L, *et al.* 2016. Mutations in DNAJB13, Encoding an HSP40 Family Member, Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Male Infertility. *Am J Hum Genet.* 99(2):489-500.
- Elliott WH, Elliot DC. 2002. *Bioquímica y biología molecular.* Ed. Ariel ciencia.
- Emiralioglu N, Taşkıran EZ, Koşukcu C *et al.* 2020. Genotype and phenotype evaluation of patients with primary ciliary dyskinesia: First results from Turkey. *Pediatr Pulmonol.* Feb;55(2):383-393.
- Escudier E, Couprie M, Duriez B, *et al.* 2002. Computer-assisted analysis helps detect inner dynein arm abnormalities. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(9):1257-1262.
- Escudier E, Escalier D, Pinchon MC, *et al.* 1990. Dissimilar expression of axonemal anomalies in respiratory cilia and sperm flagella in infertile men. *Am Rev Respir Dis.* 142(3):674-679.
- Eymieux S, Blanchard E, Uzbekov R, Hourieux C, Roingeard P. 2021. Annulate lamellae and intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* Aug;23(8):e13328.
- Fahy JV, Dickey BF. 2010. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* Dec 2;363(23):2233-47.
- Fassad MR, Patel MP, Shoemark A, *et al.* 2020. Clinical utility of NGS diagnosis and disease stratification in a multiethnic primary ciliary dyskinesia cohort. *J Med Genet.* 57(5):322-330.
- Fassad MR, Shoemark A, Legendre M, *et al.* 2018. Mutations in Outer Dynein Arm Heavy Chain DNAH9 Cause Motile Cilia Defects and Situs Inversus. *Am J Hum Genet.* 6;103(6):984-994.

- Faus-Perez A, Sanchis-Calvo A and Codoner-Franch P. 2015. Ciliopathies: an Update. *Pediatrics Research International Journal*, Vol. 2015. Article ID 935983,
- Ferkol T, Leigh M. 2006. Primary ciliary dyskinesia and newborn respiratory distress. *Semin Perinatol*. 30(6):335–340
- Ferkol T, Mitchison H, Callaghan C, *et al*. 2006a. Current issues in the basic mechanisms, pathophysiology, diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Monograph*.
- Fliegauf M, Benzing T, Omran H. 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(11):880-893.
- Francis RJ, Christopher A, Devine WA, Ostrowski L, Lo C. 2012. Congenital heart disease and the specification of left-right asymmetry. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May 15;302(10):H2102-11.
- Frommer A, Hjejij R, Loges NT, *et al*. 2015. Immunofluorescence Analysis and Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia with Radial Spoke Defects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 53(4):563-573.
- Funkhouser WK 3rd, Niethammer M, Carson JL, *et al*. 2014. A new tool improves diagnostic test performance for transmission electron microscopy evaluation of axonemal dynein arms. *Ultrastruct Pathol*. 38(4):248-255.
- Gaillard DA, Lallement AV, Petit AF, Puchelle ES. 1989. In vivo ciliogenesis in human fetal tracheal epithelium. *Am J Anat*. Aug;185(4):415-28.
- Ganesan S, Comstock AT, Sajjan US. 2013. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers*. Oct 1;1(4):e24997
- Garcia-Gonzalo FR and Reiter JF. 2012. Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J Cell Biol*. Jun 11;197(6):697–709.
- Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, *et al*. 2011. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet*. Jul 3;43(8):776-84.
- Ghadially FN .1988. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, ed.3. Boston; Butterworth-Heinemann. 573-583.
- Gonçalves J, Pelletier L. 2017. The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol cells*. 40(4):243–253.
- Graham L, Orenstein JM. 2007. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nat Protoc*. 2(10):2439-2450.

- Greenan GA, Vale RD, Agard DA. 2020. Electron cryotomography of intact motile cilia defines the basal body to axoneme transition. *J Cell Biol.* Jan 6;219(1):e201907060.
- Guo Z, Chen W, Wang L, Qian L. 2020. Clinical and Genetic Spectrum of Children with Primary Ciliary Dyskinesia in China. *J Pediatr.* Oct;225:157-165.
- Hagiwara H, Ohwada N, Aoki T, Takata K. 2000. Ciliogenesis and ciliary abnormalities. *Med Electron Microsc.* 33(3):109-114.
- Hagiwara H, Ohwada N, Takata K. 2004. Cell biology of normal and abnormal ciliogenesis in the ciliated epithelium. *Int Rev Cytol.* 234:101-41.
- Hagiwara H. 1994. Electron microscopic observation of ciliated cysts in the human oviduct epithelium. *Arch Histol Cytol.* Dec;57(5):523-30.
- Halbert SA, Patton DL, Zarutskie PW, Soules MR. 1997. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum Reprod.* 12(1):55-58.
- Hannah WB, DeBrosse S, Kinghorn B, *et al.* 2019. The expanding phenotype of OFD1-related disorders: Hemizygous loss-of-function variants in three patients with primary ciliary dyskinesia. *Mol Genet Genomic Med.* 7(9):e911.
- Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. 2009. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 187:921-933.
- Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. 2011. Ciliopathies. *N Engl J Med.* 364(16):1533-1543.
- Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell.* Apr 7;125(1):33-45
- Hirst RA, Rutman A, Williams G, O'Callaghan C. 2010. Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia. *Chest.* 138(6):1441-1447.
- Holwill ME, Satir P. 1990. A physical model of microtubule sliding in ciliary axonemes. *Biophys J.* Oct;58(4):905-17.
- Hong DH, Pawlyk B, Sokolov M, *et al.* 2003. RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(6):2413-2421.
- Horani A, Ferkol TW. 2018. Advances in the Genetics of Primary Ciliary Dyskinesia: Clinical Implications. *Chest.* 154(3):645-652.

-
- Horani A., Brody S.L., Ferkol T.W., *et al.* 2013. CCDC65 mutation causes primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure and hyperkinetic cilia. *PLoS ONE*. 8:e72299
- Hosie PH, Fitzgerald DA, Jaffe A *et al.* 2015. Presentation of primary ciliary dyskinesia in children: 30 years' experience. *J Paediatr Child Health*. Jul;51(7):722-6.
- Huang S, Hirota Y and Sawamoto K. 2009. Various facets of vertebrate cilia: Motility, signaling, and role in adult neurogenesis. Proceedings of the Japan Academy. *Series B, Physical and biological sciences*. 85:324-36.
- Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M, *et al.* 2004. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymal flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet*. Sep 15;13(18):2133-41.
- Imhof S, Zhang J, Wang H, *et al.* 2019. Cryo electron tomography with volta phase plate reveals novel structural foundations of the 96-nm axonemal repeat in the pathogen *Trypanosoma brucei*. *Elife*. Nov 11;8.
- Inaba K, Mizuno K. 2015. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol*. 15(2):77-94.
- Irving S, Dixon M, Fassad MR *et al.* 2018. Primary Ciliary Dyskinesia Due to Microtubular Defects is Associated with Worse Lung Clearance Index. *Lung*. Apr;196(2):231-238.
- Ishikawa H, Marshall WF. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(4):222-234.
- Ishikawa H, Marshall WF. 2017. Intraflagellar Transport and Ciliary Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Mar 1;9(3):a021998.
- Ishikawa T. 2015. Cryo-electron tomography of motile cilia and flagella. *Cilia*. Feb 2;4(1):3.
- Ishikawa T. 2017. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9(1):a028076.
- Jackson CL, Behan L, Collins SA *et al.* 2016. Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. Mar;47(3):837-48.
- Johnson NT, Villalón M, Royce FH, Hard R, Verdugo P. 1991. Autoregulation of beat frequency in respiratory ciliated cells. Demonstration by viscous loading. *Am Rev Respir Dis*. Nov;144(5):1091-4.

- Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E, De Boeck K. 2000b. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 54(3):343-356.
- Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E. 2000a Secondary ciliary dyskinesia is absent after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 54(3):333-342.
- Jorissen M, Willems T. 2004. The secondary nature of ciliary (dis)orientation in secondary and primary ciliary dyskinesia. *Acta Otolaryngol.* 124(4):527-531.
- Kilinc AA, Cebi MN, Ocak Z, Cokugras HC. 2021. The Relationship between Genotype and Phenotype in Primary Ciliary Dyskinesia Patients. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul.* Jul 2;55(2):188-192.
- Knight DA, Holgate ST. 2003. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* Dec;8(4):432-46.
- Knowles MR, Boucher RC. 2002. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* Mar;109(5):571-7.
- Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. 2013. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 188(8):913-922.
- Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, et al. 2012. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax.* 67(5):433-441.
- Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, et al. 2014. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 189(6):707-717.
- Knowles MR, Zariwala M, Leigh M. 2016. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clin Chest Med.* 37(3):449-461.
- Kott E, Legendre M, Copin B et al. 2013. Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects. *Am J Hum Genet.* Sep 5;93(3):561-70.
- Kouis P, Yiallourous PK, Middleton N, et al. 2017. Prevalence of primary ciliary dyskinesia in consecutive referrals of suspect cases and the transmission electron microscopy detection rate: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Res.* 81(3):398-405.

- Kunimoto K, Yamazaki Y, Nishida T, *et al.* 2012. Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell*. Jan 20;148(1-2):189-200.
- Lechtreck KF, Delmotte P, Robinson ML, Sanderson MJ, Witman GB. 2008. Mutations in Hydin impair ciliary motility in mice. *J Cell Biol*. Feb 11;180(3):633-43
- Leigh MW, Ferkol TW, Davis SD, *et al.* 2016. Clinical Features and Associated Likelihood of Primary Ciliary Dyskinesia in Children and Adolescents. *Ann Am Thorac Soc*. 13(8):1305-1313.
- Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK *et al.* 2013. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc*. Dec;10(6):574-81.
- Leigh MW, O'Callaghan C, Knowles MR. 2011. The challenges of diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Proc Am Thorac Soc*. 8(5):434-437.
- Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, *et al.* 2009. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med*. 11(7):473-487.
- Lindemann CB. 2007. The geometric clutch as a working hypothesis for future research on cilia and flagella. *Ann N Y Acad Sci*. Apr;1101:477-93.
- Liu H, Kiseleva AA, Golemis EA. 2018. Ciliary signalling in cancer. *Nat Rev Cancer*. Aug;18(8):511-524.
- Lobo J, Zariwala MA, Noone PG. 2015. Primary ciliary dyskinesia. *Semin Respir Crit Care Med*. Apr;36(2):169-79.
- Loges NT, Antony D, Maver A, *et al.* 2018. Recessive DNAH9 Loss-of-Function Mutations Cause Laterality Defects and Subtle Respiratory Ciliary-Beating Defects. *Am J Hum Genet*. 103(6):995-1008.
- Loges NT, Olbrich H, Becker-Heck A *et al.* 2009. Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *Am J Hum Genet*. Dec;85(6):883-9
- Long H and Huang K. 2019. Transport of Ciliary Membrane Proteins. *Front Cell Dev Biol*. 7:381.
- Long H, Zhang F, Xu N, *et al.* 2016. Comparative Analysis of Ciliary Membranes and *Ectosomes*. *Curr Biol*. Dec 19;26(24):3327-3335.
- Loreng TD, Smith EF. 2017. The Central Apparatus of Cilia and Eukaryotic Flagella. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9(2):a028118.

- Lucas JS, Barbato A, Collins SA, *et al.* 2017. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 49(1):1601090.
- Lucas JS, Davis SD, Omran H, Shoemark A. 2020. Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *Lancet Respir Med.* 8(2):202-216.
- Lucas JS, Paff T, Goggin P, Haarman E. 2016. Diagnostic Methods in Primary Ciliary Dyskinesia. *Paediatr Respir Rev.* Mar;18:8-17.
- Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. 2006. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update.* Jul-Aug;12(4):363-72.
- Ma M, Stoyanova M, Rademacher G, *et al.* 2019. Structure of the Decorated Ciliary Doublet Microtubule. *Cell.* 179(4):909-922.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC and Bleicher F. 2009. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J. Exp. Zool.* 312B:416-424.
- Manabe S, Mochizuki T, Sato M *et al.* 2021. Lupus Nephritis and Hydroxychloroquine-Associated Zebra Bodies: Not Just in Fabry Disease. *Kidney Med.* Mar 18;3(3):442-446.
- Marshall WF, Rosenbaum JL. 2001. Intraflagellar transport balances continuous turnover of outer doublet microtubules: implications for flagellar length control. *J. Cell Biol.* 155:405–14.
- Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. 2010. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med.* Jun 1;181(11):1262-8.
- McEwen BF, Radermacher M, Rieder CL, Frank J. 1986. Tomographic three-dimensional reconstruction of cilia ultrastructure from thick sections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(23):9040-9044.
- Merigo F, Benati D, Piacentini G, Boner A, Sbarbati A. 2002. The ultrastructure of nasal mucosa in children with asthma. *Ultrastruct Pathol.* Sep-Oct;26(5):293-8.
- Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A *et al.* 2011. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat Genet.* Jan;43(1):72-8.
- Mierau GW, Agostini R, Beals TF *et al.* 1992. The role of electron microscopy in evaluating ciliary dysfunction: report of a workshop. *Ultrastruct Pathol.* Jan-Apr;16(1-2):245-54.

- Mirra V, Werner C, Santamaria F. 2017. Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies. *Front Pediatr.* 5:135.
- Mitchell DR. 2007. The evolution of eukaryotic cilia and flagella as motile and sensory organelles. *Adv Exp Med Biol.* 607:130-140.
- Mitchison HM, Shoemark A. 2017. Motile cilia defects in diseases other than primary ciliary dyskinesia: The contemporary diagnostic and research role for transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol.* Nov-Dec;41(6):415-427.
- Mitchison HM, Valente EM. 2017. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol.* 241(2):294-309.
- Mohri H, Inaba K, Ishijima S, Baba SA. 2012. Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88(8):397-415.
- Molla-Herman A, Ghossoub R, Blisnick T, et al. 2010. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *J Cell Sci.* May 15;123(Pt 10):1785-95.
- Møller ME, Alanin MC, Grønhøj C, Aanæs K, Høiby N, von Buchwald C. 2017. Sinus bacteriology in patients with cystic fibrosis or primary ciliary dyskinesia: A systematic review. *Am J Rhinol Allergy.* Sep 1;31(5):293-298.
- Moore A, Escudier E, Roger G, et al. 2006. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet.* 43(4):326-333.
- Moreno Galdó A, Vizmanos Lamotte G, Reverte Bover C, et al. 2010. Valor del óxido nítrico nasal en el diagnóstico de la discinesia ciliar primaria. *An Pediatr (Barc).* 73(2):88-93.
- Mullowney T, Manson D, Kim R, et al. 2014. Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress. *Pediatrics.* 134(6):1160-1166.
- Munkholm M, Mortensen J. 2014. Mucociliary clearance: pathophysiological aspects. *Clin Physiol Funct Imaging.* May;34(3):171-7.
- Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell.* Jan 8;96(1):79-88.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, et al. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell.* 95:829-37.
- Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, et al. 2004. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med.* 169(4):459-467.

- O'Callaghan C, Rutman A, Williams G, Kulkarni N, Hayes J, Hirst RA. 2018. Ciliated conical epithelial cell protrusions point towards a diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Respir Res*. Jun 25;19(1):125.
- Olbrich H, Cremers C, Loges NT, *et al*. 2015. Loss-of-Function GAS8 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Disrupt the Nexin-Dynein Regulatory Complex. *Am J Hum Genet*. 97(4):546-554.
- Olbrich H, Häffner K, Kispert A, *et al*. 2002. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet*. 30(2):143-144.
- Olbrich H, Schmidts M, Werner C, *et al*. 2012. Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry. *Am J Hum Genet*. 91(4):672-684.
- Omran H, Loges NT. 2009. Immunofluorescence staining of ciliated respiratory epithelial cells. *Methods Cell Biol*. 91:123-133.
- Onoufriadis A, Shoemark A, Schmidts M, Patel M, Jimenez G, Liu H, *et al*. 2014. Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects. *Hum Mol Genet*. 23(13):3362-74.
- Orpha.net <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease.php?lng=ES>
- Osinka A, Poprzeczko M, Zielinska MM, *et al*. 2019. Ciliary Proteins: Filling the Gaps. Recent Advances in Deciphering the Protein Composition of Motile Ciliary Complexes. *Cells*. 8(7):730.
- Paff T, Daniels JM, Pals G, Haarman EG. 2014. Primary ciliary dyskinesia: From diagnosis to molecular mechanisms. *J Pediatr Genet*. Jun;3(2):115-27.
- Panizzi JR, Becker-Heck A, Castleman VH, *et al*. 2012. CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nat Genet*. 44(6):714-719.
- Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, *et al*. 2010. A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 35(5):1057-1063.
- Pazour GJ, Witman GB. *Curr Opin*. 2003. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Cell Biol*. Feb;15(1):105-10.
- Pedersen LB, Rosenbaum JL. 2008. Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr Top Dev Biol*. 85: 23–61.

-
- Pennekamp P, Menchen T, Dworniczak B, Hamada H. 2015. Situs inversus and ciliary abnormalities: 20 years later, what is the connection? *Cilia*. Jan 14;4(1):1.
- Pifferi M, Bush A, Mariani F, *et al.* 2020. Lung Function Longitudinal Study by Phenotype and Genotype in Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest*. 158(1):117-120.
- Pifferi M, Bush A, Mulé G, *et al.* 2021. Longitudinal Lung Volume Changes by Ultrastructure and Genotype in Primary Ciliary Dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc*. 18(6):963-970.
- Pifferi M, Montemurro F, Cangiotti AM *et al.* 2009. Simplified cell culture method for the diagnosis of atypical primary ciliary dyskinesia. *Thorax*. Dec;64(12):1077-81.
- Pigino G, Ishikawa T. 2012. Axonemal radial spokes: 3D structure, function and assembly. *Bioarchitecture*. 2(2):50-58.
- Plesec TP, Ruiz A, McMahon JT, Prayson RA. 2008. Ultrastructural abnormalities of respiratory cilia: a 25-year experience. *Arch Pathol Lab Med*. 132(11):1786-1791.
- Poprzeczko M, Bicka M, Farahat H, *et al.* 2019. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells*. 8(12):1614.
- Raidt J, Wallmeier J, Hjejij R, *et al.* 2014. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 44(6):1579-1588.
- Raidt J, Werner C, Menchen T, *et al.* 2015. Ciliary function and motor protein composition of human fallopian tubes. *Hum Reprod*. 30(12):2871-2880.
- Rautiainen M, Collan Y, Nuutinen J, Kärjä J. 1984. Ultrastructure of human respiratory cilia: a study based on serial sections. *Ultrastruct Pathol*. 6(4):331-339.
- Rautiainen M, Nuutinen J, Kiukaanniemi H, Collan Y. 1992. Ultrastructural changes in human nasal cilia caused by the common cold and recovery of ciliated epithelium. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 101(12):982-987.
- Rayner CF, Rutman A, Dewar A, Greenstone MA, Cole PJ, Wilson R. 1996. Ciliary disorientation alone as a cause of primary ciliary dyskinesia syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 153(3):1123-1129.
- Reiter JF and Leroux MR. 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Sep;18(9):533–547.

- Reiter JF, Blacque OE, and Leroux MR. 2012. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.* Jul;13(7):608–618.
- Requena-Fernández MÁ, Dasí F, Castillo S, Barajas-Cenobi R, Navarro-García MM, Escribano A. 2020. Knowledge of Rare Respiratory Diseases among Paediatricians and Medical School Students. *J Clin Med.* 9(3):869.
- Reula A, Moreno-Galdó A, Rovira-Amigó S, Camats-Tarruella N, Jaijo T, Baz-Redón N, Carda C, Milian L, Mata M, Armengot-Carceller M (2020). Primary Ciliary Dyskinesia. Pp: 1-69. In: Understanding Dyskinesia. Dvorak Jan (Ed). *Nova Science Publishers*- ISBN: 9781536185584. New York
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7): 671-675.
- Jain R, Javidan-Nejad C, Alexander-Brett J, *et al.* 2012. Sensory functions of motile cilia and implication for bronchiectasis. *Front Biosci (Schol Ed).*4:1088-1098.
- Rodríguez-Santiago B y Dulcet LI. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal.* 23:56–66.
- Rohatgi R, Snell WJ. 2010. The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol.* Aug;22(4):541-6.
- Roomans GM, Ivanovs A, Shebani EB, Johannesson M. 2006. Transmission electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Ups J Med Sci.* 111(1):155-168.
- Rubbo B, Shoemark A, Jackson CL, *et al.* 2019. Accuracy of High-Speed Video Analysis to Diagnose Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest.* 155(5):1008-1017.
- Rumman N, Jackson C, Collins S, *et al.* 2017. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: potential options for resource-limited countries. *Eur Respir Rev.* 26(143):160058.
- Rutland J, Dewar A, Cox T, Cole P. 1982. Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *J Clin Pathol.* 35(3):357-359.
- Satir P, Christensen ST. 2007. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol.* 69:377-400.
- Satir P, Heuser T, Sale WS. 2014. A Structural Basis for How Motile Cilia Beat. *Bioscience.* 64(12):1073-1083.
- Satir P, Pedersen LB, Christensen ST. 2010. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci.* 123(Pt 4):499-503.

- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, *et al.* 2006. New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science*. Feb 3;311(5761):629-32
- Schroeder JA. 2017. Application of laboratory and digital techniques for visual enhancement during the ultrastructural assessment of cilia. *Ultrastruct Pathol*. 41(6):399-407.
- Schwabe GC, Hoffmann K, Loges N *et al.* 2008. Primary ciliary dyskinesia associated with normal axonemeultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum Mutat*. 29:289–298
- Serra R. 2008. Role of Intraflagellar Transport and Primary Cilia in Skeletal Development. *Anatomical Record*. 291(9):1049-1061.
- Shah AS, Ben-Shahar Y, Moninger TO, Kline JN, Welsh MJ. 2009. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*. 325(5944):1131-1134.
- Shapiro AJ, Davis SD, Ferkol T, *et al.* 2014. Laterality defects other than situs inversus totalis in primary ciliary dyskinesia: insights into situs ambiguus and heterotaxy. *Chest*. 146(5):1176-1186.
- Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, *et al.* 2018. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 197(12):e24-e39.
- Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, *et al.* 2016. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatr Pulmonol*. 51(2):115-132.
- Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, *et al.* 2020. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *Eur Respir J*. 55(4):1900725.
- Shoemark A, Burgoyne T, Kwan R, *et al.* 2018. Primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure: three-dimensional tomography detects absence of DNAH11. *Eur Respir J*. 51(2):1701809.
- Shoemark A, Dixon M, Corrin B, Dewar A. 2012. Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J Clin Pathol*. 65(3):267-271.
- Shoemark A, Frost E, Dixon M, *et al.* 2017. Accuracy of Immunofluorescence in the Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 196(1):94-101.

- Shoemark A. 2017. Applications of emerging transmission electron microscopy technology in PCD research and diagnosis. *Ultrastruct Pathol.* Nov-Dec;41(6):408-414.
- Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. 2020. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci.* 77(11):2029-2048.
- Sisson JH, Stoner JA, Ammons BA, Wyatt TA. 2003. All-digital image capture and whole-field analysis of ciliary beat frequency. *J Microsc.* Aug;211(Pt 2):103-111.
- Sloboda RD and Rosenbaum JL. 2007. Making sense of cilia and flagella. *J Cell Biol.* Nov 19; 179(4):575–582.
- Song L, Dentler WL. 2001. Flagellar protein dynamics in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem.* Aug 10;276(32):29754-63.
- Stannard W, Rutman A, Wallis C, O'Callaghan C. 2004. Central microtubular agenesis causing primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 169(5):634-637.
- Stockinger L, Sellner W, Ellinger A, Höfler H. 1989. Pathophysiology of the ciliated epithelium of the respiratory mucosa in humans. Disorders of ciliogenesis. *Exp Lung Res.* Dec;15(6):925-41.
- Suarez-Cuartin G, Chalmers JD, Sibila O. 2016. Diagnostic challenges of bronchiectasis. *Respir Med.* Jul;116:70-7.
- Summers KE, Gibbons IR. 1971. Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 68:3092–3096.
- Tarkar A, Loges NT, Slagle CE *et al.* 2013. DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility. *Nat Genet.* Sep;45(9):995-1003.
- Theegarten D, Ebsen M. 2011. Ultrastructural pathology of primary ciliary dyskinesia: report about 125 cases in Germany. *Diagn Pathol.* Nov 24;6:115.
- Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. 2015. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol.* 77:379-406.
- Torkkeli T, Nuutinen J, Rautiainen M. 1997. Clinical relevance of tubulus anomalies and compound cilia. *Acta Otolaryngol Suppl.* 529:140-143.
- Vanaken GJ, Bassinet L, Boon M, *et al.* 2017. Infertility in an adult cohort with primary ciliary dyskinesia: phenotype-gene. *Eur Respir J.* 50(5):1700314.

- Verhage HG, Bareither ML, Jaffe RC, Akbar M. 1979. Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat.* Dec;156(4):505-21.
- Verra F, Fleury-Feith J, Boucherat M, *et al.* 1993. Do nasal ciliary changes reflect bronchial changes? An ultrastructural study. *Am Rev Respir Dis.* 147(4):908-913.
- Vladar EK, Lee YL, Stearns T, Axelrod JD. 2015. Observing planar cell polarity in multiciliated mouse airway epithelial cells. *Methods Cell Biol.* 127:37-54
- Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, *et al.* 2014. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet.* 46(6):646–51.
- Wallmeier J, Boon M, Mutairi DA, *et al.* 2015. Mutations in CCNO and MCIDAS lead to a mucociliary clearance disorder due to reduced generation of multiple motile cilia. *Mol Cell Pediatr.* 2(Suppl 1):A15.
- Wallmeier J, Frank D, Shoemark A, *et al.* 2019. De Novo Mutations in FOXJ1 Result in a Motile Ciliopathy with Hydrocephalus and Randomization of Left/Right Body Asymmetry. *Am J Hum Genet.* 105(5):1030-1039.
- Wan KY, Jékely G. 2020. On the unity and diversity of cilia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 375(1792):20190148.
- Wang B, Zhang X, Jiang W, *et al.* 2020. Double lung transplantation for end-stage Kartagener syndrome: a case report and literature review. *J Thorac Dis.* 12(4):1588-1594.
- Werner C, Onnebrink JG, Omran H. 2015. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Cilia.* Jan 22;4(1):2.
- Whitfield M, Thomas L, Bequignon E, *et al.* 2019. Mutations in DNAH17, Encoding a Sperm-Specific Axonemal Outer Dynein Arm Heavy Chain, Cause Isolated Male Infertility Due to Asthenozoospermia. *Am J Hum Genet.* Jul 3;105(1):198-212.
- Wirschell M, Olbrich H, Werner C, *et al.* 2013. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nat Genet.* 45(3):262-268.
- Wodehouse T, Kharitonov SA, Mackay IS, *et al.* 2003. Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 21(1):43-47.
- Wood CR, Huang K, Diener DR, Rosenbaum JL. 2013. The cilium secretes bioactive ectosomes. *Curr Biol.* May 20;23(10):906-11.

- Woodworth BA, Smythe N, Spicer SS, Schulte BA, Schlosser RJ. 2005. Presence of surfactant lamellar bodies in normal and diseased sinus mucosa. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 67(4):199-202.
- Yang J, Gao J, Adamian M, *et al.* 2005. The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol Cell Biol.* May;25(10):4129-37.
- Yuksel H, Turkeli A. 2017. Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood. *Tissue Barriers.* Oct 2;5(4):e1367458.
- Ziętkiewicz E, Bukowy-Bieryłło Z, Voelkel K, *et al.* 2012. Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients. *PLoS One.* 7(3):e33667.

Anexo 1

Valencia a 25 de mayo de 2021

El **Dr. Máximo Vento Torres**, Presidente de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: “*CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE BIOPSIAS NASALES EN PACIENTES CON DISCINESIA CILIAR PRIMARIA.*” será realizado en el HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC LA FE, siendo el Director de la Tesis y Tutor del Hospital el **Dr. FRANCISCO JOSÉ VERA SEMPERE**, del servicio/unidad/grupo de investigación de **ANATOMÍA PATOLÓGICA**, y el DOCTORANDO D./ Dña. **ROSANA BLANCO MÁÑEZ**. contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad y aceptación para su realización.

Máximo Vento Torres
Presidente de la Comisión de Investigación



CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: "Caracterización ultraestructural de biopsias nasales en pacientes con disquinesia ciliar primaria"

Yo, _____ (nombre y apellidos).

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: Rosana Blanco (nombre del Investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del Investigador

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mí salud: **Sí** **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente): **Sí** **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

Anexo 2

Article

Axonemal Symmetry Break, a New Ultrastructural Diagnostic Tool for Primary Ciliary Dyskinesia?

Rosana Blanco-Máñez ^{1,*}, Miguel Armengot-Carceller ^{2,3,4,5}, Teresa Jaijo ^{2,6,7} and Francisco Vera-Sempere ⁸¹ Pathology Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain² Molecular, Cellular and Genomic Biomedicine Group, IIS La Fe, 46020 Valencia, Spain; miguel.armengot@gmail.com (M.A.-C.); tjaijo@gmail.com (T.J.)³ Surgery Department, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain⁴ CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Carlos III Health Institute, Ministerio de Ciencia e Innovación, 28029 Madrid, Spain⁵ ENT Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain⁶ Genetics Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain⁷ CIBER of Rare Diseases (CIBERES), Carlos III Health Institute, Ministerio de Ciencia e Innovación, 28029 Madrid, Spain⁸ Pathology Department, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; fco.jose.vera@uv.es

* Correspondence: blanco_rosman@gva.es

Abstract: Diagnosis testing for primary ciliary dyskinesia (PCD) requires a combination of investigations that includes study of ciliary beat pattern by high-speed video-microscopy, genetic testing and assessment of the ciliary ultrastructure by transmission electron microscopy (TEM). Historically, TEM was considered to be the “gold standard” for the diagnosis of PCD. However, with the advances in molecular genetic techniques, an increasing number of PCD variants show normal ultrastructure and cannot be diagnosed by TEM. During ultrastructural assessment of ciliary biopsies of patients with suspicion of PCD, we observed an axonemal defect not previously described that affects peripheral doublets tilting. To further characterize this defect of unknown significance, we studied the ciliary axonemes by TEM from both PCD-confirmed patients and patients with other sino-pulmonary diseases. We detected peripheral doublets tilting in all the PCD patients, without any significant difference in the distribution of ciliary beat pattern or mutated gene. This defect was also present in those patients with normal ultrastructure PCD subtypes. We believe that the performance of axonemal asymmetry analysis would be helpful to enhance diagnosis of PCD.

Keywords: primary ciliary dyskinesia; diagnosis; ciliary axoneme; transmission electron microscopy

Citation: Blanco-Máñez, R.; Armengot-Carceller, M.; Jaijo, T.; Vera-Sempere, F. Axonemal Symmetry Break, a New Ultrastructural Diagnostic Tool for Primary Ciliary Dyskinesia? *Diagnostics* **2022**, *12*, 129. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12010129>

Academic Editor: Bruno Märkl

Received: 28 November 2021

Accepted: 3 January 2022

Published: 6 January 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disease of motile cilia with an estimated prevalence of 1 per 20,000–40,000 births (ORPHA244). It is associated with abnormal ciliary function and/or structure, resulting in a defective mucociliary clearance [1]. PCD is characterized by chronic upper and lower respiratory tract disease with daily wet cough and rhinorrhea, chronic rhinosinusitis, chronic otitis media and development of bronchiectasis, fertility problems secondary to sperm immotility or impaired ciliary function in the oviduct, and organ laterality defects [2,3].

A precise diagnosis of PCD may be challenging because motile cilia are highly complex structures composed of approximately 250 proteins. A mutational change in any of these proteins leads to different clinical and ciliary phenotypes [4]. Currently, the diagnosis of PCD is based on the presence of a typical clinical phenotype and a combination of technically demanding investigations, including high-speed video-

microscopy analysis (HVMA), genetic testing and assessment of the ciliary ultrastructure by transmission electron microscopy (TEM) [5,6].

Since the first ultrastructural description was published in 1976 by Björn Afzelius [7], the ciliary ultrastructural analysis by transmission electron microscopy has played a key role in the PCD diagnostic workflow. However, approximately 30% of PCD cases display apparently normal ciliary ultrastructure [8–10].

Concurrently, developments in genomics and molecular medicine are rapidly increasing gene discovery, and nearly 40 genes have been reported to cause PCD [11]. Therefore, a new diagnostic characterization of these patients, including motility and ultrastructural typification, will be necessary.

During the ultrastructural diagnostic evaluation of nasal biopsies of patients suspected of PCD, we observed an axonemal defect not previously described. This defect affected the peripheral doublets orientation of PCD patients, and we believe it could be a new useful tool in ultrastructural diagnosis. We have termed it “axonemal asymmetry”. We proceeded to formally study this defect to test the hypothesis that its presence was predictive of the PCD diagnosis. To determine if axonemal asymmetry was specific to PCD patients, we also studied nasal biopsies from patients with a clinical suspicion for PCD but excluded from the diagnosis, patients with cystic fibrosis, immunodeficiency or idiopathic bronchiectasis.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Aspects

This was a retrospective, observational, single-center study. A total of 20 patients with a confirmed PCD diagnostic and a control group of 20 patients with a chronic respiratory disease were included in this study. We reviewed the clinical characteristics and diagnostic tests of all the participants.

This study was performed in the Pathology Department of La Fe Polytechnic and University Hospital of Valencia, Spain. Patient recruitment was carried out in the Otorhinolaryngology Department of the same center.

Written informed consent was obtained from all participants or their legal guardians. This study was approved by the Ethics Local Committee of La Fe Hospital (protocol 2021-278-1, 12 May 2021).

2.2. Preparation of Nasal Brushings for Analysis by Transmission Electron Microscopy

Samples of nasal curettage were fixed in 2.5% phosphate-buffered glutaraldehyde pH 7.3 for 1 day at 4 °C, washed later twice in the same buffer. The specimens were postfixed in buffered 1% osmium tetroxide for 2 h, washed, dehydrated through a graded series of acetone, cleared in propylene-oxide and embedded in EMbed 812 resin (EMS, Harrisburg, PA, USA). Semithin sections 200 nm thick, cut with glass knives on a Leica Ultramicrotome EM UC6 and stained with 0.1% toluidine blue, were examined with the light microscope in order to make an overall assessment of the presence of ciliary structures. Ultrathin sections (70 nm thickness) from selected blocks were cut with a diamond knife (DiATOME, Nidau, Switzerland) using the same ultramicrotome, retrieved onto copper grids, double-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined at 80 kV with a Hitachi HT7700 transmission electron microscope (Hitachi, Japan).

2.3. Diagnostic Assessment of the Ciliary Axonemes

At least 50 cross-sections of cilia from each patient were evaluated to establish the presence of ultrastructural abnormalities. A detailed ultrastructural analysis was undertaken, and all the diagnostic abnormalities were recorded. Results were expressed as a percentage of abnormal axonemes among the total number of analyzed cross-sections. The axonemal defects were classified as a Class 1 defect (hallmark diagnostic defect) or

Class 2 defect (indicating a PCD diagnosis with other supporting evidence) in agreement with the BEAT PCD Criteria [12]. For the asymmetry assessment, a preserved axonemal structure is required; hence, patients with microtubular disorganization defects were excluded (Table 1).

Table 1. Summary of Class 1 and Class 2 defects for the ultrastructural diagnosis of PCD (Modified BEAT PCD Criteria).

Class 1 Defects ¹	Class 2 Defects ¹
Outer dynein arm defect (>50% cross sections)	Outer dynein arm absence from 25–50% cross sections
Outer and inner dynein arm defect (>50% cross sections)	Combined inner and outer dynein arm absence from 25–50% cross section
	Central complex defect

¹ Microtubular disorganization defects are excluded.

2.4. Axonemal Asymmetry Assessment

We define the axonemal circumference—or oval—as the line joining the center of all the A-tubules (Figure 1b). In ciliary sections with preserved axonemal structure, the doublets are aligned with their axonemal circumference, and few of them show a slight inclination. These ciliary sections show axonemal symmetry.

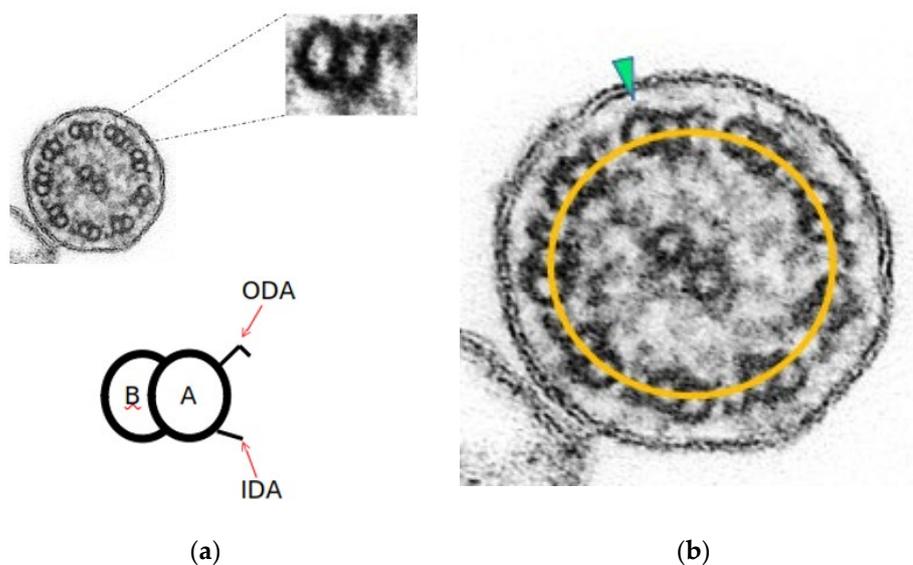


Figure 1. Axonemal symmetry. (a) Each microtubule doublet of the ciliary axoneme contains an incomplete B-tubule and a complete A-tubule, with the outer (ODA) and inner (IDA) motor protein dynein arms. (b) Ciliary section of (a) with preserved axonemal symmetry: both microtubules of each peripheral doublets are aligned with the axonemal circumference (yellow line), and just one doublet is tilted (green arrowhead) (Original magnification $\times 530,000$).

In this study, and through a repeated observation method of ciliary sections of non-PCD patients, the axonemal symmetry break was established in those ciliary sections with more than 3 rotated peripheral doublets. To identify this misalignment, the B-tubule should be outside the axonemal circumference (Figure 2).

To assess this symmetry break as an axonemal ultrastructural defect in PCD patients, we retrospectively studied the ciliary biopsies of the PCD patients and the control group of patients excluded from the diagnosis. Axonemal asymmetry (AA) results were expressed as a percentage of axonemes with symmetry breaks among the total number of analyzed cross-sections.

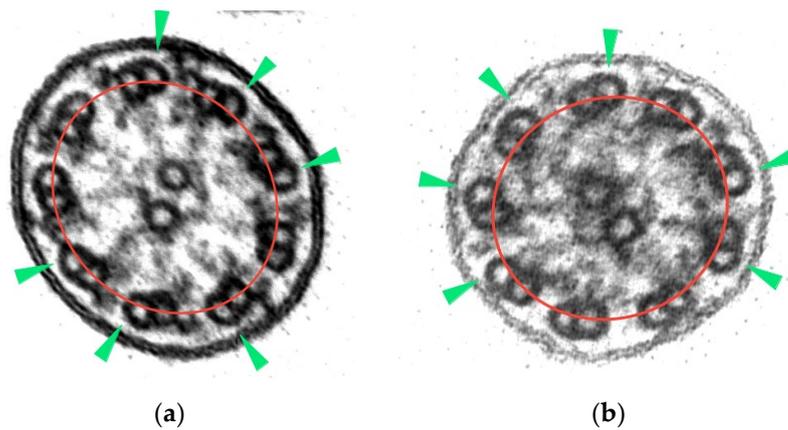


Figure 2. Axonemal symmetry break: (a) rotating doublets of ciliary section without apparent axonemal defects; (b) rotating doublets of ciliary section with absence of ODAs. B-tubules (green arrowheads) are outside the axonemal circumference (red line) (micrographs, original magnification $\times 530,000$).

2.5. Statistical Analysis

The data were summarized using the mean (SD) and median (1st and 3rd quartiles) in the case of numerical variables and using the absolute frequency (%) in the case of qualitative variables.

3. Results

3.1. Symmetry Break Analysis

The axonemal asymmetry in PCD patients ranged from 38 to 68% (Table 2). Symmetry breaking was more evident in those ciliary sections with the absence of outer dynein arms (Figure 3b,c), although it was also observed in normal-appearing ultrastructure sections (Figure 3f).

Table 2. Summary of diagnostic tests and CCI of PCD patients according to axonemal asymmetry.

ID	CCI (%)	Genetic Defect	HSVA	TEM Defect	AA (%)
23	40	Not identified	Dyskinetic	No	38
62	60	DNAH9	Dyskinetic	C1	38
74	90	DNAH5	Dyskinetic	C1	40
83	50	DNAH5	Immotile	C1	40
27	40	DNAH5	Immotile	C1	42
44	60	TTC25	Immotile	C1	42
47	70	DNAH5	Immotile	C1	44
55	50	DNAH9	Immotile	No	44
4	40	DNAAF1	Immotile	C1	46
51	60	Not identified	Dyskinetic	No	46
14	60	RSPH1	Dyskinetic	C2	48
32	70	DYX1C1	Immotile	C1	48
80	60	Not identified	Dyskinetic	No	48
91	60	RSPH1	Dyskinetic	No	48
6	50	RSPH1	Normal	C2	50
81	70	DNAH11	Immotile	No	50
22	40	DNAH5	Immotile	C1	56
16	30	Not identified	Immotile	C1	58
92	60	RSPH1	Dyskinetic	No	66
21	60	DNAH5	Immotile	C1	68

Definition of abbreviations: ID = participant identification; CCI = compatible clinical index; HSVA = high-speed video-microscopy analysis; TEM = transmission electron microscopy; C1 = Class 1 defect; C2 = Class 2 defect; AA = axonemal asymmetry.

Hence, all the PCD patients in our study showed an AA beyond 38%, regardless of the mutated gene, CCI, ciliary motility or TEM results. We also observed this symmetry break in the ciliary axonemes of the patients with normal ultrastructure (7/20; 35%), even in those with a mutation in *DNAH11* (patient 81) or *RSPH1* (patients 91 and 92), two specific forms of PCD with apparently normal ultrastructure. All the patients showed ultrastructural defects, in diagnostic and non-diagnostic proportions (Table S1), with the exception of patients 91 and 92, in which the AA was the only detected ultrastructural defect.

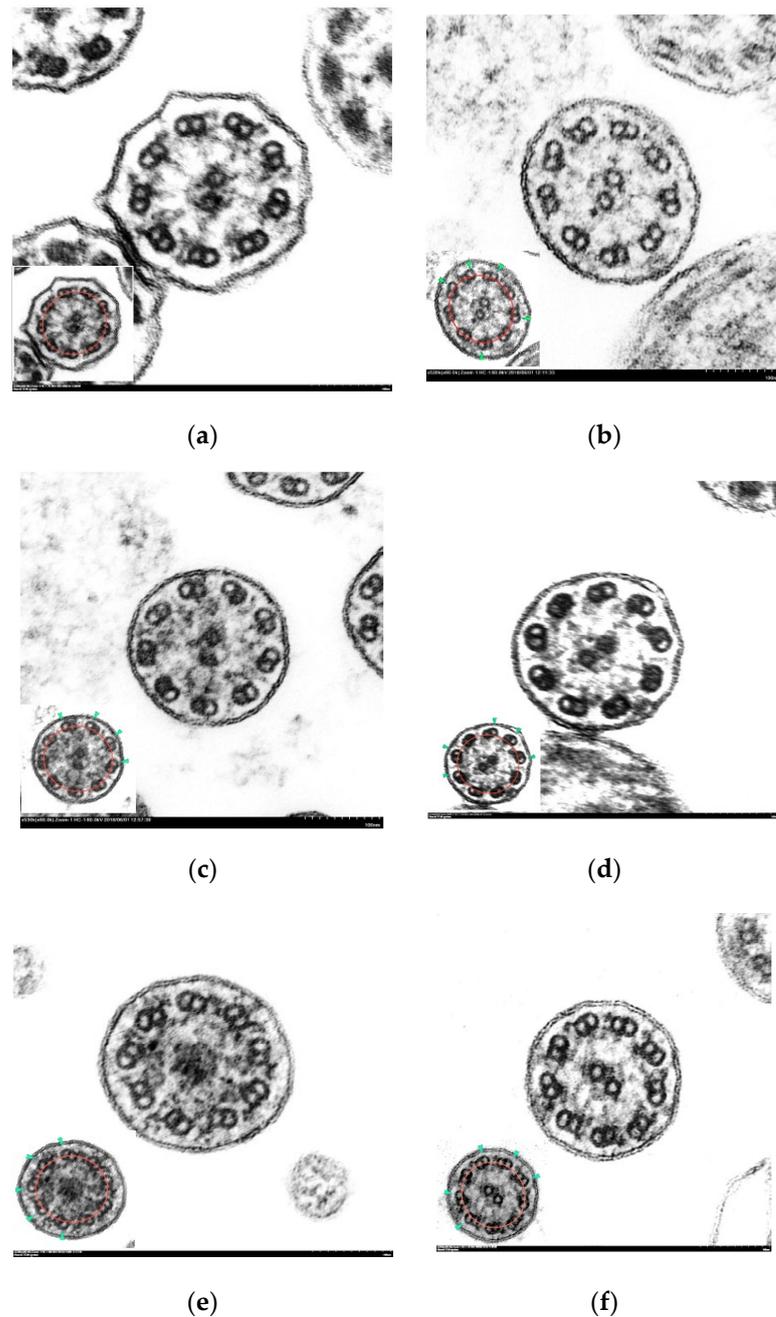


Figure 3. Electron micrographs of transverse sections of cilia with axonemal symmetry break. Inset: ciliary sections with marked axonemal circumference (red line) and tilted doublets (green arrowhead). (a) Normal cilium showing conserved ultrastructure and axonemal symmetry; (b–f) ciliary axonemes with more than 3 tilted peripheral doublets: (b) partial absence of outer dynein arms (short arms); (c) absence of inner and outer dynein arms; (d) complete absence of outer dynein

arms; (e) central complex defect: absence of central pair; (f) ciliary axoneme with normal ultrastructure and axonemal asymmetry. (Micrographs, original magnification $\times 530,000$).

The data obtained from the control group (Table 3) revealed a minimal axonemal asymmetry proportion of 2%, with a maximal value of 63% in participant 59. Their demographic and clinical characteristics are summarized in Table S2.

Table 3. Summary of diagnostic tests and CCI of control group according to axonemal asymmetry.

ID	CCI (%)	Genetic Defect	HSVA	TEM Defect	AA (%)
78	30	*	N	No	2
66	40	*	N	No	8
2	20	*	N	No	10
69	50	*	N	No	12
73	30	*	N	No	12
43	20	*	N	No	14
68	50	Not identified	N	No	14
70	40	*	N	No	14
99	30	*	N	No	14
28	30	*	N	No	18
36	20	*	N	No	18
67	40	*	N	No	18
85	40	*	N	No	18
86	40	*	N	No	18
58	40	VUS RSPH4	N	No	22
34	20	*	N	No	24
40	40	*	N	No	34
98	30	*	N	No	36
25	40	*	N	No	44
59	60	VUS CCDC103	N	No	63

Definition of abbreviations: ID = participant identification; CCI = compatible clinical index; VUS = variant of unknown significance; * = not tested; HSVA = high-speed video-microscopy analysis; TEM = transmission electron microscopy; AA = axonemal asymmetry.

Participants 25 and 59 showed AA values within the range observed in PCD patients. Moreover, their detailed ultrastructural analysis revealed non-diagnostic ODA defect rates (16% and 22%, respectively), and higher ODA defect values for the control group (Table S3).

3.2. Statistical analysis

The genetic, HSVA and TEM information of PCD patients are summarized in Table S4, and their demographic and clinical characteristics in Table S5.

Our data did not show any significant difference in the distribution of ciliary phenotypes and axonemal asymmetry (Tables 4 and 5).

Table 4. Distribution of ultrastructural defects with demographic characteristics, ICC, HSVA and axonemal asymmetry.

	Class 1 Defect (n = 19)	Class 2 Defect (n = 5)	No Defect (n = 11)
Age	18.53 (15.9)	22 (21.25)	30.18 (23.17)
Median	15 (8.5, 20)	13 (6, 33)	25 (8.5, 50.5)
Sex			
Female	9 (47.37%)	2 (40%)	7 (63.64%)

Male	10 (52.63%)	3 (60%)	4 (36.36%)
CCI	57.37 (15.93)	56 (15.17)	50 (16.12)
Median	60 (45, 70)	50 (50, 60)	50 (45, 60)
HSVA			
Dyskinetic	5 (26.32%)	2 (50%)	6 (54.55%)
Immotile	13 (68.42%)	1 (25%)	5 (45.45%)
Normal	1 (5.26%)	1 (25%)	0 (0%)
AA	48.27 (9.16)	49.5 (6.61)	50.29 (9.48)
Median	46 (42, 52)	49 (46.5, 52)	48 (47, 54)

Mean (SD)/n (%). Median (1st, 3rd Q.). Definition of abbreviations: CCI = compatible clinical index; HSVA = high-speed video-microscopy analysis; AA = axonemal asymmetry.

Table 5. Distribution of HSVA with demographic characteristics, ICC, ultrastructural defects and axonemal asymmetry.

	Dyskinetic (n = 13)	Immotile (n = 19)	Normal (n = 2)
Age	29.23 (23.34)	16.53 (13.55)	23 (24.04)
Median	20 (10, 54)	14 (6, 20)	23 (14.5, 31.5)
Sex			
Female	5 (38.46%)	12 (63.16%)	1 (50%)
Male	8 (61.54%)	7 (36.84%)	1 (50%)
CCI	55.38 (21.06)	54.74 (13.07)	50 (0)
Median	60 (40, 60)	50 (45, 70)	50 (50, 50)
TEM defect			
Class 1	5 (38.46%)	13 (68.42%)	1 (50%)
Class 2	2 (15.38%)	1 (5.26%)	1 (50%)
No defect	6 (46.15%)	5 (26.32%)	0 (0%)
AA	48.55 (10.12)	49.5 (8.7)	49 (1.41)

Mean (SD)/n (%). Median (1st, 3rd Q.). Definition of abbreviations: CCI = compatible clinical index; TEM = transmission electron microscopy; AA = axonemal asymmetry.

4. Discussion

This study first reports the observation that axonemal asymmetry is mainly observed in axonemes from patients with PCD and is seen across different PCD phenotypes and genotypes.

Virtually all the PCD patients in our cohort showed impairment of ciliary beat pattern, and all of them showed axonemal symmetry break. In contrast, the control group patients, with a conserved axonemal symmetry, had normal ciliary motility. The exception to this statement was two patients in the control group with raised axonemal asymmetry and moderate absence of outer dynein arms.

We propose several hypotheses for the link between axonemal asymmetry and dysfunctional cilia. It could be pointed to the following subjects: the basal body architecture, some axonemal components, as ODA or nexin link dynein regulator complex proteins (N-DRC) or acquired ciliary defects. Basal bodies give rise to cilia in the last stage of the ciliogenesis process. They provide a ninefold symmetric template on which the ninefold symmetry axonemal structure of the cilium can be built. They are modified centrioles, composed of nine triplet microtubule “blades” arranged in a barrel shape [13]. Nine peripheral doublet microtubules of the ciliary axoneme elongate from A- and B-tubules of the triplet microtubules of the basal body [14], and at the proximal cilium region, peripheral doublets have the characteristic angled-out appearance of basal body triplets. This geometry changes through the axoneme, reducing the doublets angulation but keeping the rotational symmetry of the basal body [15]. Consequently, peripheral

doublets show a slight non-pathologic tilt, evidenced in 1984 by Rautiainen et al. in a study of ciliary serial sections [16]. We have termed this conformation as “axonemal symmetry”. Our observations revealed more than three clearly tilted doublets in a significant number of ciliary sections in PCD patients’ samples. A basal body abnormal template could lead to an asymmetric axoneme.

On the other hand, it is estimated that the axoneme must experience considerable distortion during the beat cycle [17]. The N-DRC provides some resistance to microtubule sliding and maintains alignment between outer doublet microtubules during ciliary bending [18]. Some genetic defects encoding the N-DRC have been reported, such as *CCDC164*, *CCDC65* and *GAS8*, and the ultrastructural analysis occasionally shows not well aligned peripheral doublets [19–21]. Nonetheless, the main genetic defect in our cohort affects ODA structure, and the cases that revealed the higher axonemal asymmetry values had mutations on *RSPH1* or genes encoding ODA components. It is also important to note that participants 25 and 59, with axonemal asymmetry values in the PCD patients’ range, were the only ones with minor ODA defects. Indeed, each stalk of heavy chains of ODA attached to an A-tubule seems to connect to a consecutive, specific protofilament on the neighboring B-tubule [22]. Considering all the presented data as a whole, peripheral doublets tilting could be due to a novel structural defect localized at ODAs or N-DRC complexes. Further studies would be necessary to elucidate the molecular basis of this finding.

A third explanation of the axonemal symmetry break would be an ultrastructural change secondary to chronic respiratory disease of these patients. Altered ciliogenesis following recurrent infections can lead to ciliary abnormalities—swollen cilia, compound cilia, disorganized axonemes, addition or deletion of peripheral microtubules, or loss of one or both of the central pair of microtubules—but these changes are present in less than 5–10% of the cilia examined and in a localized area [23–25]. Thus, the characteristic identifying axonemal asymmetry is shown not to represent secondary ciliary defect but rather to be a distinctive defect only present in PCD patients and widespread in distribution within the ciliary samples. To establish this novel axonemal defect as a primary abnormality, we might achieve the universal and permanent criteria, i.e., to demonstrate the presence of the same abnormality in cilia collected from at least one additional site and at least one additional point in time [26].

Although some genetic defects have been linked to specific ultrastructural ciliary defects, the relationship between clinical findings, genotype and ciliary phenotype is still not clear [27,28]. We did not find any significant difference in the distribution of axonemal asymmetry, mutated gene, clinical findings or ciliary beat pattern in our cohort, but the small number of patients does not allow speculating about a potential correlation.

As previously reported [29], our cohort of PCD patients showed apparently normal ultrastructure in 35% of them, and all of them showed an axonemal symmetry break above 38%. Furthermore, we observed more evident AA in axonemes with an ODA defect, and some of the DCP patients with a higher proportion of ODA defect also showed higher scores of AA. The results of the detailed ultrastructural study that we additionally performed in the ciliary biopsies presumably pointed out the absence of correlation between these two variables. Nevertheless, it also suggested that the AA could indicate the diagnosis in PCD patients with virtually normal axonemal ultrastructure. In this way, the quantitative assessment of the axonemal asymmetry as a new diagnostic tool would enhance the diagnostic yield of TEM.

In this study, we have focused on TEM as a diagnostic procedure of PCD, and we believe that the modified peripheral doublets arrangement detected in our study provides another point of view of the underlying pathogenesis of this condition. Further investigations will be required to validate our findings.

Our study has two main limitations: the small sample size and the potential for observer bias because the axonemal asymmetry analysis is largely based on a subjective description.

In summary, we report a not previously described ciliary ultrastructural defect that could provide a novel diagnostic approach of PCD.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12010129/s1, Table S1: Detailed ultrastructural axonemal defects in PCD patients with their axonemal asymmetry proportion, Table S2: Demographic and clinical characteristics of control group, Table S3: Detailed ultrastructural axonemal defects in control group with their axonemal asymmetry proportion, Table S4: Genetics, HSVA and TEM information of PCD patients, Table S5: Demographic and clinical characteristics of PCD patients.

Author Contributions: Conceptualization, R.B.-M.; funding acquisition, M.A.-C.; investigation, R.B.-M., T.J. and M.A.-C.; validation, M.A.-C. and F.V.-S.; writing—original draft, R.B.-M.; writing—review & editing, T.J., M.A.-C. and F.V.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto de Salud Carlos III, grant No. FIS PI19/00949. The funding entities did not contribute to the study design or the collection, analysis and interpretation of data or to the writing of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Local Committee of La Fe Hospital (protocol 2021-278-1, 12 May 2021).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Knowles, M.R.; Zariwala, M.; Leigh, M. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clin. Chest Med.* **2016**, *37*, 449–461.
- Lobo, J.; Zariwala, M.A.; Noone, P.G. Primary ciliary dyskinesia. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *36*, 169–179.
- Shapiro, A.J.; Davis, S.D.; Ferkol, T.; Dell, S.D.; Rosenfeld, M.; Olivier, K.N.; Sagel, S.D.; Milla, C.; Zariwala, M.A.; Wolf, W.; et al. Laterality defects other than situs inversus totalis in primary ciliary dyskinesia: Insights into situs ambiguus and heterotaxy. *Chest* **2014**, *146*, 1176–1186.
- Wallmeier, J.; Nielsen, K.G.; Kuehni, C.E.; Lucas, J.S.; Leigh, M.W.; Zariwala, M.A.; Omran, H. Motile ciliopathies. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2020**, *6*, 77.
- Lucas, J.S.; Barbato, A.; Collins, S.A.; Goutaki, M.; Behan, L.; Caudri, D.; Dell, S.; Eber, E.; Escudier, E.; Hirst, R.A.; et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur. Respir. J.* **2017**, *49*, 1601090.
- Shapiro, A.J.; Davis, S.D.; Polineni, D.; Manion, M.; Rosenfeld, M.; Dell, S.D.; Chilvers, M.A.; Ferkol, T.W.; Zariwala, M.A.; Sagel, S.D.; et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *197*, e24–e39.
- Afzelius, B.A. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **1976**, *193*, 317–319.
- Shapiro, A.J.; Leigh, M.W. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure. *Ultrastruct. Pathol.* **2017**, *41*, 373–385.
- Shoemark, A.; Dixon, M.; Corrin, B.; Dewar, A. Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J. Clin. Pathol.* **2012**, *65*, 267–271.
- Knowles, M.R.; Leigh, M.W.; Carson, J.L.; Davis, S.D.; Dell, S.; Ferkol, T.W.; Olivier, K.N.; Sagel, S.D.; Rosenfeld, M.; A Burns, K.; et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax* **2012**, *67*, 433–441.
- Lucas, J.S.; Davis, S.D.; Omran, H.; Shoemark, A. Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 202–216.
- Shoemark, A.; Boon, M.; Brochhausen, C.; Bukowy-Bieryllo, Z.; De Santi, M.M.; Goggin, P.; Griffin, P.; Hegele, R.G.; Hirst, R.A.; Leigh, M.W.; et al. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *Eur. Respir. J.* **2020**, *55*, 1900725.
- Marshall, W.F. Basal bodies platforms for building cilia. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2008**, *85*, 1–22.
- Hagiwara, H.; Ohwada, N.; Takata, K. Cell biology of normal and abnormal ciliogenesis in the ciliated epithelium. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *234*, 101–141.
- Greenan, G.A.; Vale, R.D.; Agard, D.A. Electron cryotomography of intact motile cilia defines the basal body to axoneme transition. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e201907060.
- Rautiainen, M.; Collan, Y.; Nuutinen, J.; Kärjä, J. Ultrastructure of human respiratory cilia: A study based on serial sections. *Ultrastruct. Pathol.* **1984**, *6*, 331–339.

17. Lindemann, C.B.; Mitchell, D.R. Evidence for axonemal distortion during the flagellar beat of *Chlamydomonas*. *Cell Motil. Cytoskelet.* **2007**, *64*, 580–589.
18. Bower, R.; Tritschler, D.; VanderWaal, K.; Perrone, C.A.; Mueller, J.; Fox, L.; Sale, W.S.; Porter, M.E. The N-DRC forms a conserved biochemical complex that maintains outer doublet alignment and limits microtubule sliding in motile axonemes. *Mol. Biol. Cell* **2013**, *24*, 1134–1152.
19. Merveille, A.C.; Davis, E.E.; Becker-Heck, A.; Legendre, M.; Amirav, I.; Bataille, G.; Belmont, J.; Beydon, N.; Billen, F.; Clément, A.; et al. CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 72–78.
20. Austin-Tse, C.; Halbritter, J.; Zariwala, M.A.; Gilberti, R.M.; Gee, H.Y.; Hellman, N.; Pathak, N.; Liu, Y.; Panizzi, J.R.; Patel-King, R.S.; et al. Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* **2013**, *93*, 672–686.
21. Olbrich, H.; Cremers, C.; Loges, N.T.; Werner, C.; Nielsen, K.G.; Marthin, J.K.; Philipsen, M.; Wallmeier, J.; Pennekamp, P.; Menchen, T.; et al. Loss-of-Function GAS8 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia and Disrupt the Nexin-Dynein Regulatory Complex. *Am. J. Hum. Genet.* **2015**, *97*, 546–554.
22. Bui, K.H.; Sakakibara, H.; Movassagh, T.; Oiwa, K.; Ishikawa, T. Asymmetry of inner dynein arms and inter-doublet links in *Chlamydomonas* flagella. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 437–446.
23. Demarco, R.C.; Tamashiro, E.; Rossato, M.; Ferreira, M.D.; Valera, F.C.; Anselmo-Lima, W.T. Ciliary ultrastructure in patients with chronic rhinosinusitis and primary ciliary dyskinesia. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2013**, *270*, 2065–2070.
24. Chilvers, M.A.; Rutman, A.; O’Callaghan, C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax* **2003**, *58*, 333–338.
25. Rossman, C.M.; Lee, R.M.; Forrest, J.B.; Newhouse, M.T. 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*, 161–167.
26. Mierau, G.W.; Agostini, R.; Beals, T.F.; Carlén, B.; Dardick, I.; Henderson, D.W.; Pysker, T.J.; Weeks, D.A.; Yowell, R.L. The role of electron microscopy in evaluating ciliary dysfunction: Report of a workshop. *Ultrastruct. Pathol.* **1992**, *16*, 245–254.
27. Davis, S.D.; Rosenfeld, M.; Lee, H.S.; Ferkol, T.W.; Sagel, S.D.; Dell, S.D.; Milla, C.; Pittman, J.E.; Shapiro, A.J.; Sullivan, K.M.; et al. Primary Ciliary Dyskinesia: Longitudinal Study of Lung Disease by Ultrastructure Defect and Genotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **2019**, *199*, 190–198.
28. Blanchon, S.; Legendre, M.; Bottier, M.; Tamalet, A.; Montantin, G.; Collot, N.; Faucon, C.; Dastot, F.; Copin, B.; Clement, A.; et al. Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. *J. Med. Genet.* **2020**, *57*, 237–244.
29. Kouis, P.; Yiallourous, P.K.; Middleton, N.; Evans, J.S.; Kyriacou, K.; Papatheodorou, S.I. Prevalence of primary ciliary dyskinesia in consecutive referrals of suspect cases and the transmission electron microscopy detection rate: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Res.* **2017**, *81*, 398–405.

Article

Axonemal Symmetry Break, a New Ultrastructural Diagnostic Tool for Primary Ciliary Dyskinesia?

Rosana Blanco-Máñez ^{1,*}, Miguel Armengot-Carceller ^{2,3,4,5}, Teresa Jaijo ^{2,6,7} and Francisco Vera-Sempere ⁸

¹ Pathology Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain

² Molecular, Cellular and Genomic Biomedicine Group, IIS La Fe, 46020 Valencia, Spain; miguel.armengot@gmail.com (M.A.-C.); tjaijo@gmail.com (T.J.)

³ Surgery Department, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

⁴ CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Carlos III Health Institute, Ministerio de Ciencia e Innovación, 28029 Madrid, Spain

⁵ ENT Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain

⁶ Genetics Department, La Fe Polytechnic and University Hospital, 46020 Valencia, Spain

⁷ CIBER of Rare Diseases (CIBERES), Carlos III Health Institute, Ministerio de Ciencia e Innovación, 28029 Madrid, Spain

⁸ Pathology Department, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; fco.jose.vera@uv.es

* Correspondence: blanco_rosman@gva.es

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1. Detailed ultrastructural axonemal defects in PCD patients with their axonemal asymmetry proportion.

ID	Detailed TEM defect (%) ¹	AA (%)
23	CC (10)	38
62	ODA (74)	38
74	ODA (82)	40
83	ODA (98)	40
27	ODA (96)	42
44	ODA (100)	42
47	ODA (96)	44
55	ODA (16)	44
4	ODA (98)+ IDA (62)	46
51	ODA (10)	46
14	CC (32)	48
32	ODA (98)	48
80	ODA (6)	48
91	No defect	48
6	CC (20)	50
81	ODA (4)	50
22	ODA (100)	56
16	ODA (100)	58
92	No defect	66
21	ODA (100)	68

¹ Expressed as a percentage of affected ciliary sections.

Definition of abbreviations: ID= participant identification; TEM= Transmission Electron microscopy; CC= Central complex defect; ODA= Outer dynein arm defect; IDA= Inner dynein arm defect; AA= Axonemal asymmetry.

Table S2. Demographic and clinical characteristics of control group (n=20).

	n	%
Male/Female	11/9	55/45
Age (years)	16,4(5-52)	
Clinical characteristics		
NRD	6	30
Rhinorrhea	13	65
Cronic wet cough	15	75
Pneumonia	10	50
Bronchiectasis	7	35
Laterality defects	2	10
Fertility problems ¹	1	20

Definition of abbreviations: NRD= Neonatal respiratory distress. ¹ In patients older than 18 years.

Table S3. Detailed ultrastructural axonemal defects in control group with their axonemal asymmetry proportion.

ID	Detailed TEM defect (%) ¹	AA (%)
78	No defect	2
66	No defect	8
2	No defect	10
69	ODA (4)	12
73	ODA (8)	12
43	ODA (2)	14
68	ODA (2)	14
70	ODA (4)	14
99	No defect	14
28	No defect	18
36	No defect	18
67	ODA (8)	18
85	No defect	18
86	ODA (2)	18
58	No defect	22
34	No defect	24
40	ODA (2)	34
98	ODA (6)	36
25	ODA (22)	44
59	ODA (16)	63

¹ Expressed as a percentage of affected ciliary sections. Definition of abbreviations: ID= participant identification; TEM= Transmission Electron microscopy; ODA= Outer dynein arm defect; AA= Axonemal asymmetry.

Table S4. Genetics, HSVA and TEM information of PCD patients (n=20).

	n	%
Ultrastructural defect		
C1	11	55
C2	2	10
No defect	7	35
Mutated gene		
DNAH5	6	30
DNAH9	2	10
RSPH1	4	20
TTC25	1	5
DNAAF1	1	5
DYX1C1	1	5
DNAH11	1	5
Not identified	4	20
HSVA		
Dyskinetic	8	40
Immotile	11	55
Normal	1	5

Definition of abbreviations: ID= Participant identification; C1= Class 1 defect; C2= Class 2 defect; HSVA= High speed videomicroscopy analysis.

Table S5. Demographic and clinical characteristics of PCD patients (n=20).

	n	%
Male/Female	11/9	55/45
Age (years)	24 (1-64)	
Clinical characteristics		
NRD	13	65
Rhinorrhea	17	85
Cronic wet cough	18	90
Pneumonia	10	50
Bronchiectasis	13	65
Laterality defects	8	40
Fertility problems ¹	3	33,3

Definition of abbreviations: NRD= Neonatal respiratory distress. ¹ In patients older than 18 years.

