

## Diagnóstico de discinesia ciliar primária\*

Diagnosis of primary ciliary dyskinesia

Mary Anne Kowal Olm<sup>1</sup>, Elia Garcia Caldini<sup>2</sup>, Thais Mauad<sup>3</sup>

### Resumo

Discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença genética que compromete a estrutura e/ou a função ciliar, causando retenção de muco e bactérias no trato respiratório e levando a infecções crônicas nas vias aéreas superiores e inferiores, defeitos de lateralidade visceral e problemas de fertilidade. Revisamos os sinais e sintomas respiratórios da DCP, os testes de triagem e a investigação diagnóstica, bem como detalhes relacionados ao estudo da função, ultraestrutura e genética ciliar. Descrevemos também as dificuldades em diagnosticar a DCP por meio de microscopia eletrônica de transmissão, bem como o seguimento dos pacientes.

**Descritores:** Síndrome de Kartagener; Cílios; Depuração mucociliar; Transtornos da motilidade ciliar; Diagnóstico.

“O batimento ciliar foi uma das primeiras características, o Alfa, da vida animal na Terra, e será a última, o Ômega.”

– J. C. de Man, médico e historiador holandês

### Introdução

A discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença que se caracteriza por uma alteração da frequência e/ou do padrão de batimento ciliar e que possui uma base genética heterogênea, tipicamente autossômica recessiva; a principal consequência da disfunção ciliar é a baixa eficiência da depuração mucociliar das vias aéreas superiores e inferiores, levando a infecções crônicas e inflamação.<sup>(1,2)</sup>

Poucos países apresentam registros da prevalência, do diagnóstico e do prognóstico da doença, com grandes variações entre os dados. A prevalência varia de 1:2.200 a 1:40.000, com maior ocorrência em famílias com casamentos consanguíneos. Evidências sugerem que o diagnóstico é frequentemente tardio, devido principalmente ao não reconhecimento da doença e à necessidade de recursos técnicos sofisticados para a sua investigação.<sup>(1)</sup>

Na Europa, há registros de mais de 1.000 pacientes distribuídos em 223 centros em 26 países.<sup>(1)</sup> Nos Estados Unidos, há relatos de menos de 1.000

pacientes com um diagnóstico bem estabelecido.<sup>(3)</sup> No Brasil, a maioria dos serviços de pneumologia carece de recursos para a investigação da DCP, havendo, portanto, poucos casos descritos,<sup>(4,5)</sup> ainda não representativos da prevalência nacional. Segundo consenso europeu, o diagnóstico deve ser baseado na presença do fenótipo e confirmado por meio de testes diagnósticos em centros especializados.<sup>(6)</sup> Os testes de triagem devem preceder a investigação diagnóstica da DCP.<sup>(6)</sup> O objetivo deste estudo foi revisar a literatura a respeito do diagnóstico da DCP.

### Biologia ciliar

Cílios são estruturas especializadas filiformes, recobertas por membrana plasmática, que se estendem a partir das superfícies celulares. No seu interior, o cílio apresenta nove pares de microtúbulos com distribuição radial periférica, podendo ou não haver mais um par central de microtúbulos, de modo que os arranjos são

1. Pós-doutoranda. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

2. Professora Associada. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

3. Professora Livre-Docente. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

\*Trabalho realizado no Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil.

Endereço para correspondência: Mary Anne Kowal Olm. Avenida Dr. Arnaldo, 455, sala 1150, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil. Tel. 55 11 5686-7301. E-mail: maryakolm@yahoo.com.br

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 1/10/2014. Aprovado, após revisão, em 22/1/2015.

designados 9+2 ou 9+0, respectivamente. Os cílios são classificados em móveis e não móveis.<sup>(7,8)</sup>

Os cílios móveis têm função na motilidade celular e na movimentação de fluidos extracelulares. Os cílios móveis com padrão microtubular 9+0 são os cílios das células nodais da placa notocordal do embrião. Durante o desenvolvimento embriológico (na fase de gástrula do embrião humano), existem células localizadas no polo ou nodo ventral do embrião com um único cílio móvel por célula. Este cílio especializado móvel possui nove pares de microtúbulos periféricos com braços da proteína dineína, mas sem os pares centrais de microtúbulos; seu movimento rotatório determina o desenvolvimento da lateralidade visceral na embriogênese. Na ausência de um funcionamento ciliar nodal normal, a posição dos órgãos será ao acaso. Os cílios móveis com padrão microtubular 9+2 são os cílios das células ciliadas epiteliais das vias aéreas, da tuba uterina, do epêndima e da cauda dos espermatozoides.

Os cílios não móveis têm função de percepção de sinais físicos e bioquímicos extracelulares. Os cílios não móveis com padrão microtubular 9+0 são os cílios das células epiteliais dos túbulos renais (monocílio) e dos ductos biliar e pancreático. São também os cílios dos condrócitos e osteócitos, bem como os cílios conectores das células fotorreceptoras da retina. Os cílios não móveis com padrão microtubular 9+2 são os cílios da orelha interna (quinocílios e estereocílios).

### ***Ultraestrutura do cílio normal no epitélio ciliado das vias aéreas***

A estrutura ciliar em corte axial (Figura 1) apresenta nove microtúbulos duplos periféricos. Cada dupla é formada por subfibra A e subfibra B. O espaço uniforme entre os pares de microtúbulos é mantido pela proteína nexina, que mantém unidos os microtúbulos adjacentes entre si. Há também os braços externos e internos da proteína dineína ao longo da subfibra A, um par central de microtúbulos isolados ligados e circundados por uma bainha central descontínua, de natureza proteica, e espículas proteicas radiais, que conectam os microtúbulos centrais aos periféricos.

Os braços externos e internos de dineína possuem proteínas de alto, médio e baixo peso molecular. As cadeias pesadas de proteína possuem atividade ATPase, que, através da hidrólise da ATP, produzem deslizamento da subfibra A sobre a subfibra B de cada dupla adjacente.

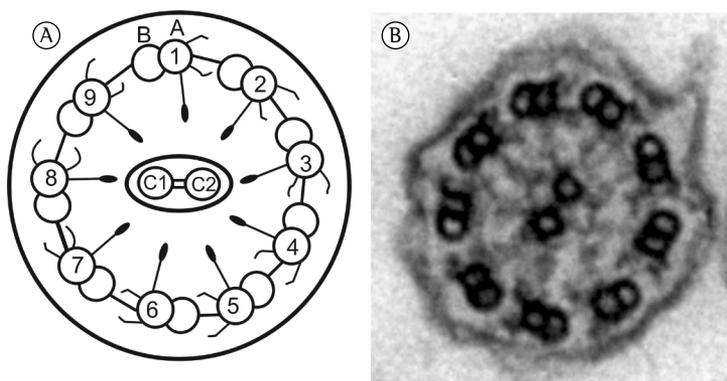
Os microtúbulos do lado oposto mediam o encurvamento na direção oposta (batimento efetivo para frente e de recuperação para trás).<sup>(9)</sup>

O epitélio das vias aéreas com células ciliadas móveis ocorre na cavidade nasal, nos seios paranasais, na orelha média, na tuba uterina, no colo uterino, nos ductos deferentes masculinos e no epêndima. Na via aérea, os cílios são encontrados até a 16ª divisão brônquica. As células ciliadas do epitélio respiratório são caracterizadas por suas longas projeções citoplasmáticas, com cerca de 200 cílios por célula. Cada cílio tem uma extensão de 5-7  $\mu\text{m}$  na traqueia e de 2-3  $\mu\text{m}$  na sétima geração da via aérea, com diâmetro de 0,25-0,33  $\mu\text{m}$ .<sup>(10)</sup>

A principal função das células ciliadas da via aérea é mediar a propulsão da camada gel de muco em direção cefálica, através de movimentos coordenados. Em pulmões de indivíduos saudáveis, o muco é propelido a uma frequência de batimento de 12-15 Hz, em forma de ondas, a uma velocidade de 4-20 mm/min.<sup>(11)</sup>

### **Quadro clínico**

A presença de indicadores clínicos aplicáveis a todas as idades (indicadores gerais) e de indicadores específicos para cada idade deve levantar a suspeita clínica de DCP.<sup>(12)</sup> Os indicadores gerais são anormalidades de *situs* (dextrocardia, isomerismo) e história pessoal ou familiar de ciliopatias. Os indicadores específicos dividem-se em indicadores pré-natais (anormalidades de *situs* no ultrassom), indicadores neonatais (rinorreia desde o nascimento, desconforto respiratório neonatal sem causa aparente em recém-nascido a termo, *situs* anormal, doença cardíaca congênita complexa – especialmente com desordens de lateralidade – e antecedentes familiares da doença), indicadores na infância (tosse crônica produtiva, asma atípica não responsiva ao tratamento, bronquiectasia idiopática, rinosinusite – a presença de polipose nasal é rara – agenesia de um ou mais seios, otite média grave com efusão, otorreia prolongada após a inserção de tubos de ventilação e diagnóstico em outro membro da família) e indicadores na vida adulta (os dados da infância com o acréscimo de infertilidade masculina em virtude de imobilidade espermática, gravidez ectópica e subfertilidade em virtude de cílios estáticos na tuba uterina).<sup>(12)</sup> Outros autores acrescentam aos dados anteriores a presença de *pectus excavatum*, que ocorre



**Figura 1** - Ilustração esquemática e micrografia eletrônica de cílio de via aérea normal. Em A, ilustração esquemática de corte axial de um cílio normal de célula ciliada epitelial das vias aéreas, em que os microfibrilas duplos periféricos aparecem numerados de 1 a 9 (cada qual com sua subfibra A e B); os microfibrilas centrais aparecem designados C1 e C2. Nas subfibrilas A encontram-se os braços externos e internos de dineína, cuja interação dinâmica com a subfibra B do microfibrilo adjacente promove o deslizamento dos microfibrilas duplos, um sobre o outro. Estão representadas também as pontes de nexina, que unem os microfibrilas duplos, impedindo o desarranjo estrutural durante o deslizamento, e as espículas radiais, dispostas da periferia para o centro do eixo ciliar. Em B, micrografia eletrônica (aumento original: 50.000x) mostrando o aspecto ultraestrutural de um corte axial de cílio normal de via aérea. Fonte: Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil, 2010.

em aproximadamente 10% dos pacientes com DCP e em 0,3% da população geral, e uma alta prevalência de escoliose (5-10%).<sup>(3)</sup>

Quanto aos problemas otorrinolaringológicos, aproximadamente 85% das crianças com DCP apresentam otite média grave com efusão, que costuma melhorar até a idade de 13 anos. O acúmulo de muco na tuba auditiva causa perda condutiva de audição que varia com o tempo. Há ainda um subdesenvolvimento dos seios frontal e esfenoidal nesses pacientes, e a polipose nasal pode ocorrer em até 18% dos casos.<sup>(6)</sup> Mais da metade dos pacientes costuma ter problemas nos seios paranasais, com investigações radiológicas frequentes e cirurgias locais.<sup>(13)</sup>

## Diagnóstico

Uma declaração de consenso entre serviços europeus orienta que sejam realizados testes diagnósticos nos seguintes grupos: pacientes com *situs inversus* ou heterotaxia; crianças com tosse produtiva crônica ou bronquiectasia de causa desconhecida ou morbidade grave da via aérea superior; crianças com ventriculomegalia cerebral; irmãos de pacientes; recém-nascidos com desconforto respiratório inexplicado; homens com imobilidade espermática e mulheres com gravidez ectópica.<sup>(1)</sup>

Os pacientes devem ser encaminhados para um centro especializado,<sup>(6)</sup> em que se analisa a história clínica e se realizam os testes de triagem, os testes específicos de função (batimento ciliar e padrão de onda),<sup>(2)</sup> a análise da ultraestrutura, a imunofluorescência e a análise genética. Nos casos de bronquiectasia de causa desconhecida, a DCP é um diagnóstico de exclusão, visto que, para a sua investigação, outras causas de bronquiectasia devem ter sido afastadas.<sup>(14)</sup>

O diagnóstico depende de recursos e treinamento adequado nos centros. É consenso entre americanos e britânicos que o fenótipo e o teste do óxido nítrico (NO) nasal são importantes; o movimento ciliar é estudado com mais detalhes por europeus,<sup>(15,16)</sup> assim como o é a cultura de cílios. Contudo, centros americanos de diagnóstico de DCP referem dificuldades em padronizar a interpretação do movimento ciliar e da microscopia eletrônica. Priorizam, portanto, para o diagnóstico da doença, a constatação do fenótipo com o teste do NO nasal alterado, associando-o a testes genéticos para a identificação das mutações.<sup>(15)</sup>

Os padrões de batimento ciliar, gravados em vídeos de alta velocidade, possibilitam o entendimento das consequências dos defeitos ciliares no transporte de muco. Por meio desses vídeos, é possível visualizar o padrão normal

de batimento ciliar, ou seja, um movimento efetivo para frente, seguido de um movimento lento de recuperação para trás, com leve desvio do eixo. Alterações do padrão normal de batimento podem ser associadas com defeitos genéticos específicos.<sup>(16-18)</sup> O Quadro 1 mostra a correlação entre defeitos na ultraestrutura ciliar, mutações genéticas e padrões de batimento ciliar relatados.<sup>(16)</sup> As mutações genéticas mais frequentemente diagnosticadas até o momento são a do gene *DNAH5* (em 15-28% dos casos) e a do gene *DNAI1* (em 2-10% dos casos).<sup>(19)</sup>

O estudo da frequência de batimento ciliar deve ser acompanhado pela análise do padrão ou formato de onda, pois cerca de 10% dos casos de frequência de batimento ciliar normal podem ter alteração em seu padrão de onda.<sup>(20,21)</sup>

Testes de imunofluorescência, em cílios coletados por escovados nasais, com anticorpos específicos, segundo mutações estabelecidas, propiciam ainda um auxílio para o diagnóstico genético da doença.<sup>(22,23)</sup>

Quanto ao espermograma, esse é aceito em alguns serviços nacionais como um indicador indireto do diagnóstico, em virtude de o espermatozoide se comportar como um cílio modificado, com motilidade reduzida. Apresenta, contudo, a crítica de que os flagelos dos espermatozoides e os cílios respiratórios dos pacientes com síndrome de Kartagener variam entre os indivíduos e podem não ser iguais num mesmo paciente, o que sugere que os axonemas dos cílios e flagelos<sup>(24,25)</sup> devem ser controlados por genes comuns e genes diferentes.<sup>(26)</sup> Portanto, pacientes com espermograma alterado devem ser encaminhados a serviços terciários para estudo do cílio respiratório, a fim de estabelecer o diagnóstico.

**Diagnóstico definitivo**

Para que se estabeleça o diagnóstico definitivo de DCP, devem estar presentes certas características fenotípicas (no mínimo três, tipicamente cinco ou mais): desconforto respiratório neonatal em

**Quadro 1** – Defeitos na ultraestrutura ciliar, mutações genéticas e padrão de batimento ciliar na discinesia ciliar primária.

Alterações ultraestruturais, mutações genéticas e cromossomos relacionados	Padrão descrito de batimento ciliar
Nos braços externos de dineína <i>DNAI1</i> (9p21-p13); <i>DNAI2</i> (17q25); <i>DNAH5</i> (5p15.2); <i>DNAL1</i> (14q24.3); <i>NME8</i> / <i>TXNDC3</i> (7p14-p13); <i>CCDC114</i> (19q13.32); <i>ARMC4</i> (10p12.1-p11.23) <sup>(3,19,25)</sup>	<i>DNAH5</i> , <i>DNAI1</i> , <i>DNAI2</i> , <i>ARMC4</i> e <i>CCDC103</i> : batimento mínimo residual, desorganizado, com cílios vizinhos incoordenados <sup>(6,16)</sup>
Proteínas envolvidas na formação dos braços externos e internos de dineína <i>DNAAF1</i> ( <i>LRRCSQ</i> ): 16q24.1; <i>DNAAF2</i> ( <i>KTU</i> ): 14q21.3; <i>DNAAF3</i> ( <i>C19orf51</i> ): 19q13.42; <i>CCDC103</i> (17q21.31); <i>C21orf59</i> (21q.22.1); <i>DYX1C1</i> (15q21.3); <i>LRRCC6</i> (8q24); <i>HEATR2</i> (7p22.3); <i>SPAG1</i> (8q22); <i>ZMYND10</i> (3p21.31) <sup>(3,19,25)</sup>	<i>KTU</i> / <i>DNAAF2</i> , <i>LRRCSQ</i> / <i>DNAAF1</i> , <i>LRRCC6</i> e <i>ZMYND10</i> : imobilidade ciliar completa; <i>DYX1C1</i> : imobilidade ciliar completa ou redução da amplitude de movimento, com cílios estáticos ocasionais <sup>(16)</sup>
Nos braços internos de dineína e desorganização dos microtúbulos <i>CCDC39</i> (3q26.33); <i>CCDC40</i> (17q25.3) <sup>(3,19,25)</sup>	Cílios rígidos, com pouca amplitude <sup>(16)</sup>
Pontes de nexina <i>CCDC164</i> ( <i>DRC1</i> ), 2p23.3: nexina ausente, desorganização do axonema em poucos cílios <sup>(23,25)</sup> ; <i>CCDC65</i> ( <i>DRC2</i> ): 12q13.12 <sup>(23,25)</sup>	<i>CCDC164</i> : redução da amplitude <sup>(16)</sup>
Alteração no par central de microtúbulos <i>HYDIN</i> (16q22.2): maioria normal; <i>RSPH9</i> (6p21.1), <i>RSPH4</i> (6q22.1) e <i>RSPH1</i> (21q22.3): defeitos no par central em pequena quantidade de cílios <sup>(3,19,25)</sup>	<i>HYDIN</i> : redução do encurvamento dos cílios; alguns com movimentos circulares, outros imóveis; <i>RSPH4A</i> : cílios rígidos; <i>RSPH1</i> : cílios rígidos e cílios com movimento circular <sup>(16)</sup> ; <i>RSPH9</i> : movimento circular <sup>(6)</sup>
Ultraestrutura normal <i>DNAH11</i> (7p21): alterações em proteínas dos braços externos <sup>(3,19,25)</sup>	Redução do encurvamento <sup>(16)</sup> ; cílios rígidos, hipercinéticos ou estáticos <sup>(6,15)</sup>
Redução da geração de cílios móveis <i>CCNO/MCIDAS</i> (5q11) <sup>(60)</sup>	Reduzido número de cílios que são móveis <sup>(60)</sup>

Observação: Cílios não móveis: RPG (XP 21.1), relacionado com retinite pigmentosa, e OFD1 (Xq22), associado à retardo mental.<sup>(3,25)</sup>

recém-nascidos a termo, defeitos de lateralidade, congestão nasal crônica o ano todo, tosse produtiva o ano todo, infecções recorrentes do trato respiratório inferior, bronquiectasia, otite média crônica com efusão maior de 6 meses, pansinusite crônica, infertilidade masculina e história de discinesia ciliar em familiar próximo.<sup>(27)</sup>

Em uma recomendação recente de um consórcio financiado pela Comissão Europeia denominado BESTCILIA,<sup>(23)</sup> com o intuito de melhorar o conhecimento e o tratamento da doença, deve-se considerar para o diagnóstico: a) a apresentação clínica consistente com a doença; e b) a confirmação diagnóstica por, no mínimo, dois dos seguintes métodos – a certeza do movimento ciliar alterado em vídeos de alta velocidade, a certeza de alteração na ultraestrutura ciliar, a certeza de alteração em testes de imunofluorescência (anticorpos marcados para cílios, segundo mutações estabelecidas), a demonstração de anormalidades na concentração/ produção do NO nasal e a certeza do encontro de mutação genética (em dois alelos) relacionada à doença. Nos casos em que apenas o movimento e o teste do NO nasal estiverem alterados, deve-se repetir o teste de movimento ciliar por até três vezes para comprovar sua alteração.<sup>(23)</sup> Pacientes com sintomas clínicos e apenas um teste diagnóstico alterado são considerados como portadores possíveis da doença, com mais exceções.

A utilização do teste do NO nasal é recomendada para a certeza diagnóstica por vários serviços,<sup>(15)</sup> sendo que a não correlação de fenótipo e baixos níveis de NO nasal com a ultraestrutura e a frequência de batimento ciliar implica a repetição dos testes diagnósticos. Defeitos secundários devem ser excluídos quando o teste do NO nasal for normal e acompanhado por defeitos da motilidade ciliar ou da ultraestrutura.

O teste genético positivo para a doença implica a presença de dois genes com mutações em arranjo *trans*, no qual um alelo selvagem (A) e um alelo mutante do outro gene (b) se situam em um cromossomo, enquanto o alelo mutante (a) e o alelo selvagem de outro gene (B) se situam no homólogo correspondente, assim como a ausência de mutações corretoras de defeito.<sup>(12)</sup>

## Testes de triagem

Os testes de triagem são importantes para a seleção dos pacientes que, dentre aqueles com

sinais e sintomas que sugerem a presença de DCP, devem ser submetidos ao estudo da função e ultraestrutura ciliar. Quanto ao acesso aos testes de triagem para a DCP, foi constatado que, em 26 países europeus, 46% dos centros utilizavam o NO nasal e 36% utilizavam o teste da sacarina como testes de triagem.<sup>(2)</sup>

## Medida do NO nasal exalado

A medida do NO nasal exalado é atualmente o teste de triagem mais recomendado.<sup>(28)</sup> No entanto, os processos de produção e de metabolismo do NO nasal na DCP ainda não foram totalmente elucidados.<sup>(29)</sup>

As principais hipóteses para explicar a diminuição do NO nasal em mais de 95% dos pacientes com DCP estão relacionadas com a célula ciliada propriamente dita e com bloqueios anatômicos locais. Ao nível epitelial, haveria uma redução da biossíntese de NO ou um aumento de seu metabolismo provocado pelo acúmulo de muco espesso ou pela presença de bactérias. Ao nível anatômico, o NO seria sequestrado em seios nasais obstruídos ou teria sua biossíntese e estoque prejudicados por agenesias dos seios paranasais.<sup>(29)</sup>

Os resultados do teste são extremamente baixos para pacientes com DCP, com recomendações expressas para a mensuração do NO nasal.<sup>(30-32)</sup> Na via aérea, o NO exerce muitas funções, tais como mediação da inflamação e estimulação da motilidade ciliar, sendo que suas concentrações na via aérea superior (de 200 a 2.000 ppb) são muito maiores que na via aérea inferior (de 4 a 160 ppb). Para calcular o resultado final do teste, multiplica-se a concentração do NO nasal exalado pela taxa de fluxo da amostra coletada (nl/min). Valores menores que 100 nl/min indicam a possibilidade de DCP.<sup>(27)</sup> Contudo, valores menores que 77 nl/min apresentam sensibilidade de 0,98 e especificidade maior que 0,999 para DCP<sup>(32)</sup> (em pacientes com mais de 5 anos de idade, com manobras de fechamento do palato e analisadores não manuais, baseados em quimioluminescência). São necessários maiores estudos para definir pontos de corte em mensurações do volume corrente de crianças pequenas, não cooperativas.<sup>(28,31)</sup> Das mutações genéticas até o momento relacionadas com a doença, a mutação RSPH1 pode apresentar valores normais no teste.<sup>(15)</sup>

## Teste da sacarina

O teste da sacarina é um bom teste para avaliar o transporte mucociliar nasal, que é geralmente prolongado na DCP. Consiste na colocação de uma partícula de sacarina de 1 mm de diâmetro no assoalho da fossa nasal, cerca de 1 cm para dentro do corneto inferior. O paciente deve se manter quieto, com a cabeça recurvada para frente. Não pode tossir, espirrar, cheirar, comer ou beber durante o teste. Mede-se o tempo decorrido (em min) desde a colocação da sacarina até o início da sensação de gosto doce na faringe. O resultado do teste é alterado em adultos quando o tempo transcorrido for maior que 60 min.<sup>(14)</sup> Contudo, um estudo brasileiro<sup>(33)</sup> com 238 crianças (de 10-16 anos de idade) determinou um ponto de corte diferente, de 30 min, não devendo ser o teste realizado durante infecção viral aguda nem no mês subsequente ao episódio agudo. O teste apresenta ainda boa sensibilidade para pacientes com ultraestrutura ciliar alterada (95% dos casos com valores maiores que 30 min e 75% dos casos com valores maiores que 60 min). Falsos positivos, contudo, podem ocorrer em 0,4-15% dos casos em adultos saudáveis. O transporte mucociliar nasal pode ainda ser mais lento em pacientes com desvio de septo ou rinoscleroma. Em uma revisão recente,<sup>(6)</sup> o teste da sacarina foi considerado difícil de ser realizado corretamente e não confiável em menores de 12 anos. Pacientes com cílios muito incoordenados também podem não ser detectados pelo teste.

## Medição da depuração mucociliar por radioaerossol

As experiências clínicas são insuficientes para recomendar a medição da depuração mucociliar por radioaerossol na prática.<sup>(2)</sup>

## Genética

Estudos genéticos têm identificado mutações em vários genes que codificam a estrutura e proteínas funcionais do cílio, mas tais testes são pouco disponíveis na prática.<sup>(8)</sup> O achado de mutação genética relacionada é evidência laboratorial para o diagnóstico definitivo de DCP.<sup>(27)</sup> O Quadro 1 detalha os mais importantes genes até agora relacionados com a doença. Mutações como as dos genes *RSPH1*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *HYDIN*, *MCIDAS*

e *CCNO*, que não causam defeitos de lateralidade, permitem correlações clínicas.<sup>(3,23)</sup>

## Condições clínicas associadas

Há evidências de que as desordens ciliares estão relacionadas com diversos problemas de desenvolvimento e condições clínicas, que são denominadas ciliopatias. Se existir uma história familiar de ciliopatia, uma suspeita diagnóstica deve estar presente para aquele paciente ou membros familiares com possíveis características de DCP.<sup>(34)</sup> As manifestações não sindrômicas de ciliopatias envolvem tipicamente o coração, o rim, o fígado, a retina e o sistema nervoso central e se caracterizam por doença cardíaca congênita complexa, doença policística renal, nefronoftise, displasia renal, doença fibrocística hepática, retinite pigmentosa e hidrocefalia.

Ciliopatias constituem um grupo de doenças associadas<sup>(12)</sup> com mutações genéticas que resultam em alterações na formação ou na função dos cílios. Como os cílios são componentes de muitos tipos celulares, a disfunção ciliar pode se manifestar na forma de uma constelação de características clínicas como degeneração da retina, doença renal e anomalias cerebrais. Os estudos de genética molecular realizados nos últimos anos sugerem uma clara ligação entre o desenvolvimento e função do cílio primário e várias condições clínicas.<sup>(35)</sup>

As manifestações sindrômicas de ciliopatias estão presentes na síndrome de Joubert, na síndrome de Meckel-Gruber, na síndrome de Senior-Loken, na síndrome orofacial digital, na amaurose congênita de Leber, na síndrome de Bardet-Biedl, na síndrome de Alström, na distrofia torácica asfixiante (síndrome de Jeune), na síndrome de Ellis-van Creveld e na síndrome de Sensenbrenner.<sup>(12)</sup>

A síndrome de Kartagener é uma rara malformação congênita que compreende a tríade *situs inversus*, bronquiectasia e sinusite.<sup>(37)</sup> A associação entre imobilidade ciliar e *situs inversus* partiu da hipótese de que, nos estágios iniciais da embriogênese normal, os cílios das células nodais e da placa notocordal do embrião possuem uma posição e uma direção de batimento pré-determinada e de que este batimento, por meio de uma cascata de sinalização molecular, determina a lateralidade visceral. Quando esses cílios são imóveis, a simetria corporal passa a ser determinada ao acaso, resultando em muitos

casos de *situs inversus*, que costuma ocorrer em 50% dos pacientes com DCP,<sup>(36,37)</sup> alguns dos quais são diagnosticados com a síndrome de Kartagener.<sup>(38)</sup>

## Padronização da avaliação ciliar por meio de microscopia eletrônica

Serviços diferentes de microscopia eletrônica de transmissão vêm trabalhando na padronização dos critérios diagnósticos para a avaliação ciliar, porém nenhuma proposta tem sido universalmente aceita. A variedade de defeitos descritos associados à DCP e a raridade da doença tornam difícil a padronização da interpretação da microscopia eletrônica.<sup>(39)</sup>

Há múltiplos fatores que limitam o uso da microscopia eletrônica como teste diagnóstico de DCP: o dano ciliar secundário causado pela infecção ou inflamação; as dificuldades na fixação e processamento das células ciliadas; a necessidade de cortes ultrafinos; a complexidade técnica do uso do microscópio eletrônico de transmissão; um número suficiente de amostras para a interpretação e o fato de que a interpretação da microscopia eletrônica requer o conhecimento da variabilidade normal e das alterações que não são específicas.<sup>(40)</sup> Além disso, amostras provenientes de crianças costumam ser menos adequadas do que as provenientes de adultos (60% vs. 87%) para análise ciliar.<sup>(40,41)</sup>

## Coleta de cílios

A técnica da escovação nasal para a coleta de células ciliadas tem menor morbidade e custo e é de fácil realização quando comparada à biópsia nasal.<sup>(14,42)</sup> Para tanto, são utilizadas escovas de broncoscopia para a coleta de células ciliadas na concha inferior nasal, próximo ao septo transversal. Parte do material é separada para avaliação da frequência de batimento ciliar e padrão da onda de muco, sendo a parte restante enviada para análise por meio de microscopia eletrônica.<sup>(12,14)</sup>

Os pacientes devem estar livres de infecção respiratória aguda há 4-6 semanas no momento da coleta para minimizar a presença de alterações causadas por discinesia secundária.

## Parâmetros de avaliação da ultraestrutura ciliar

### Orientação ciliar

A desorientação ciliar é também associada à DCP. Em tal situação, o cílio possui um padrão de ultraestrutura normal, com frequência de batimento ciliar normal ou quase normal, porém seu movimento não é eficiente, porque sua direção de batimento não é orientada para a correta propulsão da onda de muco.<sup>(42)</sup>

### Microtúbulos

Os microtúbulos periféricos podem apresentar defeitos como desarranjo ou desorganização, associados a defeitos nos braços internos de dineína,<sup>(3)</sup> bem como defeitos de transposição (substituição de um par central por um microtúbulo periférico).<sup>(43,44)</sup>

Os defeitos de transposição<sup>(44,45)</sup> ou translocação<sup>(3)</sup> são caracterizados pela ausência do par central em alguns cortes transversais (arranjo 9+0), associados com cortes apresentando a substituição do par central por uma dupla de microtúbulos externos em outras seções de corte (arranjo 8+2).<sup>(43,45)</sup> A ausência do par central isoladamente também foi relatada como defeito primário.<sup>(47)</sup>

### Avaliação quantitativa dos braços de dineína

A quantificação dos braços externos e internos de dineína é realizada em alguns serviços, porém com diferentes padrões.<sup>(17,39,43,46,48)</sup> O Quadro 2 sintetiza estudos em que se realizou a avaliação quantitativa dos braços de dineína.

Quanto à quantificação dos cílios com defeitos nos braços de dineína, a ausência de braços de dineína pode ser verificada em mais de 90% dos cílios.<sup>(17)</sup> Os defeitos isolados nos braços internos de dineína compreendem uma pequena fração e devem ser confirmados por meio da repetição do teste com uma amostra de epitélio saudável.<sup>(3)</sup>

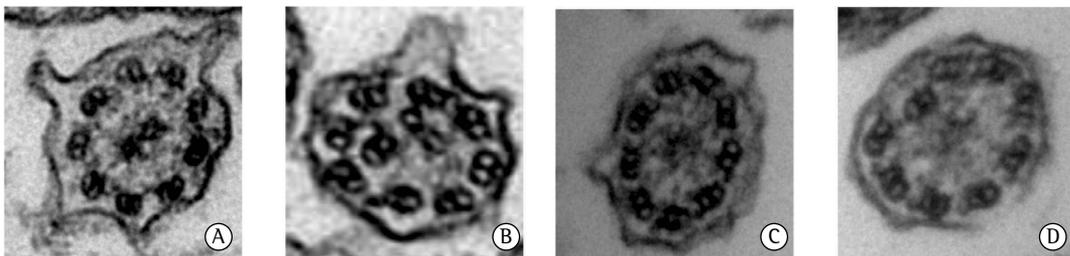
A ausência parcial de dineína, como defeito primário, é considerada controversa e requer mais estudos para sua confirmação.<sup>(43)</sup> A Figura 2 mostra os mais importantes defeitos ultraestruturais descritos.

### Ultraestrutura ciliar normal e DCP

A presença de NO nasal muito reduzido e a função ciliar alterada (alteração de frequência

**Quadro 2** – Avaliação quantitativa dos braços de dineína.

Autores	Braço externo	Braço interno
	(número de braços por cílio)	(número de braços por cílio)
Jorissen et al. <sup>(43)</sup>	Normal: 8,7 ± 0,4 braços	Normal: 3,0 ± 0,4 braços
	Médias de até 2,7 braços ou menos para defeitos de braços externos	Médias de até 1,1 braços internos ou menos para defeitos de braços externos e internos
	Médias de até 2,2 braços externos para defeitos de braços externos e internos	
Chilvers et al. <sup>(17)</sup>	Médias de até 0,7 braços externos para defeitos de braços externos e internos	Médias de até 0,7 braços internos para defeitos de braços externos e internos
	Médias de até 1,7 braços externos para defeitos de braços externos	Médias de até 2,3 braços internos para defeitos de braços internos
Carlén et al. <sup>(48)</sup>	Normal: 7,5-9,0 braços externos por cílio	Normal: 3,0-5,0 braços internos
	Médias < 1,6 braços para defeito	Médias < 0,6 braços para defeito
Plesec et al. <sup>(39)</sup>	Defeito: ausência ou aspecto truncado ou interrompido	Defeito: ausência ou aspecto truncado ou interrompido
Shoemark et al. <sup>(46)</sup>	Normal: presença de 1 ou mais braços externos de dineína em cada cílio	Normal: presença de 1 ou mais braços internos de dineína em cada cílio



**Figura 2** – Micrografias eletrônicas de cílios com defeitos ultraestruturais. Em A, ausência de braços externos de dineína (aumento: 65.000x); em B, desarranjo dos microtúbulos (aumento: 30.000x); em C, ausência do par central, com a apresentação 9+0, que costuma se associar com o defeito de transposição 8+2 (aumento: 65.000x); em D, defeito de transposição 8+2 (aumento: 65.000x). Fonte: Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP) Brasil, 2010.

de onda, padrão de onda ou de ambos), ambos associados com ultraestrutura ciliar normal, exigem a pesquisa genética de mutação compatível com a doença (isto é, mutação no gene *DNAH11*).<sup>(8,27)</sup> Pacientes com história clínica compatível, baixos níveis de NO nasal exalado e motilidade ciliar anormal já receberam diagnóstico de DCP, não obstante a recomendação do estudo genético para a confirmação do diagnóstico.<sup>(8,27)</sup>

Há registros ainda de uma alta prevalência (de 3-30%) de DCP com ultraestrutura normal ou incerta, cujo diagnóstico não se baseou na ultraestrutura apenas.<sup>(44)</sup> Os avanços na genética molecular da DCP têm mostrado que aproximadamente 70% das mutações podem ser identificadas.<sup>(15,25)</sup>

Dentre os defeitos encontrados, defeitos dos braços de dineína são os mais comuns: defeitos nos

braços externos, em 30-43% dos casos; defeitos nos braços internos e externos, em 9-36%; defeitos nos braços internos, em 11-30%; ultraestrutura normal, em 25%; transposição, em 14%; defeitos no par central, em 9%; defeitos nas espículas radiais, em 7%; e aplasia ciliar, em 6%.<sup>(34)</sup>

#### *Defeitos raros*

Alterações ultraestruturais da DCP incluem ainda defeitos nas ligações de nexina,<sup>(49)</sup> ausência dos microtúbulos centrais e bainha e corpos basais ausentes ou com redução do número de cílios.<sup>(47,48)</sup>

#### *Discinesia ciliar secundária*

A discinesia ciliar secundária ou adquirida pode ser causada por agressão aos cílios das vias

aéreas, em decorrência de insultos variados por agentes físicos e químicos.

Infecções respiratórias e a resposta imune inflamatória às infecções podem alterar a função ciliar, induzindo discinesia ciliar secundária.

Dentre as lesões secundárias relatadas estão os cílios compostos (fusão das membranas ou aumento do número de axonemas em uma membrana), as anormalidades nas tubulopatias periféricas e centrais, edema das membranas, braços de dineína encurtados, bolhas na membrana e ausência da membrana ciliar.<sup>(50,51)</sup>

Em indivíduos saudáveis e em pacientes sem discinesia ciliar, há variações de normalidade de alterações ciliares secundárias de  $4 \pm 3\%$  para os indivíduos saudáveis, sendo que até 10% de cílios fora do padrão podem ser considerados normais.<sup>(50,52)</sup> A aplasia ciliar exige biópsia em mucosa brônquica para a confirmação de defeito ciliar em outro local da via aérea. Os pacientes com ultraestrutura ciliar normal e função ciliar alterada necessitam de estudo de orientação dos cílios.<sup>(14)</sup>

### *Confirmação diagnóstica por meio de cultura de cílios*

Realizada apenas em centros especializados, a cultura de cílios, com posterior análise por meio de microscopia eletrônica de transmissão, está indicada para diferenciar o defeito primário do secundário. O tempo de cultura é de cerca de 6 semanas. A taxa de sucesso da cultura de cílios é de 75%, e a cultura é conclusiva em 85% dos casos.<sup>(42,43)</sup>

A ausência de defeitos secundários, após crescimento em meios de cultura (ciliogênese), é um auxílio para o diagnóstico de DCP.

### *Relatório da ultraestrutura e resultados finais*

Serviços com tradição internacional no estudo da DCP baseiam o diagnóstico (laudo) de alteração ultraestrutural na verificação de 200–300 cílios,<sup>(46)</sup> com um mínimo de 100 cílios<sup>(44)</sup> avaliados em cortes transversais (e com aproximadamente 30% de braços de dineína visualizados). Anormalidades encontradas em menos de 10% dos cílios são consideradas dentro de uma faixa de normalidade.<sup>(50)</sup> Os defeitos relacionados com DCP incluem ausência de braços externos de dineína, ausência de braços

externos e internos de dineína, desarranjo dos microtúbulos<sup>(43)</sup> e alterações no par central com transposição.<sup>(44)</sup>

Os defeitos isolados de braços internos<sup>(3)</sup> e de desorientação ciliar exigem novas amostras para a confirmação do diagnóstico. O relatório da ultraestrutura deve ser conclusivo quanto à presença ou à ausência de defeitos relacionados com a DCP. Os resultados de todas as investigações devem ser expressos em forma de diagnóstico definitivo (Quadro 3).

## **Radiologia**

A TCAR de tórax (Figura 3) demonstra um maior comprometimento dos lobos médio e inferiores (em contraste com os lobos superiores que são mais afetados na fibrose cística), com destaque para atelectasias subsegmentares, espessamentos peribrônquicos, rolhas de muco, evidências de represamento de ar, opacidades em vidro fosco,<sup>(25)</sup> áreas de consolidação e bronquiectasias bem definidas.<sup>(19)</sup>

A presença de bronquiectasia está relacionada à idade. Em casuística de 72 pacientes, 98% dos pacientes com mais de 18 anos (19–73 anos) apresentavam sinais e sintomas de bronquiectasia contra 61% dos pacientes com menos de 18 anos.<sup>(53)</sup> Os pacientes adultos apresentam doença pulmonar com comprometimento avançado.<sup>(54)</sup>

## **Fisiopatologia da doença nas vias aéreas e na função pulmonar**

O defeito genético do cílio respiratório causa uma redução importante do transporte mucociliar, com retenção de secreções, infecções de repetição e, conseqüentemente, bronquiectasias. Em longo prazo, pode ocorrer comprometimento da troca gasosa alveolar, causando insuficiência respiratória, hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca direita.<sup>(52)</sup>

A perda de função pulmonar ocorre em razão do subtratamento ou diagnóstico tardio, existindo uma relação entre idade e perda de função, com o VEF<sub>1</sub> declinando com a idade. Há registro de perda média de VEF<sub>1</sub> de 0,8% por ano (dado não relacionado com o defeito estrutural na DCP).<sup>(53)</sup> Contudo, em recente estudo longitudinal de 74 pacientes, houve grande variação da função pulmonar ao longo de 10 anos, com até 34% dos pacientes apresentando declínio importante

**Quadro 3** – Investigação de discinesia ciliar primária.

Presença de fenótipo específico ( <i>Assinalar os pontos positivos que sugerem o diagnóstico</i> )
Desordens de lateralidade: dextrocardia, <i>situs inversus</i> , isomerismo Doença de via aérea superior: otite, sinusite Doença de via aérea inferior: pneumonias de repetição Bronquiectasia de causa desconhecida
Teste de triagem utilizado:
Teste da sacarina ( <i>resultado em ____ minutos</i> ) Teste do NO nasal ( <i>recomendação formal; indicar o método utilizado e o resultado</i> )
Avaliação do movimento ciliar
Padrão da onda de muco formado ( <i>Assinalar</i> ) Estático, reduzido, circular, discinético Frequência de batimento ciliar do paciente Resultado do paciente: ____ Hz. Média do grupo controle: ____ Hz.
Diagnóstico definitivo
Avaliação dos cílios respiratórios pela microscopia eletrônica de transmissão Descrição do defeito predominante ( <i>Um resultado normal não exclui o diagnóstico</i> ) Estudo genético Indicado nos casos de ultraestrutura normal, mas com fenótipo, movimento ciliar e teste do NO nasal alterados Imunofluorescência ou pesquisa de mutação genética
Estudos acessórios no diagnóstico
Prova de função pulmonar Espermograma Escore radiológico de bronquiectasia (TCAR de tórax) Escore radiológico dos seios da face (TCAR) Cultura de escarro Avaliação otorrinolaringológica Avaliação da qualidade de vida Encaminhamento para clínicas de fertilidade



**Figura 3** – Corte axial de TCAR de tórax de paciente de 30 anos de idade com discinesia ciliar primária (ausência de braços externos e internos de dineína) e doença pulmonar avançada. Nota-se importante comprometimento das bases pulmonares, com imagens de espessamento brônquico, sinal do anel de sinete, áreas de consolidação e diferenças de atenuação. Fonte: Divisão de Pneumologia Clínica do Instituto do Coração, Hospital das Clínicas. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SP), Brasil, 2014.

da função pulmonar a despeito de tratamento, o que emite um alerta de gravidade.<sup>(55,56)</sup>

## Tratamento

Os defeitos ciliares não são tratáveis com o arsenal farmacológico convencional, e não há tratamento específico para corrigir a disfunção ciliar. A terapêutica busca melhorar a depuração mucociliar, tratar as infecções e melhorar ou estabilizar a função pulmonar, impedindo dano pulmonar crônico. As recomendações baseiam-se na opinião de especialistas, inferidas a partir das evidências disponíveis para a fibrose cística, embora existam diferenças na fisiopatologia das duas doenças.<sup>(6)</sup> A educação e a informação dos pacientes e familiares são consideradas ferramentas importantes.<sup>(14)</sup>

O tratamento ambulatorial é multidisciplinar, envolvendo pneumologistas, otorrinolaringologistas, enfermeiras, fisioterapeutas, psicólogos e assistentes sociais.<sup>(19)</sup>

Os pacientes devem ser aconselhados a evitar alérgenos ambientais e fumo, e o exercício físico pode ser um melhor broncodilatador que o uso

de beta-agonistas. A consulta em centros de referência pode ser feita a cada 2 ou 3 meses em crianças e a cada 6 ou 12 meses em adultos, dependendo da necessidade.<sup>(14)</sup>

Além da imunização básica, os pacientes devem receber a vacina anual contra influenza e a vacina pneumocócica.

### **Monitorização respiratória**

Os dois pilares do tratamento respiratório são a antibioticoterapia e a fisioterapia respiratória. A fisioterapia respiratória deve ser realizada duas vezes ao dia em sessões de 20 min cada e deve ser aumentada nas exacerbações.<sup>(14)</sup> Cultura de escarro e espirometria seriada devem ser realizadas no acompanhamento de pacientes com DCP. Ao primeiro sinal do aumento dos sintomas respiratórios ou deterioração da função pulmonar, deve ser iniciada a antibioticoterapia, cuja duração é geralmente de duas semanas. Os antibióticos devem ser indicados conforme a sensibilidade das culturas. O tratamento intravenoso deve ser realizado se os sintomas não cederem com a antibioticoterapia oral. Em adultos, a colonização por *Pseudomonas aeruginosa* não é rara e pode requerer terapia intravenosa mais agressiva e uso de antibióticos inalatórios em longo prazo.<sup>(2,3,6,23)</sup>

O uso de DNase humana recombinante, que reduz a viscoelasticidade do muco respiratório, apresenta resultados conflitantes e requer mais estudos para a sua prescrição na DCP. A solução salina hipertônica pode ser eficaz em melhorar a depuração mucociliar, porém não há, até o momento, ensaios terapêuticos controlados que justifiquem seu uso.<sup>(6,23)</sup>

### **Monitorização auditiva**

Serviços de otorrinolaringologia devem acompanhar perdas auditivas, que exigem condutas específicas.<sup>(13)</sup> Os resultados de estudos sobre o tratamento da otite média com efusão são contraditórios quanto ao uso de tubos de ventilação, necessitando de maior casuística para conclusões.<sup>(57)</sup> Cirurgias endoscópicas dos seios nasais parecem melhorar a sintomatologia local.<sup>(13)</sup>

### **Outros encaminhamentos**

Os pacientes devem ser orientados quanto a dificuldades para a concepção.<sup>(14)</sup> Além disso, é necessário apoio psicossocial para o estigma que acompanha a doença, tais como a infertilidade e possíveis problemas escolares.<sup>(14)</sup>

Há casos em que a ressecção cirúrgica da bronquiectasia localizada pode ser benéfica para o paciente.<sup>(58)</sup> Há também a possibilidade de transplante, porém há poucos casos descritos na literatura.<sup>(59)</sup>

### **Prognóstico**

Não há ainda grandes estudos de longo prazo para um prognóstico mais detalhado dos pacientes com DCP. A doença apresenta uma grande variabilidade genética, que determina evoluções diferentes. Pacientes diagnosticados na vida adulta apresentam maior comprometimento pulmonar que os pacientes diagnosticados na adolescência. Uma minoria de pacientes pode progredir para doença pulmonar grave, com insuficiência respiratória e possível necessidade de transplante pulmonar.<sup>(25)</sup>

### **Considerações finais**

No relatório diagnóstico da DCP, devem ser descritos os resultados das investigações que propiciaram o diagnóstico da doença, isto é, o fenótipo, o teste de triagem, a função ciliar (frequência de batimento ciliar, padrão de onda ou ambos), a análise qualitativa e quantitativa da ultraestrutura ciliar, a imunofluorescência ou a pesquisa de mutação genética. Culturas dos cílios também podem ser usadas como auxílio diagnóstico. A ultraestrutura ciliar normal não exclui o diagnóstico de DCP. Os resultados de todas as investigações devem ser expressos em forma de diagnóstico definitivo.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à Dra. Samia Rached a imagem tomográfica.

### **Referências**

1. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J.* 2010;36(6):1248-58. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00001010>
2. Strippoli MP, Frischer T, Barbato A, Snijders D, Maurer E, Lucas JS, et al. Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice. *Eur Respir J.* 2012;39(6):1482-91. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00073911>
3. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(8):913-22. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201301-0059CI>

4. Olm MA, Kögler JE Jr, Macchione M, Shoemark A, Saldiva PH, Rodrigues JC. Primary ciliary dyskinesia: evaluation using cilia beat frequency assessment via spectral analysis of digital microscopy images. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111(1):295-302. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00629.2010>
5. Santos JW, Waldow A, Figueiredo CW, Kleinubing DR, Barros SS. Discinesia ciliar primária. *J Pneumol*. 2001;27(5):262-68. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862001000500006>
6. Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, Snijders D, Azevedo I, Baktai G, et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J*. 2009;34(6):1264-76. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00176608>
7. Fliegau M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):880-93. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):88. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2278>
8. Leigh MW, Pittman JE, Carson JL, Ferkol TW, Dell SD, Davis SD, et al. Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome. *Genet Med*. 2009;11(7):473-87. <http://dx.doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a53562>
9. Cowan MJ, Gladwin MT, Shelhamer JH. Disorders of ciliary motility. *Am J Med Sci*. 2001;321(1):3-10. <http://dx.doi.org/10.1097/00000441-200101000-00002>
10. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J*. 1999;13(5):1177-88. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.13e39.x>
11. Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annu Rev Physiol*. 2014 Oct 29. [Epub ahead of print]
12. Bush A, Hogg C. Primary ciliary dyskinesia: recent advances in epidemiology, diagnosis, management and relationship with the expanding spectrum of ciliopathy. *Expert Rev Respir Med*. 2012;6(6):663-82. <http://dx.doi.org/10.1586/ers.12.60>
13. Sommer JU, Schäfer K, Omran H, Olbrich H, Wallmeier J, Blum A, et al. ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011;268(3):383-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-010-1341-9>
14. Bush A, Cole P, Hariri M, Mackay I, Phillips G, O'Callaghan C, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *Eur Respir J*. 1998;12(4):982-8. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.98.12040982>
15. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: searching for a gold standard. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1418-22. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00175614>
16. Raidt J, Wallmeier J, Hjej R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, et al. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1579-88. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00052014>
17. Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(3):518-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(03\)01799-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(03)01799-8)
18. Chilvers MA, Rutman A, O'Callaghan C. Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults. *Thorax*. 2003;58(4):333-8. <http://dx.doi.org/10.1136/thorax.58.4.333>
19. Boon M, Jorissen M, Proesmans M, De Boeck K. Primary ciliary dyskinesia, an orphan disease. *Eur J Pediatr*. 2013;172(2):151-62. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-012-1785-6>
20. Bush A, O'Callaghan C. Primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child*. 2002;87(5):363-5; discussion 363-5. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.87.5.363>
21. Stannard WA, Chilvers MA, Rutman AR, Williams CD, O'Callaghan C. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(4):307-14. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200903-04590C>
22. Djakow J, O'Callaghan C. Primary ciliary dyskinesia. *Breathe* [serial on the Internet]. 2014 Jun [cited 2014 Oct 1];10(2):122-33. Available from: <http://breath.ersjournals.com/content/10/2/122.full>
23. Werner C, Onnebrink JG, Omran H. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Cilia*. 2015;4(1):2. <http://dx.doi.org/10.1186/s13630-014-0011-8>
24. Munro NC, Currie DC, Lindsay KS, Ryder TA, Rutman A, Dewar A, et al. Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*. 1994;49(7):684-7. <http://dx.doi.org/10.1136/thx.49.7.684>
25. Lobo LJ, Zariwala MA, Noone PG. Primary ciliary dyskinesia. *QJM*. 2014;107(9):691-9. <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hcu063>
26. Escudier E, Escalier D, Pinchon MC, Boucherat M, Bernaudin JF, Fleury-Feith J. Dissimilar expression of axonemal anomalies in respiratory cilia and sperm flagella in infertile men. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(3):674-9. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/142.3.674>
27. Leigh MW, Zariwala MA, Knowles MR. Primary ciliary dyskinesia: improving the diagnostic approach. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(3):320-5. <http://dx.doi.org/10.1097/MOP.0b013e328329cddb>
28. Marthin JK, Nielsen KG. Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2011;37(3):559-65. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00032610>
29. Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2012;40(4):1024-32. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00176111>
30. American Thoracic Society; European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):912-30. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200406-710ST>
31. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1589-99. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00088614>
32. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, et al. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(6):574-81. <http://dx.doi.org/10.1513/AnnalsATS.201305-1100C>
33. Adde FV, Rozov T. Teste da sacarina em crianças. *J Pneumol*. 1997;23(2):66-70.
34. Hogg C. Primary ciliary dyskinesia: when to suspect the diagnosis and how to confirm it. *Paediatr Respir Rev*. 2009;10(2):44-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prrv.2008.10.001>

35. Waters AM, Beales PL. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(7):1039-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-010-1731-7>
36. Afzelius BA. Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int J Dev Biol.* 1999;43(4):283-6.
37. Brueckner M. Cilia propel the embryo in the right direction. *Am J Med Genet.* 2001;101(4):339-44. [http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628\(20010715\)101:4<339::AID-AJMG1442>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/1096-8628(20010715)101:4<339::AID-AJMG1442>3.0.CO;2-P)
38. Sutherland MJ, Ware SM. Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2009;151C(4):307-17. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.c.30228>
39. Plesec TP, Ruiz A, McMahon JT, Prayson RA. Ultrastructural abnormalities of respiratory cilia: a 25-year experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(11):1786-91.
40. Leigh MW, O'Callaghan C, Knowles MR. The challenges of diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Proc Am Thorac Soc.* 2011;8(5):434-7. <http://dx.doi.org/10.1513/pats.201103-028SD>
41. Papon JF, Coste A, Roudot-Thoraval F, Boucherat M, Roger G, Tamalet A, et al. A 20-year experience of electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2010;35(5):1057-63. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00046209>
42. Jorissen M, Willems T. Success rates of respiratory epithelial cell culture techniques with ciliogenesis for diagnosing primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):357-65.
43. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B, Verbeken E, De Boeck K. Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis in culture. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):343-56.
44. Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C, et al. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child.* 2014;99(9):850-6. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2013-304831>
45. Sturgess JM, Chao J, Turner JA. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. *N Engl J Med.* 1980;303(6):318-22. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198008073030606>
46. 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(3):267-71. <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200415>
47. Stannard W, Rutman A, Wallis C, O'Callaghan C. Central microtubular agenesis causing primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(5):634-7. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200306-782OC>
48. Carlén B, Stenram U. Primary ciliary dyskinesia: a review. *Ultrastruct Pathol.* 2005;29(3-4):217-20. <http://dx.doi.org/10.1080/01913120590951220>
49. Carlén B, Lindberg S, Stenram U. Absence of nexin links as a possible cause of primary ciliary dyskinesia. *Ultrastruct Pathol.* 2003;27(2):123-6. <http://dx.doi.org/10.1080/01913120309930>
50. Bush A. Primary ciliary dyskinesia. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):317-24.
51. Bertrand B, Collet S, Eloy P, Rombaux P. Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2000;54(3):309-16.
52. Rossman CM, Newhouse MT. Primary ciliary dyskinesia: evaluation and management. *Pediatr Pulmonol.* 1988;5(1):36-50. <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.1950050109>
53. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169(4):459-67. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200303-365OC>
54. Kennedy MP, Noone PG, Leigh MW, Zariwala MA, Minnix SL, Knowles MR, et al. High-resolution CT of patients with primary ciliary dyskinesia. *AJR Am J Roentgenol.* 2007;188(5):1232-8. <http://dx.doi.org/10.2214/AJR.06.0965>
55. Marthin JK, Petersen N, Skovgaard LT, Nielsen KG. Lung function in patients with primary ciliary dyskinesia: a cross-sectional and 3-decade longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(11):1262-8. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200811-1731OC>
56. Ellerman A, Bisgaard H. Longitudinal study of lung function in a cohort of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 1997;10(10):2376-9. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.97.10102376>
57. Campbell RG, Birman CS, Morgan L. Management of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia: a literature review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73(12):1630-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2009.08.024>
58. Smit HJ, Schreurs AJ, Van den Bosch JM, Westermann CJ. Is resection of bronchiectasis beneficial in patients with primary ciliary dyskinesia? *Chest.* 1996;109(6):1541-4. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.109.6.1541>
59. Date H, Yamashita M, Nagahiro I, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Living-donor lobar lung transplantation for primary ciliary dyskinesia. *Ann Thorac Surg.* 2001;71(6):2008-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(00\)02276-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(00)02276-1)
60. Boon M, Wallmeier J, Ma L, Loges NT, Jaspers M, Olbrich H, et al. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Commun.* 2014;5:4418. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5418>