

DIAGNÓSTICO DE DISQUINESIA CILIAR PRIMARIA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN DOS PACIENTES CANINOS

Jurado, S. B.^{1*}, Giordano, A. L.², Aprea A. N.², Gómez, F. E.³; Baschar H. A.²

¹Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

²Servicio de Endoscopia. Hospital Escuela. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

³Clínica de Pequeños Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

*Autor de Correspondencia: sjurado@fcv.unlp.edu.ar

Recibido en Noviembre 12, 2007. Aceptado en Abril 28, 2008.

Publicado en-línea: Mayo 30, 2008

RESUMEN

La disquinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad autosómica recesiva que afecta a los epitelios ciliados. Las alteraciones ultraestructurales de las cilias del epitelio respiratorio producen un movimiento ciliar anormal y un barrido mucociliar deficiente, lo que predispone a infecciones bronquiales y sinusales recurrentes. Los pacientes que padecen DCP exhiben una gran variedad de defectos en la ultraestructura ciliar, tales como ausencia de los brazos de dineína, alteraciones en los brazos radiales, alteraciones en los microtúbulos y ausencia de axonema en la vaina ciliar. En este estudio se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (MET) para realizar el diagnóstico de DCP en dos pacientes caninos y describir las alteraciones morfológicas de las cilias del epitelio bronquial. A cada animal se le practicó una biopsia endoscópica de mucosa bronquial que fue remitida al laboratorio de microscopía electrónica. Durante el examen ultramicroscópico de cada muestra se estudiaron al menos 100 cilias cortadas transversalmente. Las alteraciones ultraestructurales fueron con mayor frecuencia los defectos de los brazos de dineína. También se observó ausencia de dobletes, microtúbulos simples, dobletes supernumerarios y transposición de dobletes periféricos. Además, se detectaron alteraciones ciliares inespecíficas, tales como fusión ciliar, cilias múltiples, hernias de membrana y ausencia de membrana plasmática. Nuestro estudio permitió realizar el diagnóstico de DCP en los dos pacientes. Concluimos que la microscopía electrónica brinda datos significativos sobre la estructura ciliar y le permite al veterinario distinguir las alteraciones ciliares primarias de los defectos no específicos.

Palabras clave: disquinesia ciliar primaria, microscopio electrónico de transmisión.

DIAGNOSIS OF PRIMARY CILIARY DYSKINESIA THROUGH ELECTRON MICROSCOPY IN TWO CANINE PATIENTS

ABSTRACT

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is an autosomal recessive disease affecting the ciliary epithelium. The ultrastructural ciliar alterations of the respiratory epithelium produce abnormal ciliary movements and deficient mucociliary clearance which is, in time, predispose to bronchial and sinus infections. The patients who suffer PCD show a large variety of ultrastructural cilia defects, such as absence of dynein arms, radial spoke alterations, microtubular disorders and absence of axoneme in the ciliary sheath. Transmission electron microscopy was used to diagnose PCD in two canine patients, and to describe the morphological cilia alterations of bronchial epithelium. Bronchial biopsies were obtained with a fibrobronchoscope and sent to the electron microscopy laboratory for evaluation. The samples were fixed in 2% glutaraldehyde, postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a JEM -1200 EX transmission electron microscope. At least 100 ciliary cross sections per patient were studied. The paramount ultrastructural alterations observed were the dynein arm defects. Absence of doublets, single microtubules, additional peripheral microtubules and transpositions of peripheral doublets also were observed. Furthermore, ultrastructural analysis revealed unspecific ciliary abnormalities, such as ciliary fusion, multiple cilia, ciliary membrane evaginations and absence of plasmatic membrane. These procedures allowed the diagnosis of PCD in two canine patients. We concluded that the transmission electron microscopy produces significative data about the structure ciliary of the epithelium and allows the veterinarian to distinguish between primary abnormalities from unspecific defects.

Key words: Primary ciliary dyskinesia, transmission electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

La disquinesia ciliar primaria (DCP) es una enfermedad autosómica recesiva no ligada al sexo, caracterizada por la alteración de la ultraestructura ciliar de las células ciliadas [1].

A lo largo del siglo XX, la DCP tuvo diferentes denominaciones: “síndrome de Kartagener” [2], “síndrome de la cilia inmóvil” [3], “síndrome disquinésico ciliar” [4]. En 1981, Sleight [5] propuso usar el término con el que se la conoce actualmente de “disquinesia ciliar primaria” para denotar la alteración ultraestructural congénita de las cilias. Al mismo tiempo, propuso el término de “disquinesia ciliar secundaria” (DCS) para describir los defectos de la ultraestructura ciliar adquirida.

La DCP es una enfermedad ampliamente descrita en humanos [6] pero también fue comprobada en perros de diferentes razas, tales como Dálmata [7], Pointer inglés [8], Shar pei [9], Newfoundland [10] y Bull terrier [11], entre otras. La mayoría de los casos de DCP se identificó en cachorros o perros jóvenes menores de 18 meses [8].

La DCP afecta a los epitelios ciliados del tracto respiratorio superior e inferior, senos paranasales, oído medio, recubrimiento ependimal del cerebro, el conducto deferente en el macho y el oviducto en la hembra [12]. Además, este defecto congénito está asociado a la alteración de las colas de los espermatozoides [13].

En el tracto respiratorio, las cilias se encuentran en las células epiteliales de revestimiento de la mucosa de las vías aéreas. Cada cilia está formada por microtúbulos longitudinales agrupados en 9 dobletes que forman un círculo periférico alrededor de un par central de microtúbulos simples (Fig. 1). Esta estructura en conjunto constituye el axonema [6]. El axonema se continua, en la base del cilio y por debajo de la membrana plasmática, con un corpúsculo basal, que tiene una estructura semejante pero más compleja.

Cada doblete tiene una subunidad A y otra B. La subunidad A de cada uno de los dobletes periféricos

posee dos brazos de dineína, que permiten y determinan el movimiento ciliar al actuar como ATPasa [14].

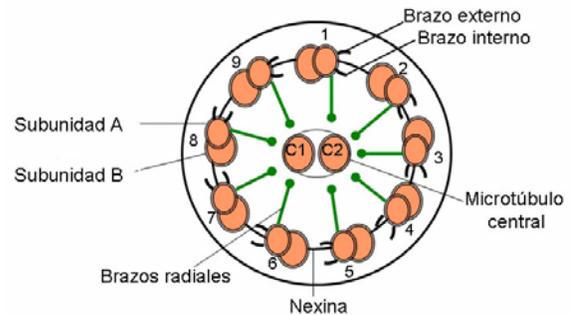


Fig. 1. Diagrama que ilustra la estructura de un axonema normal

La alteración ultraestructural de las cilias del epitelio respiratorio produce un movimiento ciliar anormal y un barrido mucociliar deficiente, lo que predispone a infecciones recurrentes [15,16]. Los pacientes que padecen DCP exhiben una gran variedad de defectos en la ultraestructura ciliar, tales como ausencia de los brazos de dineína, alteraciones en los brazos radiales, alteraciones en los microtúbulos y ausencia de axonema en la vaina ciliar [6].

En este estudio se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (MET) para realizar el diagnóstico de DCP en dos pacientes caninos y describir las alteraciones morfológicas de las cilias del epitelio bronquial.

PACIENTES Y MÉTODOS

Reseña

Dos pacientes caninos macho (Rottweiler) y hembra (Weimaraner) de 60 días y 2 años de edad respectivamente fueron derivados al Servicio de Endoscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de La Plata. Los dos presentaban historias clínicas con cuadros recidivantes de enfermedad respiratoria, tanto superior como inferior (tos crónica, rinorrea). Ambos habían recibido antibiótico terapia empírica con mejoría transitoria y los estudios radiológicos evidenciaban patrones compatibles con

bronconeumonía, sin observarse *situs inversus*. Ante la recurrencia de las infecciones respiratorias, a pesar de tratamientos correctamente indicados, se sugirió broncoscopia con toma de muestras para bacteriología, micología y microscopía electrónica.

Examen Endoscópico

Los hallazgos endoscópicos fueron diferentes en los dos casos. El paciente de 60 días presentó excesiva cantidad de moco transparente y colapso traqueal entre los 18 y 23 cm de la arcada dental superior. En el paciente de 2 años, se observó atrofia de mucosa bronquial que permitía la visualización excesiva de vasos y, a diferencia del anterior, muy escasa cantidad de moco. Se remitieron muestras de mucosa bronquial al Servicio Central de Microscopía Electrónica.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las muestras de mucosa bronquial se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) durante 2 horas a 4 °C. La fijación secundaria se realizó

con tetróxido de osmio al 1 % en agua destilada durante 1 hora a 4 °C y posteriormente, se deshidrataron las muestras en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en Araldita. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (Jeol). Durante el examen ultraestructural de cada muestra, se estudiaron al menos 100 cilias cortadas transversalmente.

RESULTADOS

En las observaciones realizadas, las alteraciones ultraestructurales primarias de las cilias del epitelio respiratorio bronquial de los dos pacientes del presente estudio fueron: ausencia de ambos brazos de dineína (21%), ausencia del brazo de dineína interno (17%), transposición de dobletes periféricos (12%), presencia de dobletes supernumerarios (9%), dobletes incompletos (5%) compatibles con las alteraciones descritas en la DCP (Fig. 2).

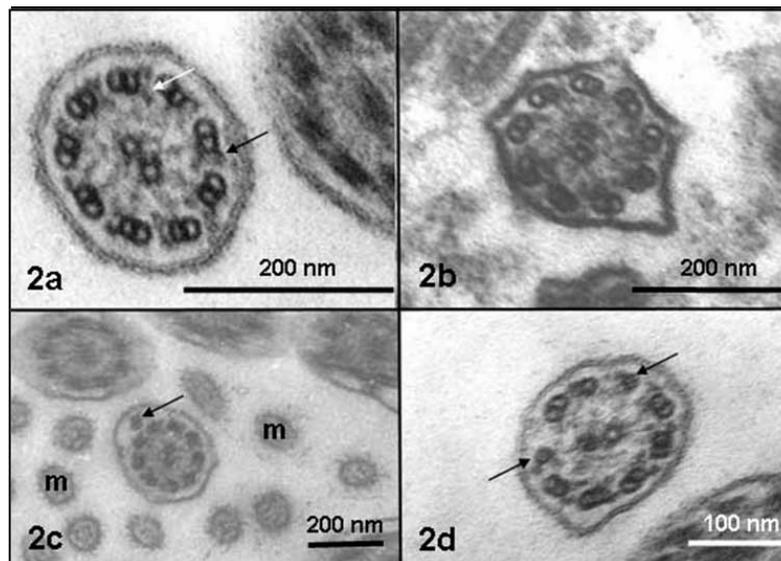


Fig. 2: Imágenes de campo claro de MET donde se presenta la ultraestructura ciliar normal y algunas alteraciones ciliares primarias del epitelio respiratorio bronquial. 2a. Corte transversal de una cilia normal. Las flechas señalan los brazos de dineína externos e internos. 2b. Cilias de un paciente con DCP. Los brazos de dineína internos y externos están ausentes. 2c. Cilias con un par de dobletes localizado en el exterior del axonema (flecha). m: microvellosidades.

También se observaron alteraciones ciliares inespecíficas [fusión ciliar (5%), ciliadas múltiples (7%), hernias de membrana (8%) y ausencia de membrana plasmática (3%)] compatibles con el diagnóstico de DCS (Figura 3).

CONCLUSIONES

En la DCP la alteración más frecuente es la deficiencia en los brazos de dineína [17], tal como lo hemos observado en los dos casos estudiados. También son frecuentes las alteraciones ciliares adquiridas, de ahí la importancia de la cuantificación de las alteraciones halladas, por lo que deben contarse 100 ciliadas [18,19]. Para confirmar el diagnóstico de DCP debe observarse alguna de las alteraciones morfológicas descritas, al menos, en un 50-

60% de las ciliadas estudiadas [20]. En nuestro estudio se observó que el 64% del total de los cortes transversales de las ciliadas examinadas en ambas muestras, presentaba alteraciones ultraestructurales que se correspondían con las clásicamente descritas en la DCP (ausencia de uno o ambos brazos de dineína, transposición de dobletes periféricos, presencia de dobletes supernumerarios, dobletes incompletos), mientras que un 26% presentaban anomalías atípicas compatibles con la DCS (hernias de membrana, ciliadas múltiples, fusión ciliar, ausencia de membrana plasmática). Estos hallazgos son concordantes con los comunicados por De Scally y col. [11], quienes describieron el primer caso de DCP registrado en Sudáfrica en un perro de la raza bull terrier.

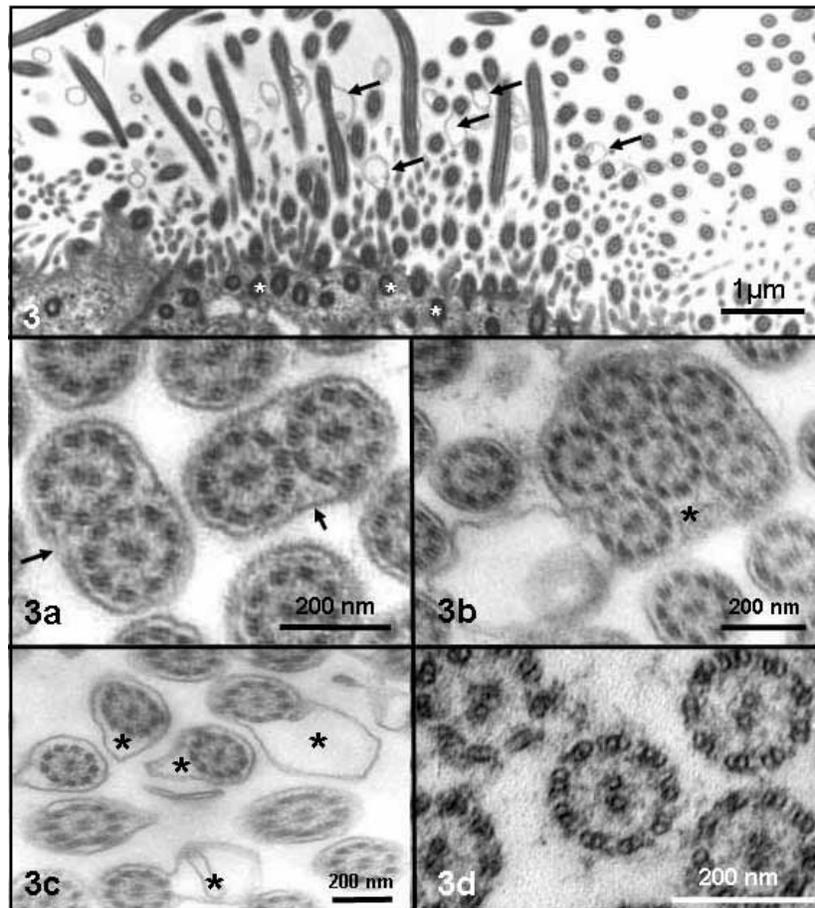


Fig. 3: Imagen del epitelio respiratorio bronquial donde se observan algunas alteraciones ciliares secundarias, tales como hernias de membrana (flechas). Note la presencia de corpúsculos basales (*). Las Fig. 3a-d ilustran alteraciones ciliares secundarias: Fig. 3a: fusión ciliar (flechas); Fig. 3b: ciliadas múltiples (*); Fig. 3c: ciliadas con hernias de membrana (*). La Fig. 3d muestra ciliadas carentes de membrana plasmática y en las que se observa la exposición del axonema ciliar.

Moya y col. [15] destacan la importancia de realizar una fibrobroncoscopia en los casos sospechosos de DCP, ya que esta técnica permite obtener una muestra adecuada para confirmar la sospecha diagnóstica.

La microscopía electrónica de transmisión también es una parte importante del diagnóstico de la DCP [12]. Si bien algunos investigadores prefieren realizar el examen ultraestructural a partir de una muestra de mucosa nasal, nosotros preferimos utilizar una muestra de mucosa bronquial. Según Ghadially [21] las muestras de mucosa nasal no son las mejores cuando el propósito es realizar el diagnóstico ultraestructural de la DCP. Se fundamenta en que las alteraciones de la mucosa nasal a nivel ciliar, podrían ser más bien de tipo secundario y no genético, ya que el epitelio nasal constituye la primera barrera de defensa frente a las infecciones o a las condiciones adversas del medio ambiente, lo que induciría cambios en la estructura ciliar.

Si bien el examen ultraestructural de las cilias no puede plantearse como un examen de rutina, debería estar indicado en los pacientes portadores de afecciones respiratorias crónicas severas carentes de diagnóstico etiológico [6]. Además, las alteraciones ultraestructurales en las cilias pueden ser primarias y secundarias, siendo vital diferenciarlas para elegir el tratamiento más apropiado. Por eso se recomienda repetir la toma de muestra en períodos diferentes e incluso de zonas distintas, para obtener una información más consistente [22, 23, 24].

La curación de la DCP no es posible pero el diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado podrían mejorar el pronóstico y reducir considerablemente la morbilidad [20].

Concluimos que se pudieron diagnosticar dos casos de DCP mediante microscopía electrónica, se aportaron datos significativos sobre la estructura ciliar y se distinguieron las alteraciones ciliares primarias de los defectos no específicos.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo se contó con la colaboración del Ht. Silvio Igal del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

REFERENCIAS

- [1] Edwards D., Patton C., Kennedy J. (1992) "Primary ciliary dyskinesia in the dog". *Probl Vet Med* 4 (2):291-319.
- [2] Kartagener M. (1933) "Pathogenesis of bronchiectasis in the *situs inversus viscerum*". *Beitr Klin Tuberk* 83: 489-501.
- [3] Eliasson R., Mossberg B., Camner P., Afzelius B. (1977) "The immotile cilia syndrome". *N Engl J Med* 297: 1-6.
- [4] Rossmann C., Lee R., Forrest J., Newhouse M. (1980) "The dyskinetic cilia syndrome". Ciliary motility in immotile cilia syndrome. *Chest* 78: 580-582.
- [5] Sleight M. (1981) "Primary ciliary dyskinesia". *Lancet* 2: 476.
- [6] Brauer M., Vietro L. (2003) "Aportes de la microscopía electrónica de transmisión al diagnóstico de la disquinesia ciliar". *Rev Med Uruguay* 19: 140-148.
- [7] Killingsworth C., Slocombe R., Wilsman N. (1987) "Immotile cilia syndrome in an aged dog". *J Am Vet Med Assoc.* 190 (12): 1567-71.
- [8] Morrison W., Wilsman N., Fox L., Farnum C. (1987) "Primary ciliary dyskinesia in the dog". *J Vet Intern Med.* 1 (2): 67-74.
- [9] Dhein C., Prieur D., Riggs M., Potter K., Widders P. (1990) "Suspected ciliary dysfunction in Chinese Shar Pei pups with pneumonia". *Am J Vet Res* 51 (3): 439-46.
- [10] Watson E., Herrtage M., Peacock M., Sargan D. (1999) "Primary ciliary dyskinesia in Newfoundland dogs". *Vet Rec.* 144 (26): 718-25.

- [11] de Scally M., Lobetti R., Van Wilpe E. (2004) "Primary ciliary dyskinesia in a Staffordshire bull terrier". *J S Afr Vet Assoc* 75 (3): 150-2.
- [12] Roomans G., Ivanovs A., Shebani E., Johannesson M. (2006) "Transmission Electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia". *Upsala J Med Sci* 11 (1): 155-168.
- [13] Cowan M., Gladwin M., Shelhamer J. (2001) "Disorders of ciliary motility". *Am J Med Sci* 321:3-10.
- [14] Bisgrove B., Yost H. (2006) "The roles of cilia in developmental disorders and disease". *Development* 133: 4131-4143.
- [15] Moya G., Caussade S., González S., Navarro H., Sánchez I. (1999) "Disquinesia ciliar primaria. Experiencia en 6 pacientes". *Rev. Méd. Chile* 127 (8): 961-966.
- [16] Melgarejo Moreno P., Galindo Ortego X., Marqués Amat L., Torres Cortada G., Hellin Meseger D., García González B. (2004) "Alteración ciliar con ausencia de los brazos de dineína en el síndrome de Kartagener". *Acta Otorrinolaringol Esp* 55: 145-147.
- [17] Pedersen M., Rebbe H. (1975) "Absence of arms in the axonema of immobile human spermatozoa". *Biol reprod* 12: 541-544.
- [18] Armengot M., Juan G., Barona R., Garin L., Basterra J. (1994) "Immotile cilia syndrome: nasal mucociliary function and nasal ciliary abnormalities". *Rhinology* 32: 109-111.
- [19] Rubin E. (1988) "Immotile cilia syndrome. (primary ciliary dyskinesia) and inflammatory lung disease". *Clin Chest Med* 9: 657-668.
- [20] Busquets Monge R., García López A., Esteban Torné E., Herrero Pérez S., Bargues Cardelus R., Lloreta Trull J. (2001) "Discinesia ciliar primaria: tres nuevos casos". *Anales de Pediatría*. 54 (5): 513 - 517
- [21] Ghadially F. (1997) "*Ultrastructural pathology of the cell and matrix*". Boston, Butterworth-Heinemann, 4th ed. pp: 1176-1214
- [22] Senent Sánchez C., Piris Pinilla M., González Gutiérrez M., Panadero Sevilla P., Menéndez Lozano A. (1990) "Procedimientos diagnósticos en la discinesia ciliar primaria. Utilidad de la biopsia nasal". *Rev Clin Esp* 187: 263-268.
- [23] Mierau G., Agostini R., Beals T., Carlen B., Dardick I., Henderson D., Pysker T., Weeks D., Yowell R. (1992) "The role of electron microscopy in evaluating ciliary dysfunction: report of a workshop". *Ultrastructural Pathology* 16: 245-254.
- [24] Sauret Valet J., Gómez Iglesias J., Romero Plaza A., Tárrega Camarasa J. (1998) "*Manual de neumología y cirugía torácica*" Madrid, Editores Médicos, pp: 709-716.