



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES
DIAGNÓSTICAS DE DISQUINESIA CILIAR PRIMARIA EN
BIOPSIAS BRONQUIALES**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE

**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

Dra. Ericka Sagrario Peña Mirabal

Director: Dr. Luis Felipe Jiménez García



México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES DIAGNÓSTICAS DE DISQUINESIA CILIAR PRIMARIA EN BIOPSIAS BRONQUIALES

AUTORES

ALUMNA

Dra. Ericka Sagrario Peña Mirabal
Medico Adscrito al Servicio de Anatomía Patológica
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"
Calzada de Tlalpan 4502 sección XVI, Tlalpan D. F.
Teléfono 54871700 ext. 5169, Correo Electrónico sagrario99@hotmail.com

TUTOR DE TESIS

Dr. Francisco José Trigo Tavera
Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F.
Teléfono 5622-5883, Correo Electrónico trigo@servidor.unam.mx

CO-TUTOR DE TESIS

MC. Daniel Carrasco Daza
Patologo Pediatra, Jefe de Patología del Instituto Nacional de Pediatría
Insurgentes Sur 3700, Letra C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, México D. F.
Teléfono 1084-0900, Correo Electrónico d_carrasco@yahoo.com

**FACULTAD DE CIENCIAS
Ciudad Universitaria**

México D.F.

2011

INDICE

RESUMEN

1	INTRODUCCIÓN.....	5
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
3	JUSTIFICACION.....	7
4	HIPOTESIS.....	7
5	OBJETIVOS.....	7
5.1.	General.....	7
5.2.	Específico.....	7
6	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
7	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	7
8	MATERIALES Y MÉTODOS	8
9	LIMITANTES DEL ESTUDIO.....	8
10	RESULTADOS.....	8
11	CONSIDERACIONES.....	9
12	ANEXOS.....	10
12.1	Figura 1.....	10
12.2	Imágenes.....	11
12.2.1	Electronfotografía de epitelio bronquial.....	11
12.2.2	Electronfotografía de cilios múltiples.....	12
12.2.3	Electronfotografía de cilios con alteraciones.....	13
12.2.3	Electronfotografía de aplasia ciliar.....	14
12.3	Tabla 1.....	15
13	BIBLIOGRAFÍA.....	16

RESUMEN

INTRODUCCION. 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. 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 hombre y el oviducto en la mujer [12]. Además, este defecto congénito está asociado a la alteración de las colas de los espermatozoides.

OBJETIVO. Presentar 3 casos con sospecha clínica fundada de disquinesia ciliar primaria en el que se analiza la ultraestructura ciliar para correlacionar la disfuncionalidad con las alteraciones estructurales.

MATERIAL Y METODOS. Las muestras de mucosa bronquial se obtuvieron mediante procedimiento broncoscópico y se fijaron por inmersión 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 tetraóxido 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 Epon. Los cortes ultrafinos (70 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 10 cilios cortados transversalmente.

RESULTADOS. En este estudio se encontraron 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.

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 ciliadas¹.

En 1975, se presentan los primeros casos que relacionaban la esterilidad masculina con alteraciones en el flagelo espermático^{3,4}. Estos estudios pioneros mostraron que estos pacientes, además de ser infértiles, poseían una historia de infecciones auditivas y respiratorias recurrentes, y en algunos casos presentaban las manifestaciones clínicas de la denominada tríada de Kartagener (sinusitis, bronquiectasias y *situs inversus*). Estudios posteriores demostraron que estos individuos tenían un transporte mucociliar deficiente⁵ y que sus cilios mostraban alteraciones microanatómicas que sólo eran visibles bajo el microscopio electrónico de transmisión^{6,7}.

En 1977, Eliasson y colaboradores⁸ denominaron como síndrome de inmovilidad ciliar al defecto congénito de cilios y flagelos causante de la infección recurrente de las vías auditivo-respiratorias y la infertilidad masculina. Actualmente, este nombre ha sido cambiado por el de síndrome de disquinesia ciliar, al comprobarse que en algunos casos los cilios defectuosos son capaces de moverse, aunque lo hacen en una forma no coordinada o disquinética^{9,10}. Así, el síndrome de disquinesia ciliar primaria se define actualmente como una enfermedad de origen genético, generalmente autosómico y recesivo^{11,12} que agrupa una variedad heterogénea de condiciones patológicas caracterizadas por alteraciones funcionales o estructurales, o ambas, en los cilios^{2,13,14}. Clásicamente se estimó que esta enfermedad afectaba a uno de entre 15.000 y 30.000 individuos, pero actualmente se cree que su prevalencia está subestimada aún en los países desarrollados y que existe un alto número de pacientes no diagnosticados^{2,14,15}. Esto se debe a que, si bien los primeros síntomas de la enfermedad se presentan durante el período neonatal, existen variaciones en la forma y edad de presentación, por lo que su diagnóstico se ve frecuentemente postergado¹².

En 1981, Sleight⁵ propuso usar el término con el que se la conoce actualmente de “disquinesia ciliar primaria” (DCP) para denotar la alteración ultraestructural congénita de los cilios. Al mismo tiempo, propuso el término de “disquinesia ciliar secundaria” (DCS) para describir los defectos de la ultraestructura ciliar adquirida. Estas alteraciones secundarias son causadas por las propias infecciones bacterianas o virales, por micoplasma y por agentes ambientales irritantes, tales como el humo del tabaco y la contaminación ambiental. Las mismas pueden aparecer en

forma aislada o asociadas con las determinadas genéticamente, llegando en algunos casos a afectar la integridad del epitelio respiratorio.

El diagnóstico precoz de la disquinesia ciliar primaria ha mostrado ser crucial para disminuir la morbimortalidad de estos pacientes y mejorar sustancialmente su calidad de vida^{2,14,18,19}.

Actualmente se acepta que el tratamiento de esta enfermedad requiere de una rigurosa fisioterapia pulmonar, antibioticoterapia profiláctica o patógeno específica contra los patógenos respiratorios que pueden encontrarse en la comunidad^{18,19}. Los estadios tardíos de la enfermedad pueden llegar a requerir cirugía para eliminar las bronquiectasias, llegándose al trasplante pulmonar en los casos terminales^{1,20}.

La DCP afecta a los epitelios ciliados del tracto respiratorio superior e inferior, senos paranasales, oído medio, recubrimiento ependimal del cerebro, el conducto deferente y salpinge¹². Además, este defecto congénito está asociado a la alteración de las colas de los espermatozoides¹³.

En el tracto respiratorio, los cilios se encuentran en las células epiteliales de revestimiento de la mucosa de las vías aéreas. Cada cilio está formado 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 axonema⁶. El axonema se continúa, 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 ATPasa¹⁴.

La alteración ultraestructural de los cilios 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 ciliar⁶. La ausencia o ineficacia de la actividad ciliar interfiere en la eliminación de las bacterias predisponiendo a las infecciones bronquiales y sinusales de repetición, afectándose además el desplazamiento visceral durante la embriogénesis, responsable del situs inversus, que solo en la mitad de los casos estará presente³.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la prevalencia de la enfermedad y que existe un alto número de pacientes no diagnosticados. Se debe contar con una herramienta útil que lleve a un diagnóstico oportuno para disminuir la morbilidad de los pacientes.

JUSTIFICACIÓN

La microscopía electrónica de transmisión puede ayudar en el diagnóstico precoz de la DCP y ha mostrado ser crucial para disminuir la morbimortalidad de estos pacientes, mejorando sustancialmente su calidad de vida.

HIPOTESIS

La microscopía electrónica de transmisión es una herramienta útil y confiable, para el diagnóstico de la disquinesia ciliar primaria

OBJETIVO GENERAL

Realizar el diagnóstico de DCP en pacientes con bronquiectasias y describir las alteraciones morfológicas de los cilios del epitelio bronquial

OBJETIVO ESPECIFICO

Discutir la utilidad de la microscopía electrónica como herramienta para el diagnóstico de la disquinesia ciliar primaria

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Básica, descriptiva y transversal

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes portadores de enfermedades auditivo-respiratorias crónicas, carentes de diagnóstico etiológico, que fueron remitidos por neumólogos pediatras para biopsia bronquial

MATERIAL Y MÉTODOS

- Las muestras de mucosa bronquial se obtuvieron mediante procedimiento broncoscópico y se fijaron por inmersión 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 tetraóxido 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 Epon.
- Los cortes ultrafinos (70nm) se contrastaron con acetato de uranilo acuoso y alcohólico y citrato de plomo
- Los cortes fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL).
- La ultraestructura ciliar fue evaluada sobre un mínimo de 10 y un máximo de 100 cilios en corte perfectamente transversal por paciente.

LIMITANTES DEL ESTUDIO

Por razones académicas, el presente trabajo corresponde a una serie de casos.

RESULTADOS

Se realizó el estudio ultraestructural de tres pacientes pediátricos con edades de 3 a 6 años, y cuadro respiratorio, que incluyó neumonías bacterianas recidivantes, bronquiectasias (diagnosticadas por radiografía común y confirmadas por tomografía axial computarizada [TAC] de alta resolución), bronquitis, rinitis, otitis y asma.

La microscopía electrónica de las biopsias bronquiales (imagen 1), demostró en los tres casos, cilios compuestos (imagen 2), cilios con pérdida de brazos externos o internos de dineína (imagen 3), ausencia casi absoluta de los radios intertubulares, así como fusión ciliar. En uno de los cortes se identifica ausencia de axonemas con aplasia ciliar (imagen 4).

En los tres casos, también se identificaron escasos cilios normales.

CONSIDERACIONES

De acuerdo a la clasificación de Barlocco (Tabla 1) nuestros pacientes muestran una gran variedad de alteraciones, incluyendo un porcentaje bajo de cilios normales. Se requiere ampliar el número de muestra para integrar una correlación morfológica y clínica.

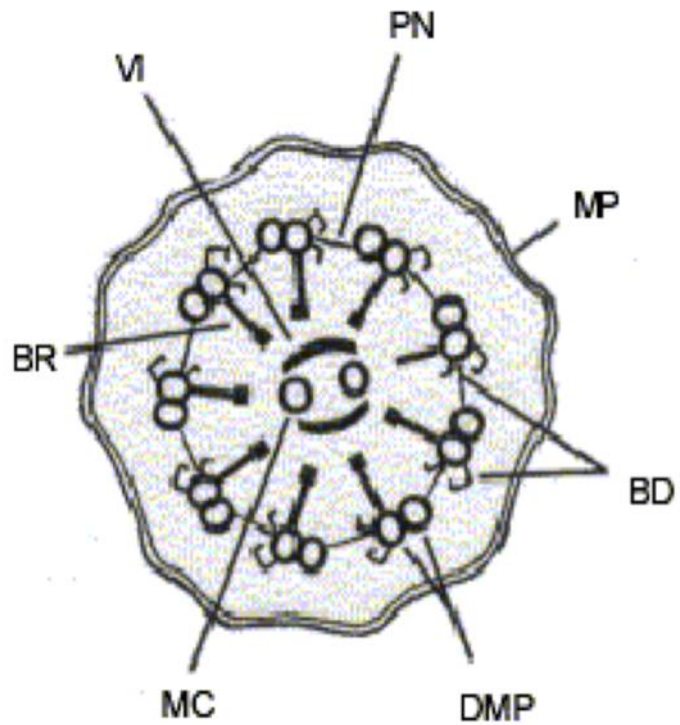
La microscopía electrónica demostró ser una herramienta útil en el diagnóstico de disquinesia ciliar, si bien no puede plantearse como un examen de rutina, si debe estar indicado en todos los pacientes con cuadro respiratorio recurrente y resistente a tratamiento.

Según algunos autores⁷ el porcentaje de cilios anormales en la DCP oscila entre el 7 y el 34% frente a los controles normales que presentan un 1%, siendo las alteraciones patognomónicas la transposición de los microtúbulos o el defecto en las espículas radiadas. Tal y como se observó en nuestros pacientes, es frecuente la existencia de un número normal de cilios en las células de la mucosa bronquial, así como la pérdida de los brazos de dineína internos y/o externos, habiéndose descrito con frecuencia una localización anómala de los microtúbulos centrales, un número anormal de los dobletes de los microtúbulos y alteraciones en la orientación ciliar⁸⁻¹⁰.

ANEXOS

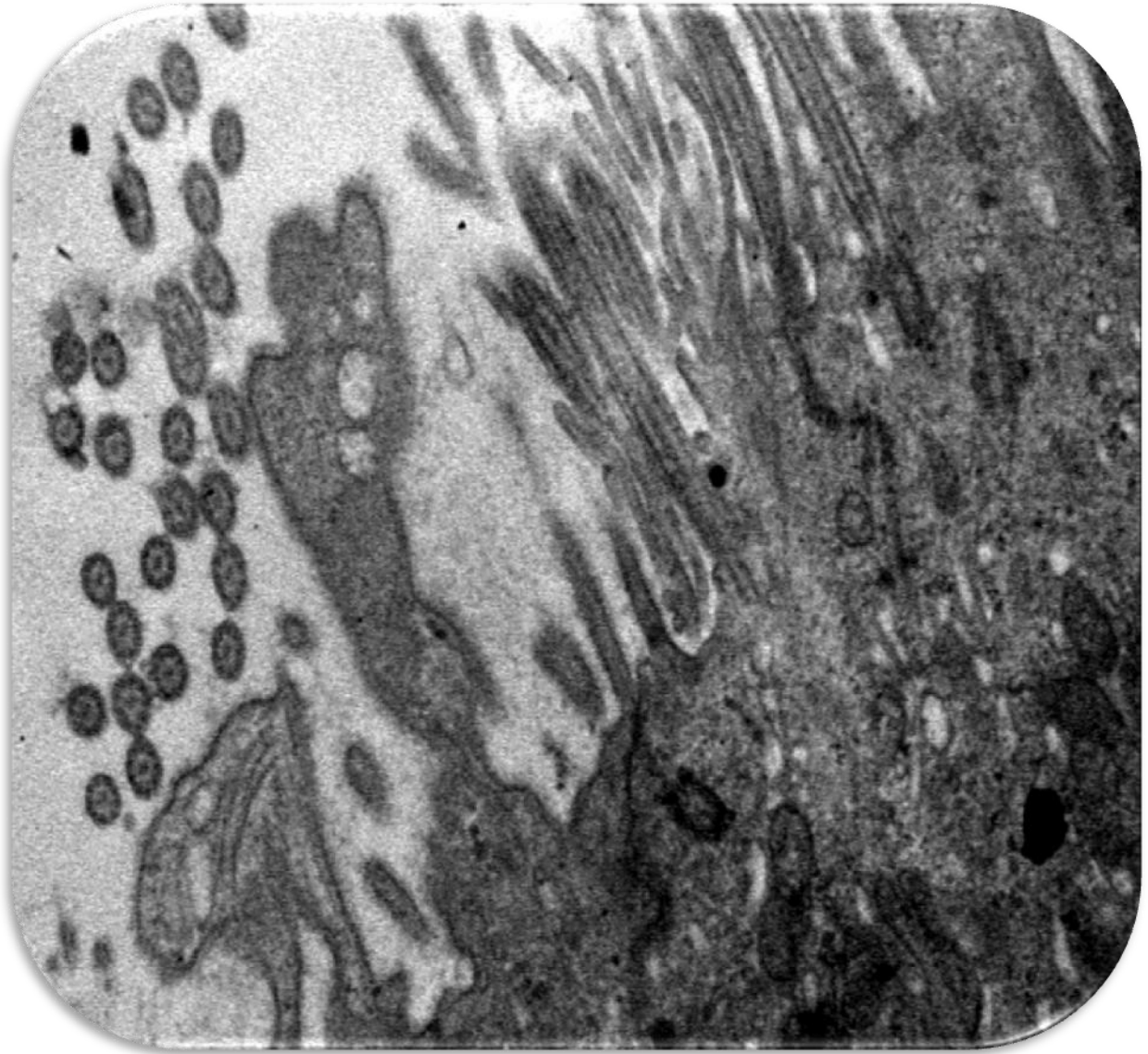
FIGURA 1

MP: Membrana
Plasmática Celular
BD: Brazos de Dineína
Internos y Externos
BR: Brazos Radiales
DMP: Dobletes de Micro
Túbulos Periféricos
MC: Micro Túbulos
Centrales
PN: Puentes de Nexina
VI: Vaina Interna



IMÁGENES

1.

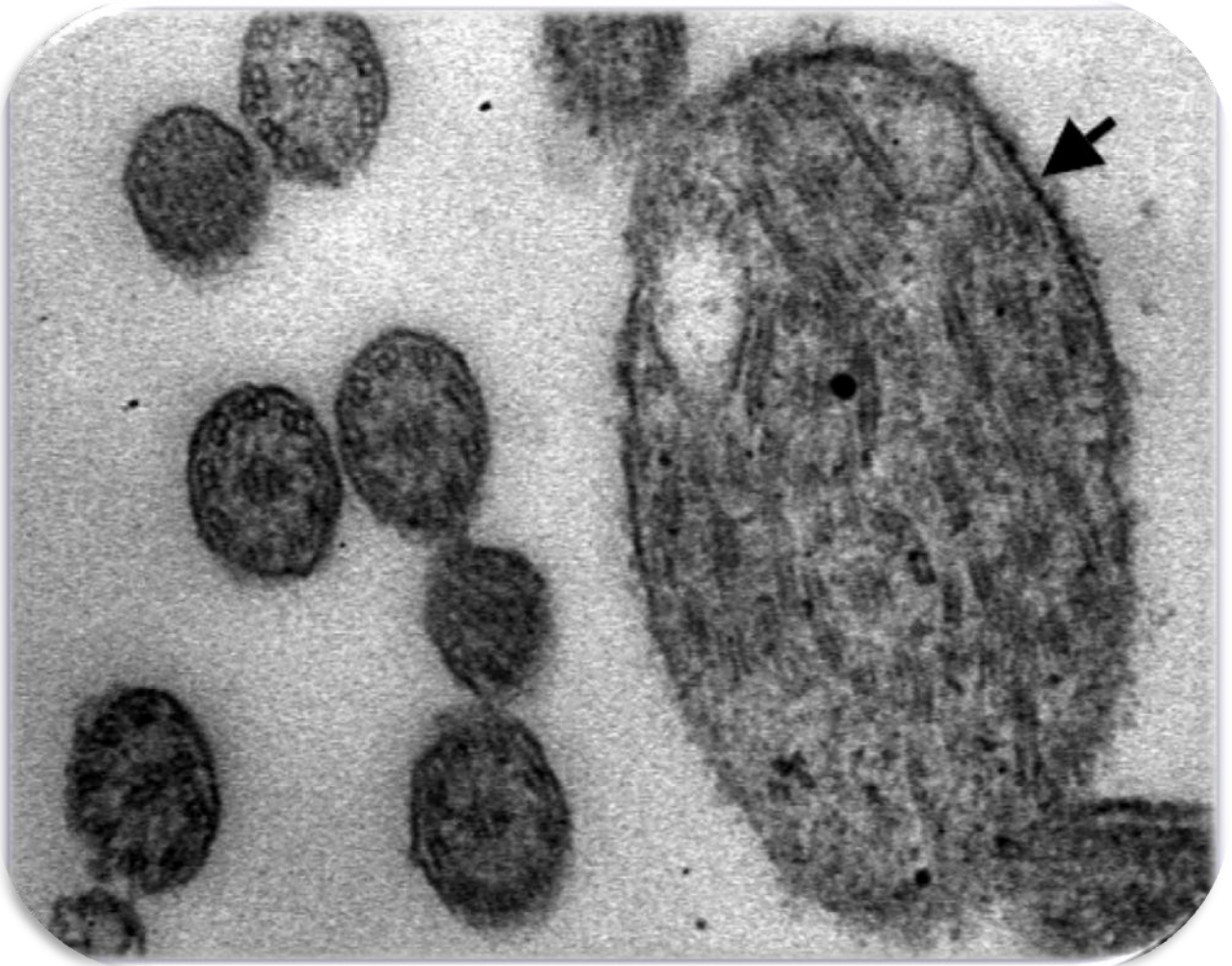


ELECTRONFOTOGRAFÍA DE EPITELIO BRONQUIAL.

AUMENTO 15,000x.

IMÁGENES

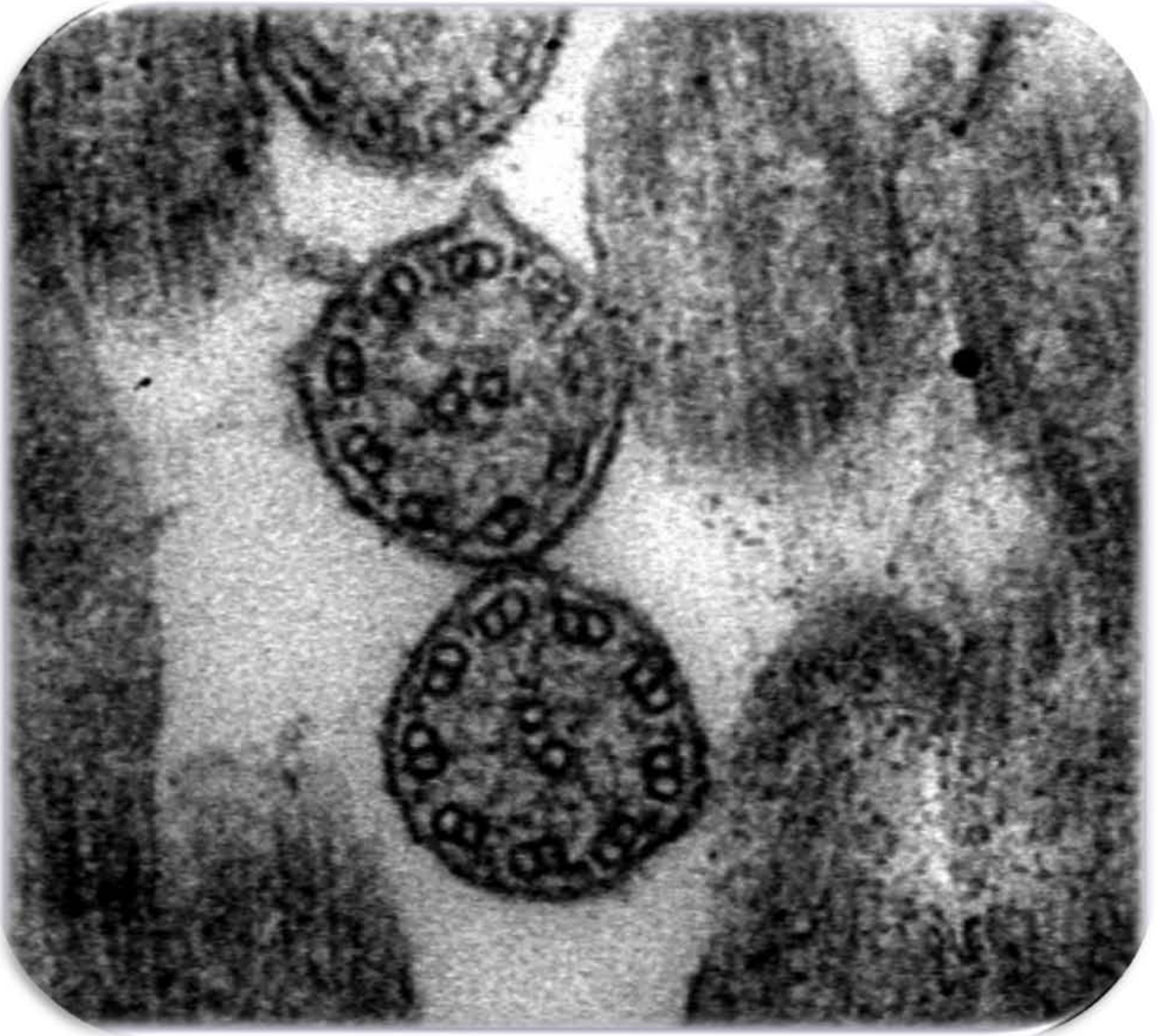
2.



ELECTRONFOTOGRAFÍA QUE MUESTRA CILIOS MULTIPLES (FLECHA).
AUMENTO 15,000x.

IMÁGENES

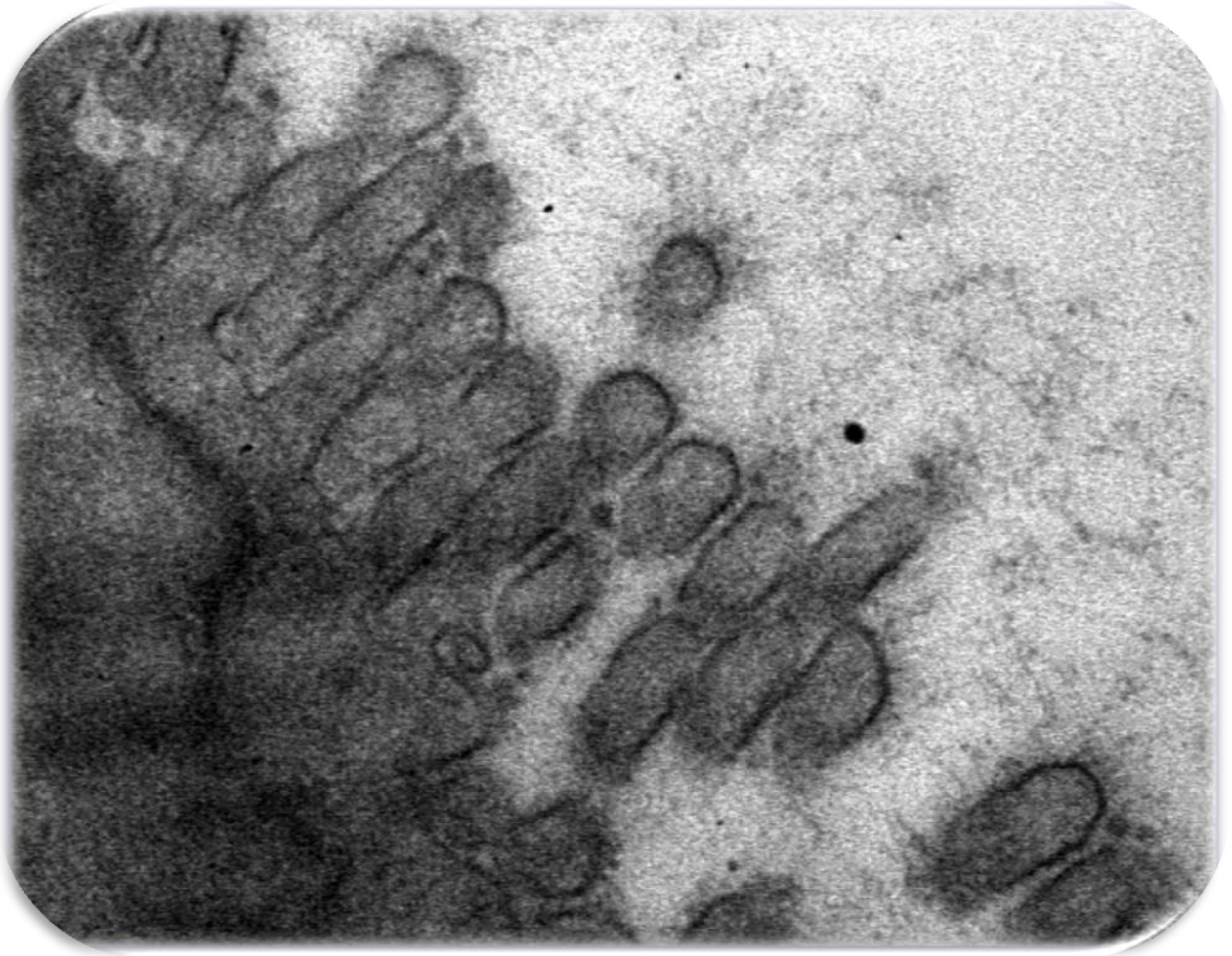
3.



ELECTRONFOTOGRAFÍA QUE MUESTRA CILIOS CON ALTERACIONES EN LOS BRAZOS DE DINEÍNA. AUMENTO 120,000x.

IMÁGENES

4.



ELECTRONFOTOGRAFÍA QUE MUESTRA APLASIA CILIAR CON AUSENCIA DE AXONEMAS. AUMENTO 50,000x.

TABLA I

Clasificación de las alteraciones ciliares. Modificada de Barlocco y colaboradores, 1991

DISQUINESIA TIPO I

Deficiencia, ausencia o alteraciones en los brazos de dineína. Se consideraron patológicos los valores medios inferiores a 3.5 brazos de dineína internos y 7.0 brazos de dineína externos por corte transversal de cilio

DISQUINESIA TIPO II

Alteraciones en los brazos radiales.

DISQUINESIA TIPO III

Alteraciones en los microtúbulos. Transposición de dobletes periféricos a posición central, presencia de dobletes o microtúbulos supernumerarios, ausencia de dobletes o microtúbulos

DISQUINESIA TIPO IV

Ausencia de axonema en la vaina ciliar (cilios aplásicos)

DISQUINESIA TIPO V

Alteraciones ciliares inespecíficas: fusión ciliar, cilios múltiples, hernias de membrana, ausencia de membrana plasmática.

DISQUINESIA TIPO VI

Ausencia de cilios y corpúsculos basales en las células epiteliales.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Kartagener M. (1933) "Pathogenesis of bronchiectasis in the *situs inversus viscerum*". *Beitr Klin Tuberk* 83: 489-501.
- [2] Eliasson R., Mossberg B., Camner P., Afzelius B. (1977) "The immotile cilia syndrome". *N Engl J Med* 297: 1-6.
- [3] Rossman C., Lee R., Forrest J., Newhouse M. (1980) "The dyskinetic cilia syndromee". Ciliary motility in immotile cilia syndrome. *Chest* 78: 580-582.
- [4] Sleight M. (1981) "Primary ciliary dyskinesia". *Lancet* 2: 476.
- [5] Brauer M., Viettro L. (2003) "Aportes de la microscopía electrónica de transmisión al diagnóstico de la disquinesia ciliar". *Rev Med Uruguay* 19: 140-148.
- [6] 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.
- [7] Cowan M., Gladwin M., Shelhamer J. (2001) "Disorders of ciliary motility". *Am J Med Sci* 321:3- 10.
- [8] Bisgrove B., Yost H. (2006) "The roles of cilia in developmental disorders and disease". *Development* 133: 4131- 4143.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Pedersen M., Rebbe H. (1975) "Absence of arms in the axonema of immobile human spermatozoa". *Biol reprod* 12: 541-544.
- [12] Armengot M., Juan G., Barona R., Garin L., Basterra J. (1994) "Immotile cilia syndrome: nasal mucociliary function and nasal ciliary abnormalities". *Rhinology* 32: 109-11.

- [13] Rubin E. (1988) "Immotile cilia. syndrome. (primary ciliary dyskinesia) and inflammatory lung disease". *Clin Chest Med* 9: 657-668.
- [14] 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
- [15] Ghadially F. (1997) "*Ultrastructural pathology of the cell and matrix*". Boston, Butterworth- Heinemann, 4th ed. pp: 1176-1214
- [16] 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.
- [17] 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 disfunction: report of a workshop". *Ultrastructural Pathology* 16: 245-254.
- [18] 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.
- [19] Afzelius BA. Immotile cilia syndrome: past, present and prospect future. *Thorax* 1998; 53: 894-7.3.
- [20] Pedersen M, Rebbe H. Absence of arms in the axoneme of immobile human spermatozoa. *Biol Reprod* 1975; 12: 541-4. 4.
- [21] Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O, Lindhomer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J CellBiol* 1975; 225-32.
- [22] Barlocco EG, Valleta EA, Canciani M, Lungarella G, Gardi C, De Santi MM, et al. Ultrastructural ciliary defects in children with recurrent infections of the lower respiratory tract. *Pediatr Pulmonol* 1991; 10: 11-7.
- [23] Escudier E, Escalier D, Pinchon MC, Boucherat M, Bernaudin JF, Fleury-Feith. Dissimilar expression of axonemal anomalies in respiratory cilia and sperm flagella in infertile men. *Am Rev Resp Dis* 1990; 142: 674-9.