



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA DALBO CONTRERA TORO

**AVALIAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA, DO TESTE DA SACARINA,
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GENÉTICAS EM PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA**

*EVALUATION OF ELECTRONIC MICROSCOPY, SACCHARIN TEST, CLINICAL AND
GENETIC CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH PRIMARY CILIARY DYSKINESIA
CLINICAL DIAGNOSIS*

CAMPINAS

2021

MARIANA DALBO CONTRERA TORO

AVALIAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA, DO TESTE DA SACARINA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E GENÉTICAS EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA

EVALUATION OF ELECTRONIC MICROSCOPY, SACCHARIN TEST, CLINICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH PRIMARY CILIARY DYSKINESIA CLINICAL DIAGNOSIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas in partial of the requirements for master's degree in sciences, in the area of Child and Adolescent Health

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro

COORIENTADORA: Profa. Dra. Eulália Sakano

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Mariana Dalbo Contrera Toro, e orientado pelo Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T634a Toro, Mariana Dalbo Contrera, 1989-
Avaliação da microscopia eletrônica, do teste da sacarina, características clínicas e genéticas em pacientes com diagnóstico clínico de discinesia ciliar primária / Mariana Dalbo Contrera Toro. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: José Dirceu Ribeiro.
Coorientador: Eulália Sakano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transtornos da motilidade ciliar. 2. Microscopia eletrônica de transmissão. 3. Mucosa nasal. 4. Diagnóstico clínico. 5. Sacarina. I. Ribeiro, José Dirceu, 1952-. II. Sakano, Eulália, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of electronic microscopy, saccharin test, clinical and genetic characteristics in patients with primary ciliary dyskinesia clinical diagnosis

Palavras-chave em inglês:

Ciliary Motility Disorders

Microscopy, Electron, Transmission

Nasal mucosa

Clinical diagnosis

Saccharin

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

José Dirceu Ribeiro [Orientador]

Paulo de Tarso Roth Dalcin

Wilma Terezinha Anselmo-Lima

Data de defesa: 15-09-2021

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8294-3698>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2097279693750473>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
MARIANA DALBO CONTRERA TORO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). EULALIA SAKANO

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). JOSÉ DIRCEU RIBEIRO**
- 2. PROF(A). DR(A). WILMA TEREZINHA ANSELMO-LIMA**
- 3. PROF(A). DR(A). PAULO DE TARSO ROTH DALCIN**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: 15/09/2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus Mestres, José Dirceu Ribeiro e Eulália Sakano, por me guiarem nessa jornada e tão generosamente compartilharem sua vasta sabedoria.

Ao Prof. Dr. Marcus Hebert Jones que, com apoio da CNPq, permitiu o financiamento para que toda a análise genética fosse realizada para o segundo artigo.

A todos os pacientes envolvidos nessa pesquisa pela paciência, coragem e disponibilidade. A minha eterna gratidão por terem me ensinado tanto ao longo desses últimos 7 anos.

Aos meus colegas rinologistas, Fernanda Cunha, Marcelo Antônio, Marcelo Sampaio e Thiago Serrano, pela parceria e excelência na dedicação à profissão.

Aos residentes e fellows dos serviços de otorrinolaringologia e pneumopediatria que contribuíram com imensa dedicação ao cuidado dos pacientes.

A equipe de enfermagem do ambulatório de otorrinolaringologia do HC-UNICAMP que forneceu todo o apoio necessário durante a realização desse projeto.

A Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani pela contribuição e colaboração no departamento de Anatomia patológica e uso do microscópio eletrônico de transmissão do HC-UNICAMP.

A Mayara Rodrigues Linares Silva, pela confecção das telas de microscopia eletrônica, disponibilidade e apoio em todas as etapas da análise.

Agradeço também o acesso aos equipamentos e a assistência provida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia (LME/UNICAMP).

A Dra. Erica Ortiz por me ensinar a avaliar a ultraestrutura ciliar além de ser um grande exemplo de otorrinolaringologista, cirurgiã e pesquisadora e a Dra. Laiza Mohana Duarte que iniciou o projeto em 2012 e confiou em mim, ainda como residente, em 2015 para levá-lo a diante.

Ao Dr. Fernando Augusto Lima Marson pela contribuição na análise genética dos pacientes, revisão dos artigos e parceria científica nesse período.

Às professoras Dra. Milena Baptistella Grotta e Dra. Rebecca Maunsell, pelas contribuições e sugestões realizadas na qualificação do meu mestrado.

Ao Dr. Lucas Augusto Monteiro Trigo, pela amizade e pelos ensinamentos sobre estatística no período do mestrado.

Aos meus amigos queridos que me deram força para continuar trazendo alegria nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus irmãos Pedro e Eduardo, e minhas cunhadas Fernanda e Sarah, que me apoiaram em todas as ocasiões, acreditando sempre no meu potencial.

Aos meus avôs Fermin e Agenor, que sempre torceram e comemoraram todas as minhas realizações.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ivan e Adyléia, meu porto-seguro nos dias de sol e de tormenta, que me ensinaram tudo sobre a vida, o amor e a medicina.

Ao meu futuro marido Vinícius, pelo amor incondicional e parceria para todos os momentos.

À minha avó Diva, cuja sabedoria me guiou a entender que a jornada é mais importante que o destino, e a minha avó Alayr que mostrou que não há limites para as conquistas das mulheres.

EPÍGRAFE

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro”

Fernando Sabino (O Encontro Marcado)

RESUMO

Introdução: A presente dissertação foi realizada segundo as normas do curso de pós-graduação da FCM/Unicamp. Foram apresentados e discutidos dois artigos: Artigo 1: “*Saccharin transit time test for primary ciliary dyskinesia: did we discard this tool too soon?*” e Artigo 2: “*Challenges in Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia in a Brazilian Tertiary Hospital*”. A discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença genética cujas alterações na ultraestrutura ciliar e função ciliar cursam com repercussões clínicas importantes. Devido a ampla variabilidade de fenótipos e genótipos e por não existir um teste padrão ouro, ainda há grande dificuldade na confirmação diagnóstica dessa doença. **Objetivos:** **Artigo 1:** O objetivo deste estudo foi comparar as alterações na microscopia eletrônica (MET) com variáveis clínicas e teste da sacarina em indivíduos com diagnóstico clínico de DCP. **Artigo 2:** O objetivo deste estudo foi descrever os achados clínicos e as alterações nas ferramentas diagnósticas (MET, genética e questionários clínicos) em indivíduos com suspeita clínica de DCP em um Hospital Terciário Brasileiro. **Método:** **Artigo 1:** Estudo prospectivo observacional foi realizado no ambulatório de otorrinolaringologia no período de agosto de 2012 a abril de 2021. Foram avaliados os pacientes do grupo controle e do grupo DCP. Esses pacientes foram submetidos aos questionários de triagem clínica PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule) e American Thoracic Society, endoscopia nasal, teste do tempo de trânsito da sacarina e biópsia nasal para análise em microscopia eletrônica. **Artigo 2:** Foi realizado um estudo observacional e prospectivo com indivíduos durante o acompanhamento no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-Unicamp) por suspeita clínica de DCP. Os pacientes foram avaliados entre 2011 e 2021 e submetidos a questionários clínicos, MET e análises de variantes genéticas. Esses pacientes foram classificados de acordo com o grau de suspeita de DCP. **Resultados:** **Artigo 1:** foram avaliados 34 pacientes com diagnóstico clínico de DCP e 36 controles. As alterações clínicas mais prevalentes foram pneumonias de repetição, bronquiectasias e rinosinusite crônica. A análise por microscopia eletrônica confirmou o diagnóstico clínico de DCP em 16/34 (47,1%) pacientes. Houve associação entre o teste de sacarina maior que 30 minutos e o diagnóstico clínico de DCP. **Artigo 2:** Trinta e sete pacientes foram incluídos no estudo, destes, vinte pacientes apresentavam RSC (54,1%), 28 bronquiectasias (75,6%) e 29 pneumonias de repetição (78,4%). Um total de 20 (54%) indivíduos tiveram confirmação genética ou por MET de PCD. A média de idade ao diagnóstico foi de 15 anos e o tempo médio entre a suspeita e o diagnóstico foi de 5 anos. Um total de 17 indivíduos foram submetidos a testes de variantes

genéticas, dos quais 10 apresentaram variantes patogênicas positivas para PCD. **Conclusão:**

Artigo 1: A microscopia eletrônica ajudou a confirmar o diagnóstico de DCP. O teste da sacarina mostrou-se capaz de auxiliar na triagem de um paciente com DCP, devido à sua associação com alterações clínicas. **Artigo 2:** Este estudo descreve os achados clínicos, MET e genéticos em uma população de um hospital terciário e demonstra a importância da suspeita clínica de DCP em pacientes com infecções respiratórias superiores e inferiores anormais ou evolução incomum de sintomas clínicos, mesmo em indivíduos sem alterações de situs. O teste genético provou ser um método simples que pode melhorar o diagnóstico e o tratamento, e ajudar nas decisões médicas do paciente no futuro.

Palavras-Chave: Transtornos da Motilidade Ciliar, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Mucosa Nasal, Diagnóstico Clínico, Sacarina.

ABSTRACT

Introduction: The present thesis was performed according to the norms of the FCM/Unicamp post-graduation course. Two articles were presented and discussed. Article 1: “*Saccharin transit time test for primary ciliary dyskinesia: did we discard this tool too soon?*” e Artigo 2: “*Challenges in Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia in a Brazilian Tertiary Hospital*”. Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a genetic disease whose changes in ciliary ultrastructure and ciliary function have important clinical repercussions. Due to the great variability of phenotypes and genotypes and because there is no gold standard test, there is still great difficulty in confirming the diagnosis of this disease. **Aim: Article 1:** The aim of this study was to compare changes in electron microscopy with clinical variables and saccharin test in individuals with a clinical PCD diagnosis. **Article 2:** The aim of this study was to describe the clinical findings and alterations in the diagnostic tools (TEM, genetics, and clinical questionnaires) in individuals with clinical suspicion of PCD from a Brazilian Tertiary Hospital. **Method: Article 1:** Observational prospective study was carried out in the otorhinolaryngology outpatient clinic from August 2012 to April 2021. Patients in the control group and PCD group were evaluated. These patients were submitted to the PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule) and American Thoracic Society clinical screening questionnaires, nasal endoscopy, saccharin transit time test, and nasal biopsy for analysis in electron microscopy. **Article 2:** An observational and prospective study was carried out with individuals during the follow-up at the Hospital de Clínicas of the University of Campinas (HC-Unicamp) due to clinical suspicion of PCD. Patients were evaluated between 2011 and 2021, and were submitted to clinical questionnaires, TEM, and genetic variants analyses. Those patients were classified according to the degree of suspicion for PCD. **Results: Article 1:** 34 patients with clinical PCD diagnosis and 36 controls were evaluated. The most prevalent clinical changes were recurrent pneumonia, bronchiectasis, and chronic rhinosinusitis. The electron microscopy analysis confirmed the clinical PCD diagnosis in 16/34 (47.1%) patients. There was an association between saccharin test greater than 30 minutes and clinical PCD diagnosis. **Article 2:** Thirty-seven patients were included in the study, of those, twenty patients had CRS (54,1%), 28 had bronchiectasis (75,6%) and 29 had recurrent pneumonia (78,4%). A total of 20 (54%) individuals had either TEM or genetic confirmation of PCD. The mean age at diagnosis was 15 years old and the mean time between suspicion and diagnosis was 5 years. A total of 17 individuals underwent genetic variants testing, of which 10 had positive pathogenic variants for PCD. **Conclusion: Article**

1: Electron microscopy helped to confirm the PCD diagnosis. The saccharin test proved to be capable of assisting in the screening of a patient's with PCD, due to its association with clinic alterations. **Article 2:** This study described clinical, TEM and genetic findings in a population of a tertiary hospital and demonstrates the importance of the clinical suspicion for PCD in patients with abnormal upper and lower respiratory infections, or unusual evolution of clinical symptoms, even in individuals without situs alterations. Genetic testing proved to be a straightforward method that can improve diagnosis and treatment and help future patient's decisions.

Keywords: Ciliary Motility Disorders, Microscopy, Electron, Transmission, Nasal mucosa, Clinical Diagnosis, Saccharin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Desenho esquemático da ultraestrutura ciliar das células ciliadas do epitélio respiratório.....Pág 16
- Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando cortes transversais de axonemas ciliares sem alterações ultraestruturais.....Pág 16
- Figura 3. Célula ciliada em corte longitudinal. Cortes A, B e C correspondem as diferentes apresentações ultraestruturais do ao longo do axonema: Ponta (A), meio (B) e base.....Pág 17
- Figura 4. Características clínicas associadas a Discinesia Ciliar Primária (DCP) por faixa etária. Baseado em (10,26,27)Pág 20
- Figura 5. Tomografia de seios da face em cortes axial e coronal de paciente com Discinesia ciliar primária e rinossinusite crônica com polipose.....Pág 21
- Figura 6. Tomografia de torax em cortes axial e coronal de paciente adulto com Discinesia ciliar primária. Nota-se áreas de bronquiectasia e situs inversus.....Pág 23
- Figura 7. Resumo dos algoritmos diagnósticos para Discinesia ciliar primária (DCP) da European Respiratory Society ERS (a) e da American Thoracic Society ATS(b) (Adaptado e Shoemark, A 2019 et al(49).Pág 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATS - American Thoracic Society

ATS-CSQ- American Thoracic Society Clinical Screening Questionnaire

BEAT-PCD -Better Experimental Approaches to Treat Primary Ciliary Dyskinesia

BED- Braço externo de dineína

BID- Braço interno de dineína

CC- Complexo central

CIPED - Centro de Investigação em Pediatria

CR-ND- Complexo regulatório Nexina-Dineína

DCP -Discinesia Ciliar Primária

DM- Desorganização dos Microtúbulos

DPOCs - Doenças pulmonares obstrutivas crônicas

nNO –Óxido Nítrico nasal

ER – Espícula Radial

ERS - European Respiratory Society

MET- Microscopia eletrônica de Transmissão

MT- Microtúbulos

NO- Óxido Nítrico

PICADAR: Primary Ciliary Dyskinesia Rule

VMAV- Vídeo Microscopia de Alta Velocidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1- DEFINIÇÃO	15
1.2- HISTÓRICO	18
1.3- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	19
1.4- DIAGNÓSTICO	23
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
5. RESULTADOS	29
5.1. Artigo 1	30
5.2 Artigo 2	50
6. DISCUSSÃO GERAL	73
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	75
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	77
9. CONCLUSÃO GERAL	78
10. REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	88
Apêndice 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)- Sacarina	88
Apêndice 2- Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)- Genética	90
Apêndice 3 –Ficha clínica Discinesia Ciliar Primária	95
Anexo 1- Carta de aprovação comitê de ética em pesquisa em seres humanos- Sacarina	96
Anexo 2 - Carta de aprovação comitê de ética em pesquisa em seres humanos- Genética	104
Anexo 3- Questionário PICADAR e ATS- clinical screening questionnaire	113
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO	114

1. INTRODUÇÃO

1.1- DEFINIÇÃO

A mucosa do trato nasossinusal, orelha média e vias aéreas inferiores são recobertas por epitélio pseudoestratificado ciliado (1). Os cílios porém não estão presentes apenas no epitélio respiratório, são organelas dispostas em várias células de diferentes tecidos, que podem ter função motora ou sensitiva (2). Nos cílios motores e flagelos, essas organelas, que se apresentam em forma de extensões celulares, irão gerar um movimento regular em forma de onda, que será responsável pela movimentação dos espermatozoides, do muco do trato respiratório e dos óvulos na trompa uterina (3).

Cada célula do epitélio respiratório tem aproximadamente 300 cílios, cada um envolvido por citoplasma em uma estrutura denominada axonema (3). O axonema é composto por 9 pares de microtúbulos periféricos (MT), e dois microtúbulos centrais (os cílios motores embrionários- cílios nodais não apresentam os microtúbulos centrais)(4). Cada MT é composto de 13 e 11 protofilamentos; protofilamentos são compostos de α e β heterodímeros de tubulina (4). Os MTs são conectados entre si através dos complexos regulatórios nexina-dineína. De um dos microtúbulos de cada par, se estendem os braços internos de dineína (BID), mais próximos do centro, e os braços externos de dineína (BED), mais próximo da membrana citoplasmática (3,4). Os microtúbulos do complexo central (CC) estão ligados aos microtúbulos periféricos pelas espículas radiais (ER), todos esses componentes são distribuídos com a periodicidade de 96 nm ao longo do axonema, exceto pelo BED, que são repetidos a cada 24 nm(4). Ao longo do axonema, pode-se distinguir duas formas de BED a mais proximal (que apresenta duas cadeias de dineínas pesadas : DNAH5 e DNAH9) e distal (que apresenta apenas DNAH9) (5). As **figuras 1 e 2** apresentam a ultraestrutura ciliar normal, em corte transversal em desenho esquemático e na microscopia eletrônica de transmissão. A **figura 3** representa o cílio em corte transversal e as diferenças na ultraestrutura entre a base e ponta.

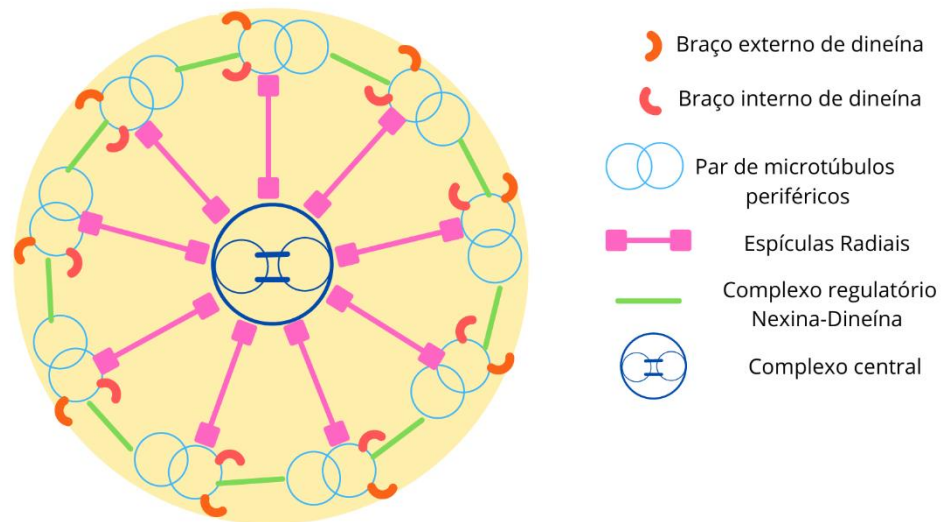


Figura 1. Desenho esquemático da ultraestrutura ciliar das células ciliadas do epitélio respiratório.*Figura: banco de imagens pessoal da autora.

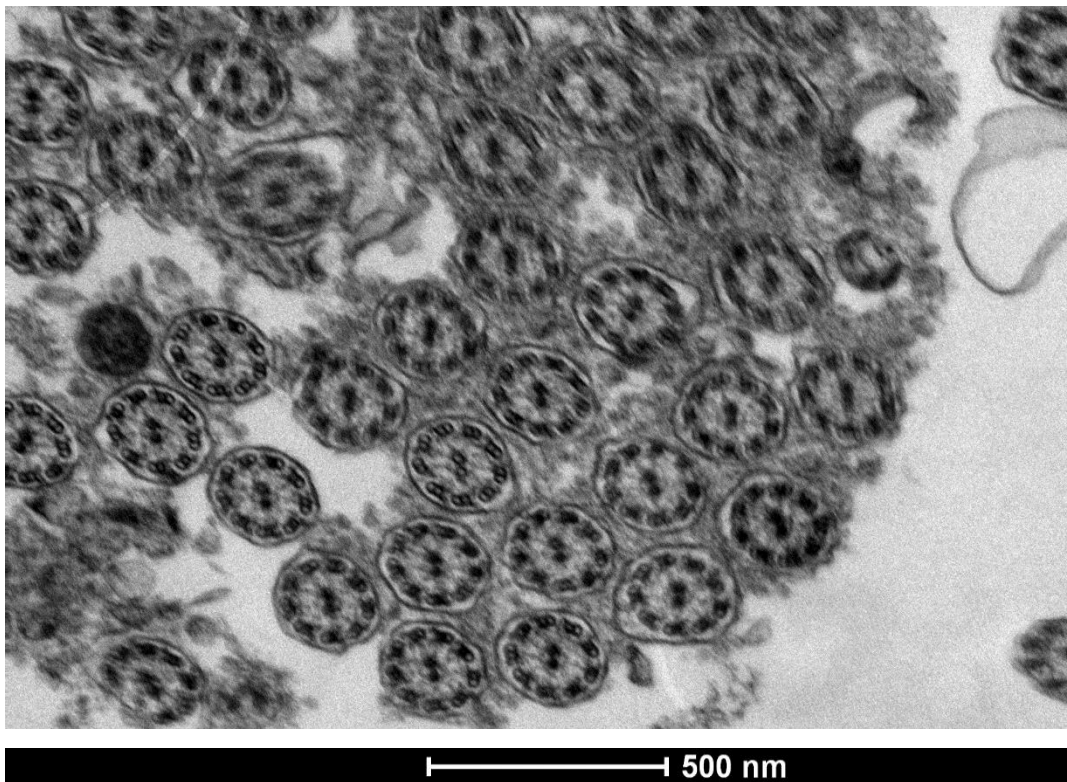


Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando cortes transversais de axonemas ciliares sem alterações ultraestruturais. *Foto: banco de fotos pessoal da autora.

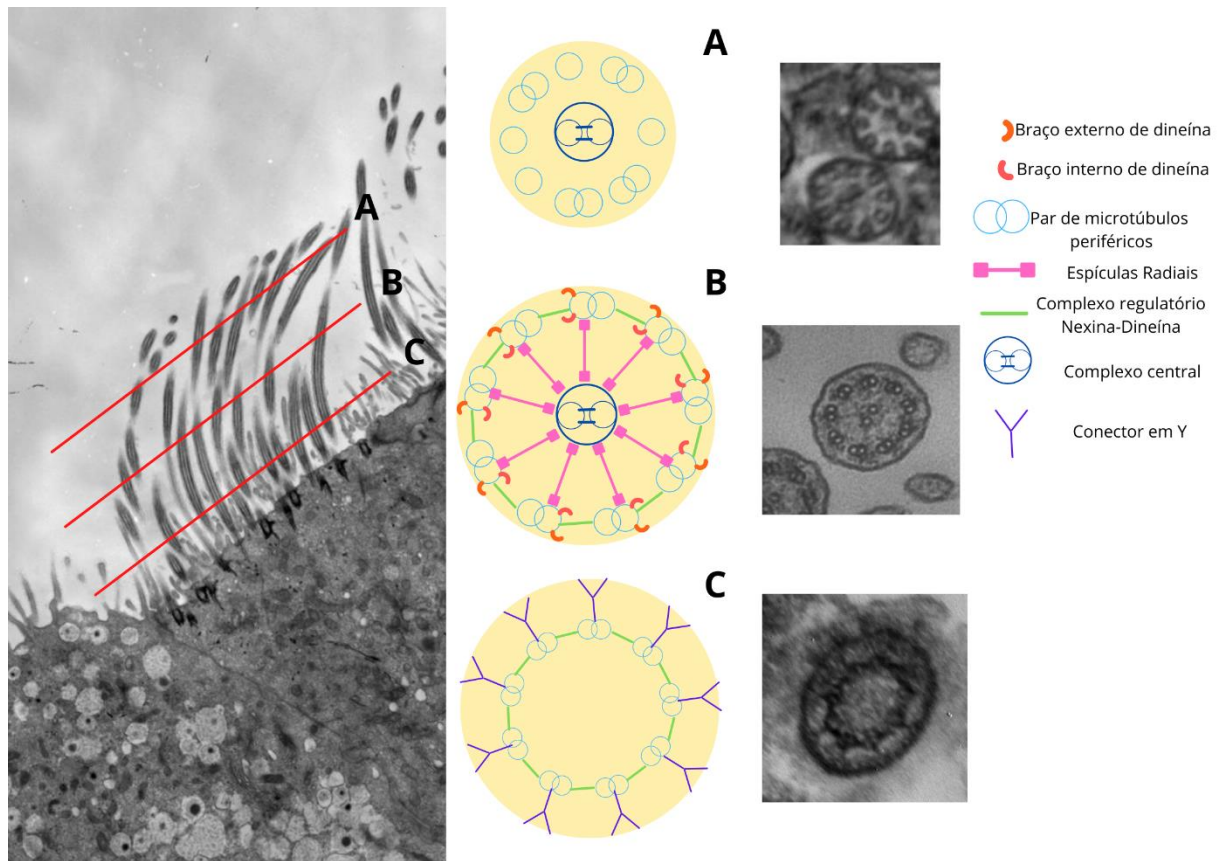


Figura 3. Célula ciliada em corte longitudinal. Cortes A, B e C correspondem as diferentes apresentações ultraestruturais do ao longo do axonema: Ponta (A), meio (B) e base. *Figura e fotos: do banco de imagens pessoal da autora.

O batimento ciliar ocorre através do deslizamento dos braços de dineína sobre os microtúbulos em intervalos regulares. Esse processo ocorre através da hidrólise de ATP. Para que haja o movimento em forma de chicote do cílio, os braços de dineína de uma metade do axonema devem estar ativos, enquanto a outra metade está inativa (3). Outras estruturas também contribuem para movimentação celular. Por exemplo, o complexo nexina-dineína (CR-ND) é regulador da atividade dineína, e além disso o complexo central e as espículas radiais também são importantes nessa movimentação (6).

Nas vias aéreas superiores e inferiores, esses cílios são responsáveis pelo transporte mucociliar, que desempenha função importante de defesa inata do organismo (2,7). A eficácia do *clearance* mucociliar é relacionada com a característica do muco, com a estrutura do cílio, e com a função : sincronicidade e frequência do batimento ciliar(1,8).

A discinesia ciliar primária (DCP) é uma doença autossômica recessiva na qual alterações da motilidade ciliar vão cursar com acúmulo de muco e mudança na microbiota das

vias aéreas, infecções, e alterações estruturais com consequente alteração funcional com repercussões clínicas importantes (9,10). Nessa doença, as variantes genéticas patogênicas irão determinar alterações nas proteínas presentes da ultraestrutura ciliar das células ciliadas, comprometendo portanto o batimento ciliar e suas funções: clearance mucociliar, fertilidade e embriogenia(11). Atualmente aproximadamente 45 genes relacionados a DCP já foram identificados, porém muitos casos ainda não apresentam variantes genéticas conhecidas (12). Essa variedade genômica está relacionada com uma multiplicidade fenóptica significativa, o que leva a DCP a apresentar quadros clínicos e evolutivos bastante heterogêneos (11).

Há uma grande variação na literatura em relação a prevalência da DCP. Em países Europeus a prevalência estimada é de 1 para 10000-20000 nascidos vivos (13), porém sua prevalência em crianças com infecções respiratórias crônicas pode chegar até 5%(14). Populações que apresentam culturalmente maiores taxas de casamentos consanguíneos tendem a ter uma maior prevalência da doença, visto que se trata de herança autossômica recessiva. Populações como asiáticos morando na Inglaterra apresentam prevalência de até 1: 2265 (15). Porém em muitas partes do mundo ainda faltam dados de prevalência e há locais em que esses números são subestimados (13,16). No Brasil não existem estudos quanto a prevalência da DCP.

1.2- HISTÓRICO

A história científica da DCP inicia 1904, quando o Dr. A. K. Siewert relatou a coexistência de bronquiectasia e situs inversus, porém apenas após três décadas essa doença entraria em evidência (17).

O professor Doutor Mane Kartagener, sob a supervisão do Doutor Wilhelm Löffler, estudava pacientes com bronquiectasias (18). Na época havia uma controvérsia grande a respeito das bronquiectasias serem congênitas ou resultado de uma inflamação adquirida (18). Em 1933, Kartagener publicou a primeira descrição da síndrome que receberia seu nome, descrevendo quatro casos de pacientes com bronquiectasias, *situs inversus totalis* e rinossinusite crônica (19). Durante sua carreira científica ele identificou 334 casos da síndrome, e 15 famílias acometidas, e apesar de ter reconhecido o caráter autossômico recessivo da doença, nunca identificou a relação com infertilidade (18,20).

Em 1976, Dr. Bjorn A. Afzelius, ao investigar pacientes com imobilidade de espermatozoides, notou, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), alterações na ultraestrutura ciliar dos axonemas. Esses pacientes também apresentavam a síndrome descrita por Kartagener, com alteração de lateralidade, bronquiectasias e rinossinusite crônica (21). Afzelius então, foi o primeiro a relacionar as alterações da ultraestrutura ciliar, com a diminuição ou incoordenação do batimento ciliar, levando a alterações clínicas (18).

Ainda na década de 1970, Dra. Jenifer Sturgess, familiarizada com os achados de alterações ultraestruturais do dr Afzelius, após ler sobre alterações de flagelos em *chlamydomonas* (alga unicelular), notou e descreveu detalhadamente alterações das espículas radiais em pacientes com síndromes associadas a imobilidade ciliar (18).

A partir da década de 1990, a incorporação de ferramentas como a imunofluorescência, a vídeo-microscopia de alta velocidade (VMAV), e a tomografia de coerência micro-óptica permitiram a elucidação sobre as proteínas da ultraestrutura ciliar e suas funções no batimento ciliar (22–24). Nas últimas duas décadas, a identificação das variantes genéticas e mutações relacionadas a DCP, especialmente após o sequenciamento do exoma e genoma completo, proporcionaram uma mudança de paradigma no entendimento molecular das alterações provocadas nessa doença, transformando-a em um verdadeiro modelo para entendimento da função e fisiologia ciliar (4,11).

1.3- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

O quadro clínico dos pacientes com DCP é bastante variado e pode ser diferente conforme o genótipo, além disso apresenta característica evolutiva, fazendo com que o quadro clínico seja diferente em diversas faixas etárias (25). A **Figura 4** resume os principais achados clínicos da DCP por idade.

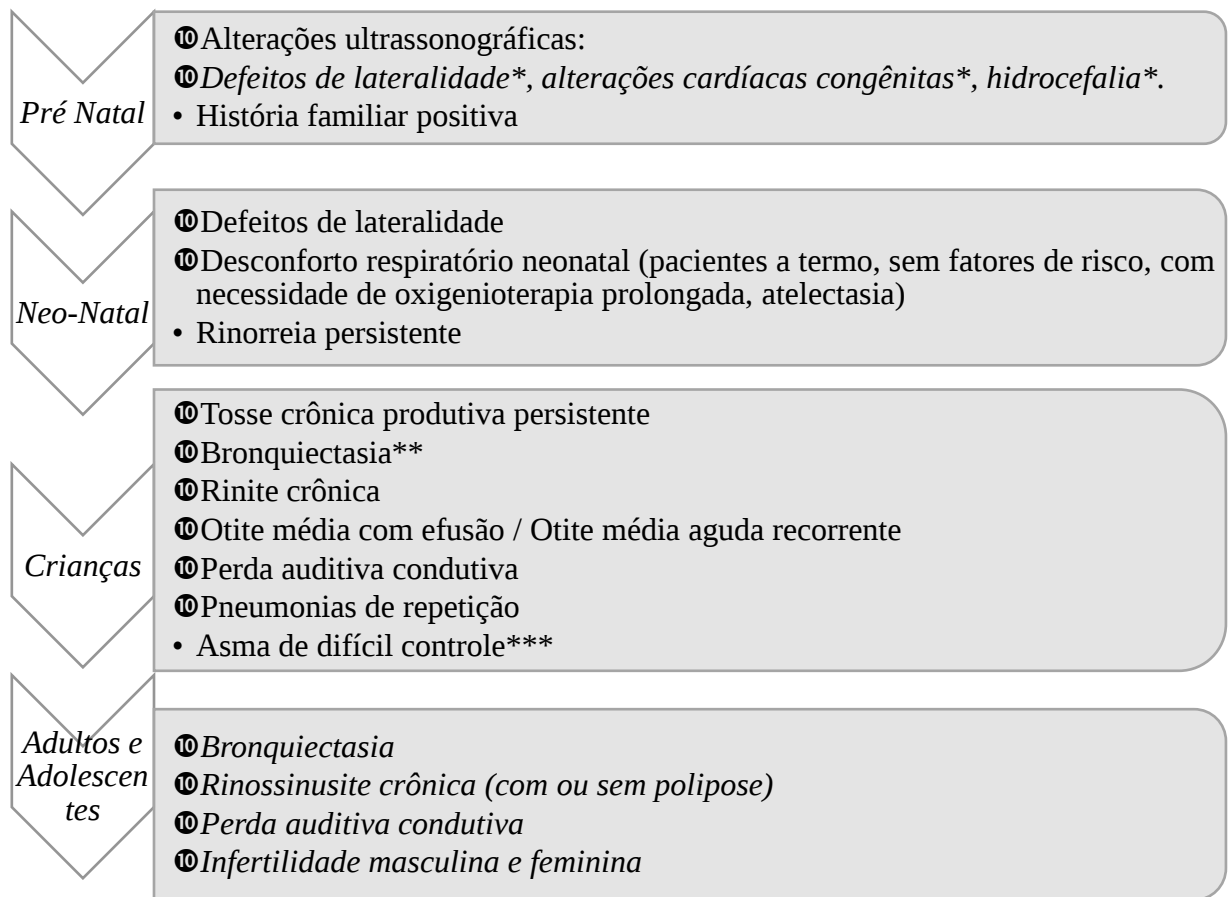


Figura 4. Características clínicas associadas a DCP por faixa etária. Baseado em (10,26,27)

*Na maioria dos casos essas alterações não estão relacionadas a Discinesia ciliar primária.

Bronquiectasia pode iniciar no período pré-escolar em alguns casos, e está presente em praticamente em todos os adultos **Diagnóstico diferencial de asma de difícil controle: sibilância sem melhora com terapêutica profilática associado a episódios infecciosos recorrentes

Via aérea Superior

As vias aéreas superiores dependem muito do *clearence* mucociliar para manter sua fisiologia (28). Assim, pacientes com DCP apresentam comumente rinite perene e persistente de início precoce, rinorreia e obstrução nasal, com prevalência desses sintomas em 75-77% dos casos (29,30). Ainda na faixa etária pediátrica, os pacientes podem iniciar quadros de rinossinusite aguda de repetição e crônica, e além disso alguns pacientes também apresentam polipose nasossinusal (figura 5) e hiposmia (30). Esses pacientes irão apresentar consequentemente, colonização nasossinusal por bactérias como *Haemophilus influenzae*,

Streptococcus pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus*(31). Além disso, pacientes com DCP tem um menor volume dos seios maxilares, esfenoidais e frontais, devido à uma diminuição da pneumatização (32).

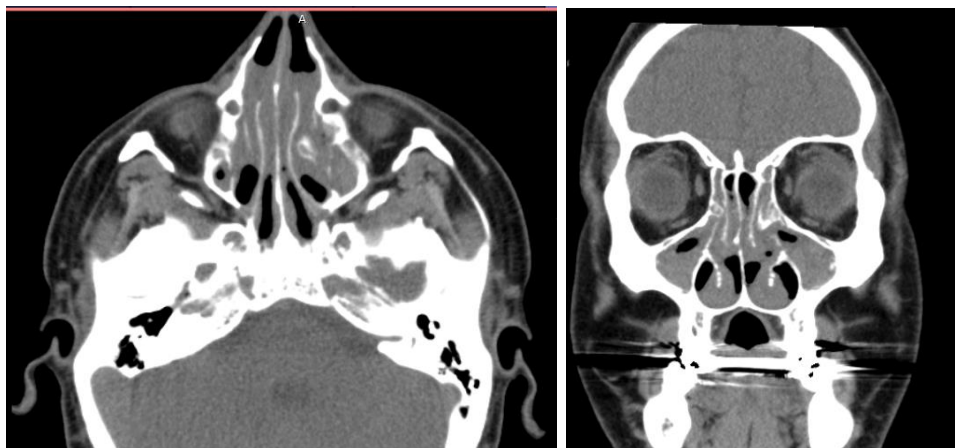


Figura 5. Tomografia de seios da face em cortes axial e coronal de paciente com Discinesia ciliar primária e rinossinusite crônica com polipose.

Orelha Média

O ouvido médio apresenta variação na distribuição de epitélio ciliado e a secreção produzida na caixa média é eliminada para nasofaringe através das tubas auditivas (33). Devido ao agravamento da disfunção tubária, já muito comum em pré escolares, crianças com DCP apresentam comumente, otite média aguda recorrente e otite média serosa crônica, sendo comum a necessidade frequente de uso de antibióticos (26,30). Esses quadros podem levar a otite média crônica com sequelas como perfuração timpânica, timpanoesclerose, erosão de cadeia ossicular e hipoacusia condutiva (14,29,33). Esses pacientes comumente apresentam otorréia profusa e crônica após cirurgia de timpanotomia (25).

Sistema Reprodutor

A imobilidade ciliar pode afetar a fertilidade desses pacientes. Nos pacientes do sexo masculino a estrutura do flagelo espermático apresenta ultraestrutura semelhante ao axonema dos cílios do epitélio respiratório, levando a quadros de imobilidade, hipomobilidade dos espermatozoides e azoospermia (34). Porém nem todo paciente com imobilidade ciliar apresenta alterações espermáticas, já que genes compensatórios particulares dos testículos e espermatozoides podem prevenir o efeito de variações na espermatogênese (34). Além disso pacientes do sexo feminino também podem apresentar disfunção da motilidade ciliar das tubas uterinas, levando a maior incidência de infertilidade e gestações ectópicas (35,36).

Embriogênese

Aproximadamente metade dos pacientes com DCP apresentam alterações de lateralidade como situs inversus, situs inversus totalis, situs ambíguos e dextrocardia (29). Isso ocorre devido a alterações nos cílios nodais, expressos transitoriamente no nó ventral da gástrula durante o desenvolvimento embrionário (36). Esses cílios têm estrutura semelhante aos do epitélio respiratório, porém não apresentam o complexo central. Neles os BED e BID são responsáveis por uma rotação no sentido horário, gerando fluxo para a esquerda de fluido extracelular através da superfície nodal(36,37). Este fluxo é detectado pelos cílios sensoriais perinodais, o que ativa uma cascata de sinalização responsável pela diferenciação lateral entre esquerda-direita (36,37). Na ausência desse fluxo, a lateralidade torna-se aleatória, levando aos defeitos descritos acima (36,37). Da mesma forma, essa disfunção embrionária pode gerar alterações cardíacas congênitas (37,38).

Via aérea Inferior

Cerca de 50% dos pacientes com DCP apresentam insuficiência respiratória neonatal, enquanto para todos os recém nascidos a termo esse número representa 5%.(39). Porém enquanto a taquipneia transitória é a causa mais comum na população geral e tem resolução em no máximo 5 dias, nos paciente com DCP a necessidade de oxigênio ou suporte ventilatório pode-se prolongar por semanas(26).

Em uma meta-análise de 2016, Goutaki et al demonstrou que a tosse é um sintoma frequente nesses pacientes, com uma prevalência de 88% (14-100%)e pode ter início já nos primeiros meses de vida (14,29).Nos pré-escolares essa tosse geralmente está relacionada a episódios infecções brônquicas recorrentes acompanhadas ou não de pneumonias de repetição (esta última geralmente em áreas pulmonares diferentes) (40). A retenção de secreções nas vias aéreas prejudica a defesa inata e adaptativa do organismo, e tornam o tecido pulmonar mais vulnerável à infecção crônica. A persistência de patógenos como *Pseudomonas Aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* incita uma resposta inflamatória que resulta em lesão e remodelamento das vias aéreas inferiores, resultando na bronquiectasia, levando a um ciclo vicioso que perpetua a inflamação pulmonar (25,41–43). Apesar da bronquiectasia estar comumente associada a crianças escolares e adolescentes, há relatos de bronquiectasia já em pré escolares com DCP (26). A figura 6 mostra tomografia de tórax de paciente com bronquiectasias.

Portanto, a deficiência do *clearance* mucociliar ao gerar esses episódios inflamatórios e infecciosos, tem como consequência a ocorrência de doença de pequenas e médias vias aéreas, o que caracteriza a doença pulmonar obstrutiva crônica (10,29,44). Previamente tida como uma doença pulmonar de baixa gravidade, sabe-se que parte dos fenótipos estão associados a deterioração grave da função pulmonar, e o diagnóstico precoce nesses casos pode contribuir com um melhor prognóstico(45,46). Em uma população de 49 pacientes adultos com DCP da cidade de São Paulo, mais da metade dos pacientes apresentaram comprometimento funcional pulmonar grave (47).

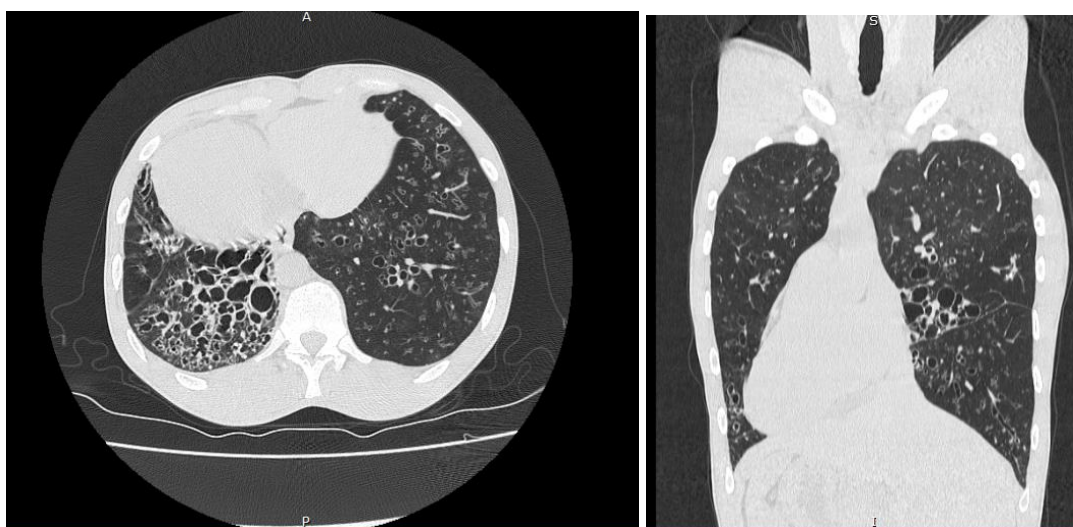


Figura 6. Tomografia de torax em cortes axial e coronal de paciente adulto com Discinesia ciliar primária. Nota-se áreas de bronquiectasias e situs inversus.

1.4- DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da discinesia ciliar ainda é um grande desafio devido à ausência de um teste diagnóstico referência ou padrão ouro, além da dificuldade de existirem diferentes critérios e algoritmos diagnósticos (48,49). A European Respiratory Society (ERS) e a American Thoracic Society (ATS), diferem bastante em relação aos critérios diagnósticos, sendo que ATS se baseia na avaliação genética, no nNO e na MET, enquanto a ERS valoriza a videomicroscopia de alta velocidade (VMAV) (49–52). A figura 7 resume os algoritmos diagnósticos da ERS e ATS.

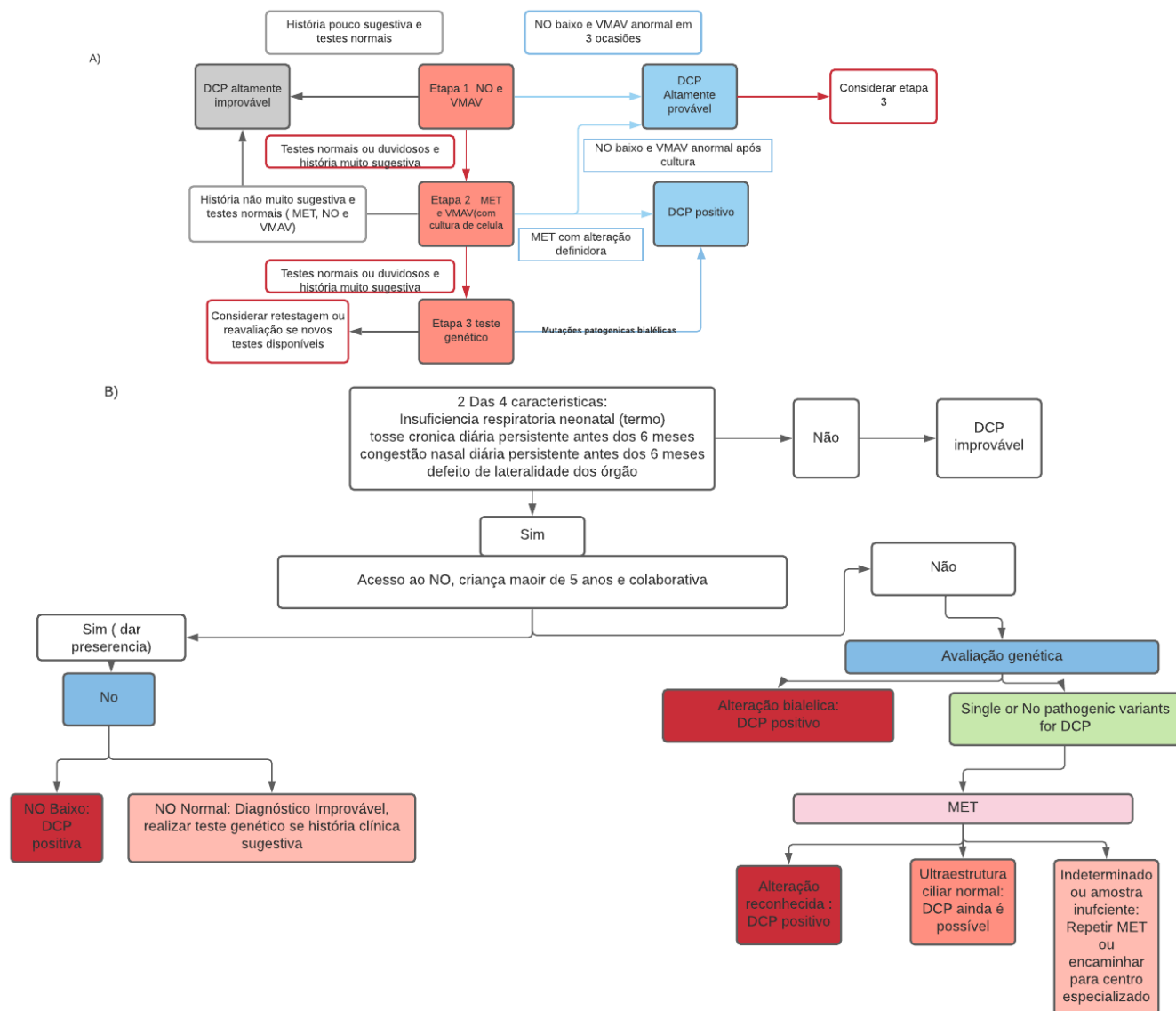


Figura 7. Resumo dos algoritmos diagnósticos para Discinesia Ciliar primária (DCP) da European respiratory Society (ERS) (a) e American Thoracic Society (ATS) (b) - Adaptado de Shoemark, A 2019 et al(49). MET: Microscopia eletrônica de transmissão, NO : Óxido Nítrico nasal, VMAV: videomicroscopia de alta velocidade.

Por ser uma doença rara, e com constante evolução em termos de diagnósticos, alguns fenótipos da DCP ainda não estão completamente estabelecidos, assim a confirmação do diagnóstico de DCP sempre exigirá mais testes e associação com a clínica (53).

Triagem e seleção dos Pacientes

Atualmente os principais métodos de triagem para discinesia ciliar são o questionários clínicos, sendo o PICADAR (PrImary CiliARy DyskinesiA Rule) e o questionário de triagem clínica da ATS (ATS-CSQ)(14,54,55). O PICADAR inclui 8 perguntas, com pontuação de zero a 14, sendo que scores acima ou igual a 5 tem uma chance maior que 11% de diagnóstico positivo para DCP. Scores acima ou igual a 10 tem mais que 90% de chance de diagnóstico positivo para DCP (14). O ATS-CSQ consiste em 4 perguntas, cada resposta sim recebe uma pontuação de um ponto, e pacientes com dois pontos ou mais são selecionados para investigação de DCP(54).

Anteriormente utilizado, o teste do tempo de transito da sacarina foi desconsiderado nas novas diretrizes diagnósticas devido à dificuldade técnica de execução, principalmente em crianças (49). O teste da sacarina permite uma avaliação aproximada da função mucociliar (56). Neste teste é colocado uma partícula de sacarina na cabeça do corneto inferior do paciente e aguarda-se até que o indivíduo relate sentir o gosto doce. O tempo maior que 30 minutos é considerado alterado(57). É um teste de triagem amplamente disponível fora de centros especializados, simples, barato e de fácil execução, além de ser uma ferramenta útil para o clínico geral (8,57,58). No entanto é um teste subjetivo que pode ser normal em pacientes com batimento ciliar hipercinético (9).

Óxido Nítrico nasal (nNO)

O nNO, no Brasil, ainda é utilizado somente em centros de pesquisa. Vários estudos mostraram que os níveis de óxido nítrico exalado, e particularmente NO nasal, são muito baixos na DCP (59). Assim, níveis nasais de nNO alto ou normal podem ajudar a excluir a DCP, principalmente nos pacientes em que a história clínica não é clássica. Níveis baixos de nNO, contudo, podem estar presentes em outras doenças obstrutivas nasais e em algumas imunodeficiências (60,61).

Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

A MET consiste na análise de amostras de epitélio ciliado, obtido por escovado da mucosa nasal ou pulmonar ou biópsias. Nessa análise são avaliadas alterações na

ultraestrutura ciliar (2). Pacientes com ultraestrutura normal podem ter alterações na função ciliar, assim mesmo não apresentando defeitos óbvios na MET não podem ter o diagnóstico descartado (3,17). Apesar da MET ser utilizada desde a década de 70 para o diagnóstico da síndrome, em 2020 pela primeira vez foi publicado um consenso estabelecendo os critérios microscópicos compatíveis com DCP(62). Os defeitos considerados “definidores” de discinesia ciliar, ou seja, classe 1 são : Ausência do BED com ou sem Ausência do BID e desorganização dos microtubulos (DM) associada a ausência do BID (62). Alterações da MET consideradas classe II são : defeitos do CC, deslocamentos dos corpúsculos basais com poucos ou nenhum cílio (oligocilia), DM com presença de BID, e ausência de BED em 25-50% dos cortes transversais. Essas alterações confirmam o diagnóstico de DCP na presença de mais evidências geradas por outra ferramenta diagnóstica (62).

A MET é uma ferramenta muito importante principalmente em pacientes com situs inversus e/ou síndromes sino-pulmonares. Contudo em pacientes com alterações isoladas, pulmonares ou nasossinusais, deve-se ter cautela ao interpretar os resultados da MET devido as alterações ciliares secundárias (63).

Avaliação das variantes genéticas

A avaliação genética como teste diagnóstico para DCP é uma modalidade promissora para maior acurácia na avaliação desses pacientes (11,64). Testes genéticos para uma doença mendeliana tem especificidade alta, no entanto, pode-se esperar que a sensibilidade ainda seja baixa visto que 30% dos casos não apresentam variantes genéticas conhecidas (50). Em uma revisão da literatura sobre DCP, Zariwala e colaboradores, demonstraram que mais de 50% dos pacientes com DCP possuem duas mutações patogênicas em um gene conhecido causador de DCP (65) . Contudo, a sensibilidade dos testes genéticos deve aumentar com a incorporação de painéis de diagnóstico que identificaram genes de DCP (64). Ainda, a correlação das alterações genéticas com variações da ultraestrutura ciliar facilitam o entendimento da fisiopatogenia da doença e correlações clinicas importantes (36,66). A **tabela 1** mostra variantes genéticas conhecidas e as alterações ultraestruturais correspondentes.

Tabela 1. Variantes genéticas associadas a Discinesia ciliar primária (DCP) descritas na literatura e alterações correspondentes da ultraestrutura ciliar à microscopia eletrônica*

Alteração da Ultraestrutura ciliar	Gene
<i>Defeito do braço externo de dineína</i>	DNAH11, DNAI1, DNAI2, DNAL1, NME8, DNAH9
<i>Ancoragem do braço externo de dineína</i>	CCDC114, ARMC4, CCDC151, TTC25, MNS1, CCDC103
<i>Complexo regulatório Nexina-Dineína</i>	CCDC164, CCDC65, GAS8
<i>Régua axonemal de 96 nm:</i>	CCDC39, CCDC40
<i>Espícula Radial</i>	RSPH1, RSPH4A, RSPH9, RSPH3, DNAJB13
<i>Complexo central</i>	HYDIN, STK36
<i>Fator de pré-formação</i>	DNAAF1, DNAAF2, DNAAF3,
<i>Outros:</i>	CCNO, MCIDAS, OFD1, RPGR
<i>Espectro da DCP</i>	CFAP53, ENKUR, GAS2L2, LRRC56

*baseado em Lucas JS, 2019 (11).

Vídeo-microscopia de alta velocidade (VMAV)

Na VMAV podemos analisar diretamente a atividade ciliar imediatamente após a biópsia e novamente após um período de cultura para diferenciar DCP primária e secundária (51,67). Nesse teste uma câmera acoplada a um microscópio grava o batimento ciliar em altas velocidade, podendo ser analisado por diferentes examinadores e até por softwares em relação a alterações de frequência e padrão de batimento ciliar(51,68). Ainda há necessidade de estabelecer protocolos específicos para a realização e avaliação desse método (68).

Outras ferramentas

Além das ferramentas descritas, outras estão sendo utilizadas em centros de pesquisa para corroborar no diagnóstico da DCP. São essas ferramentas, a tomografia de coerência micro-óptica que é uma modalidade de imagem de refletância de alta velocidade e alta resolução, para a obtenção de imagens transversais do epitélio das vias aéreas com uma resolução inferior a 1 μm . A imunofluorescência (IF), que investiga a localização de proteínas ciliares que podem estar ausentes na DCP, e é um exame útil e promissor na avaliação de diferentes fenótipos da DCP (22,26,69). Além de softwares para contagem de elementos ultraestruturais e avaliação do batimento ciliar(6) .

Portanto apesar da DCP ser uma doença amplamente estudada, a avaliação diagnóstica adequada ainda é um obstáculo para a melhoria do tratamento e seguimento desses pacientes(13,53).

2. JUSTIFICATIVA

Justifica-se esse trabalho pela necessidade de avaliar alterações da ultraestrutura ciliar na microscopia eletrônica e variantes genéticas associadas a DCP na população brasileira. Além disso, avaliar ferramentas de triagem que possam auxiliar na seleção de casos suspeitos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar características clínicas, métodos diagnósticos e de triagem na DCP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ARTIGO 1: Comparar alterações do tempo de trânsito do teste da sacarina com alterações da microscopia eletrônica em pacientes com diagnóstico clínico de DCP

Comparar alterações clínicas, tempo de trânsito do teste da sacarina e alterações da microscopia eletrônica de pacientes com diagnóstico clínico de DCP com pacientes do grupo controle (sem doenças inflamatórias nasais, com rinossinusite crônica e com rinite alérgica).

ARTIGO 2: Descrever as características clínicas e resultados de diferentes ferramentas diagnósticas utilizadas em pacientes com suspeita de DCP.

Descrever alterações clínicas, alterações dos scores clínicos, alterações da MET e as variantes genéticas de pacientes com suspeita para DCP.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Os métodos utilizados neste trabalho estão descritos no artigo 1 (encaminhado para publicação na revista *Jornal Brasileiro de Pneumologia*) e no artigo 2 (aguarda ser encaminhado para publicação no *Orphanet Journal of Rare Diseases*).

Ressaltamos que todos os procedimentos utilizados seguiram rigorosamente os princípios científicos previamente publicados, normas técnicas e éticas previstas e necessárias para a realização dos dois estudos.

5. RESULTADOS

Esta dissertação foi escrita de acordo com o modelo alternativo, conforme as novas normas do curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, desta forma, os resultados foram apresentados através de artigos científicos.

5.1. ARTIGO 1

Artigo enviado para revista – Jornal Brasileiro de Pneumologia, aguarda parecer dos revisores.

Title Page

Saccharin transit time test for primary ciliary dyskinesia: did we discard this tool too soon?

Comparing the saccharin transit time with transmission electron microscopy and clinic questionnaires.

Mariana Dalbo Contrera Toro^a, Érica Ortiz^a, Fernando Augusto Lima Marson^{b,c,d}, Laíza Mohana Pinheiro Duarte^a, Albina Messias de Almeida Milani Altemani^e, Adyléia Ap. Dalbo Contrera Toro^b, José Dirceu Ribeiro^b, Eulália Sakano^a.

^aDepartment of Otolaryngology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, RTessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, R Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^cLaboratory of Medical Genetics and Genome Medicine, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, R Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^dLaboratory of Human and Medical Genetics, São Francisco University, Avenida São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista, São Paulo, CEP: 12916-900, Brazil

^eDepartment of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, R Tessalia Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitaria, Campinas, São Paulo, 13083887, Brazil

Corresponding author: Mariana D. C Toro Address: RTessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

Email :mdctoro@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a genetic disease whose changes in ciliary ultrastructure and ciliary function have important clinical repercussions. Due to the great variability of phenotypes and genotypes and because there is no gold standard test, there is still great difficulty in confirming the diagnosis of this disease. Also, diagnostic tests can be expansive and unavailable in most centres. The saccharin transit time test is a simple tool that can screen mucociliary clearance alterations. The aim of this study was to compare changes in electron microscopy with clinical variables and saccharin test in individuals with a clinical PCD diagnosis. **Method:** Observational prospective study was carried out in the otorhinolaryngology outpatient clinic from August 2012 to April 2021. Patients in the control group and PCD group were evaluated. These patients were submitted to the PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule) and American Thoracic Society clinical screening questionnaires, nasal endoscopy, saccharin transit time test, and nasal biopsy for analysis in electron microscopy. **Results:** 34 patients with clinical PCD diagnosis and 32 controls were evaluated. The most prevalent clinical changes were recurrent pneumonia, bronchiectasis, and chronic rhinosinusitis. The electron microscopy analysis confirmed the clinical PCD diagnosis in 16/34 (47.1%) patients. There was an association between saccharin test greater than 30 minutes and clinical PCD diagnosis. **Conclusion:** Electron microscopy helped to confirm the PCD diagnosis. The saccharin test proved to be capable of assisting in the screening of a patient's with PCD, due to its association with clinical alterations related to DCP.

Keywords: Ciliary Motility Disorders; Microscopy, Electron, Transmission; Nasal mucosa; Clinical Diagnosis; Saccharin

INTRODUCTION

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is an autosomal recessive disease in which ciliary motility is compromised, with mucus accumulation and change in the microbiota of the airways, infection, structural changes with consequent functional worsening and important clinical repercussions (1,2).

The clinical changes secondary to ciliary motility dysfunction are defects of laterality (*situs inversus*, *situs inversus totalis*, and dextrocardia), infertility, chronic rhinosinusitis (CRS), chronic otitis media and recurrent infections of the upper and lower airways (1,2,3). In addition, in the lung, changes in mucociliary clearance are related to respiratory failure in the neonatal period, recurrent pneumonia, bronchiectasis and chronic cough (1,3,4).

There is no gold standard for the PCD diagnosis (1,2). It is a rare disease that affects 1:10,000 live births approximately (1). Also, it is constantly evolving condition in terms of diagnoses, some PCD phenotypes are not yet fully established (1,2).

Currently, guidelines from the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) suggest diagnostic confirmation through combinations of clinical suspicion and diagnostic methods such as nasal nitric oxide (nNO), transmission electron microscopy (TEM), high-speed video microscopy and genetics screening for pathogenic variants in the PCD-related genes (1,6). Clinical scores such as PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule) and the ATS clinical screening questionnaires can help in the suspicion of this disorder (1,6-7).

The TEM consists in the analysis of samples of ciliated epithelium. In this analysis, alterations in the ciliary ultrastructure are evaluated, and about 70% of PCD patients will present alterations within the TEM (8). Some PCD patients may not present obvious defects under TEM, even with changes in ciliary function (2,8).

Infectious and inflammatory processes can affect mucociliary transport, so false positives can be found in these cases (9). On the other hand, patients with normal ciliary ultrastructure may present functional defects of ciliary motility (8).

The saccharin test allows a rough evaluation of mucociliary function. It is a screening test that is widely available outside specialized centers, it is simple, inexpensive, and easy to implement, also, it can be a useful tool for the general practitioner (10,11,12). Nevertheless, it is a subjective test that may be normal in patients with dyskinetically beating cilia and may be difficult to perform in children younger than 12 years old (12).

The adequate diagnostic evaluation for PCD disease is still a challenge to the management and follow-up of these patients (1,2,13,14). Since the last studies involving the use of saccharin transit time tests there were many changes in the diagnosis criteria and methods (1,2). Therefore, this study is justified as it could verify the saccharin test as a screening prospect.

Thus, the aim of this study was to compare changes in TEM with clinical variables and saccharin transit time test in individuals with a clinical PCD diagnosis.

METHODS

A cross-sectional, prospective observational study was conducted with patients from the hospital of clinics of the University of Campinas (HC-Unicamp). All participants and their guardians signed the terms of assent and informed consent, before the beginning of the study. The study was approved by the ethics committee of the Unicamp (CAAE: #31498020.8.0000.5404).

Patients with clinical PCD (cPCD) diagnosis from otorhinolaryngology, pneumopediatrics and pulmonology from August 2012 to April 2021 were included in the group clinically classified as cPCD. The clinical diagnosis was based on the characteristic symptoms described by the ERS task force *criteria*: defects of laterality, family history of PCD, persistent rhinorrhea, CRS, neonatal respiratory failure, productive cough, bronchiectasis, chronic otitis (chronic otitis media, serous otitis media, hearing loss conductive), and infertility (1).

For the control group (CG), patients from the otorhinolaryngology outpatient clinic diagnosed with allergic rhinitis (AR), CRS and patients without nasal inflammatory diseases were included. Both groups had patients with CRS, but in the CG these conditions were not associated with other characteristic PCD symptoms. The patients who presented acute upper airway infections on the day of appointment were rescheduled.

Patients diagnosed with cystic fibrosis, alpha-1-antitrypsin deficiency, immunodeficiencies and smokers were excluded from both groups. Also, patients with insufficient material for TEM were excluded from the study.

All patients answered a clinical form containing demographic data, characteristic PCD symptoms, personal history, and patients evaluated after 2016 answered the PICADAR and ATS clinical screening questionnaires (6,7).

All patients underwent nasal endoscopy inspection, and the main findings were documented. The examination allowed the choice of the nasal fossa to be biopsied and tested, excluding obstructive factors.

The saccharin test was performed as described in the literature (10,11,15). A sodic saccharin fragment measuring 1 mm in diameter was placed on the surface of the head of the inferior nasal turbinate, 1 cm posterior to the nasal vestibule, to avoid the squamous epithelium area. Participants remained seated, breathing normally, without sneezing or blowing their noses. The time was measured in minutes between the placement of saccharin and the beginning of the feeling of sweet taste. If the patient did not report feeling the taste after 60 minutes, the test was interrupted. The test was considered altered when the result was greater than 30 minutes (11).

For evaluation of TEM, material was collected through cytological brushing of the inferior turbinate. The material was placed in a container with glutaraldehyde fixing solution 3% kept at 4°C for 3 hours. The biopsy was then processed, washed, and placed in a phosphate buffer container. The samples were analyzed by two researchers (MDCT and EO) and according to the international consensus guideline for reporting transmission electron microscopy (Better Experimental Approaches to Treat Primary Ciliary Dyskinesia- BEAT-PCD TEM criteria)(16). Changes in the ultrastructure were based on the observation of at least 100 cilia, being evaluated in cross sections (1). Abnormalities found in less than 10% of the cilia were considered as within the normal range (17). Described alterations associated

with PCD were analyzed, such as absence of the internal and external arm of dynein, translocations and absences of central microtubules, compound cilia, ciliary disorientation, and alterations of peripheral and central microtubules (18,19).

The BEAT PCD TEM criteria consists in: [class 1 alteration] hallmark defects such as more than 50% of axonemes with outer dynein arm (ODA) defects with or without inner dynein arm (IDA) defects, or microtubular disorganization (MD) with IDA defects; [class 2 alterations] cilia alterations that confirms PCD diagnosis in presence of other supporting evidence which include: central complex (CC) defects, mislocalisation of basal bodies with few or no cilia (Oligocilia), MD defect with IDA present or ODA defect with or without IDA defect in 25-50% of cross-sections (16).

The descriptive analysis was performed using categorical data by absolute and relative frequency. The numerical data are presented by median and minimum and maximum values, and interquartile interval. The normality of numerical data was evaluated by the following techniques: (i) analysis of descriptive measures for central tendency; and (ii) method by statistical test (normality tests): Kolmorov-Smirnov and Shapiro-Wilk. The data collected from the biopsies were compared between the groups, using the statistical analysis of contingency (Chi-square), Fisher exact test and Wilcoxon-Mann-Whitney. The significance level considered was 0.05.

RESULTS

A total of 81 individuals were evaluated, 45 of them from the cPCD group and 36 from the CG. Four patients in the CG and 8 patients in the cPCD group were excluded by insufficient material for TEM. Three patients were excluded after genetic testing positive for *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene. After this exclusions cPCD group was composed of 34 patients. Moreover, in the cPCD group, 4 patients were not able to do the saccharin transit time test due to lack of understating of the test or reactive sneezing during it. The CG was composed of 32 individuals being 10 patients with AR, 8 patients with CRS, 5 patients with both AR and CRS and 9 patients without nasal inflammatory diseases. The CG was composed of 15 male patients, while in cPCD group 22 patients were male. The **Figure 1** shows the inclusion of the participants in each step of the

study. Curiously, in our data a statistical difference between the median ages for both groups were described, being the CG older when compared with the cPCD group (**Figure 2a**).

The frequency of clinical alterations most found in participants in CG and cPCD group are shown in **Figure 3a**. Also, in the CG none of the individuals meet either class 1 or 2 BEATPCD TEM criteria for diagnosis of PCD.

In the cPCD group, 27 (79.4%) individuals presented changes in the ciliary ultrastructure and 7 (20.6%) no alterations on TEM. When classifying these alterations according to the BEAT PCD TEM criteria (16), 16 patients of the cPCD (47.1%) group, presented class I alterations, 5 patients (14.7%) presented class II alterations and 13 patients (38.2%) didn't present alterations compatible with the PCD diagnosis. **Figure 3b** shows the clinical alterations, clinical scores of PICADAR and ATS-CSQ, and saccharin transit time in the groups with or without class I alterations.

Patients in cPCD group presented the following alterations in the ciliary ultrastructure: absence of dynein's inner arm, absence of dynein external arm, ciliary disorientation, compound cilia, central microtubule translocation, extra numeral peripheral microtubules, extra central microtubule, absence of cilia, absence of peripheral microtubules and absence of central microtubule. **Figure 4** shows some examples of TEM findings.

The median progression time of saccharin was 10 minutes for the CG and 11.5 for the cPCD group, there was no statistical difference in relation to the median time of progression in the two groups, as shown in **Figure 2b**. However, when analyzing altered saccharin tests (transition time >30 min), there was a difference between CG and cPCD group (p-value=0.004), as seen in **Figure 3a**. Considering the subgroups of the CG with AR, CRS and patients without nasal inflammatory disease, there was no significant difference between the median time of saccharin progression. Also, no association was found between altered saccharin test and changes in TEM in general or according to the BEAT PCD TEM criteria.

As for the clinical score's tools, no association was found between PICADAR ≥ 7 or the ATS clinical score ≥ 2 and saccharin test greater than 30 minutes. Also, there were no association between PICADAR ≥ 7 or the ATS clinical score ≥ 2 and TEM class I defects (hallmarks ultrastructural defects) as shown in **figure 3b**.

DISCUSSION

The PCD diagnosis remains a major challenge in clinical practice due to the need for a combination of tools, which often require sophisticated techniques available in a few centers of a limited number of countries (13). The investigation of this disease becomes even more difficult due to the low incidence and great variability of genotypes and phenotypes (7). In Brazil, there are few studies evaluating the diagnosis and clinical characteristics of PCD patients (20).

Due to this phenotypic unpredictability, a great heterogeneity may be observed among the clinical characteristics of these patients. In this study, clinical variability in the cPCD group was shown and the most frequent features were recurrent pneumonia, bronchiectasis, and CRS.

A significant difference in age was also found between the groups, which was due to the ethical option of not including children in the CG, except for those who would go for anesthesia for a different reason.

Identifying children with suspicion of PCD at an early age can improve prognosis and delay pulmonary remodeling that leads to decrease of pulmonary function (6,21). But complex and expensive screening and diagnosis tests may delay the PCD diagnosis. Pediatric European centers demonstrated a 5.3-year median age at diagnosis (21). However, Braun et al demonstrated a median age of PCD diagnosis with 17 years in a retrospective 30-year analysis of a single center (22), like the results of this study.

Three meta-analysis of studies with PCD patients showed differences between the prevalence of clinical features like CRS, bronchiectasis, situs inversus, otitis media and recurrent pneumonias. There was great heterogeneity in the prevalence of the clinical characteristic (5,23,24,25).

Seventy seven percent of patients with clinical characteristics compatible with PCD presented alterations in ciliary ultrastructure in TEM analysis. The result was consistent with a meta-analysis, which found a detection rate of 83% (25). In the literature, approximately 30% of PCD cases present normal TEM (8).

The findings of our study concerning TEM were similar to the study by Demarco et al, also in the Brazilian population, which presented 54% of alterations in dynein arms (internal, external, or associated) and 14% of ciliary aplasia (9).

However, when analyzing the criteria published by the international consensus of TEM (BEAT PCD TEM criteria) in 2020, 61,8% of our patients were classified with either class I or Class II TEM alterations (16).

Previously used, the saccharin test was disregarded in the new diagnostic guidelines of 2017 and 2018, due to its performing technical difficulty, especially in children (1,26). There was a significant difference in relation to the saccharin test between the CG and cPCD group in our data. Previous study demonstrated a sensitivity of this test in up to 95% to identify normal ciliary ultrastructure (17). However, in our results there was no relationship between the altered saccharin test and TEM. Patients with ciliary beat alterations may also present false negatives, what may also be true in other diagnosis tests as TEM and genetics screening (11,27).

Although the statement of the unreliable saccharin transit time tests, in children younger than 12 years old (11), is present in several guidelines, many studies showed a reliable result when testing patients from 3-11 years old for other conditions as adenoid hypertrophy, and even health children (27-29).

In our study, there was no association between altered clinical scores, such as PICADAR and ATS-CSQ, and alterations in the saccharin test or TEM. Clinical scores have gained great relevance in the diagnostic algorithm, especially in ATS guidelines in which patients with clinical screening questionnaire less than 2 should not continue with the investigation (2). The positive predictive value of these scores in previous studies were similar to the nNO, but these scores require multicentric and multidisciplinary validation (13).

The complete diagnosis algorithm can cost from €653 to €2,097 per patient, which can be challenging in limited-resources and social heterogeneous countries, such as Brazil, not only considering the costs but also the lack of reference centers with capacitated staff to perform tests and analysis (26,30).

Thus, for the initiation of diagnostic investigation, physicians should pay attention to patients with severe or atypical symptoms, and individually evaluate each clinical history (1). In this context, the assessment of saccharin transit time may be an additional tool to corroborate with subjective clinical decisions, particularly in primary and secondary care centers.

Our study has limitations because it examines a rare disease, reducing the number of patients evaluated per year. In the 9 years of analysis of this study there were changes in the diagnostic criteria, especially concerning TEM criteria, and scores such as PICADAR and the ATS clinical questionnaire were incorporated, which before 2016 were not available for example. Also, because of the lack of a reference test for PCD diagnosis, evaluating other tools is challenging. The access to nNO, ciliary beat analysis through video microscopy, and genetic testing may complement the task to best evaluate diagnostic and screening tools. Due to the genotype and phenotype complexity of PCD, this study shows that the Saccharin transit time test and the TEM may be complementary to other more specific tools.

CONCLUSIONS

The saccharin test was useful to differentiate the CG and the cPCD. Nevertheless, it cannot be used as a diagnostic test because of its lack of association with TEM alterations. Therefore, we consider that the saccharin transit time test is a simple tool capable of assisting in the screening of patients with clinical suspicion of PCD out of specialized centers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state that there was no conflict of interest.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Laboratory of Electron Microscopy of HC-Unicamp. We also thank the access to equipment and assistance provided by the Electron Microscope Laboratory (LME/Unicamp).

REFERENCES

1. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2017;49:1601090.
2. Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, Manion M, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: An official American thoracic society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(12):e24–39.
3. Bequignon E, Dupuy L, Zerah-Lancner F, Bassinet L, Honoré I, Legendre M, et al. Critical Evaluation of Sinonasal Disease in 64 Adults with Primary Ciliary Dyskinesia. *J Clin Med*. 2019;8(5):619.
4. Kempeneers C, Chilvers MA. To beat, or not to beat, that is question! The spectrum of ciliopathies. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(8):1122–9.
5. Goutaki M, Meier AB, Halbeisen FS, Lucas JS, Dell SD, Maurer E, et al. Clinical manifestations in primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2016;48(4):1081–95.
6. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2016;47(4):1103–12.

7. Leigh MW, Ferkol TW, Davis SD, Lee HS, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Clinical features and associated likelihood of primary ciliary dyskinesia in children and adolescents. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(8):1305–13.
8. Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51(2):115–32.
9. Demarco RC, Tamashiro E, Rossato M, Ferreira MDS, Valera FCP, Anselmo-Lima WT. Ciliary ultrastructure in patients with chronic rhinosinusitis and primary ciliary dyskinesia. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2013;270(7):2065–70.
10. Rodrigues F, Freire AP, Uzeloto J, Xavier R, Ito J, Rocha M, et al. Particularities and clinical applicability of saccharin transit time test. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2019;23(2):229–40.
11. Adde FV, Rozov T. The saccharin test (ST) in children. *J pneumol*. 1997;23(2):66–70.
12. 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.
13. Kuehni CE, Lucas JS. Toward an earlier diagnosis of primary ciliary dyskinesia which patients should undergo detailed diagnostic testing? *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(8):1239–43.
14. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Searching for a gold standard. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1418–22.
15. Plaza Valía P, Valero FC, Pardo JM, Rentero DB, Monte CG. Saccharin test for the study of mucociliary clearance: Reference values for a Spanish population. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(10):540–5.
16. Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, Bukowy-Bieryllo Z, de Santi MM, Goggin P, et al. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *Eur Respir J*. 2020;55(4).
17. Olm MAK, Caldini EG, Mauad T. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J Bras*

Pneumol. 2015;41(3):251–63.

18. Armengot Carceller M, Mata Roig M, Milara Payá X, Cortijo Gimeno J. Discinesia ciliar primaria. Ciliopatías. Acta Otorrinolaringol Esp. 2010;61(2):149–59.

19. Boon M, Smits A, Cuppens H, Jaspers M, Proesmans M, Dupont LJ, et al. Primary ciliary dyskinesia: Critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. Orphanet J Rare Dis. 2014;9(1):11.

20. Olm MAK, Marson FAL, Athanazio RA, Nakagawa NK, Macchione M, Loges NT, et al. Severe pulmonary disease in an adult primary ciliary dyskinesia population in Brazil. Sci Rep. 2019;9:8693.

21. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. Eur Respir. 2010;36(6):1248–58.

22. Braun JJ, Boehm N, Metz-Favre C, Kosciński I, Teletin M, Debry C. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: When and how? Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2017;134(6):377–82.

23. Inaba A, Furuhashi M, Morimoto K, Rahman M, Takahashi O, Hijikata M, et al. Primary ciliary dyskinesia in Japan: Systematic review and meta-analysis. BMC Pulm Med. 2019;19(1):135.

24. Guan Y, Yang H, Yao X, Xu H, Liu H, Tang X, et al. Clinical and Genetic Spectrum of Children with Primary Ciliary Dyskinesia in China. Chest. 2021; 159(5):1768-1781.

25. Kouis P, Yiallourous PK, Middleton N, Evans JS, Kyriacou K, Papatheodorou SI. Prevalence of primary ciliary dyskinesia in consecutive referrals of suspect cases and the transmission electron microscopy detection rate: A systematic review and meta-analysis. Pediatr Res. 2017;81(3):398–405.

26. Rumman N, Jackson C, Collins S, Goggin P, Coles J, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Potential options for resource-limited countries. Eur Respir Rev. 2017;26(143).

27. Canciani M, Barlocco EG, Mastella G, De Santi MM, Gardi C, Lungarella G. The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary

ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 1988;5(4):210–4.

28. Yadav J, Ranga RK, Singh J, Gathwala G. Nasal mucociliary clearance in healthy children in a tropical country. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2001 Jan;57(1):21-4.

29. Yazici H , Soy FK, Kulduk E, Doğan E, Dünder R et al. Comparison of nasal mucociliary clearance in adenoid hypertrophy with or without otitis media with effusion. *International J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015;78(7):1143-6.

30. Kouis P, Papatheodorou SI, Middleton N, Giallourous G, Kyriacou K, Cohen JT, et al. Cost-effectiveness analysis of three algorithms for diagnosing primary ciliary dyskinesia: A simulation study. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):142

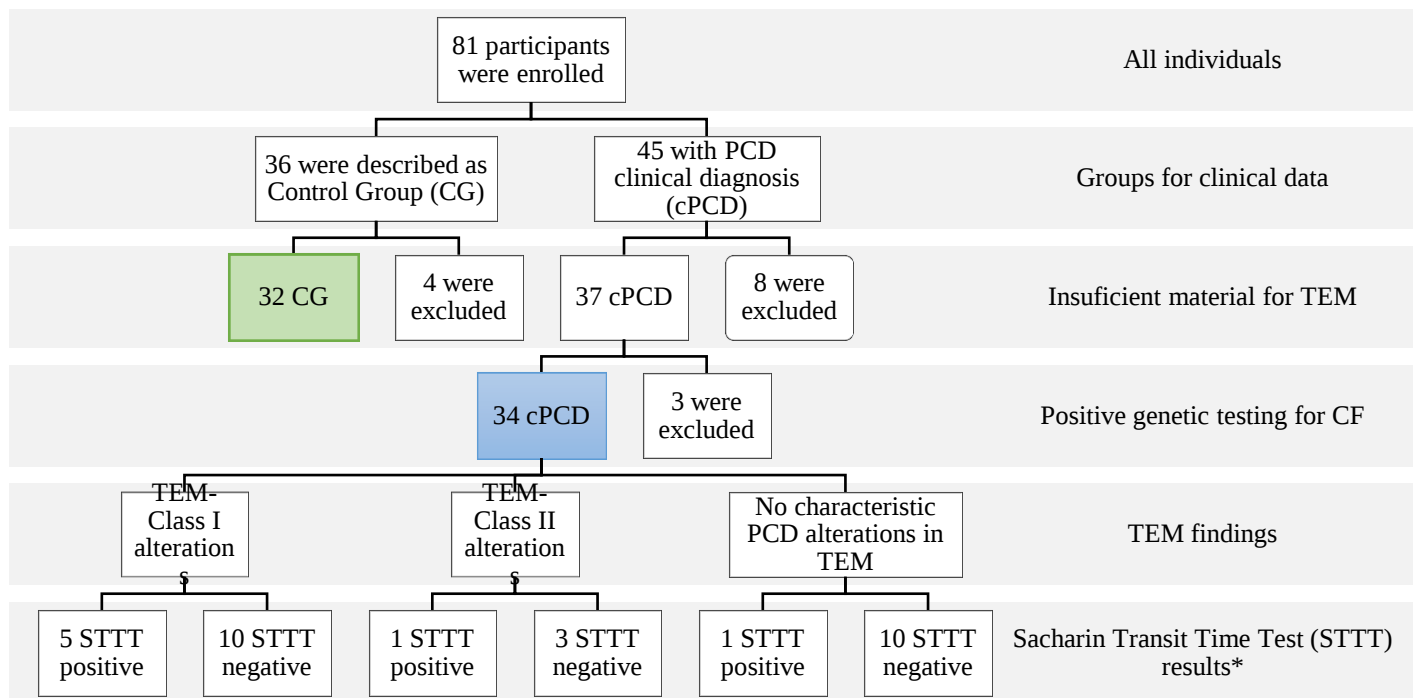
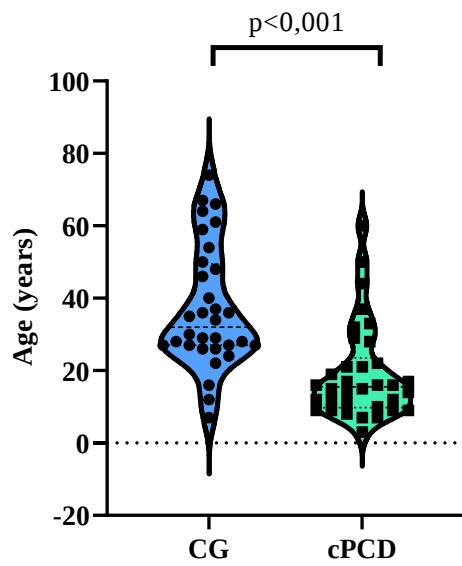


Figure 1. The inclusion of the participants in each step of the study. TEM, transmission electron microscopy. The positive genetic testing for Cystic Fibrosis (CF) was done based on the genetic screening for pathogenic variants in the Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator was a tool to avoid the inclusion of CF patients with similar clinical symptoms with Primary Ciliary Patients and, mainly, with borderline value at the sweat test. A total of 34 patients were included as cPCD group, however,* in 4 cases it was not possible to perform the saccharin test.

A



B

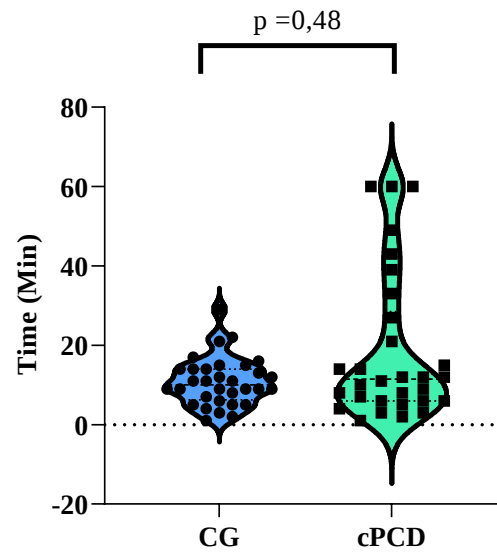
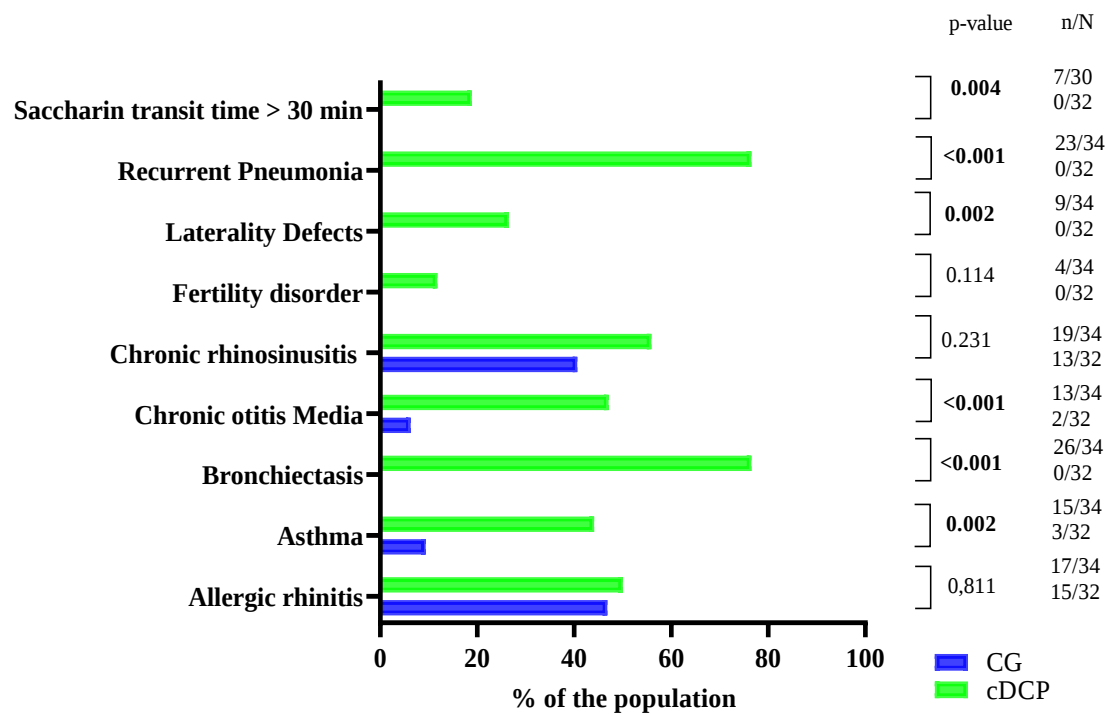


Figure 2. Violin plot for age and for saccharin progression time (minutes) of individuals in the control group (CG) and clinically classified as primary ciliary dyskinesia (cPCD).

The statistical analysis was done using the Mann-Whitney test. Alpha of 0.05 was set in all analysis.

A



B

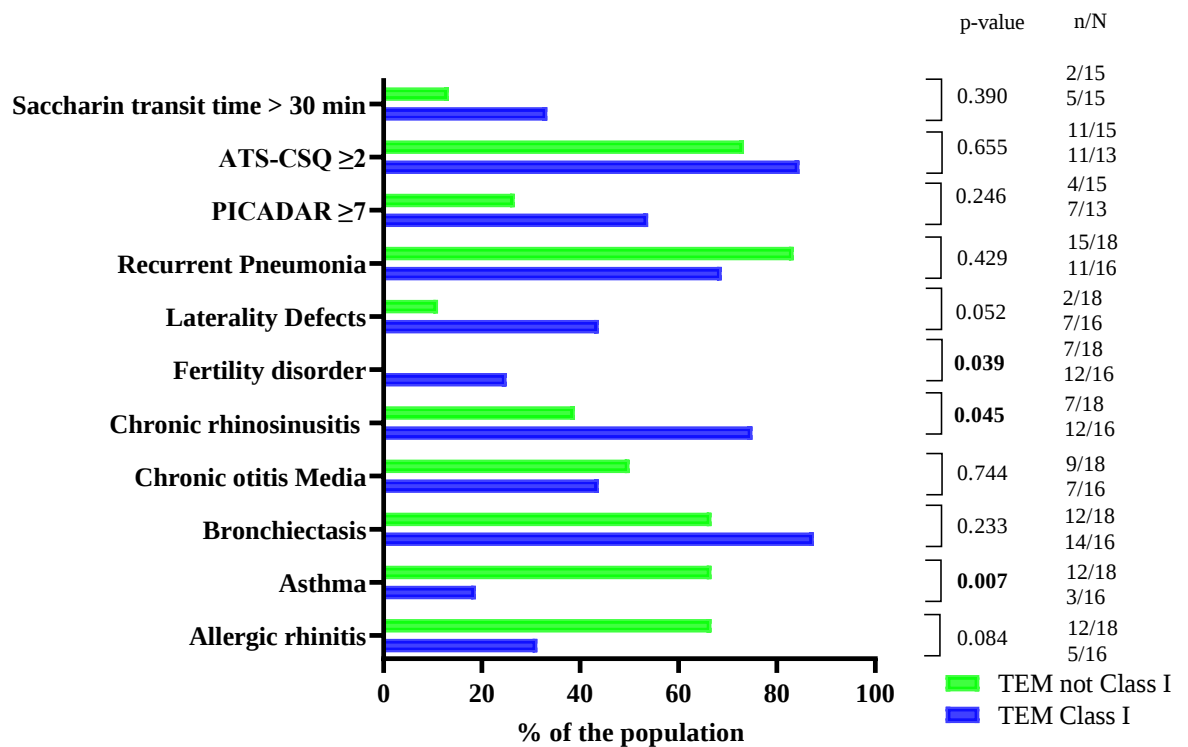


Figure 3. A) Clinical characteristics and alteration in saccharin progression time test (>30 min) of individuals in the control group (CG) and clinically classified as primary

ciliary dyskinesia (cPCD). B) Clinical characteristics, clinical scores of PICADAR and ATS-CSQ (American thoracic society clinical screening questionnaire) , and alteration in saccharin progression time test (>30 min) of individuals clinically classified as primary ciliary dyskinesia (cPCD), divided by transmission electron microscopy (TEM) findings . TEM class I represents patients with hallmark ultrastructural defects por PCD, and TEM not class I represents either normal or other TEM alterations. The statistical analysis was done using the Fisher's exact test. Alpha of 0.05 was set in all analysis.

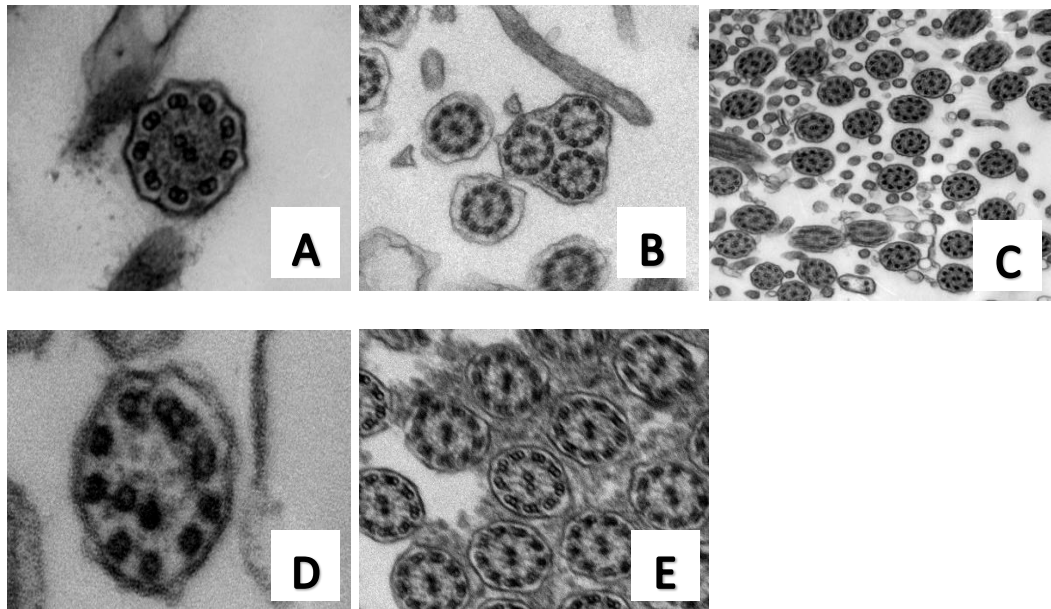


Figure 4. Transmission electron microscopy (TEM) findings in participants classified as clinical primary ciliary dyskinesia group (A-D) and control Group (E). (A) Absent inner and outer dynein arm (TEM 40000X). (B) Compound cilia (TEM 6000X). (C) ciliary disorientation (TEM 10000X). (D) Absent peripheral microtubule and central pair translocation (TEM 40000X). (E) Normal ciliary ultrastructure (TEM 10000X).

5.2 ARTIGO 2

Title: Challenges in Diagnosing Primary Ciliary Dyskinesia in a Brazilian Tertiary Hospital

Running title: Primary Ciliary Dyskinesia Diagnosis

Authors: Mariana Dalbo Contrera Toro^a, José Dirceu Ribeiro^b, Fernando Augusto Lima Marson^{c,d}, Erica Ortiz^a, Adyléia ap. Dalbo Contrera Toro^b, Carmem Bertuzzo^c, Marcus Herbert Jones^e, Eulália Sakano^a.

^aDepartment of Otolaryngology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieirade Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^bDepartment of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^cLaboratory of Medical Genetics and Genome Medicine, Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

^dLaboratory of Human and Medical Genetics, São Francisco University, Avenida São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista, São Paulo, CEP: 12916-900, Brazil

^eDepartment of Pediatrics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brazil

Corresponding author: Mariana D. C Toro Adress: Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo, CEP: 13083-887, Brazil

Email :mdctoro@gmail.com

Abstract

Background: Primary ciliary dyskinesia (PCD) causes alterations in the cellular cilia motility which lead to clinical manifestations in the upper and lower respiratory tract along with situs abnormalities. The PCD diagnosis was improved after the inclusion of several diagnostic tools, such as transmission electron microscopy (TEM) and genetic analysis, however, in several centers, the PCD screening is a challenge yet. We described the alterations in the diagnostic tools (clinical questionnaires, TEM, and genetics testing) in individuals with clinical suspicion of PCD (cPCD) from a Brazilian Tertiary Hospital. **Method:** An observational cross-sectional prospective study was carried out with individuals during the follow-up at the Hospital de Clínicas of the University of Campinas (HC-Unicamp) due to clinical suspicion of PCD. Patients were evaluated between 2011 and 2021, and were submitted to clinical questionnaires, TEM, and genetic variants analyses. Those patients were classified according to the degree of suspicion for PCD. **Results:** Thirty-seven cPCD individuals included, 20/37 (54.1%) had chronic rhinosinusitis, 28/37 (75.6%) had bronchiectasis, and 29/37 (78.4%) had recurrent pneumonia. A total of 20/37 (54.1%) individuals had either TEM or genetic confirmation of PCD; being 10/17 (58.8%) had positive pathogenic variants for PCD. Considering the degree of clinical suspicion, we had: (N=13; high suspicion) 11 (84.6%) PCD, two (15.4%) highly likely PCD diagnosis; (N=16; moderate suspicion) seven (43.8%) PCD, three (18.8%) highly likely PCD diagnosis, four (25%) highly unlikely PCD diagnosis, two (12.5%) inconclusive PCD diagnosis; (N=8; low suspicion) two (25%) PCD, 5 (62.5%) highly unlikely PCD diagnosis, and one (12.5%) inconclusive PCD diagnosis. The mean age at diagnosis was 15 yo and the mean time between suspicion and diagnosis was five years. **Conclusion:** This study described clinical, TEM and genetic findings in a population of a tertiary hospital. Genetic testing proved to be a straightforward method that can improve diagnosis and treatment, even in individuals without situs alterations. However, the time between suspicion and diagnosis should be reduced to improve the disease management.

Keywords: Ciliary Motility Disorders; Kartagener Syndrome; Microscopy, Electron, Transmission; Genetic Testing, Sinusitis, Bronchiectasis

1. Background

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a disease in which alterations in the cellular cilia motility lead to clinical manifestation, such as situs inversus, bronchiectasis, upper respiratory tract infections and infertility (1,2). Several genetic variants in PCD-related genes are responsible for modifications on the ciliary ultrastructure and function, that will result in a heterogenous clinical phenotype (3). In the lower respiratory tract, the malfunction of the ciliary clearance can create an appropriate environment for acute recurrent infection, remodeling of the airways and deteriorated the lung function (4). This motility disfunction also increase the upper respiratory symptoms and the risk for chronic rhinosinusitis (CRS), chronic rhinitis, and chronic and acute otitis (5). Also, laterality situs defects along with infertility are commonly present (1).

Although it has been 45 years since Afzelius described the ultrastructure ciliary alteration in individuals with bronchiectasis, sinusitis, and situs inversus, the clinicians still face difficult in diagnosing PCD individuals (6,7). The American thoracic society (ATS) and the European respiratory society (ERS) differ in their algorithm to diagnosis, and even other adaptations of this algorithm have been reported (8,9). In addition, the lack of one gold standard test, along with a PCD phenotype heterogeneity justifies the needs to apply a different number of tools to establish a confirmatory diagnosis in those algorithms (7,8).

The difficult in diagnosing starts with the selection the individuals that should initiate investigation, because clinical criteria can differ to many authors. For example, there is no consensus on predictive clinical questionnaires as PICADAR (PrImary CiliAry DyskinesiA Rule), ATS clinical screening questionnaire (ATS-CSQ), and Clinical index questionnaires (10–12). Commonly used tools as transmission electron microscopy (TEM), high speed video microscopy, nasal nitric oxide can be implemented in the PDC diagnosis workflows, besides that, these tools are complex, expensive and have a considerable rate of false negatives (1,2,13). In addition, genetic screening of those individuals can though to be a solution as it is less expensive than other tools and may become even cheaper in the future. Also, it is a straightforward test that can be done without patients' collaboration, but it still has allowed

sensitivity as we are not completely aware of all genetic variants involved with the PCD disease (14,15).

In the International PCD cohort (iPCD) formed by majorly high-income countries, 30% of individuals had ambiguous or did not conclude a diagnostic algorithm (16). Considering low-income countries and more remote regions those diagnostic tests are even more unavailable and difficult to perform (17). The delay in suspicion and diagnosis of this disease can corroborate with a poorer prognosis because early identifying and treat infectious exacerbations can avoid lung structural damage in PCD individuals and late diagnosis are associated with decrease lung function (18,19).

The aim of this study was to describe the alterations in the diagnostic tools (TEM, genetics testing, and clinical questionnaires) in individuals with clinical suspicion of PCD (cPCD) from a Brazilian Tertiary Hospital.

2. Material and Methods

An observational analytic cross-sectional prospective study was carried out with individuals during the follow-up at the Hospital de Clínicas of the University of Campinas (HC-Unicamp) due to cPCD. All the participants and their guardians signed the terms of consent. The study was approved by the ethics committee of institution (CAAE: #31498020.8.0000.5404 and #48630115.0.2001.5404).

Individuals of the otorhinolaryngology clinics followed from a period of 2012 to 2021, with cPCD were invited to participate in the research. cPCD individuals were referred to by other otorhinolaryngologists, pneumologists and pediatricians from the institution. The inclusion criteria were based on clinical characteristics of PCD described on the ERS task force: defects of laterality, positive family history of PCD, persistent rhinorrhea, chronic rhinitis, neonatal respiratory failure, productive cough, bronchiectasis, chronic otitis (chronic otitis media, serous otitis media, conductive hearing loss), CRS and infertility (20). Subjects diagnosed with cystic fibrosis, alpha-1-antitrypsin deficiency, immunodeficiencies and other clinical conditions that may mimic clinical alterations found on PCD were excluded.

All individuals responded to a clinical form containing demographic data, characteristic symptoms of PCD, personal history, and the individuals evaluated after 2016 responded to the PICADAR and ATS clinical screening questionnaires (10,11).

All individuals were then classified with low, moderate, or high suspicion for PCD according to the following criteria: (low suspicion) individuals with repetition pneumonia or non-atopic severe asthma and upper respiratory tract infections; (moderate suspicion) individuals with bronchiectasis and sinusitis or repetition pneumonia and positive familiarly history of PCD; and (high suspicion) individuals with bronchiectasis and either situs alterations or sperm defects.

For nasal evaluation, the individuals underwent nasal endoscopy. The main alterations as mucosa edema, nasal polyps, septal deviation, inferior turbinate hypertrophy, nasal secretion, and adenoid hypertrophy were documented. Individuals who had acute upper airways infections on the day of collection were rescheduled after 30 days.

For evaluation of TEM, material (ciliated epithelial tissue) was collected through cytological brushing of the inferior turbinate. The material was placed in a container with 3% glutaraldehyde fixative solution maintained at the temperature of 4° C for 3 h. The biopsy was then processed, washed, and placed in a container with a phosphate buffer. The samples were analyzed by two researchers (MDCT and EO), according to the “Better Experimental Approaches to Treat Primary Ciliary Dyskinesia” criteria (BEAT- PCD TEM criteria) from ERS (21).

The BEAT-PCD-TEM criteria consists in: [class 1 alteration] hallmark defects such as more than 50% of axonemes with outer dynein arm (ODA) defects with or without inner dynein arm (IDA) defects, or microtubular disorganization (MD) with IDA defects; [class 2 alterations] cilia alterations that confirms PCD diagnosis in presence of other supporting evidence which include: central complex (CC) defects, mislocalisation of basal bodies with few or no cilia (Oligocilia), MD defect with IDA present or ODA defect with or without IDA defect in 25-50% of cross-sections.

Ultrastructure changes were based on observation of at least 100 cilia, being evaluated in cross sections (20). Abnormalities found in less than 10% of the cilia were considered within the normal range (22). It was described all alterations found in the cilia ultrastructure and organization such as the absence of the IDA and ODA, translocations and absences of central microtubules, compound cilia, ciliary disorientation, and alterations in peripheral and central microtubules (23,24).

Analysis of genetic variants was done according to previously published data (19). In brief, the venous blood was collected from individuals and transported to the Molecular Genetics Laboratory of the Faculty of Medical Sciences/Unicamp. At the laboratory, the material was processed for DNA extraction using the FlexiGene DNA Kit extraction kit (Qiagen[®], Valencia, CA, 91355, USA). After, the DNA extraction was quantified in Qubit 2.0 (Life Technologies[®], São Paulo/SP, Brazil) and being in accordingly, the sample was sent for a DNA panel gene (TruSeq[®] 202 amplicon custom panel) sequencing. The genetic sequencing was performed on the MySeq platform (Illumina[®], San Diego, CA 92122 USA) following three steps: (i) creation of the DNA library; (ii) equipment sequencing to generate the DNA sequencing; and (iii) construction of the final DNA sequence by software analysis. After the initial description of the variants, it was assigned to association with the disease by comparison with previously published data and the classification according to pathogenicity was done using the definition from American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.

In our data, the follow PCD-related genes were analyzed: Armadillo Repeat Containing (*ARMC4*); Chromosome 21 Open Reading Frame 59 (*C21ORF59*); Coiled-Coil Domain Containing 103 (*CCDC103*); Coiled-Coil Domain Containing 114 (*CCDC114*); Coiled-Coil Domain Containing 151 (*CCDC151*); Coiled-Coil Domain Containing (*CCDC39*); Coiled-Coil Domain Containing 40 (*CCDC40*); Coiled-Coil Domain Containing 65 (*CCDC65*); Cyclin O (*CCNO*); Dynein, Axonemal, Assembly Factor 1 (*DNAAF1*); Dynein, Axonemal, Assembly Factor 2 (*DNAAF2*); Dynein, Axonemal, Assembly Factor 3 (*DNAAF3*); Dynein Axonemal Heavy Chain 11 (*DNAH11*); Dynein Axonemal Heavy Chain 5 (*DNAH5*); Dynein, Axonemal, Intermediate Chain 1 (*DNAI1*); Dynein, Axonemal, Intermediate Chain 2 (*DNAI2*); Dynein, Axonemal, Light Chain 1 (*DNAL1*); Dynein Regulatory Complex Subunit 1 (*DRC1*); Dyslexia Susceptibility 1 Candidate 1 (*DYX1C1*); HEAT Repeat Containing 2 (*HEATR2*); Axonemal Central Pair Apparatus Protein (*HYDIN*); Leucine Rich Repeat Containing 6 (*LRRC6*); NME/NM23 Family Member 8 (*NME8*); Oral-Facial-Digital Syndrome 1 (*OFD1*); Retinitis Pigmentosa Gtpase Regulator (*RPGR*); Radial Spoke Head 1 Homolog (Chlamydomonas) (*RSPH1*); Radial Spoke Head 4 Homolog A (Chlamydomonas) (*RSPH4A*); Radial Spoke Head Component 9 (*RSPH9*); Sperm Associated Antigen 1 (*SPAG1*); Zinc Finger, MYND-Type Containing 10 (*ZMYND10*); and Coiled-Coil Domain Containing 164 (*CCDC164*). In addition, it was performed genetic sequencing of the

CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene to exclude cystic fibrosis disease.

All individuals then had their clinical and diagnosis data described in an excel sheet and classified as diagnosed, excluded diagnosis or dubious diagnosis. A retrospective review of the charts allowed the researchers to double check for any clinical and diagnosis alterations through the years. Also, the age at suspicion and the age at diagnosis were recorded. It was evaluated which tools were used to diagnose these patients [clinical characteristics, TEM, genetics testing, PICADAR, and ATS-CSQ]. It was considered a PICADAR >6 points and an ATS-CSQ >2 the score for suspicion of PCD as previously reported in the literature (10,11,25).

The descriptive analysis was performed using categorical data by absolute and relative frequency. Numeric data are presented by median and minimum and maximum values; interquartile range and 95% confidence interval for the mean. The normality of the numerical data was evaluated by the following techniques: (I) measurement analysis descriptive for central tendency; (II) method by statistical test (normality tests): Kolmorov-Smirnov and Shapiro-Wilk, the level of significance considered was 0.05.

3. Results

A total of 45 individuals with clinical suspicion for PDC were initially included. Three individuals were excluded due to later diagnosis of cystic fibrosis and Willian Campbell Syndrome. Other three patients were excluded after loss of follow up before any diagnostic tests were concluded. Three individuals had insufficient material for TEM analysis. Of the remaining 37 individuals, six did not answer the PICADAR questionnaire and ATS-CSQ because of implementation of this tool after 2016, and 14 individuals did not undergo genetics testing. Seventeen individuals had the complete protocol done (**Figure 1**).

In our study cohort, 37 (67.6%) individuals were male; 20 (54.1%) had CRS, 28 (75.6%) had bronchiectasis and 29 (78.4%) had recurrent pneumonia. **Table 1** summarizes the clinical alterations and the classification of the individuals in degree of cPCD. In addition, the means age at testing, suspicion, and diagnosis of these individuals in total and according to the degree of cPCD are summarized in **Table 2**. The mean age at diagnosis was 15 yo and the

mean time between suspicion and diagnosis was five years. The PICADAR score predicted 55% of the positive confirmed diagnosis, and ATS-CSQ was positive in 77.8% of the cases.

Table 3 summarizes the diagnostic tests, clinical scores, and age at suspicion and diagnosis of PCD of everyone. A total of 20 (54.1%) individuals had either TEM or genetic confirmation of PCD. When considering the degree of clinical suspicion, out of the 13 individuals in the high suspicion group, 11 (84.6%) had the PCD diagnosis, and two (15.4%) had a highly likely PCD diagnosis. In the moderate suspicion group, with a total of the 16 individuals, seven (43.8%) individuals had PCD positive diagnosis, three (18.8%) had highly likely PCD diagnosis, four (25%) had a highly unlikely PCD diagnosis and two (12.5%) had inconclusive tests results; this group was therefore, the most heterogeneous one. In the individuals of the low suspicion group, two (25%) individuals had PCD positive diagnosis, five (62.5%) had highly unlikely PCD diagnosis, and one (12.5%) had inconclusive PCD diagnosis. **Figure 2** represents the timeline for PCD diagnosis from 2011 to 2021.

A total of 17 individuals underwent genetic variants testing, of which 10 had positive pathogenic variants for PCD, two had the *CFTR* in heterozygosis and five had negative results for the genes included in the DNA panel gene. **Table 4** shows the individuals with positive genetic variants for PCD, their pathogenic variants and proteins involved, the expected ciliary ultrastructure alteration and if TEM findings confirmed that alteration. **Figure 3** shows TEM findings and its correspondent genetic variants according to the BEAT-PCD-TEM criteria (21).

4. Discussion

Diagnosing PCD is a challenge often explained by the low sensitivity and specificity of the tests used; concomitantly with the presence of phenotype and genotype variability (8). However, in our data, the implementation of genetic testing in our practice improved the number of individuals with a definitive diagnosis. As shown in **Figure 3**, the establishment of genetic testing was a turning point in terms of confirming PCD in our study cohort. Also, it could help on genetic counseling in the future. This tool offers an accurate diagnosis, with no age restrictions, and with a potential of been more cost-effaces (15). In the other hand, at least 45 PCD-genes have so far been described but there is still a great number of individuals with positive PCD diagnosis and an inconclusive genetic testing. Curiously, PCD can be caused by

pathogenic variants in genes encoding proteins that are necessary for ciliary function but with normal ultrastructure (14).

However, limited resources countries have additional difficulty because of the need of expensive equipment and highly trained professionals (17), and many regions of the world still suffer with a probable underestimated number of cases (26). It was established that in European countries, both the number of diagnosed cases and the age at diagnosis were correlated with the government's health expenditure (27). In Brazil, the national health care system still does not cover the use of any diagnostic tool in PCD and the only individuals with definitive diagnosis are those enrolled in research projects.

Individuals with situs inversus are in general, diagnosed in an earlier age due to a higher suspicion por ciliopathies (27,28). An international study showed that 37% of the PCD individuals were referred to specialists for diagnosis after at least 40 visits (29). In our study there were no differences in the median age of individuals with clinical low, moderate, or high suspicion, also, we had a higher median age of diagnosis than reported in literature (27,29), which is probably explained by the damming of cases in the last couple of decades. A late diagnose of this condition can impact in a greater number of lower respiratory exacerbations and *Pseudomonas aeruginosa* colonization, which may be associated with pulmonary structure and function deterioration (18). Also, a previous study demonstrated that individuals with an earlier diagnosis of PCD presented better health related quality of life, highlighting the impact of prompt health interventions (30).

Deciding which individuals should undergo a detailed investigation is still a question to be answered. Screening questionnaires as PICADAR and the ATS-CSQ, along with the clinical index were created to facilitate referral from primary doctors (10–12). Although all have proven to have good sensibility comparing to other diagnostic tools, they are still in need of validation, as they were created to a specific population (10–12). In our study, almost all individuals with high suspicion for PCD had their diagnosis confirmed. However, in the low and moderate group diagnosis was very heterogenous and, in these groups, PICADAR failed to predict diagnosis in the majority of PCD+ individuals.

The PICADAR was validated in a pediatric population, and cough was the most important predictive factor, the use of this tool in a mixed aged population, referred to the otorhinolaryngology outpatient clinic may not be so useful one. The ATS-CSQ was a simpler and more reliable tool in our study, but still not flawless. For this reason, individuals with low and moderate suspicion should looked closely as they often demand more effort to

ensure diagnosis, and mostly, physicians should be aware of patients with severe or atypical symptoms, and individually assess each patient's medical history (20). Also, in adult individuals, physicians are often more worried about the deteriorate lung function, then in determine a specific diagnosis (29). Considering the lack of diagnostic clinical tools for this population, along with the lower level of suspicion there is a great chance that adult individuals are underdiagnosed.

The genetic testing can improve the number of individuals with PCD diagnosis. Concerning the genetic analysis, the *DNAH5* pathogenic variants are the most common gene alterations in PDC individuals, and these variations results in ODA defects, being the ODA the main mechanical force responsible for cilia movement, and the absence of this protein will likely result in an immotile cilia (3,31). Two distinct ODA complexes can be found within ciliated epithelium, although they have different distributions along the cilia axoneme, both contain *DNAH5* (32). The two individuals in our study with *DNAH5* variants were heterozygous (one had only one variant and other was a compound heterozygote), and none had isolated ODA defects. Like one of our patients that had ODA+IDA defects, Faily et al reported 27% of its cohort with ODA+IDA defects presented *DNAH5* variants (33). Interestingly, one of our individuals did not have ODA defect what can be explained by either *DNAH5* not been the gene causing PCD or TEM may have missed ODA defects that may be only present in the distal part of the axoneme (defect of only ODA Type 2) (32).

According to the literature, *DNAH11* pathogenic gene variants, despite encoding a protein of the outer arm of dynein, are associated with normal ciliary ultrastructure (34). Cases of PCD with *DNAH11* variants can be identified through abnormal hyperkinetic ciliary beat pattern in high-speed video microscopy immunofluorescence and TEM (35). As with the *DNAH11*, *DNA12* also encodes a protein in the ODA, and individuals with this alteration may present with modified immunofluorescence microscopy and high-speed video microscopy with anomalous ciliary beat. Also, the *CCDC151* encodes an anchoring protein of the external dynein arm, and individuals with this genetic variant have laterality defects and severe cardiac malformations (36). Curiously, both individuals in our study with pathogenic variants in the *CCDC151* had situs inversus, only one presented ODA defect, along with other ultrastructural alterations, and the other had normal ciliary ultrastructure. *ARMC4* pathogenic variants also caused abnormal ODA docking, but in this case, it is more prominent in the distal ciliary axoneme, and it is associated with left-right laterality defects, similarly in our study the

individual that presented the pathogenic variant had dextrocardia along with bronchiectasis and CRS (1,2).

The *CCDC40* is related to the absence of the IDA with or without axoneme disorganization (38). In our study, both individuals with *CCDC40* pathogenic variants had IDA defects along with axoneme disorganization, CRS, bronchiectasis, and recurrent pneumonia, and one of them also presented dextrocardia. Also, in literature the *CCDC40* was linked with a worsening lung function (3). Importantly, most genetic variants were compatible with the TEM findings in our study (2).

Our study demonstrated a diagnostic profile for a rare disease and its practical evolution along the years, it also reveals a genetic and TEM profile in a south American population that is still poorly studied. The main limitations included the loss of follow-up of individuals during the implementations of new tools, and genetic testing was performed in search of only 33 of the 45 known PCD-related gene. However, it brings light to cPCD and urges an earlier diagnosis of the disease through awareness of the primary physicians that first attend those individuals.

5. Conclusions

The cPCD, even in individuals without situs alterations, followed by the diagnostic tests, mainly PCD genetic testing, are able to confirm the PCD diagnosis. However, the time between suspicion and diagnosis should be reduced to improve the disease management.

6. References

1. Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, Manion M, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: An official American thoracic society clinical practice guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2018;197(12):e24–39.
2. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *European Respiratory Journal*. 2017;49(1): 1601090.
3. Lucas JS, Davis SD, Omran H, Shoemark A. Review Primary ciliary dyskinesia in the genomics age. *The Lancet Respiratory*. 2020 ;8(2):202-216.
4. Goutaki M, Meier AB, Halbeisen FS, Lucas JS, Dell SD, Maurer E, et al. Clinical manifestations in primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2016;48(4):1081–95.

5. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology journal*. 2020; Suppl 29:1–464.
6. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science*. 1976;193(4250):317–9.
7. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Searching for a gold standard. *European Respiratory Journal*. 2014;44(6):1418–22.
8. Shoemark A, Dell S, Shapiro A, Lucas JS. ERS and ATS diagnostic guidelines for primary ciliary dyskinesia: similarities and differences in approach to diagnosis. *European Respiratory Journal*. 2019; 5;54(3):1901066.
9. Amirav I, Lavie M. Reply to Shoemark et al. And to Shapiro et al. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2020;201(1):123–5.
10. Leigh MW, Ferkol TW, Davis SD, Lee HS, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Clinical features and associated likelihood of primary ciliary dyskinesia in children and adolescents. *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13(8):1305–13.
11. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *The European respiratory journal*. 2016;47(4):1103–12.
12. Martinů V, Bořek-Dohalská L, Varényiová Ž, Uhlík J, Čapek V, Pohunek P, et al. Evaluation of a Clinical Index as a Predictive Tool for Primary Ciliary Dyskinesia. *Diagnostics*. 2021;11(6):1088.
13. Rubbo B, Shoemark A, Jackson CL, Hirst R, Thompson J, Hayes J, et al. Accuracy of High-Speed Video Analysis to Diagnose Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest*. 2019;155(5):1008–17.
14. Hogg C, Bush A. CON: Primary Ciliary Dyskinesia diagnosis: Genes are all you need! *Paediatric Respiratory Reviews*. 2021;37:34–6.
15. Shirlow R, Fitzgerald DA. PRO: Primary Ciliary Dyskinesia: Genes are all you need! *Paediatric Respiratory Reviews*. 2021;37:32–3.
16. Goutaki M, Maurer E, Halbeisen FS, Amirav I, Barbato A, Behan L, et al. The international primary ciliary dyskinesia cohort (iPCD cohort): Methods and first results. *European Respiratory Journal*. 2017; 4;49(1):1601181.
17. Rumman N, Jackson C, Collins S, Goggin P, Coles J, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Potential options for resource-limited countries. *European Respiratory Review*. 2017; 26(143):160058.
18. Piatti G, de Santi MM, Farolfi A, Zuccotti G v., D'Auria E, Patria MF, et al. Exacerbations and *Pseudomonas aeruginosa* colonization are associated with altered lung structure and function in primary ciliary dyskinesia. *BMC Pediatrics*. 2020 13;20(1):158.

19. Olm MAK, Marson FAL, Athanazio RA, Nakagawa NK, Macchione M, Loges NT, et al. Severe pulmonary disease in an adult primary ciliary dyskinesia population in Brazil. *Scientific Reports*. 2019 18;9(1):8693.
20. Kuehni CE, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Summary of the ERS task force report. *Breathe*. 2017;13(3):166–78.
21. Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, Bukowy-Bieryllo Z, de Santi MM, Goggin P, et al. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *European Respiratory Journal*. 2020 16;55(4):1900725.
22. Olm MAK, Caldini EG, Mauad T. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2015;41(3):251–63.
23. Armengot Carceller M, Mata Roig M, Milara Payá X, Cortijo Gimeno J. Discinesia ciliar primaria. *Ciliopatías. Acta Otorrinolaringologica Espanola*. 2010;61(2):149–59.
24. Boon M, Smits A, Cuppens H, Jaspers M, Proesmans M, Dupont LJ, et al. Primary ciliary dyskinesia: Critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure. *Orphanet Journal of Rare Diseases [Internet]*. 2014;9(1):1–10.
25. Kuehni CE, Lucas JS. Toward an earlier diagnosis of primary ciliary dyskinesia which patients should undergo detailed diagnostic testing? *Annals of the American Thoracic Society*. 2016;13(8):1239–43.
26. Hammoudeh S, Gadelhak W, Janahi IA. Primary ciliary dyskinesia among Arabs: Where do we go from here? *Paediatr Respir Rev*. 2019 ;29:19-22.
27. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *European Respiratory Journal*. 2010;36(6):1248–58.
28. Goutaki M, Halbeisen FS, Barbato A, Crowley S, Harris A, Hirst RA, et al. Late Diagnosis of Infants with PCD and Neonatal Respiratory Distress. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(9):2871.
29. Behan L, Galvin AD, Rubbo B, Masefield S, Copeland F, Manion M, et al. Diagnosing primary ciliary dyskinesia: An international patient perspective. *European Respiratory Journal*. 2016;48(4):1096–107.
30. Behan L, Rubbo B, Lucas JS, Dunn Galvin A. The patient's experience of primary ciliary dyskinesia: a systematic review. *Quality of Life Research*. 2017;26(9):2265–85.
31. Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegauf M, Loges NT, et al. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;174(2):120–6.
32. Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, et al. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary

- ciliary dyskinesia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;171(12):1343–9.
33. Faily M, Bartoloni L, Letourneau A, Munoz A, Falconnet E, Rossier C, et al. Mutations in DNAH5 account for only 15% of a nonpreselected cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Journal of Medical Genetics*. 2009;46(4):281–6.
 34. Shapiro AJ, Leigh MW. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure. *Ultrastructural Pathology* . 2017 2;41(6):373–85.
 35. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax*. 2012;67(5):433–41.
 36. Hjeij R, Onoufriadis A, Watson CM, Slagle CE, Klena NT, Dougherty GW, et al. CCDC151 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disruption of the outer dynein arm docking complex formation. *American Journal of Human Genetics*. 2014;95(3):257–74.
 37. Hjeij R, Lindstrand A, Francis R, Zariwala MA, Liu X, Li Y, et al. ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):357–67.
 38. Blanchon S, Legendre M, Copin B, Duquesnoy P, Montantin G, Kott E, et al. Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary: Ciliary dyskinesia. *Journal of Medical Genetics*. 2012;49(6):410–6.

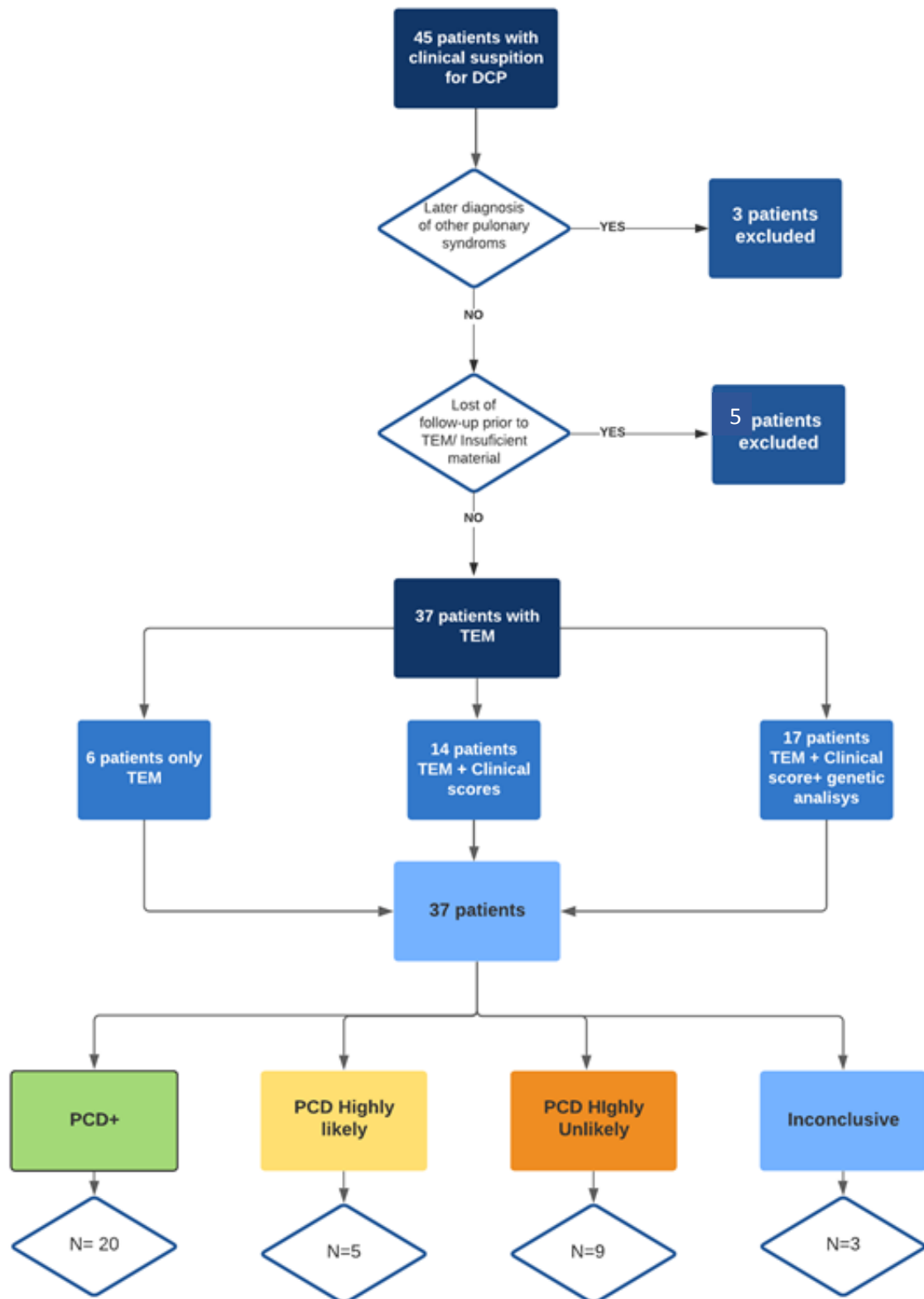


Figure 1- Included patients' algorithm and division by the degree of clinical suspicion. PCD: Primary ciliary dyskinesia, TEM: transmission electron microscopy

Table 1- Clinical characteristics and time to diagnosis in individuals with low, moderate, and high suspicion for primary ciliary dyskinesia (PCD).

	Case	PCD diagnosis	Time to diagnosis*	CRS	NP	CR	Asthma	Bronchiectasis	Laterality defect	RP	Chronic Otitis	Fertility disorders	Consanguinity
<i>Low clinical suspicion</i>	1	PCD+	4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
	2	PCD highly unlikely		-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
	3	Inconclusive		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
	4	PCD+	0	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	5	PCD highly unlikely		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	6	PCD highly unlikely		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	7	PCD highly unlikely		-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
	8	PCD highly unlikely		-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Moderate clinical suspicion</i>	9	PCD highly unlikely		-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	10	PCD highly likely		+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
	11	PCD highly likely		+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	12	PCD highly unlikely		-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	13	PCD+	3	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	14	PCD+	1	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	15	PCD+	1	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	16	PCD highly unlikely		+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	17	PCD highly likely		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	18	PCD+	2	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	19	PCD+	6	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	20	PCD highly unlikely		-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
	21	PCD+	19	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
	22	PCD+	5	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
	23	Inconclusive		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

	24	Inconclusive		+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>High clinical suspicion</i>	25	PCD+	14	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	26	PCD highly likely		+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
	27	PCD+	7	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
	28	PCD+	12	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	29	PCD+	19	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	30	PCD+	24	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	31	PCD+	1	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
	32	PCD highly likely		+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
	33	PCD+	5	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	34	PCD+	11	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
	35	PCD+	0	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
	36	PCD+	2	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	37	PCD+	22	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-

CRS: Chronic rhinosinusitis, NP: nasal polyps, RP: recurrent pneumonia, TEM: transmission electron microscopy, IDA: Inner dynein arm defect, ODA: outer dynein arm defect, CCD: central complex defect, MD: microtubular disorganization. *Time between suspicion and diagnosis in individuals with confirmation of PCD by either TEM or genetics

Table 2- Median age of individuals at Transmission electron microscopy testing, suspicion and confirmed diagnosis, separated by degree of clinical suspicion for primary ciliary dyskinesia (PCD).

Clinical suspicion	N	Median age testing *	Minimum	Maximum	P25	P75
Low suspicion	8	13	9	17	10.25	15.75
Moderate suspicion	16	15.5	2	50	8.25	21.75
High suspicion	13	17	1	60	9	30.5
Total	37	15	1	60	9	21.5
	N	Median age suspicion **	Min	Max	P25	P75
Low suspicion	8	11.5	7	15	8.25	14.5
Moderate suspicion	16	9	0	48	2.5	16
High suspicion	13	7	0	46	0.5	26
Total	37	9	0	48	2.5	15.5
	N	Median age diagnosis ***	Min	Max	P25	P75
Low suspicion	2	15.5	14	17	14	-
Moderate suspicion	7	11	7	50	7	39
High suspicion	11	22	1	60	12	32
Total	20	15	1	60	10.25	31.5

*P-value=0.687; **P-value=0.687; ***P-value=0.631. N: number of individuals with clinical suspicion for PCD, P25: percentil 25%, P75: percentil 75%. The statistical analysis was done using the Kruskal Wallis test. An alpha error of 0.05 was used in all statistical analysis.

Table 3- Individuals with clinical suspicion of primary ciliary dyskinesia (PCD), degree of clinical suspicion and results of diagnostic tests (TEM, clinical scores, and genetic testing).

	<i>ID</i>	<i>Sex</i>	<i>Age at suspicion</i>	<i>TEM^a</i>	<i>Genetics</i>	<i>PICADAR ≥ 7</i>	<i>ATS-CSQ ≥ 2</i>	<i>PCD diagnosis</i>	<i>Age at diagnosis</i>
<i>Low clinical suspicion</i>	1	F	13	Class I	-	-	-	PCD+	17
	2	M	8	Normal	N/D	-	+	PCD highly unlikely	
	3	M	9	Class II	N/D	-	-	Inconclusive	
	4	F	13	Class I	N/D	-	+	PCD+	13
	5	M	7	Normal	N/D	N/D	N/D	PCD highly unlikely	
	6	M	15	Normal	N/D	N/D	N/D	PCD highly unlikely	
	7	M	10	Normal	N/D	-	-	PCD highly unlikely	
	8	M	15	Normal	N/D	-	-	PCD highly unlikely	
<i>Moderate clinical suspicion</i>	9	F	16	Normal	N/D	-	+	PCD highly unlikely	
	10	M	0	Class II	N/D	+	+	PCD highly likely	
	11	F	9	Class II	N/D	-	+	PCD highly likely	
	12	M	16	Normal	-	-	+	PCD highly unlikely	
	13	F	8	Class I	+	+	+	PCD+	11
	14	M	12	Class I	N/D	-	-	PCD+	13
	15	M	9	Class I	+	+	+	PCD+	11
	16	M	44	Normal	N/D	N/D	N/D	PCD highly unlikely	
	17	F	4	Class II	N/D	+	+	PCD highly likely	
	18	M	48	Class I	-	-	+	PCD+	50
	19	M	1	Normal	+	-	-	PCD+	7
	20	F	15	Normal	N/D	-	+	PCD highly unlikely	
	21	M	21	Normal	+	-	+	PCD+	41
	22	M	2	Class I	-	-	-	PCD+	10
	23	F	2	Normal	N/D	+	+	Inconclusive	
	24	F	3	Normal	N/D	-	-	Inconclusive	
<i>High clinical suspicion</i>	25	M	46	Class I	N/D	N/D	N/D	PCD+	60
	26	M	27	Class II	N/D	N/D	N/D	PCD highly likely	
	27	M	25	Class I	+	+	+	PCD+	32
	28	M	0	Class I	+	+	+	PCD+	12
	29	F	15	Class I	-	+	+	PCD+	34
	30	M	1	Normal	+	+	+	PCD+	25
	31	M	28	Class I	N/D	N/D	N/D	PCD+	28
	32	M	0	Class II	-	+	+	PCD highly likely	
	33	F	8	Normal	+	+	+	PCD+	13
	34	M	6	Class I	N/D	-	+	PCD+	17
	35	F	1	Class I	-	+	+	PCD+	2

	36	M	7	Class I	+	+	+	PCD+	9
	37	M	0	Class I	+	-	+	PCD+	22

ID: identification, F: female, M: male, PICADAR: PrImary CiliAry DyskinesiA Rule, TEM: transmission electron microscopy, N/D: not done, ATS-CSQ: American Thoracic society clinical screening questionnaire. a, The BEAT-PCD-TEM criteria consists in: [class 1 alteration] hallmark defects such as more than 50% of axonemes with outer dynein arm (ODA) defects with or without inner dynein arm (IDA) defects, or microtubular disorganization (MD) with IDA defects; [class 2 alterations] cilia alterations that confirms PCD diagnosis in presence of other supporting evidence which include: central complex (CC) defects, mislocalisation of basal bodies with few or no cilia (Oligocilia), MD defect with IDA present or ODA defect with or without IDA defect in 25-50% of cross-sections.

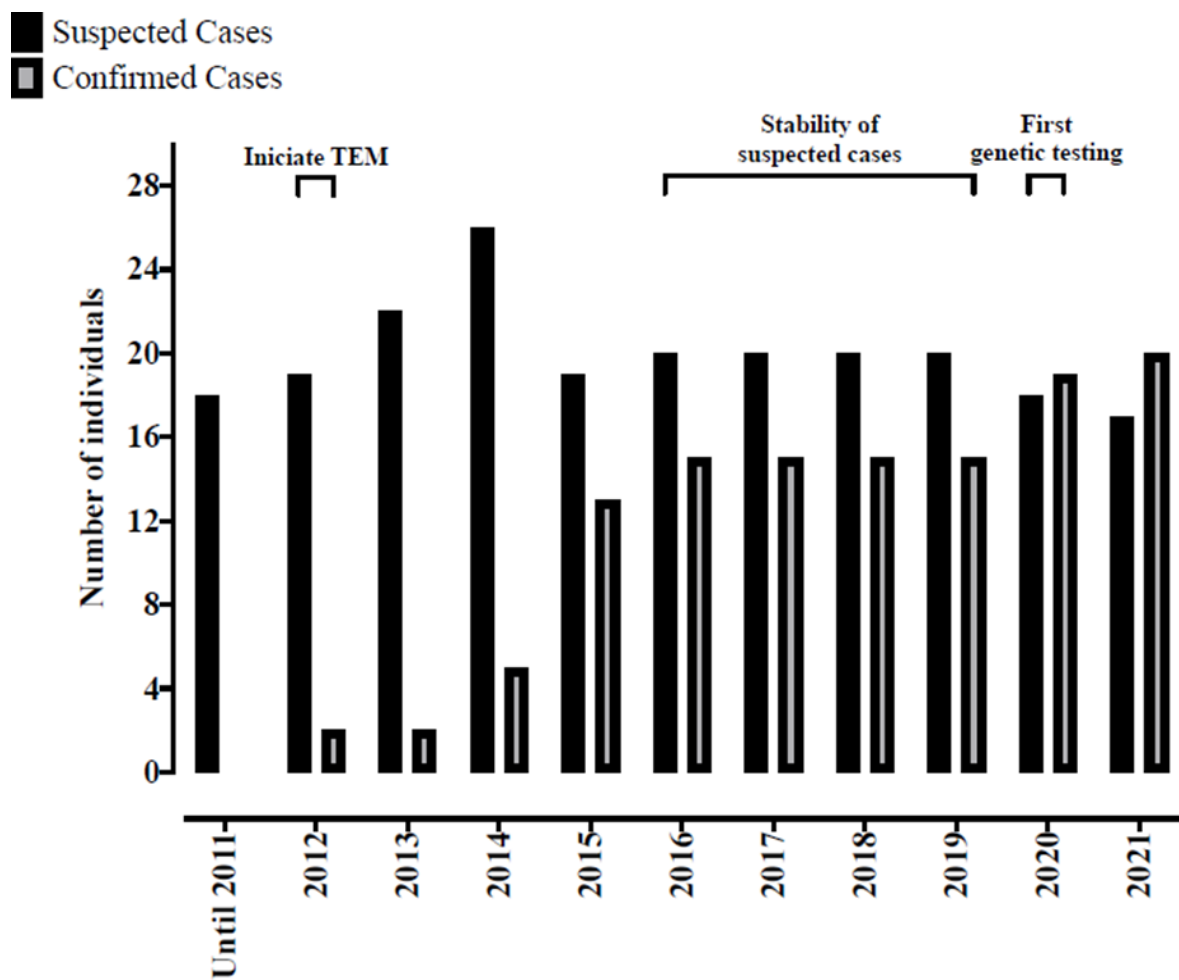


Figure 2. Suspected x confirmed cases from 2011 to 2021.

Table 4- Individuals with genetic variants positive for primary ciliary dyskinesia (PCD), their clinical and transmission electron microscopy (TEM) findings X expected ultrastructural alterations.

Case	Clinical findings	TEM findings	Gene	Protein	c.DNA	code	Expected ultrastructural alterations*	Confirmation
13	RP, BCT, CRS, CO	IDA+ODA/MD	<i>DNAH11</i> and <i>CCDC40</i>	(DNAH11) p.Cys1597Phe and p.Cys1597Phe; (CCDC40) p.Ala83ValfsTer84 and p.Leu872Ter	(DNAH11) c.4790G>T and c.4790G>T; (CCDC40) c.248delC and c.2614delC	(DNAH11) rs72657327 (Hom); (CCDC40) Without id and rs775128843 (Het)	96 nm axonemal ruler: IDA + MD/Normal ultrastructure/ODA defects	+
15	RP, BCT, CRS, CO	IDA+ODA	<i>DNAH5</i>	p.Arg4577Ter	c.13729C>T and c.11571-1G>A	Het	ODA defects	+
19	Asthma, RP, FH+	IDA	<i>DNAH11</i>	p.Met1096Ile	c.3288G>A	rs575775297 (Het)	Normal ultrastructure/ ODA defects	+
21	CRS, RP, BCT, FH+	IDA	<i>DNAH11</i>	p.Met1096Ile	c.3288G>A	rs575775297 (Het)	Normal ultrastructure/ ODA defects	+
27	BCT, CRS, CO, SI	IDA+ODA	<i>CCDC15</i> 1	p.His199ArgfsTer60	c.583_595dupGCGCAAAACAGAC	rs750658321 (Hom)	ODA docker	+
28	RP, BCT, CRS, DC	IDA+CCD+MD	<i>CCDC40</i>	p.Leu872Ter and p.Ala83ValfsTer84	c.2614delC and c.248delC	rs775128843 and rs397515393 (Het)	96 nm axonemal ruler: IDA + MD	+
30	AR, BCT, Asthma, SI, RP, CO, CH	-	<i>CCDC15</i> 1	p.His199ArgfsTer60	c.583_595dupGCGCAAAACAGAC	rs750658321 (Hom)	ODA docker	-
33	CRS, RP, SI, CO	IDA+CCD	<i>DNAH5</i>	p.Arg3885Te	c.11653C>T	rs756032160 (Het)	ODA defects	-
36	CRS, RP, BCT, CO, DC	IDA+ODA+CCD	<i>ARMC4</i>	p.Gln320SerfsTer44	c.958delC	Without id (Hom)	ODA docker	+
37	CRS, RP, BCT, SI, SD	IDA+ODA	<i>DNAI2</i>	p.Arg263Ter	c.787C>T	rs137852998 (Hom)	ODA defects	+

AR: allergic rhinitis, FH+: positive family history, SD: sperm defects, CRS: Chronic rhinosinusitis, BCT: bronchiectasis, CO: chronic otitis, SI: Situs Inversus, DC: dextrocardia, RP: recurrent pneumonia, IDA: Inner dynein arm defect, ODA: outer dynein arm defect, CCD: central complex defect, MD: microtubular disorganization.

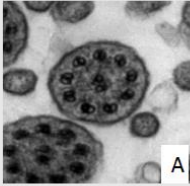
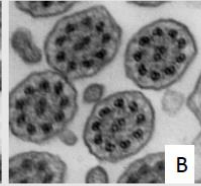
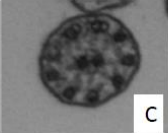
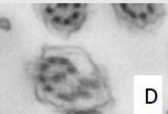
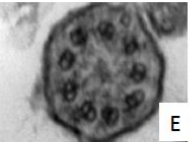
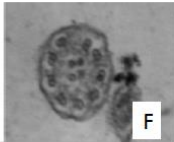
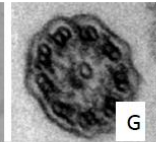
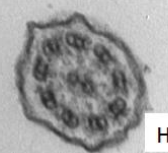
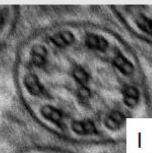
TEM Findings	Related genes	Images
Outer dynein arm defect /Outer and Inner dynein defect*	DNAH5 , DNAI1 , DNAI2 , DNAL1, NME8, DNAH9, CCDC114, ARMC4 , CCDC151 , TTC25, MNS1, DNAAF1, DNAAF2, DNAAF3, DNAAF4, DNAAF5, LRRC6, ZMYND10, SPAG1, C21ORF59, PIH1D3, CCDC103	 
Inner dynein arm defect and microtubular disorganization	CCDC39 CCDC40	
Microtubular disorganization	CCDC164 CCDC65 GAS8	
Central complex defect	RSPH1, RSPH4A, RSPH9, RSPH3, DNAJB13	  
Normal ultrastructure	CCDC11, ENKUR, GAS2L2, LRRC56, DNAH11 , HYDIN, STK36, CCNO	 

Figure 3. Transmission Electron microscopy (TEM) findings and its related genes as described in the BEAT PCD TEM Criteria (21), and TEM images of nasal brushing of patients from the study. In Bold type genes found in the present study genetic testing.

*Outer dynein arm defect with or without inner dynein defect combined.

A and B) TEM showing absence of inner and outer dynein arm. C) Absent inner dynein arm combined with microtubular disorganization. D) microtubular disorganization. E) Absent central complex. F) Two pairs of central microtubule G) central pair complex defect with absence of one central microtubule. H and I) normal ultrastructure.

6. DISCUSSÃO GERAL

Dificuldades diagnósticas na DCP

Na DCP todos os testes disponíveis apresentam vantagens e desvantagens, e nenhum teste isolado é capaz de realizar o diagnóstico da doença (48). A validação de questionários clínicos, para populações diversas em idade e apresentações de sintomas, se faz necessária para uma melhor elucidação dos pacientes que devem ser investigados para DCP (55,71). Em nosso estudo, a avaliação individual das características clínicas, juntamente com o teste da sacarina, foram uma combinação que ajudou na seleção desses pacientes. Por tratar-se de um estudo que avaliou crianças e adultos, em um ambulatório de otorrinolaringologia, o PICADAR, desenvolvido para uma população pediátrica com tosse crônica de um serviço de pneumologia, não foi uma ferramenta que contribuiu na seleção dos pacientes (14,55).

A MET, dentre as ferramentas diagnósticas já estabelecidas para o diagnóstico de DCP talvez seja a mais disponível, apesar das dificuldades técnicas inerentes ao instrumento (69). Embora seja uma ferramenta cara, com necessidade de equipe altamente especializada, de análise subjetiva e com possíveis falsos negativos (pacientes com ultraestrutura ciliar normal e alterações funcionais de mobilidade ciliar) e falsos positivos (discinesias ciliares secundárias com alterações inespecíficas), a correlação clínica e genética da ultraestrutura ajuda tanto no diagnóstico como na elucidação fenotípica desses pacientes (72,73). Devido a taxa de 30% de pacientes com ultraestrutura ciliar normal é possível que no futuro a microscopia eletrônica fique reservada apenas para casos de dúvidas após uso de outras ferramentas diagnósticas como a análise genética e o nNO (73).

O uso do nNO e da VMAV, apesar de comuns em centros diagnósticos europeus e americanos também apresentam falhas (59,68). O nNO tem sua possível utilização apenas em pacientes maiores de 5 anos de idade e que sejam cooperativos (59,60). Pensando na necessidade de diagnóstico precoce desses pacientes, essa é uma limitação significativa (39,50). Além disso, falsos positivos podem ocorrer em pacientes com outras doenças inflamatórias, especialmente não eosinofílicas. A VMAV oferece uma visão direta e funcional sobre a mobilidade ciliar, e estaria assim para DCP como o teste do suor está para fibrose cística (74). Contudo, há limitações quanto a dificuldade técnica e falta de padronização. Além disso infecções virais podem ser responsáveis por falsos positivos e

algumas mutações genéticas podem estar associadas a falsos negativos (68,74). Estudo recente de avaliação detalhada de fenótipos e genótipos conseguiu associar padrões e frequências de batimentos ciliares com variantes genéticas específicas (75).

Shoemark e cols. realizaram uma análise topológica de dados que confirmou associações entre variantes genéticas e alterações do MET e VMAV (76). Com essa metodologia também foi possível associar piora da função pulmonar com variantes do gene CCDC39, e alterações de microtúbulos. Ainda, indivíduos com mutações do gene DNAH11, mais comumente apresentando ultraestrutura ciliar normal, apresentam melhor função pulmonar e menor associação com insuficiência respiratória neonatal (76).

Nesse contexto, o estudo genético pode ser uma alternativa prática, já que pacientes com variantes genéticas específicas podem ser tratados conforme o fenótipo relacionado, por exemplo, pacientes com variantes genéticas associadas a alterações de microtúbulos como CCDC39, devem ser agressivamente tratados para evitar deterioração da função pulmonar (75,76). Devido a quantidade grande de variantes genéticas observadas nessa doença a avaliação individual de cada gene foi por muito tempo uma alternativa ineficaz e cara (36). Porém, com o advento do sequenciamento de exoma-inteiro, essa pode se tornar uma alternativa diagnóstica mais simples, menos subjetiva, e com a popularização dos sequenciamentos, possivelmente barata (36,64). Contudo, apesar de grande avanço na identificação desses genes, ainda há pacientes com genótipo não conhecido, e por isso a atenção a suspeita clínica deve permanecer (11,50).

Realidade brasileira

A discinesia ciliar primária ainda é uma doença pouco estudada na população brasileira. A maioria dos artigos de grupos brasileiros apresentam relatos ou series de casos e revisões da literatura(77–81). Os estudos que avaliaram ferramentas diagnosticas no Brasil foram feitos apenas no estado de São Paulo (47,82,83).

Em 2011, Olm e cols. avaliaram 24 pacientes com suspeita de DCP, com idades entre 1 e 19 anos, e realizou diagnóstico em 12 deles através da MET e avaliação da frequência do batimento ciliar. No seu estudo alterações da espícula radial foram as mais frequentes encontradas em pacientes com DCP, seguido por translocação de microtúbulos e alterações nos braços externos de dineína (81). DeMarco e cols. avaliaram achados da MET em 35 pacientes com suspeita de DCP e 26 pacientes com rinossinusite crônica, e apresentou 54%

de alterações nos braços de dineína (interno, externo ou associado) e 14% de aplasia ciliar, achados esses semelhantes aos do nosso estudo (83).

Em 2019, Olm e cols. avaliaram 49 pacientes adultos, em uma avaliação completa com dados clínicos, PICADAR, nNO, genética, VMAV e MET, sendo o primeiro estudo brasileiro a caracterizar essas alterações(47). Esses pacientes apresentavam mediana de idade de 41 anos, e mais da metade apresentou deterioração da função pulmonar grave(47). CCD40 e DNAH5 foram as variantes genéticas mais encontradas nessa população, o que se assemelha a alguns estudos europeus e difere da população chinesa (11,84,85). No nosso estudo, assim como a variante DNAH11, as variantes CCD40 e DNAH5 foram as mais encontradas.

Idade do diagnóstico versus evolução clínica

No Brasil, portanto, ferramentas diagnósticas para DCP não estão disponíveis pelo SUS, e o diagnóstico desses pacientes fica limitado a centros de pesquisa, muitas vezes concentrados nas regiões sul e sudeste do país. Esse atraso diagnóstico pode significar piora na qualidade de vida dos pacientes, exacerbações bacterianas mais frequentes, prejuízos em relação a audição e deterioração da função pulmonar precoce(30,46,47,86). Nesse contexto, avaliar ferramentas como o tempo de trânsito da sacarina e variantes genéticas na população brasileira pode ajudar a viabilizar a triagem e diagnóstico em um contexto socioeconômico particular da nossa região.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os fatores limitantes dos estudos estão listados a seguir:

Estudo 1. Por tratar-se de uma doença rara, o número de pacientes avaliados por ano é bastante reduzido, apesar de ser realizado em centro de referência de uma região populosa brasileira. Nos nove anos de análise do estudo houve mudanças nos critérios diagnósticos e ferramentas diagnósticas utilizadas, como os critérios de microscopia eletrônica e os questionários clínicos que foram incorporados em 2020 e 2016, respectivamente.

A falta de um teste referência, ou padrão ouro dificulta a avaliação de outras ferramentas diagnósticas e de triagem.

Estudo 2. Houve perda de seguimento de pacientes, assim como a implementação de novas ferramentas diagnósticas que não foram disponibilizadas para todos os pacientes.

A análise genética foi realizada através de 33 dos 45 genes conhecidos por variantes patológicas da DCP. Assim, é possível que alguns pacientes apresentem falsos negativos para variantes genéticas.

8. PERSPECTIVAS

A introdução da nNO no nosso serviço, possivelmente nos próximos anos irá colaborar com um aumento dos diagnósticos e melhora da triagem de pacientes com suspeita clínica de DCP. Na ausência de um padrão ouro diagnóstico, a implementação de múltiplas ferramentas juntamente com uma avaliação clínica multidisciplinar pode elucidar dúvidas diagnósticas desses pacientes.

Sendo assim, será possível estabelecer um protocolo diagnóstico específico conjunto dos serviços de pneumologia, pediatria e otorrinolaringologia da UNICAMP, em concordância com algoritmos já validados no mundo, porém respeitando as características peculiares da nossa realidade (49,87,88).

Com um diagnóstico estabelecido, será possível através de uma coorte de pacientes com DCP, acompanhar a evolução desses pacientes e estabelecer genótipos e fenótipos da nossa população a exemplo do que já ocorre em outros países do mundo (89,90). Além de disponibilizar e estudar tratamentos eficazes e específicos para esse grupo de pacientes.

9. CONCLUSÃO GERAL

Na realidade de um país com poucos centros diagnósticos para DCP a utilização do tempo de trânsito da sacarina pode ser útil na triagem de pacientes com suspeita dessa doença. A avaliação da microscopia eletrônica de transmissão, associada ao teste genético são importantes ferramentas para diagnóstico da DCP.

10. REFERÊNCIAS

1. Whitsett JA. Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance. *Ann Am Thorac Soc*. 2018;15:S143–8.
2. Kempeneers C, Chilvers MA. To beat, or not to beat, that is question! The spectrum of ciliopathies. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(8):1122–9.
3. Mitchison TJ and Mitchison HM. How cilia beat. *Nature*. 2010;463(7279):308–9.
4. Kurkowiak M, Ziętkiewicz E, Witt M. Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics. *J Med Genet*. 2015 ;52(1):1-9.
5. Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, et al. 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.
6. Sampaio P, da Silva MF, Vale I, Roxo-Rosa M, Pinto A, Constant C, et al. CiliarMove: new software for evaluating ciliary beat frequency helps find novel mutations by a Portuguese multidisciplinary team on primary ciliary dyskinesia. *ERJ Open Res*. 2021;7(1):00792–2020.
7. Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatr Pulmonol*. 2016;51(2):115–32.
8. Rodrigues F, Freire AP, Uzeloto J, Xavier R, Ito J, Rocha M, et al. Particularities and clinical applicability of saccharin transit time test. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2019;23(2):229–40.
9. 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.
10. Kuehni CE, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Summary of the ERS task force report. *Breathe*. 2017;13(3):166–78.
11. Lucas JS, Davis SD, Omran H, Shoemark A. Review Primary ciliary dyskinesia in the

- genomics age. *Lancet Respir Med*. 2020 ;8(2):202-216.
12. Crowley S, Azevedo I, Boon M, Bush A, Eber E, Haarman E, et al. Access to medicines for rare diseases: beating the drum for primary ciliary dyskinesia. *ERJ Open Res* . 2020;6(3):00377–2020.
 13. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli M-PF, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *Eur Respir J*. 2010 Dec 1;36(6):1248–58.
 14. Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, Hogg C, Carroll M, Evans HJ, et al. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2016;47(4):1103–12.
 15. Callaghan CO, Chetcuti P, Moya E, Royal L, Le L. High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a British Asian population. *Arch Dis Child*. 2010 ;95(1):51-2.
 16. Hammoudeh S, Gadelhak W, Janahi IA. Primary ciliary dyskinesia among Arabs: Where do we go from here? *Paediatr Respir Rev*. 2019; 29:19-22.
 17. NoSiefert A. Über einen Fall von Bronchiectasie bei einem Patienten mit situs inversus viscerum. *Berliner Klin Wochenschrift*. 1904;(41):139–41.
 18. Berdon WE, Willi U. Situs inversus, bronchiectasis, and sinusitis and its relation to immotile cilia: history of the diseases and their discoverers-Manes Kartagener and Bjorn Afzelius. *Pediatr Radiol*. 2004 ;34(1):38-42.
 19. Kartagener M. Bronchiektasien bei Situs viseerum inversus . *Beiträge zur Klin der Tuberkulose*. 1933;83:489–501.
 20. M Kartagener PS. Bronchiectasis with situs inversus. *Arch Pediatr*. 1962;79:193–207.
 21. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* . 1976;193(4250):317–9.
 22. Solomon GM, Francis R, Chu KK, Birket SE, Gabriel G, Trombley JE, et al. Assessment of ciliary phenotype in primary ciliary dyskinesia by micro-optical coherence tomography. *JCI Insight*. 2017;2(5):1–12.
 23. Umeda A, Yoshida T, Yamaguchi K, Kanazawa M, Torikata C. Immunohistochemical analysis of rat and human respiratory cilia with anti-dynein antibody: comparison

- between normal cilia and pathological cilia in primary ciliary dyskinesia. *Virchows Arch.* 1995; 427(4):401-6.
24. Santamaria F, Santi MM De, Grillo G, Sarnelli P, Caterino M, Greco L. Ciliary motility at light microscopy : a screening technique for ciliary defects ? *Acta Paediatr.* 1999 ;88(8):853-7.
 25. Rubbo B, Lucas JS. Clinical care for primary ciliary dyskinesia: Current challenges and future directions. *Eur Respir Rev.* 2017 Sep 6;26(145):170023.
 26. Mirra V, Werner C, Santamaria F. Primary ciliary dyskinesia: An update on clinical aspects, genetics, diagnosis, and future treatment strategies. *Front Pediatr.* 2017 Jun 9;5:135.
 27. Fitzgerald DA, Shapiro AJ. When to suspect primary ciliary dyskinesia in children. *Paediatr Respir Rev.* 2016 Mar;18:3-7.
 28. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinol J .* 2020;Suppl 29:1–464.
 29. Goutaki M, Meier AB, Halbeisen FS, Lucas JS, Dell SD, Maurer E, et al. Clinical manifestations in primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J .* 2016;48(4):1081–95.
 30. Zawawi F, Shapiro AJ, Dell S, Wolter NE, Marchica CL, Knowles MR, et al. Otolaryngology Manifestations of Primary Ciliary Dyskinesia: A Multicenter Study. *Otolaryngol Neck Surg.* 2021 22:1945998211019320.
 31. Møller ME, Alanin MC, Grønhøj C, Aanæs K, Høiby N, Buchwald C von. Sinus bacteriology in patients with cystic fibrosis or primary ciliary dyskinesia: A systematic review. *Am J Rhinol Allergy.* 2017;31(5):293–8.
 32. Pappa AK, Sullivan KM, Lopez EM, Adams KN, Zanation AM, Ebert CS, et al. Sinus Development and Pneumatization in a Primary Ciliary Dyskinesia Cohort. *Am J Rhinol Allergy.* 2021 ;35(1):72-76.
 33. Morgan LC, Birman CS. The impact of Primary Ciliary Dyskinesia on the upper respiratory tract. *Paediatr Respir Rev.* 2016 Mar;18:33-8.

34. Sironen A, Shoemark A, Patel M, Loebinger MR, Mitchison HM. Sperm defects in primary ciliary dyskinesia and related causes of male infertility. *Cell Mol Life Sci* . 2020;77(11):2029–48.
35. Poprzczyk M, Bicka M, Farahat H, Bazan R, Osinka A, Fabczak H, et al. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells*. 2019 11;8(12):1614.
36. Horani A, Ferkol TW. Advances in the Genetics of Primary Ciliary Dyskinesia: Clinical Implications. *Chest*. 2018;154(3):645–52.
37. Nakhleh N, Francis R, Giese RA, Tian X, Li Y, Zariwala MA, et al. High prevalence of respiratory ciliary dysfunction in congenital heart disease patients with heterotaxy. *Circulation*. 2012;125(18):2232–42.
38. Kennedy MP, Omran H, Leigh MW, Dell S, Morgan L, Molina PL, et al. Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia. *Circulation*. 2007;115(22):2814–21.
39. Goutaki M, Halbeisen FS, Barbato A, Crowley S, Harris A, Hirst RA, et al. Late Diagnosis of Infants with PCD and Neonatal Respiratory Distress. *J Clin Med*. 2020;9(9):2871.
40. Montella S, Corcione A, Santamaria F. Recurrent Pneumonia in Children : A Reasoned Diagnostic Approach and a Single Centre Experience. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 29;18(2):296.
41. Flume PA, Chalmers JD, Olivier KN. Advances in bronchiectasis: endotyping, genetics, microbiome, and disease heterogeneity. *Lancet* . 2018 Sep;392(10150):880–90.
42. Deniz Dog by, Nik-Ain A, Kiper N, Go A, Yalc E, Aslan T. Bronchiectasis: the Consequence of Late Diagnosis in Chronic Respiratory Symptoms. *J Trop Pediatr*. 2005 Dec;51(6):362-5.
43. Alanin MC, Nielsen KG, Buchwald C Von, Skov M, Aanaes K, Højby N, et al. A longitudinal study of lung bacterial pathogens in patients with primary ciliary dyskinesia. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(12):1093-7.

44. Videbæk K, Buchvald F, Holgersen MG, Henriksen A, Eriksson F, Garred P, et al. The impact of mannose- binding lectin polymorphisms on lung function in primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol.* 2019 ;54(8):1182-1189.
45. Saglani S. Lung function in primary ciliary dyskinesia: Breaking the myth that this is a mild disease. *Eur Respir J.* 2018 23;52(2):1801365.
46. Piatti G, De Santi MM, Farolfi A, Zuccotti G V., D’Auria E, Patria MF, et al. Exacerbations and *Pseudomonas aeruginosa* colonization are associated with altered lung structure and function in primary ciliary dyskinesia. *BMC Pediatr.* 2020 13;20(1):158.
47. Olm MAK, Marson FAL, Athanazio RA, Nakagawa NK, Macchione M, Loges NT, et al. Severe pulmonary disease in an adult primary ciliary dyskinesia population in Brazil. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
48. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Searching for a gold standard. *Eur Respir J.* 2014;44(6):1418–22.
49. Shoemark A, Dell S, Shapiro A, Lucas JS. ERS and ATS diagnostic guidelines for primary ciliary dyskinesia: similarities and differences in approach to diagnosis. *Eur Respir J.* 2019 5;54(3):1901066.
50. Shapiro AJ, Davis SD, Polineni D, Manion M, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: An official American thoracic society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197(12):e24–39.
51. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J .* 2017 4;49(1):1601090.
52. Amirav I, Lavie M. Reply to Shoemark et al. And to Shapiro et al. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;201(1):123–5.
53. Kuehni CE, Lucas JS. Toward an earlier diagnosis of primary ciliary dyskinesia which patients should undergo detailed diagnostic testing? *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(8):1239–43.
54. Leigh MW, Ferkol TW, Davis SD, Lee HS, Rosenfeld M, Dell SD, et al. Clinical

- features and associated likelihood of primary ciliary dyskinesia in children and adolescents. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(8):1305–13.
55. Martinů V, Bořek-Dohalská L, Varényiová Ž, Uhlík J, Čapek V, Pohunek P, et al. Evaluation of a Clinical Index as a Predictive Tool for Primary Ciliary Dyskinesia. *Diagnostics*. 2021;11(6):1088.
 56. Plaza Valía P, Valero FC, Pardo JM, Rentero DB, Monte CG. Saccharin test for the study of mucociliary clearance: Reference values for a Spanish population. *Arch Bronconeumol* . 2008;44(10):540–5.
 57. Adde FV, Rozov T. Teste de sacarina em crianças. *J pneumol* . 1997;23(2):66–70.
 58. Canciani M, Barlocco EG, Mastella G, De Santi MM, Gardi C, Lungarella G. The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Pulmonol*. 1988;5(4):210–4.
 59. Shapiro AJ, Josephson M, Rosenfeld M, Yilmaz O, Davis SD, Polineni D, et al. Accuracy of nasal nitric oxide measurement as a diagnostic test for primary ciliary dyskinesia a systematic review and meta-analysis. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(7):1184–96.
 60. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(5):602–15.
 61. Shapiro AJ, Davis SD, Leigh MW, Knowles MR, Lavergne V, Ferkol T. Limitations of nasal nitric oxide testing in primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;202(3):476–7.
 62. Shoemark A, Boon M, Brochhausen C, Bukowy-Bieryllo Z, de Santi MM, Goggin P, et al. International consensus guideline for reporting transmission electron microscopy results in the diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia (BEAT PCD TEM Criteria). *Eur Respir J*. 2020;55(4).
 63. 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.

64. Shirlow R, Fitzgerald DA. PRO: Primary Ciliary Dyskinesia: Genes are all you need! *Paediatr Respir Rev* . 2021;37:32–3.
65. Zariwala MA, Knowles MR, Leigh MW. Primary Ciliary Dyskinesia. 2007 [updated 2019]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021.
66. Dehlink E, Hogg C, Carr SB, Bush A. Clinical phenotype and current diagnostic criteria for primary ciliary dyskinesia. *Expert Rev Respir Med*. 2016 Nov;10(11):1163–1175.
67. 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.
68. Rubbo B, Shoemark A, Jackson CL, Hirst R, Thompson J, Hayes J, et al. Accuracy of High-Speed Video Analysis to Diagnose Primary Ciliary Dyskinesia. *Chest*. 2019; 155(5):1008–17.
69. Shoemark A. Applications of emerging transmission electron microscopy technology in PCD research and diagnosis. *Ultrastruct Pathol*. 2017;41(6):408–14.
70. Hjeij R, Lindstrand A, Francis R, Zariwala MA, Liu X, Li Y, et al. ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am J Hum Genet*. 2013;93(2):357–67.
71. Rubbo B, Best S, Hirst RA, Shoemark A, Goggin P, Carr SB, et al. Clinical features and management of children with primary ciliary dyskinesia in England. *Arch Dis Child*. 2020 1;105(8):724–9.
72. Shoemark A, Burgoyne T, Kwan R, Dixon M, Patel MP, Rogers A V., et al. Primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure: Three-dimensional tomography detects absence of DNAH11. *Eur Respir J*. 2018;51(2) :1701809.
73. Shapiro AJ, Leigh MW. Value of transmission electron microscopy for primary ciliary dyskinesia diagnosis in the era of molecular medicine: Genetic defects with normal and non-diagnostic ciliary ultrastructure. *Ultrastruct Pathol*. 2017 2;41(6):373–85.

74. Hogg C, Bush A. CON: Primary Ciliary Dyskinesia diagnosis: Genes are all you need! *Paediatr Respir Rev*. 2021;37:34–6.
75. Blanchon S, Legendre M, Bottier M, Tamalet A, Montantin G, Collot N, et al. Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. *J Med Genet*. 2020 1;57(4):237–44.
76. Shoemark A, Rubbo B, Legendre M, Fassad MR, Haarman EG, Best S et al. Topological data analysis reveals genotype-phenotype relationships in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2021 Aug 5;58(2):2002359
77. César C, Castro B De, Pola F, Vieira G, Carvalho S De, Fernandes LM, et al. Technical Challenges in Lung Transplantation of Kartagener Syndrome Recipients: A Unique Team Experience With 12 Patients. *Transplant Proc* . 2020;4:10–3.
78. Toledo MF, Adde FV. Discinesia ciliar primária na infância [Primary ciliary dyskinesia in children]. *J Pediatr (Rio J)*. 2000 ;76(1):9-16.
79. Schmidt R, Zacharias B, Trujillo DR. Primary Ciliary Dyskinesia as a Cause of Repeating Atelectasis in the Neonatal Period. *Am J Case Rep*. 2020 ; 21:e921949.
80. Queiroz RM, Filho FB. Kartagener's syndrome. *Pan Afr Med J*. 2018 ;29:160.
81. Olm MAK, Caldini EG, Mauad T. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *J Bras Pneumol*. 2015;41(3):251–63.
82. Olm MAK, Kögler JE, Macchione M, Shoemark A, Saldiva PHN, Rodrigues JC. Primary ciliary dyskinesia: Evaluation using cilia beat frequency assessment via spectral analysis of digital microscopy images. *J Appl Physiol*. 2011;111(1):295–302.
83. Demarco RC, Tamashiro E, Rossato M, Ferreira MDS, Valera FCP, Anselmo-Lima WT. Ciliary ultrastructure in patients with chronic rhinosinusitis and primary ciliary dyskinesia. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2013;270(7):2065–70.
84. Pereira R, Barbosa T, Gales L, Oliveira E, Santos R, Oliveira J, et al. Clinical and Genetic Analysis of Children with Kartagener Syndrome. *Cells*. 2019 15;8(8):900.
85. Guan Y, Yang H, Yao X, Xu H, Liu H, Tang X, et al. Clinical and Genetic Spectrum of Children with Primary Ciliary Dyskinesia in China. *Chest* . 2021 ;159(5):1768-1781.
86. Behan L, Rubbo B, Lucas JS, Dunn Galvin A. The patient's experience of primary

- ciliary dyskinesia: a systematic review. *Qual Life Res.* 2017;26(9):2265–85.
87. Kouis P, Papatheodorou SI, Middleton N, Giallourous G, Kyriacou K, Cohen JT, et al. Cost-effectiveness analysis of three algorithms for diagnosing primary ciliary dyskinesia: A simulation study. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):1–12.
 88. Rumman N, Jackson C, Collins S, Goggin P, Coles J, Lucas JS. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Potential options for resource-limited countries. *Eur Respir Rev.* 2017;26(143).
 89. Goutaki M, Maurer E, Halbeisen FS, Amirav I, Barbato A, Behan L, et al. The international primary ciliary dyskinesia cohort (iPCD cohort): Methods and first results. *Eur Respir J.* 2017 ;49(1):1601181.
 90. Goutaki M, Papon J-F, Boon M, Casaulta C, Eber E, Escudier E, et al. Standardised clinical data from patients with primary ciliary dyskinesia: FOLLOW-PCD. *ERJ Open Res.* 2020;6(1):00237–2019.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)- SACARINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Comparação entre microscopia eletrônica e teste da sacarina na análise mucociliar nasal

Pesquisadora Responsável : Dra. Mariana Toro

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): (19)3521-7523, (19)3521-7524, (19) 98643338 (24 horas/dia. Plantão Otorrino). Comitê de Ética em Pesquisa. Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887 Campinas – SP Fone (019) 3521-8936 Fax (019) 3521-7187. e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Pesquisadores participantes: Mariana Toro, Eulália Sakano

Telefones para contato : _ (19)3521-7523, (19)3521-7524, ((19) 991999397

CAAE: 1109.0.146.000-11

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: cujo objetivo é estudar o tecido que reveste o nariz internamente (a mucosa nasal). O motivo que nos leva a estudar o problema de funcionamento da mucosa nasal é encontrar métodos que possam auxiliar o diagnóstico de tal problema e por isso podem trazer diversas consequências aos seres humanos que a possuem. Se tivermos sucesso, conseguiremos acrescentar mais uma ajuda aos seres humanos que se encontram ou venham a desenvolver tal situação.

Haverá coleta de material para a realização da pesquisa. Esse material será retirado de sua própria mucosa nasal, através de material médico adequado e sob anestesia local. O risco de tal procedimento é mínimo. O principal ocorrido pode ser um sangramento nasal de pequena quantidade cessará espontaneamente. Os riscos teóricos envolvidos são uma infecção adquirida, sangramento nasal, dor, formação de cicatrizes nasais internas. Não haverá qualquer risco referente a sequelas estéticas. O material retirado será analisados nos laboratórios do HC/UNICAMP.

Haverá ainda outro teste clínico que você será submetido que será a colocação o de uma substância, semelhante a um pedaço de açúcar, que se chama sacarina. Essa substância tem tamanho menor que um grão de arroz e será colocada em seu nariz. Você deverá ficar parado, sentado e deve evitar engolir, falar ou tossir. O teste acaba quando

você sentir um gosto de açúcar em sua garganta. Esse teste não apresenta qualquer risco a sua saúde.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Não haverá qualquer exposição referente a sua identidade, e essa será mantida em absoluto sigilo.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSINTÊNCIA: **Você não será** prejudicado(a) em seu seguimento no Hospital das Clínicas da UNICAMP, mesmo caso não aceite em participar desse projeto de pesquisa.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no seu prontuário médico, uma ficará com os pesquisadores e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Nome e Assinatura do pesquisador

_____(Mariana D C Toro)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo citado acima, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisadora Laíza Mohana sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data: Campinas, _____ de _____ de 20__.

Nome: _____(HC _____)

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

APÊNDICE 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)- GENÉTICA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA E DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES PREVALENTES NO BRASIL.

I. A justificativa e objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo para avaliarmos a presença de Discinesia Ciliar Primária (DCP) e as mutações genéticas envolvidas.

A Discinesia Ciliar Primária (DCP) é uma doença que afeta múltiplos órgãos e causa infecções crônicas em vias aéreas, particularmente sinusite, otite e bronquite supurativa. A DCP é uma doença autossômica recessiva, com incidência entre 1:4.000 a 1:40.000 na população caucasiana. Não há dados de prevalência de DCP na população brasileira ou latino-americana. Portanto, podemos estimar que 10 a 20 mil brasileiros tem a doença e que a imensa maioria não tem diagnóstico confirmado e consequentemente não recebe tratamento adequado para DCP.

Este projeto tem como objetivo detectar portadores de DCP por medidas de óxido nítrico nasal e por análise de estrutura ciliar por microscopia eletrônica. Adicionalmente, através de estudos genéticos, pretendemos descobrir que tipo de mutação causou a doença. Esta pesquisa que será desenvolvida no Instituto de Pesquisas Biomédicas localizado no segundo andar do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e no Hospital de Clínicas da Unicamp.

II. Procedimentos a serem realizados

Você será convidado a responder uma ficha clínica com dados da história dos sintomas respiratórios. Será feita uma medida de óxido nítrico nasal e obtidas amostras de epitélio nasal e uma amostra de sangue detalhadas a seguir.

1. **Medida de óxido nítrico nasal:** esta medida é feita pela introdução de uma cânula na narina, por aproximadamente 3-5mm. A cânula, que está conectada ao medidor de óxido nítrico, irá registrar os níveis de óxido nítrico nasal por 30 a 60 segundos.
2. **Amostra de epitélio nasal:** a obtenção de epitélio é importante para avaliar alterações na estrutura dos cílios e também no movimento que eles realizam. Amostra do epitélio é obtida por raspagem da mucosa nasal.
3. **Amostra de sangue:** será usada para estudos genéticos e será obtida por punção venosa periférica.

Armazenamento de amostras biológicas: as amostras de epitélio e de sangue serão armazenadas por um prazo de no máximo 10 anos, para análises biológicas futuras.

Esses procedimentos serão realizados por profissionais treinados e experientes, com a duração de aproximadamente 15 minutos.

III. Desconfortos e Riscos

Alguns efeitos colaterais que são comuns durante a coleta de epitélio nasal ou coleta de sangue. A medida do óxido nítrico nasal não causa dor e pode ser levemente desconfortável. A raspagem nasal é um pouco dolorosa e pode causar sangramento no nariz. A coleta de sangue também pode causar

dor ou eventualmente hematoma na região onde o sangue é coletado, porém quando presentes oferecem riscos mínimos. Porém caso qualquer outro sinal sintoma, ou desconforto seja relatado pela criança, os profissionais responsáveis interromperão o teste e tomarão todas as medidas necessárias para a situação.

Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no termo de consentimento livre e esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas segundo a resolução 466/12 (item IV.3).

IV. Benefícios que se pode obter:

Ao participar você estará colaborando para esclarecer a origem dos seus sintomas respiratórios. Caso a doença seja confirmada, você será encaminhado a um centro especializado para atendimento de DCP. Você também estará ajudando os pesquisadores a entender melhor a DCP na nossa população.

V. Os procedimentos alternativos que possam ser vantajosos:

Conforme descrito no parágrafo anterior, em virtude de realizar testes normalmente não disponíveis, a inclusão no estudo pode auxiliar o médico no diagnóstico e no tratamento.

VI. Garantia de resposta a qualquer pergunta:

Caso ainda após a leitura do termo a criança ou o responsável ainda tiverem alguma dúvida, sobre este estudo o senhor(a) poderá contatar o pesquisador responsável Professor Dr José Dirceu Ribeiro pelo telefone (19) 992147525 a qualquer hora do dia. Para qualquer pergunta sobre meus direitos entrarei em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp pelo telefone (19) 3521.8936. O Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp funciona durante segunda a sexta das 8:30 às 17:00 horas no seguinte endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo número 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas SP

VII. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si:

Os participantes podem em qualquer momento cancelar a sua participação no estudo. Isto não influenciará no andamento do estudo e nem influenciará seu atendimento nos Hospitais.

VIII. Garantia de Privacidade:

Os dados dos clínicos e o resultado dos exames de óxido nítrico nasal, análise das amostras de epitélio e sangue (análise genética) são confidenciais e não poderão ser utilizados para outros objetivos que não estejam descritos neste termo. Os resultados deste estudo deverão ser publicados, mas a identidade dos participantes não será revelada em nenhum momento. O Comitê de Ética em Pesquisa ao qual o projeto foi submetido poderá ter acesso aos dados da pesquisa.

IX. Compromisso com informação atualizada do estudo:

Os participantes do estudo e os responsáveis saberão os resultados dos exames, bem como, após a publicação dos dados acessos às informações obtidas no estudo, após a publicação.

X. Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa:

Não haverá custos para os participantes do estudo, nem para responder o questionário nem para as coletas de secreções nasais e sangue. Você e seu (sua) filho (a) também não receberão nenhum pagamento para participar do estudo, sendo a coleta realizada durante a rotina de atendimento.

XI. Responsabilidade do pesquisador

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

O material biológico coletado no estudo (sangue e epitélio nasal) será armazenado no Instituto de Pesquisas Biomédicas caso existe a possibilidade de avaliarmos outros fatores que podem ajudar no prognóstico e tratamento dos portadores de discinesia ciliar primária.

Considerando o material biológico obtido no estudo:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: término dos estudos e validade da amostra para novas análises. Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados

a: _____.

Favor preencher abaixo se concordar em participar do estudo:

Eu, concordo em participar do projeto titulado: "IDENTIFICAÇÃO DE PORTADORES DE DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA E DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES PREVALENTES NO BRASIL" e declaro que fui informado sobre os reais objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e que estou ciente que o estudo pretende detectar

portadores de DCP por medidas de óxido nítrico nasal e por análise de estrutura ciliar por microscopia eletrônica. Adicionalmente, através de estudos genéticos, os pesquisadores pretendem descobrir que tipo de mutação causou a doença. Declaro ainda que as minhas dúvidas foram esclarecidas e sei que poderei entrar em contato caso haja dúvidas. Além disso sei que as informações dadas nesse estudo são confidenciais e que poderei me desligar do estudo a qualquer momento, bastando informar aos pesquisadores da minha decisão, sem que isso interfira no meu acompanhamento médico.

Declaro que recebi uma via do presente Termo de Consentimento e concordo com a minha participação neste estudo.

Nome do participante _____

Assinatura do participante _____

Telefones de Contato: () _____ () _____

Data: ____/____/____

Nome Pesquisador _____

Assinatura do Pesquisador _____

Este formulário foi lido para _____ em
____/____/____ (data) por _____ (nome pesquisador)
enquanto eu estava presente.

Eu, _____

_____ concordo com a participação e aceito realizar as seguintes avaliações:

Aplicação da ficha clínica	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Ass. Representante legal _____
Realização do raspado da mucosa nasal	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Ass. Representante legal _____
Realização da coleta de sangue	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Ass. Representante legal _____
Usar o material biológico para futuras análises	() Sim, estou de acordo	() Não, não estou de acordo	Ass. Representante legal _____

APÊNDICE 3 –FICHA CLÍNICA DISCINESIA CILIAR PRIMÁRIA**PROTOCOLO TESTE DA SACARINA/MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

DATA: _____

No. _____

PACIENTE CONTROLE ()

PACIENTE CONTROLE RINITE/RSC()

PACIENTE TESTE ()

NOME: _____

HC: _____ DN: _____ IDADE: _____

TEL: _____ ENDEREÇO: _____

DIAGNÓSTICOS: _____

DIAGNÓSTICOS ORL: _____

NASOFIBROSCOPIA: _____

MEDICAÇÕES EM USO:

TESTE SACARINA: INÍCIO: _____ FIM: _____ TEMPO TOTAL: _____

TEMPERATURA DA SALA: _____ TEMPERATURA CORPORAL: _____

FOSSA NASAL AVALIADA: () DIREITA () ESQUERDA

MICROSCOPIA ELETRÔNICA: _____

NORMAL () ALTERADO () _____

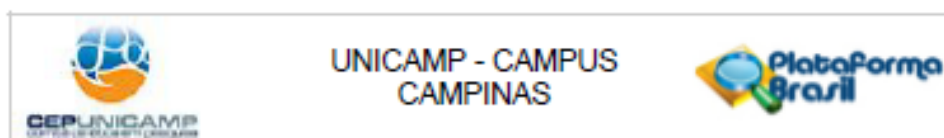
DATA ASSINATURA TCLE: _____

PICADAR: _____

ATS-CSQ: _____

ANEXOS

ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS- SACARINA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO ENTRE MICROSCOPIA ELETRÔNICA E TESTE DA SACARINA NA ANÁLISE MUCOCILIAR NASAL DE PORTADORES DE DISCINESIA CILIAR

Pesquisador: Mariana Daibo Contrera Toro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31498020.8.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.069.880

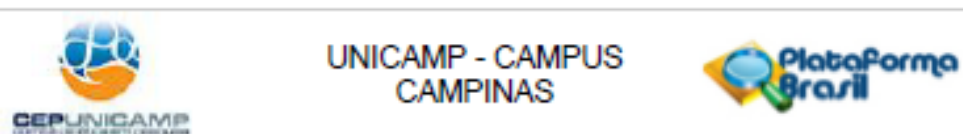
Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Introdução:

O transporte mucociliar é importante mecanismo de defesa do trato respiratório superior e inferior, sendo capaz de carrear partículas nas vias aéreas à rinofaringe, onde são deglutidas. O seu funcionamento depende da quantidade e propriedades visco-elásticas do muco, do número de células ciliadas e da atividade ciliar. Defeitos nos mecanismos do transporte mucociliar predispõem a infecções recorrentes ou crônicas do trato respiratório. Os sintomas da disfunção ciliar costumam aparecer em idade precoce, porém os sintomas não são específicos e o diagnóstico pode ser retardado. Outra causa para o atraso são os métodos diagnósticos atualmente disponíveis, tais como a microscopia eletrônica e a medida de fluxo mucociliar por partículas radiomarcadas, que são caros, complexos e não disponíveis na maioria dos hospitais. O teste da sacarina vem sendo cada vez mais estudado por se mostrar um bom teste de triagem para avaliar o transporte mucociliar nasal. É tecnicamente simples, de fácil execução, não invasivo e de baixo custo. Alguns autores demonstraram que a medida do clearance mucociliar através do teste de sacarina em crianças na faixa etária escolar demonstrou um bom coeficiente de reprodutibilidade. Alterações do clearance mucociliar podem ocorrer após cirurgia de septoplastia, mesmo havendo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Benito Godoi CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.069.000

Integridade da superfície da mucosa nasal detectado por microscopia eletrônica, conforme demonstrado previamente. O tabagismo também já foi demonstrado ser capaz de alterar o clearance mucociliar nasal. Esta pesquisa tem como finalidade padronizar o teste da sacarina como método diagnóstico das disfunções do clearance mucociliar nasal. Espera-se com esta pesquisa obter dados que apontem que o teste da sacarina é um método seguro e efetivo para o diagnóstico das disfunções mucociliares, além de pouco invasivo, baixo custo e de fácil realização. Desta forma, esta pesquisa é justificada por tentar demonstrar que este teste será uma alternativa à microscopia eletrônica da mucosa nasal, atualmente o método padrão-ouro e conhecido por ser exame de alto custo e não disponível na maior parte da rede hospitalar pública e privada do Brasil. Trata-se de uma oportunidade ímpar na realização de pesquisas dessa relevância, dignas de instituição de ensino e pesquisa como a UNICAMP. A prévia realização de microscopias eletrônicas em pesquisas mostram a afinidade do setor de otorrinolaringologia com o setor de microscopia eletrônica, o que gera mais um incentivo a realização desse projeto.

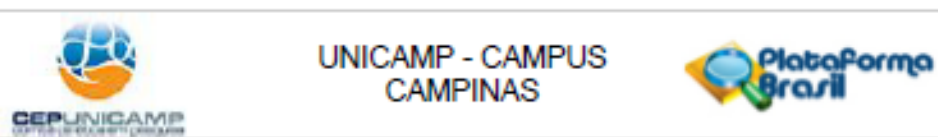
Hipótese:

O teste da sacarina é um método seguro, efetivo, de baixo custo fácil realização e isento de complicações para o diagnóstico de disfunções mucociliares da mucosa nasal. Os resultados do teste da sacarina são comparáveis aos achados à microscopia eletrônica da mucosa nasal em relação ao clearance mucociliar.

Metodologia Proposta:

Trata-se de um estudo observacional e descritivo, baseado na análise comparativa de duas opções diagnósticas. O estudo se baseará na divisão entre dois braços de pacientes (caso e controle). O grupo de casos serão pacientes com discinesia ciliar primária, já diagnosticados previamente segundo os critérios da literatura médica já evidenciados acima. O grupo controle será de pacientes saudáveis, sem queixas nasais e voluntários. A pesquisa pode ser suspensa ou encerrada em caso de impossibilidade de realização dos exames, na ausência de voluntários ou ainda se observado qualquer efeito adverso ou intercorrências graves que possam trazer consequências aos sujeitos de pesquisa. O estudo será realizado no ambulatório de Otorrinolaringologia do HC-UNICAMP. Serão selecionados voluntários portadores de discinesia ciliar, que necessitem da biópsia nasal com microscopia eletrônica para elucidação diagnóstica e voluntários saudáveis sem queixas nasais. Serão analisados sexo, idade, comorbidades, queixas nasais, temperatura nasal e ambiental, patologias nasais, morfologia do cílio, posição ciliar. Para a realização do teste de sacarina, será colocada uma partícula da sacarina de 1mm na superfície da cabeça da concha inferior, a 1cm da concha da cabeça inferior evitando-se a área de epitélio escamoso. O sujeito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.069.000

permanecerá sentado, em posição confortável, com a orientação de respirar normalmente, não tossir, não deglutir e não falar. Será monitorizada a temperatura da sala e a temperatura nasal. Ao sentir o gosto de açúcar na boca, relatará o fato ao avaliador e o tempo de teste será documentado. O tempo monitorado será em minutos. Se nenhum gosto for sentido após 60 minutos, o teste será parado e a habilidade do paciente em sentir o gosto da sacarina colocada diretamente na língua será verificada. Neste caso, o teste será repetido no mínimo duas semanas após. Será realizada a remoção de 3 pequenos fragmentos com pinça microscópica saca-bocado (1mm) da mucosa nasal localizada no : processo uncinado; transição ao septo com o assoalho nasal a 1 cm do vestibulo nasal; na concha inferior 1 cm posterior cabeça da concha, na transição da face septal com sua borda inferior. Esse material será colocado em meio Kamoviski e enviado para análise com microscopia eletrônica, com análise pelo mesmo avaliador. O procedimento será precedido de anestesia tópica nasal com xilocalina spray (10% aplicação tópica) e o paciente será completamente informado a respeito do procedimento e da pesquisa em questão. Será ainda fornecido TCLE (em anexo). Toda realização da biópsia ocorrerá sob visualização direta através de nasofibrolaringoscopia flexível. Vale lembrar que a fossa nasal a ser estudada será escolhida pelo examinador através de critérios clínicos que facilitem a realização dos testes descritos. Ambos testes serão realizados na mesma fossa nasal, sendo o primeiro o da sacarina. O material da biópsia será processado na rotina do serviço de microscopia eletrônica do HC/UNICAMP. Os dados obtidos serão anotados para em seguida serem tabulados, digitalizados e analisados.

Critério de Inclusão:

Portadores de dischesia ciliar primária; indivíduos saudáveis sem queixas nasais, que desejem colaborar voluntariamente com a pesquisa.

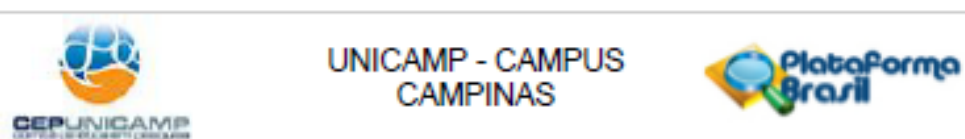
Critério de Exclusão:

Serão excluídos da pesquisa indivíduos com dificuldade de compreensão, não colaborativos e que se manifestarem receio, medo ou recusa na realização dos exames. Serão ainda excluídos (do grupo controle) pacientes que apresentem qualquer doença nasal prévia, que tenham sido submetidos a procedimentos cirúrgicos nasais, que estejam em tratamento com medicação tópica nasal ou que tenham evidência de doença nasal ativa (p. ex. Infecção de vias aéreas superiores).

Metodologia de Análise de Dados:

Os dados obtidos serão armazenados em base de dados do programa de computador SPSS para Windows, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL; EUA). A análise dos resultados também será realizada pelo do mesmo programa. Para a análise da normalidade das variáveis, será aplicado o Teste Kolmogorov- Smirnov e Shapiro-Wilks. As variáveis quantitativas serão apresentadas por média,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.069.000

desvio padrão, mínimo, mediana e máximo. As variáveis categóricas serão apresentadas em forma descritiva e as diferenças serão analisadas utilizando-se o Teste do Qui-quadrado, o Teste Exato de Fisher ou o Teste de Fisher-Freeman-Halton. Para a comparação das distribuições de variáveis quantitativas de três ou mais grupos independentes, será utilizado o Teste Anova nas variáveis com distribuição normal; ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis nas variáveis não paramétricas. Para a comparação da média de três ou mais grupos pareados será utilizado o Teste ANOVA nas variáveis com distribuição normal e o teste de Friedman nas variáveis não paramétricas. Em todos os casos será adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Desfecho Primário:

Espera-se com esta pesquisa obter dados que apontem que o teste da sacarina é um método seguro e efetivo para o diagnóstico das disfunções mucociliares, além de pouco invasivo e de baixo custo, comparado à microscopia eletrônica da mucosa nasal, atual padrão ouro.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Esta pesquisa tem como objetivo comparar os resultados do teste de sacarina com os achados à microscopia eletrônica da mucosa nasal de indivíduos saudáveis e portadores de disfunção do clearance mucociliar.

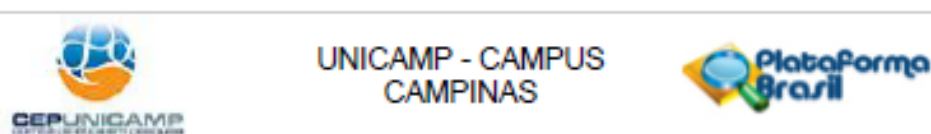
Objetivo Secundário: -padronizar a realização do teste da sacarina-comparar alterações encontradas no teste da sacarina nos indivíduos portadores de disfunção do clearance mucociliar com indivíduos com patologias nasais-comparar os resultados encontrados no teste da sacarina com os achados na microscopia eletrônica nasal;- Demonstrar que o teste da sacarina é um método seguro, efetivo, de baixo custo e fácil realização para o diagnóstico das disfunções mucociliares da mucosa nasal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa oferece um grau de risco extremamente pequeno aos voluntários, e que está relacionado ao risco de sangramento nasal e dor durante a biópsia. O risco será minimizado através da utilização de anestesia tópica e da utilização de pinça microscópica. A pesquisa não contará com a participação de grupos vulneráveis. A qualquer momento paciente poderá sair da pesquisa sem prejuízo para o atendimento. A realização da biópsia da mucosa nasal aparenta ser um método invasivo que traria riscos aos sujeitos envolvidos. Porém sabe-se que trata-se de um procedimento praticamente indolor e que não traz maiores riscos à saúde dos sujeitos. O material de cada biópsia será menor de 1mm de mucosa nasal. O risco mais evidente será de um sangramento nasal, o que certamente é improvável. Porém a equipe envolvida na realização desse

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.069.000

projeto se responsabiliza e apoiará todas e quaisquer intercorrências relacionadas a tal projeto.

Benefícios:

Ao participar você estará colaborando para esclarecer a origem dos seus sintomas respiratórios. Você também estará ajudando os pesquisadores a entender melhor a DCP na nossa população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um protocolo de pesquisa aprovado anteriormente pelo CEP ("em papel") e atendendo as orientações da Carta Circular nº189/2017/CONEP/CNS/MS de 16 de maio de 2017, o pesquisador responsável inseriu o protocolo de pesquisa para ser validado no Sistema Plataforma Brasil. Protocolo de pesquisa aprovado ("em papel") anteriormente a Plataforma Brasil em 17/01/2011 com parecer CEP nº 1208/2011.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados os seguintes documentos:

- 1-Folha de rosto: "cep1.pdf 01/04/2020 11:44:08";
- 2-Projeto detalhado: "projetooriginal.pdf 24/04/2020 15:29:18";
- 3-Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1426287.pdf 24/04/2020 15:30:03";
- 4-TCLE:"TCLEsacarina.pdf 01/04/2020 11:50:30";5-Pareceres anteriores a Plataforma Brasil: "cep4.pdf 01/04/2020 11:45:03"; "cep3.pdf 01/04/2020 11:44:47"; "cep2.pdf 01/04/2020 11:44:37"; "cep1.pdf 01/04/2020 11:44:08".

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao Item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8038 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.069.000

pandemia do SARS-CoV-2 (COVID- 19), é necessário zelar pelo melhor Interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.

- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos Investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.

- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de um protocolo de pesquisa aprovado anteriormente pelo CEP ("em papel") e atendendo as orientações da Carta Circular nº189/2017/CONEP/CNS/MS de 16 de maio de 2017, o pesquisador responsável inseriu o protocolo de pesquisa para ser validado no Sistema Plataforma Brasil. Protocolo de pesquisa aprovado ("em papel") anteriormente a Plataforma Brasil em 17/01/2011 com parecer CEP nº 1208/2011.

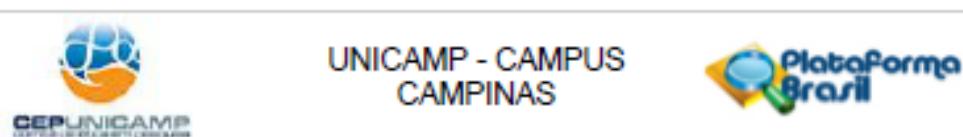
Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.009.000

realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente a ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

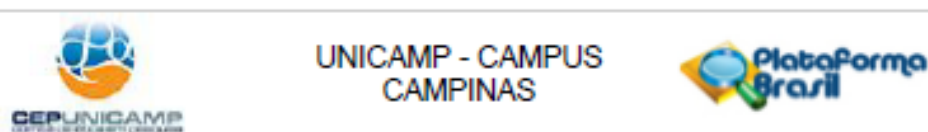
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, Item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_1426267.pdf	24/04/2020 15:30:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetooriginal.pdf	24/04/2020 15:29:18	Mariana Dalbo Contrera Toro	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.009.000

Investigador	projetooriginal.pdf	24/04/2020 15:29:18	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEsacarina.pdf	01/04/2020 11:50:30	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
Outros	ramestrado.pdf	01/04/2020 11:50:01	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
Parecer Anterior	cep4.pdf	01/04/2020 11:45:03	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
Parecer Anterior	cep3.pdf	01/04/2020 11:44:47	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
Parecer Anterior	cep2.pdf	01/04/2020 11:44:37	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito
Folha de Rosto	cep1.pdf	01/04/2020 11:44:08	Mariana Daibo Contrera Toro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 04 de Junho de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8038 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS- GENÉTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS	
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de portadores de discinesia ciliar primária e descrição das mutações prevalentes no Brasil.

Pesquisador: Jose Dirceu Ribeiro

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 48630115.0.2001.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.421.341

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa regular que consiste em um estudo observacional, multicêntrico, com o objetivo de identificar portadores de discinesia ciliar primária (DCP) e descrição das mutações prevalentes em indivíduos com DCP no Brasil. Os pesquisadores esclarecem que a DCP é uma doença que afeta múltiplos órgãos e causa infecções crônicas em vias aéreas, particularmente sinusite, otite e bronquite suprativa. A DCP é uma doença autossômica recessiva, com incidência entre 1:4.000 a 1:40.000 na população caucasiana. A incidência na população Asiática é muito mais elevada. Não há dados de prevalência de DCP na população brasileira ou latino-americana. Portanto, estimam que 10 a 20 mil brasileiros tem a doença e que a imensa maioria não tem diagnóstico confirmado e consequentemente não recebe tratamento adequado para DCP. Assim, os objetivos deste projeto serão identificar mutações de DCP na população brasileira, identificar as mutações prevalentes em indivíduos com DCP no Brasil, verificar o estado clínico, radiológico, funcional e qualidade de vida de portadores de DCP e estabelecer o Registro Brasileiro de DCP (REBRADIC) para futuros estudos de intervenção. Os pacientes serão selecionados através de critérios clínicos, recrutados ativamente de hospitais, clínicas públicas e privadas e centros especializados. O encaminhamento para os centros de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887		
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8938	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.341

referência e diagnóstico será feito de acordo com o protocolo do Consórcio BestCilia. As indicações clínicas para encaminhamento aos centros de triagem e diagnóstico serão as seguintes: crianças ou adultos com tosse crônica, bronquiectasias ou doença das vias aéreas superiores grave/persistente (otite/rinossinusite crônica) de causa desconhecida; crianças ou adultos com situs inversus totalis, ou qualquer síndrome heterotóxica; lactentes com dificuldade respiratória neonatal sem causa aparente, principalmente se existem outras características de DCP; crianças ou adultos com ventriculomegalia cerebral, na ausência de uma causa óbvia; irmãos de pacientes com DCP; homens com imotilidade de espermatozoides e mulheres com gravidez ectópica recorrente. Será feita busca ativa destes pacientes em ambulatórios de pneumologia, de otorrinolaringologia e cardiologia, clínicas de infertilidade, unidades neonatais. Será feita divulgação sobre o espectro clínico de DCP, do projeto e da importância do diagnóstico precoce em eventos das sociedades médicas de Pediatria, Otorrinolaringologia, Pneumologia, Cardiologia e de Reprodução Humana. Considerando uma estimativa de mais de 10.000 brasileiros portadores sintomáticos de DCP, que estão evoluindo aceleradamente para um quadro de DPOC, espera-se que muitos pacientes sejam encaminhados para triagem em nossos centros por médicos especialistas de todo o país. Pacientes que apresentam sinais e sintomas clínicos sugestivos de DCP, serão avaliados nos Centros de Triagem e Diagnóstico. Anamnese e exame clínico focado em sinais e sintomas respiratórios serão conduzidos por membros da equipe clínica de assistência. Além disso serão avaliados qualidade de vida, função pulmonar (espirometria), medida de óxido nítrico nasal, avaliação do padrão de batimento ciliar (vídeo-microscopia de alta velocidade, medida da estrutura ciliar (microscopia eletrônica), avaliação genética, coleta de sangue e extração de DNA, análise do exoma e análise de bioinformática. A pesquisa será desenvolvida no Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e no Hospital de Clínicas da UNICAMP. O número de participantes previsto é de 100 indivíduos. A pesquisa contará com financiamento do CNPq. A data de início prevista é 10/11/2015.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Identificar as mutações prevalentes em indivíduos com DCP no Brasil.

Objetivo Secundário: Verificar o estado clínico, radiológico, funcional e qualidade de vida de portadores de DCP. Estabelecer o Registro Brasileiro de DCP (REBRADIC) para futuros estudos de intervenção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Segundo os pesquisadores alguns efeitos colaterais que são comuns durante a coleta de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo	CEP: 13.083-887		
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8938	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.361

epitélio nasal ou coleta de sangue. A medida do óxido nítrico nasal não causa dor e pode ser levemente desconfortável. A raspagem nasal é um pouco dolorosa e pode causar sangramento no nariz. A coleta de sangue também pode causar dor ou eventualmente hematoma na região onde o sangue é coletado, porém quando presentes oferecem riscos mínimos. Afirmam que caso qualquer outro sinal, sintoma, ou desconforto seja relatado pela criança, os profissionais responsáveis interromperão o teste e tomarão todas as medidas necessárias para a situação. Benefícios: tentar esclarecer a origem dos sintomas respiratórios. Caso a doença seja confirmada, o indivíduo será encaminhado a um centro especializado para atendimento de DCP. Como benefício indireto está a ajuda para os pesquisadores entenderem melhor a DCP na população. Considero que o estudo proposto é válido e está de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. A justificativa, os objetivos e a metodologia do projeto são claros, e o projeto não apresenta riscos para os voluntários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considero que o estudo proposto é válido e está de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. A justificativa, os objetivos e a metodologia do projeto são claros, e o projeto não apresenta riscos para os voluntários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: 1) projeto de pesquisa; 2) folha de rosto, devidamente preenchida, datada e assinada pelo diretor da unidade na qual o pesquisador tem vínculo. 3) termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da Res. CNS-MS 466/12.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Lista de Pendências e Inadequações:

TCLEs Unicamp:

1-Substituir "Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp" para "Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp" – RESPOSTA: O nome do comitê foi substituído.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2-Substituir a palavra "cópia" por "via" - - RESPOSTA: O termo cópia foi substituído.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Bento Gonçalo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.361

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

3- O texto como foi descrito no TCLE não garante indenização por danos decorrentes da pesquisa. A Resolução 466/12 (Item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas". Cabe enfatizar que a questão da indenização não é prerrogativa da Resolução 466/12, estando prevista no código civil. Portanto, solicitamos que seja assegurado, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa tem direito à indenização em casos de danos decorrentes da pesquisa. Resposta: No novo termo de consentimento esclarecido o trecho foi adicionado: "Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no termo de consentimento livre e esclarecido, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas segundo a resolução 466/12 (Item IV.3)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

4-No item X o pesquisador informa que: "Não haverá custos para os participantes do estudo, nem para responder o questionário nem para as coletas de secreções nasais e sangue. Você e seu (sua) filho (a) também não receberão nenhum pagamento para participar do estudo.". A coleta de dados será realizada durante a rotina de atendimento do participante da pesquisa? Caso seja, o pesquisador deverá contemplar esta informação no TCLE. Caso contrário, como prevê o item IV.3.g da Resolução CNS 466/2012, deve ser garantido ao participante de pesquisa, e sua acompanhante, o ressarcimento de despesas decorrentes da participação no estudo, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para coleta de dados fora da rotina de atendimento - RESPOSTA: Todos os procedimentos serão realizados na rotina, já que os exames complementares realizados no estudo podem ser feitos na consulta e são procedimentos que podem ser utilizados para o diagnóstico da doença.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

5-segundo o item "Armazenamento de amostras biológicas: as amostras de epitélio e de sangue serão armazenadas por um prazo de no máximo 10 anos, para análises biológicas futuras". As

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.341

amostras serão armazenadas em um biorepositório para pesquisas futuras? Caso seja, segundo a norma operacional Nº001/2013 CNS/MS, o TCLE deverá contemplar as seguintes opções para o participante da pesquisa:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP Institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: (detalhar). Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____ (pedir para o participante indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Resposta: o seguinte trecho foi adicionado considerando pequenas alterações de escrita para o termo de adultos ou indivíduos de menor idade.

Considerando o material biológico obtido no estudo:

() concordo na participação no presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo na participação no presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP Institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: término dos estudos e validade da amostra para novas análises. Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

6- Caso exista a possibilidade dos dados dos exomas serem encaminhado para um banco, o TCLE deverá contemplar esta informação com opções para autorizar ou não o armazenamento destes dados -

RESPOSTA: Os dados não serão encaminhados para banco de exoma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.421.341

7- Inserir o item responsabilidade do pesquisador: "Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____. (Assinatura

do pesquisador)

RESPOSTA: O seguinte trecho foi adicionado

XI. Responsabilidade do pesquisador

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____. (Assinatura do

pesquisador)

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8038 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.341

previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, Item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_614053.pdf	02/02/2016 09:46:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pais_corrigido_CEP02022016.docx	02/02/2016 09:44:43	Jose Dirceu Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adultos_corrigidoCEP02022016.docx	02/02/2016 09:44:17	Jose Dirceu Ribeiro	Aceito
Outros	cartaresposta.docx	02/02/2016	Jose Dirceu Ribeiro	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.421.341

Outros	cartaresposta.docx	09:41:25	Jose Diroeu Ribeiro	Aceito
Folha de Rosto	folharostounicamp.pdf	05/11/2015 09:37:53	Jose Diroeu Ribeiro	Aceito
Outros	folhaderosto_unicamp.pdf	03/11/2015 16:14:03	Jose Diroeu Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpaisUnicampDrDiroeu.docx	29/10/2015 17:23:07	Jose Diroeu Ribeiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEaditosUnicampDrDiroeu.docx	29/10/2015 17:22:38	Jose Diroeu Ribeiro	Aceito
Outros	cartarespostaeditavel07102015.docx	07/10/2015 17:53:45	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
Outros	Carta_resposta_PARECER_123833807102015.pdf	07/10/2015 17:51:13	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Temo_deassentimento_06082015.docx	07/10/2015 17:49:06	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PCD_TCLE_06agosto2015_ADULTOScomigido_07102015.docx	07/10/2015 17:48:50	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PCD_TCLE_06_agosto2015_PAIS_comigido07102015.docx	07/10/2015 17:46:41	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PCD_2014_v6.docx	18/08/2015 11:44:38	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PCD_TCLE06agosto2015_PAIS.docx	18/08/2015 11:42:54	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PCD_TCLE06_agosto_2015.docx	18/08/2015 11:37:57	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PCD_TCLE06agosto2015_ADULTOS.docx	18/08/2015 11:36:17	MARCUS HERBERT JONES	Aceito
Outros	Link CV lattes.docx	17/08/2015 15:26:47		Aceito
Outros	Documento unificado CC.pdf	17/08/2015		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.421.361

Outros	Documento unificado CC.pdf	15:11:30		Aceito
Outros	Carta de Aprovação CC.pdf	17/08/2015 15:11:06		Aceito
Outros	comprovante deposito CNPq.pdf	17/08/2015 14:47:54		Aceito
Outros	conhecimento IPB.pdf	17/08/2015 14:46:19		Aceito
Outros	orcamento 14ago2015.pdf	17/08/2015 14:45:30		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 24 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8036 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 3- QUESTIONÁRIO PICADAR E ATS- CLINICAL SCREENING QUESTIONARIE

Questionários:

Informações Clínicas	Presença
Doença respiratória neonatal persistente inexplicável com necessidade de oxigênio suplementar em crianças nascidas a termo	
Tosse úmida, de início precoce, durante todo o ano	
Congestão nasal, de início precoce, durante todo o ano	
Defeito de lateralidade	

Adaptado de: Leigh et al. Ann Am Thorac Soc. 2016.

PICADAR		
O paciente tem tosse úmida diária que começou na primeira infância?	SIM – complete o PICADAR NÃO – PARE. PICADAR não está desenhado para os doentes sem tosse úmida	
1. O paciente nasceu prematuro ou a termo?	Termo	2
2. O paciente apresentou doença respiratória baixa no período neonatal (por exemplo, taquipneia, tosse, pneumonia)?	Sim	2
3. O paciente foi admitido na UTI Neonatal?	Sim	2
4. O paciente tem uma anormalidade de situs (situs inversus e heterotaxia)?	Sim	4
5. O paciente tem um defeito cardíaco congênito?	Sim	2
6. O paciente tem rinite perene e persistente?	Sim	1
7. O paciente relata sintomas de doença crônica no ouvido ou na audição (por exemplo, otite, otite média serosa, perda de audição, perfuração do tímpano)?	Sim	1

Adaptado de: Behan et al. Eur Respir J. 2016;47(4):1103-12.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

I. Artigos completos aceitos e publicados em periódicos

Antonio, Marcelo Augusto ; Marson, Fernando Augusto Lima ; Toro, Mariana Dalbo Contrera ; Sampaio, Marcelo Hamilton ; Barreto, Icleia Siqueira ; Dertkigil, Sérgio San Juan ; Sakuma, Emerson Taro Inoue ; Guadagnini, Dioze ; Sakano, Eulalia . Topical Tretinoin In Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps: A Randomized Clinical Trial. International Forum Of Allergy & Rhinology **JCR**, V. Online, P. 22778, 2021.

Toro, Mariana D. C.; Serrano, Thiago L. I. ; Marson, Fernando A. L. ; Chone, Carlos T. ; Dal Fabbro, Mateus ; Sakano, Eulália ; Sampaio, Marcelo H. . Comparative Analysis Of Rhinologic Outcomes In Cushing Disease And Non-Functioning Pituitary Adenoma In Patients Submitted To Endoscopic Endonasal Transsphenoidal Surgery. European Archives Of Oto-Rhino-Laryngology, V. E-Pub, P. E-Pub, 2020.

II. Artigos Completos Aceitos Para Publicação

Toro, Mariana Dalbo Contrera, Antonio, Marcelo Augusto, Reis, Mariah Gueiro; Assunção, Maira Seabra, Sakano, Eulália. Achieving The Best Method to Classify Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis: A Systematic Review* .<https://doi.org/10.4193/Rhin20.512>

III. Resumos publicados em anéis de Congressos

Gianfrancesco, L ; Matsunaga, NY ; Malheiro, APG; Simões, MCR ; Toro, MDC ; Ribeiro, MAGO ; Ribeiro, JD ; Morcillo, AM ; Dalbo Contrera Toro, AA . Are there differences in the level of physical activity and functional capacity between healthy and asthmatic children and adolescents?. In: ERS international congress 2019 abstracts, 2019. Paediatric asthma and allergy. P. Pa938.

Matsunaga, NY ; Mazzola, TN ; Oliveira, MS ; Gianfrancesco, L; Zaidan, BC; Barreto, IS; Morcillo, AM ; Toro, MDC; Simões, MCRS; Ribeiro, MAGO ; Ribeiro, JD ; Dalbo Contrera Toro, AA . Clinical characteristics, lung function, quality of life, exercise capacity and inflammatory biomarkers in induced sputum and serum in children and adolescents with uncontrolled severe asthma. In: ERS international congress 2019 abstracts, 2019. Paediatric asthma and allergy. P. Pa954.

IV. Apresentações de trabalhos em congressos

Toro, MDC; Cunha, Fernanda; Ortiz, Erica; Mohana, Laiza, Toro, Adyleia; Altemani, Albina; Ribeiro, José Dirceu, Sakano, Eulália. Saccharin test for PCD screening. Rhinoworld-Chicago 2019- Oral presentation.

Marioka, AC ; Arantes, MS ; Gonzaga. NO ; Garcia Jr, OA ; Sakano, E. ; Chone, Carlos T. ; Serrano, Thiago L. I. ; Toro, M. D. C. . Condrossarcoma Nasossinusal- Relato de Caso. 2019.

Antônio, MA ; Sampaio, MH. ; Toro, M. D. C. ; Sakano, E. . Avaliação clínica na rinossinusite crônica com polipose nasossinusal após uso de tretinoína. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TORO, M. D. C.. Comparative analysis from endoscopic endonasal transsphenoidal surgery outcomes in patients with cushing disease and non-functioning pituitary adenoma. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TORO, M. D. C.. Cerebrospinal fluid leak in pituitary endoscopic endonasal transsphenoidal surgery: is fat really important in reconstruction?. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TORO, M. D. C.. Tissue eosinophilia parameters in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: which one is reliable? Systematic review. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TORO, M. D. C.. Outcomes of pituitary endonasal transsphenoidal surgery. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

IV. Participações em eventos científicos/ Aperfeiçoamento

VI Combined Meeting and Four Otology- São Paulo/ Online – 2021 (Encontro)

50º Congresso Brasileiro De Otorrinolaringologia E Cirurgia Cervico-Facial. (Congresso)

V Combined Meeting e Four Otology 100% ONLINE. 2020. (Encontro).

European Respiratory Society Annual Congress. Are there differences in the level of physical activity and functional capacity between healthy and asthmatic children and adolescents?. 2019. (Congresso).

VII Congresso Brasileiro multidisciplinar de Fibrose Cística. 2019. (Congresso).

ERS 2018 27TH Congress Of The European Rhinologic Society. Comparative analysis from endoscopic endonasal transsphenoidal surgery outcomes in patients with cushing disease and non-functioning pituitary adenoma. 2018. (Congresso).

V. Participações em atos acadêmicos de exames de qualificação para mestrado e doutorado, defesas de dissertações e teses

Livia Gianfrancesco. Nível de atividade física e capacidade funcional de crianças e adolescentes com asma. 07 de Agosto de 2019. Orientadora: Dra Adyleia Ap Dalbo Contrera Toro. Defesa de Mestrado.

Ana Paula Gaban Malheiro. Avaliação dos níveis séricos de vitamina D e sua associação com controle e gravidade da asma em crianças e adolescentes. 29 de janeiro de 2020. Orientadora: Dra Adyleia Ap Dalbo Contrera Toro. Defesa de Mestrado.

Emília da Silva Gonçalves. Impedância Intraluminal multicanal combinada a PHmetria na detecção da Doença de Refluxo gastro esofágico em crianças com fibrose cística. Orientador: Dr José Dirceu Ribeiro. 25 de novembro 2020. Defesa de doutorado.

Nayara Soares de Oliveira Lacerda. Avaliação da função pulmonar em crianças e adolescentes com estenose laríngea. Orientador: Dr José Dirceu Ribeiro. 05 de maio de 2021. Defesa de mestrado.

VI. Cargos exercidos

Presidente da Comissão de Ética Médica do Hospital Regional de Piracicaba- 2019-2020.