

Diagnóstico genético en disquinesia ciliar primaria. Revisión bibliográfica

Genetic diagnosis in primary ciliary dyskinesia. Literature review

Carolina Grau L¹, Sergio González B², Ximena Fonseca A¹.

RESUMEN

La disquinesia ciliar primaria (DCP) corresponde a una enfermedad genética heterogénea, que se produce por una alteración estructural o funcional de los cilios.

Es de difícil diagnóstico tanto por su variada sintomatología como por la existencia de métodos de screening y diagnóstico complejos. El método que hasta ahora ha sido considerado como gold standard es el análisis de la estructura ciliar por medio de la microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica tiene limitaciones porque permite analizar un número limitado de axonemas ciliares y puede excluir del diagnóstico a pacientes con axonema normal pero con alteración funcional y clínica clásicas. En los últimos años se han desarrollado métodos diagnósticos sobre la base de un mejor conocimiento de la estructura proteica de los cilios, de los genes que codifican estas proteínas y de las mutaciones asociadas a DCP. Estos nuevos métodos consisten en un análisis genético y un estudio de la expresión de proteínas ciliares en los pacientes afectados. Esta publicación tiene como objetivo realizar una revisión de la fisiopatología de la DCP, los métodos diagnósticos actuales y resumir el desarrollo del diagnóstico genético en la literatura internacional y su posible aplicación en nuestro medio.

Palabras clave: *Disquinesia ciliar; diagnóstico genético.*

ABSTRACT

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is an heterogeneous genetic disease caused by a structural and/or functional alteration of the ciliary skeleton. It is a diagnostic challenge due to its protean clinical presentation and to the complexity of screening and diagnostic methods. The method hitherto regarded as the gold standard is the analysis of ciliary structure by transmission electron microscopy (TEM). This presents limitations because analyzes a limited number of ciliary axonemes, and may exclude cases with typical functional and clinical presentation. In recent years new diagnostic methods have been developed based on novel knowledge of the structural ciliary

¹Médico del Departamento Otorrinolaringología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

²Médico del Departamento Anatomía Patológica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

proteins, the genes encoding these proteins and mutations associated to DCP. These new methods include genetic analysis and the study of protein expression in cilia of the affected patients. This paper reviews DCP pathophysiology, the current diagnostic methods applied, and summarizes the international literature regarding the diagnosis of DCP based on genetic screening.

Key words: Primary ciliary dyskinesia; genetic diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La disquinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad poco frecuente, cuya prevalencia se estima entre 1/15.000 a 1/30.000 habitantes en población general, con un patrón de herencia autosómica recesiva.

La DCP se produce por una alteración estructural o funcional de los cilios, afectando las células y epitelios ciliados, por lo que su presentación clínica es muy variada. Entre otras manifestaciones se encuentran infecciones recurrentes de las vías aéreas, *situs inversus* en el 50% de los pacientes e infertilidad. La gravedad del cuadro clínico va de casos muy leves a severos, incluso pueden no manifestar síntomas y presentar conjuntamente importantes alteraciones ultraestructurales y funcionales¹.

Los cilios están formados por 9 dobletes de microtúbulos, que se disponen alrededor de dos microtúbulos centrales (9+2). Los microtúbulos periféricos poseen dos brazos de dineína: un brazo externo (BE) y un brazo interno (BI).

El análisis por MET ha permitido determinar la frecuencia de las distintas alteraciones estructurales de los cilios en los pacientes con DCP². El brazo externo de dineína es el que presenta el mayor porcentaje de alteraciones, de 24% a 43%, seguido por el defecto de ambos brazos de 24% a 45%, el defecto brazo interno de 14% a 29%, y por último el defecto del complejo central de 4% a 18%². Estas alteraciones estructurales son las responsables de producir las distintas alteraciones funcionales de los epitelios ciliados de los afectados, como la ausencia total del batido, un batido anormal en cada cilio y la alteración en la coordinación. Estas alteraciones influyen directamente en el *clearance* mucociliar, la embriogénesis y la motilidad espermática.

TAMIZAJE Y MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

La DCP es una enfermedad de diagnóstico difícil tanto por su clínica heterogénea como por la complejidad de los métodos diagnósticos. Lo anterior es de gran importancia ya que se ha podido determinar que el diagnóstico tardío empeora los resultados clínicos³. Entre los métodos habitualmente empleados en el estudio de la función ciliar tenemos: el test de sacarina, el estudio mediante biopsia de batido ciliar en vivo, los cultivos celulares para el estudio de la función ciliar, la medición de óxido nítrico y el estudio con MET. A estas técnicas se ha agregado últimamente el estudio genético, tanto como por medio de la identificación de mutaciones como por el estudio de expresión de proteínas mutadas mediante inmunofluorescencia de alta resolución. Con estos adelantos nuestra comprensión de la asociación entre los cambios ultraestructurales del cilio y el defecto genético de base en la DCP ha ido variando. Es probable que mutaciones en cualquiera de las 250 proteínas que constituyen un cilio puedan potencialmente participar como causa de la enfermedad. Por otro lado se ha descrito últimamente que no todos los casos con DCP tienen alteraciones ultraestructurales asociadas, lo que abre un nuevo desafío en esta materia.

Con respecto a los métodos diagnósticos clásicamente utilizados, uno de los exámenes utilizados como tamizaje ante la sospecha diagnóstica es el test de la sacarina⁴, el que se considera que el tiempo que demora el paciente en sentir el sabor de la sacarina desde que se coloca en la entrada de la fosa nasal debe ser menor de 30 minutos. Este es un examen poco preciso y depende de múltiples variables, requiriendo una anatomía y sensación gustativa normal, por lo que no es el examen ideal, menos aún en niños⁵.

La evaluación de la función ciliar se realiza por medio del análisis de la frecuencia de batido ciliar y del patrón de batido ciliar. La frecuencia de batido ciliar se determina que está alterada si es menor a 11 Hz. Esto tiene una sensibilidad de 87%, y una especificidad de 77%⁶. Se ha visto que esta alteración se relaciona con defectos en el brazo externo de la dineína. En el análisis del patrón de batido ciliar se puede encontrar desorientación ciliar, batido descoordinado y disminución de la amplitud, entre otras alteraciones. La alteración del batido ciliar se relaciona con defectos en el brazo interno de la dineína⁷.

El estudio del óxido nítrico (NO) nasal ha demostrado que los pacientes con DCP tienen valores significativamente menores que los pacientes controles. El mecanismo no está claro, pero la fuerza de roce producida por el batido ciliar podría inducir la producción de NO. Se ha encontrado alguna sobreposición de valores con fibrosis quística, aunque valores muy bajos serían muy sugerentes de DCP, por otro lado valores altos de óxido nítrico descartarían disquinesia ciliar primaria. Se ha visto que el nivel de NO es bajo sin variar en relación al tipo de alteración estructural que presente cada paciente¹.

El método diagnóstico considerado como *gold standard* es la MET. Se requiere tomar una muestra de la mucosa bronquial o nasal por medio de cepillado o biopsia con pinza. Se realiza un análisis de la estructura ciliar bajo un microscopio electrónico de transmisión en busca de las alteraciones estructurales. Para esto la biopsia debe realizarse en una mucosa sin inflamación, ya que puede haber alteraciones estructurales secundarias del axonema producto de la alteración local (disquinesia ciliar secundaria).

Otro problema frecuente con las muestras es que se necesita un número mínimo de cilios en buenas condiciones, alrededor de 50, los cuales son difíciles de obtener dado el daño secundario a inflamación de la mucosa que casi todos los pacientes tienen. Lo anterior lleva a que un porcentaje importante de las biopsias sean insuficientes para realizar el análisis. En un estudio realizado en nuestra Facultad, se determinó que de 500 biopsias por sospecha de DCP, el 39% fueron insuficientes⁸.

Algunos estudios han determinado que existe un grupo de pacientes que con clínica clásica de DCP, no presentan alteraciones estructurales en la MET. Este grupo representa el 3% a 28% de los pacientes, los cuales no podrían ser identificados por el estudio de MET⁹.

Por las razones anteriormente expuestas, se han desarrollado técnicas con mayor sensibilidad y especificidad basadas en los nuevos conocimientos sobre la genética de la DCP.

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

En los últimos años el conocimiento de las proteínas estructurales de los cilios y de los genes que codifican estas proteínas, ha permitido descubrir las alteraciones genéticas específicas asociadas a DCP, desarrollándose así nuevos métodos diagnósticos. Estos consisten en el análisis genético y en el estudio de expresión de proteínas de los pacientes afectados.

Hasta ahora se ha analizado la estructura y mutaciones que afectan el brazo externo de la dineína, al ser éste el principal afectado en la DCP. Para esto se han estudiado con anticuerpos fluorescentes específicos para cada proteína que conforma el brazo externo pudiendo así determinar la expresión y ubicación de estas proteínas según el tipo de mutación genética de los pacientes.

Los brazos externos de la dineína son multiproteínas complejas que actúan como motores moleculares. En el estudio de su estructura se ha determinado que cada brazo externo se compone de 3 cadenas pesadas (α , β y γ), 2 cadenas intermedias y 8 cadenas livianas⁶. Se han identificado los genes que codifican las cadenas pesadas e intermedias del brazo externo, sin estudiar aún los genes que codifican las cadenas livianas. Los genes identificados hasta ahora son:

Cadenas pesadas: DNAH11, DNAH17, DNAH9, DNAH5, DNAH8.

Cadenas intermedias: DNAI1, DNAI2

A continuación se analizan los genes cuyas mutaciones han sido identificadas en un porcentaje significativo de casos de DCP.

DNAH5

El gen DNAH5 se localiza en el cromosoma 5 y comprende 79 exones. Codifica una cadena pesada del BE de la dineína. La mutación de este gen produce alteraciones del BE, asociadas o no a *situs inversus*.

Se encuentra en el 28% de los pacientes con DCP, pero en el 49% de los que tienen defectos del BE. Con estudios de inmunofluorescencia se ha podido determinar que en pacientes con esta mutación hay expresión de la proteína, pero ésta es incapaz de ensamblarse en el BE, identificándose acumuladas en el centro organizador de microtúbulos¹⁰.

Con el estudio de la expresión de esta proteína, junto con la expresión de la proteína DNAH9 se han identificado la existencia de dos tipos de brazos externos en cada cilio, de esta manera los BE que se encuentran en la zona proximal de cada cilio sólo expresan la proteína del gen DNAH5, a diferencia de los BE que se encuentran en la zona distal de cada cilio, los que expresan las proteínas DNAH5 y DNAH9¹¹.

DNAI1

Este gen se localiza en el cromosoma 9, comprende 20 exones. Corresponde a una cadena intermedia del brazo externo de la dineína. La mutación sólo ha mostrado defectos del BE. Se ha encontrado en el 10% de los pacientes con DCP, y en el 14% de los pacientes con DCP con alteraciones del brazo externo³.

Se ha observado que la mutación del gen DNAI1 también afecta la expresión de la proteína DNAH5, pero sólo en la zona distal de los cilios. De esta manera los cilios pueden tener una ausencia total de la proteína DNAH5 (al haber mutación de ese gen) o ausencia parcial de la proteína DNAH5, ausentándose en los brazos externos distales del cilio, lo cual ocurre cuando hay una mutación del gen DNAI1.

Interesantemente se ha visto una diferencia en la actividad ciliar según la ausencia parcial o total de la proteína DNAH5, es así como en los tejidos que se ha determinado una ausencia parcial de DNAH5 se ha visto una frecuencia de batido ciliar severamente disminuida, en cambio en los tejidos

con ausencia completa de DNAH5 se observan cilios inmóviles¹¹.

DNAH11

Se ubica en el cromosoma 7 y comprende de 82 exones. Codifica una cadena pesada del brazo externo de la dineína. La mutación de este gen se ha identificado en pacientes con clínica compatible, batido ciliar alterado, pero MET normal⁹. La expresión de las proteínas de DNAH5 y DNAI1 también está mantenida. En estos casos no habría infertilidad masculina asociada.

La alteración de batido ciliar se debe detectar en cámaras de movimiento lento, dando más detalle de las alteraciones funcionales de los cilios.

La mutación de este gen podría explicar a los pacientes que teniendo clínica de DCP tienen MET normal.

Ventajas del diagnóstico con inmunofluorescencia de expresión de proteínas

Este método diagnóstico presenta importantes ventajas en relación a los métodos tradicionales. Entre éstas se encuentra el hecho de que la muestra de tejido puede ser obtenida por medio de cepillado nasal, además de poder usar la misma muestra para pruebas funcionales de batido ciliar, sin la necesidad de repetir la biopsia o tomar dos muestras. Además, por medio de la inmunofluorescencia de la expresión de proteínas, se pueden detectar alteraciones a lo largo de todo el axonema ciliar, y no sólo limitar el análisis a un segmento específico, como ocurre en la microscopía electrónica. Otra importante ventaja está en que la expresión de las proteínas no es afectada por causas secundarias, como es la inflamación de la mucosa de la muestra. De esta manera disminuiría el número de muestras insuficientes, aumentando la eficiencia diagnóstica de la técnica. Con la utilización de estos nuevos métodos diagnósticos se podrá identificar a los pacientes que poseen una clínica clásica de DCP sin alteraciones estructurales.

Análisis genético

Con respecto al análisis genético, hasta ahora se han estudiado en algunos grupos la frecuencia de

las distintas mutaciones identificadas. En estos estudios se ha podido determinar que los pacientes con DCP que presentan mutaciones en el gen DNAH5, junto con los pacientes con mutaciones en el gen DNAI1, representan el 39% del total de pacientes con DCP de la muestra¹².

Dentro de las múltiples mutaciones que pueden afectar al gen DNAH5, el 47% de éstas se encuentran concentradas en 5 axones¹⁰. De la misma manera, la gran mayoría de las mutaciones que afectan al gen DNAI1 se concentran en 4 exones³. Es así como si sólo se hiciera *screening* en los 9 exones con mayor probabilidad de mutación (5 exones del DNAH5 y 4 exones de DNAI1), se podrían identificar al 24% de los pacientes con DCP¹². Lo anterior abre la posibilidad de realizar test genéticos en donde con el análisis de un número de exones limitados se puedan identificar un porcentaje importante de los pacientes con DCP, haciendo este examen más sencillo y de menor costo, en comparación a la necesidad de realizar un análisis genético completo.

Un punto importante es que esta población corresponde a un grupo limitado, faltando aún estudios para conocer la prevalencia de las distintas mutaciones en otras poblaciones, como podría ser la de nuestro país.

Actualmente está disponible un test para detectar mutaciones en los genes DNAH5 y DNAI1 en la Universidad de Carolina del Norte y en el Hospital Freiburg (Alemania).

En nuestra Facultad se está comenzando a implementar técnicas que permitan estudiar la expresión de las distintas proteínas estructurales de los cilios, por medio de la inmunofluorescencia.

CONCLUSIONES

El diagnóstico de la DCP sigue siendo un desafío en otorrinolaringología, dado principalmente por su variada clínica y métodos diagnósticos complejos y poco específicos. Hasta ahora el método estándar es la MET que no detecta todos los casos de DCP, y que excluye especialmente al grupo, que teniendo una estructura ciliar normal, tendría alteraciones funcionales, que igual llevan a una clínica característica.

El estudio genético y de expresión de proteínas pueden ser herramientas muy útiles para aumentar la precisión diagnóstica en estos pacientes. Para esto se necesita ampliar el estudio para el reconocimiento de nuevas mutaciones y así abarcar con un mayor porcentaje de pacientes con DCP. De igual manera se requieren estudios locales para conocer los tipos de mutaciones específicas que presenta nuestra población de pacientes con DCP, que puede ser diferente a las de los estudios existentes debido a las diferencias geográficas y étnicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. NOONE PG. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(4): 459-67.
2. ZARIWALA MA. *Primary Ciliary Dyskinesia*. GeneReviews [Internet]. 2007 Jan 24 [updated 2009 Oct 6].
3. ZARIWALA AT AL. Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Care Med* 2006; 174: 858-66.
4. BUSH A, O'CALLAGHAN C. Primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child* 2002; 87(5): 363-4.
5. BUSH A, COLE P, HARIRI M, MACKAY I, PHILIPS G, O'CALLAGHAN C, WILSON R, WARNER JO. Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care. *Eur Respir J* 1998; 12: 982-8.
6. STANNARD WA. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181(4): 307-14.
7. 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.
8. RODRIGO IÑIGUEZ C, XIMENA FONSECA A, JURY HERNÁNDEZ C, SERGIO GONZÁLEZ B, IGNACIO SÁNCHEZ. Disquinesia ciliar: diagnóstico ultraestructural, evolución clínica y alternativas de tratamiento. *Rev Méd Chile* 2007; 135: 1147-52.
9. SCHWABE GC. Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations. *Hum Mutat* 2008; 29(2): 289-98.

10. HORNEF N. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(2): 120-6.
11. FLIEGAUF M. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(12): 1343-9.
12. COREN ME, MEEKS M, MORRISON I, BUCHDALHN RM, BUSH A. Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and syntom history. *Acta Paediatr* 2002; 91: 667-9.

Dirección: Dra. Ximena Fonseca
Pontificia Universidad Católica de Chile
E mail: xfonsecaa@gmail.com