

Introdução: A discinesia ciliar primária (PCD) é uma doença rara autossômica recessiva associada a anomalias do axonema. Os pacientes apresentam infecção respiratória crónica e infertilidade, podendo associar-se ao *situs-inversus-totalis* (síndrome de Kartagener).

Objetivos: Em 2015, descrevemos uma nova variante patogénica missense em homozigotia no gene *CCDC103*, detetada por sequenciação de nova geração (WES), encontrada num paciente infértil por ausência dos braços de dineína no axonema e síndrome de Kartagener. No presente trabalho caracterizamos o efeito dessa variante ao nível da expressão do mRNA e da proteína.

Material e Métodos: Sob consentimento informado, obtiveram-se amostras de sangue, escovado nasal e células germinativas testiculares (CG) do paciente e de controlos. Estudou-se a ultraestrutura do axonema das células ciliadas nasais e determinou-se o ângulo de batimento ciliar. Realizou-se extração de RNA das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e das células ciliadas, bem como a extração de proteína das PBMC. Quantificamos o mRNA das PBMC e das células ciliadas por real-time quantitativo (qPCR). A presença da proteína nas PBMC foi analisada por Western-Blot (WB). Nas células ciliadas e nas CG, a presença e localização da proteína foi efetuada por imunofluorescência (IF).

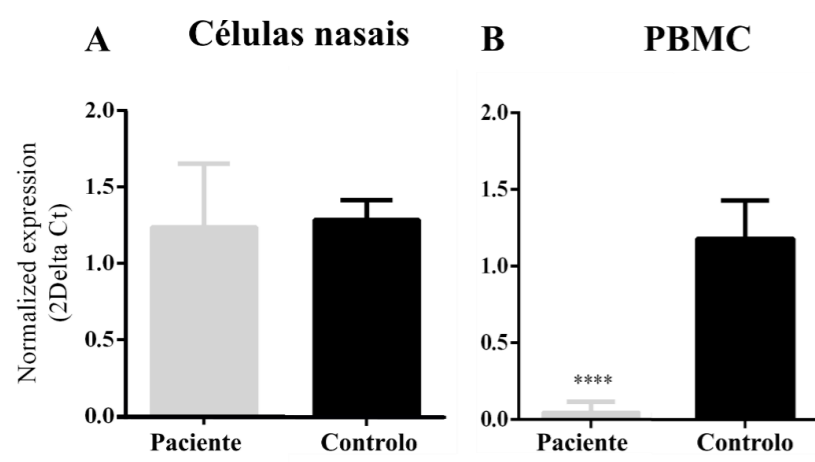


Figura 3. Expressão de mRNA do gene *CCDC103* nas células nasais (A) e células do sangue (B) do paciente em comparação a controlos, P < 0.05 e ***p < 0.0001.

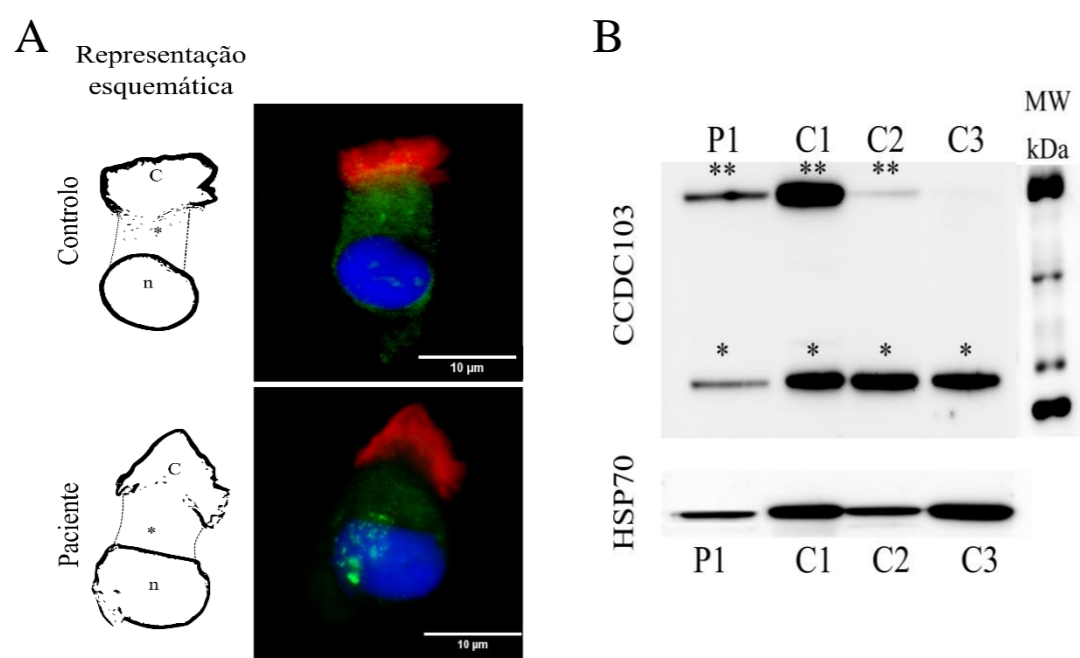


Figura 4. A. Detecção por imunofluorescência da proteína *CCDC103* (verde) e da proteína α -tubulina (vermelho) em células ciliadas nasais do controlo e paciente. Núcleo corado com DAPI (azul). C-cílios, *-citoplasma, n-núcleo. Escala: 10 μ m. B. Detecção por Western blot da da proteína *CCDC103* em células do sangue do paciente (P1) e de controlos (C1-C3). * possível forma dimérica, **possível forma oligomérica.

Resultados e Conclusões: O estudo ultraestrutural revelou ausência dos braços de dineína no axonema das células ciliadas e aumento do ângulo de batimento ciliar, confirmando a suspeita de PCD. A análise do mRNA evidenciou que a variante tem como consequência a transcrição de um mRNA alterado de expressão diminuída. Por WB verificou-se a existência de isoformas proteicas, sugerindo modificações pós-translacionais. A IF revelou presença da proteína *CCDC103* na peça-intermédia dos espermatozoides e no citoplasma das células GS e ciliadas, de expressão reduzida. Em conclusão, inferimos que esta variante impede a formação dos braços de dineína nos axonemas dos espermatozoides e das células ciliadas nasais, o que confirma a associação do gene *CCDC103* à PCD e ao síndrome de Kartagener. Adicionalmente, observamos expressões distintas nas células ciliadas e nos espermatozoides ao nível do mRNA e da localização sub-celular da proteína.

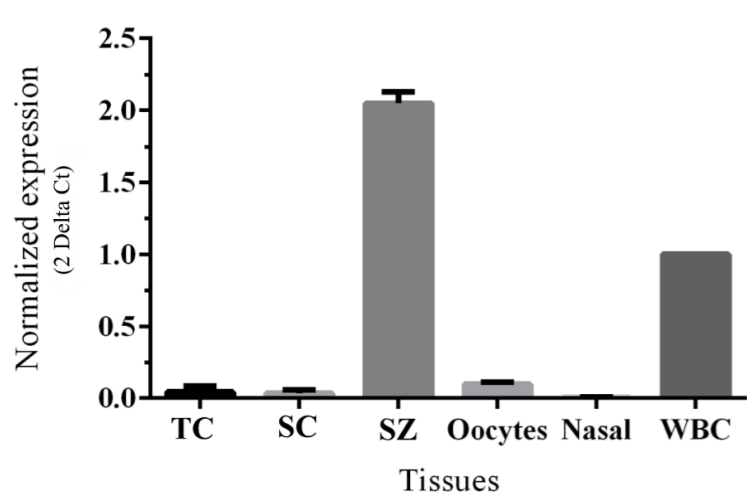


Figura 8. Níveis de expressão de mRNA do gene *CCDC103* de controlos em células testiculares (TC), células Sertoli (SC), espermatozoides (SZ), ovócitos, células nasais e do sangue (WBC).

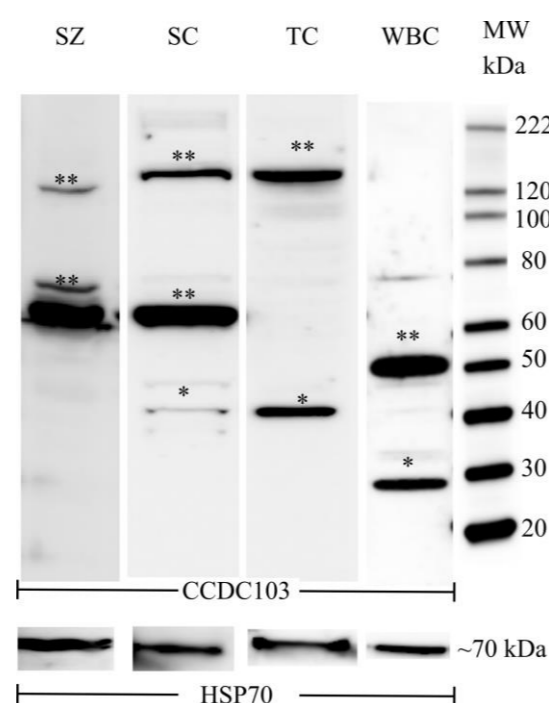


Figura 9. Detecção por Western blot da da proteína *CCDC103* em células testiculares (TC), células Sertoli (SC), espermatozoides (SZ), e do sangue (WBC). * possível forma dimérica, **possível forma oligomérica.

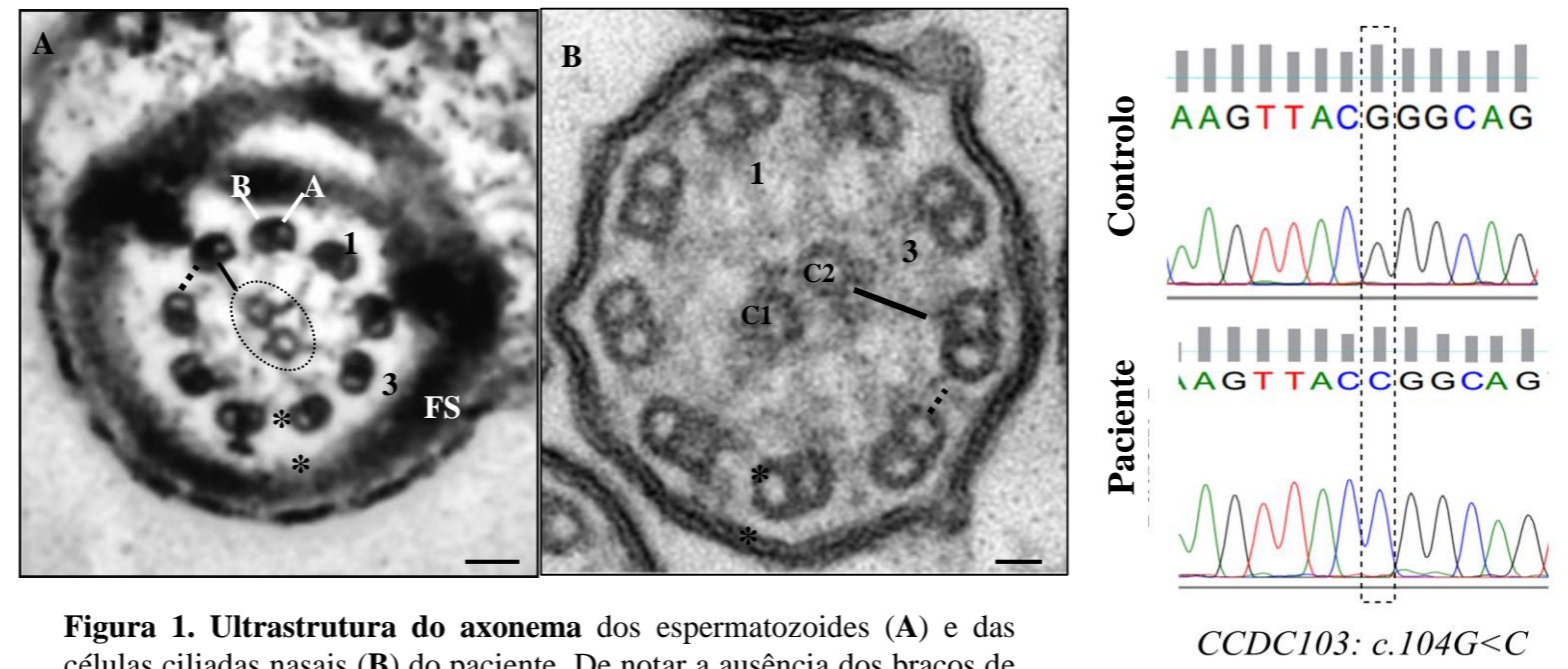


Figura 1. Ultraestrutura do axonema dos espermatozoides (A) e das células ciliadas nasais (B) do paciente. De notar a ausência dos braços de dineína (*) e ligações de nexina (linha tracejada). 1 e 3-numeração dos dupletos periféricos; A, B-microtúbulo A e B dos dupletos periféricos; círculo tracejado- complexo central; C1 e C2- microtúbulos centrais; barra preta – projeções radiais; FS-bainha fibrosa. Escala: 25 nm.

Figura 2. Electroforograma da variante c.104G>A descoberta no gene *CCDC103*.

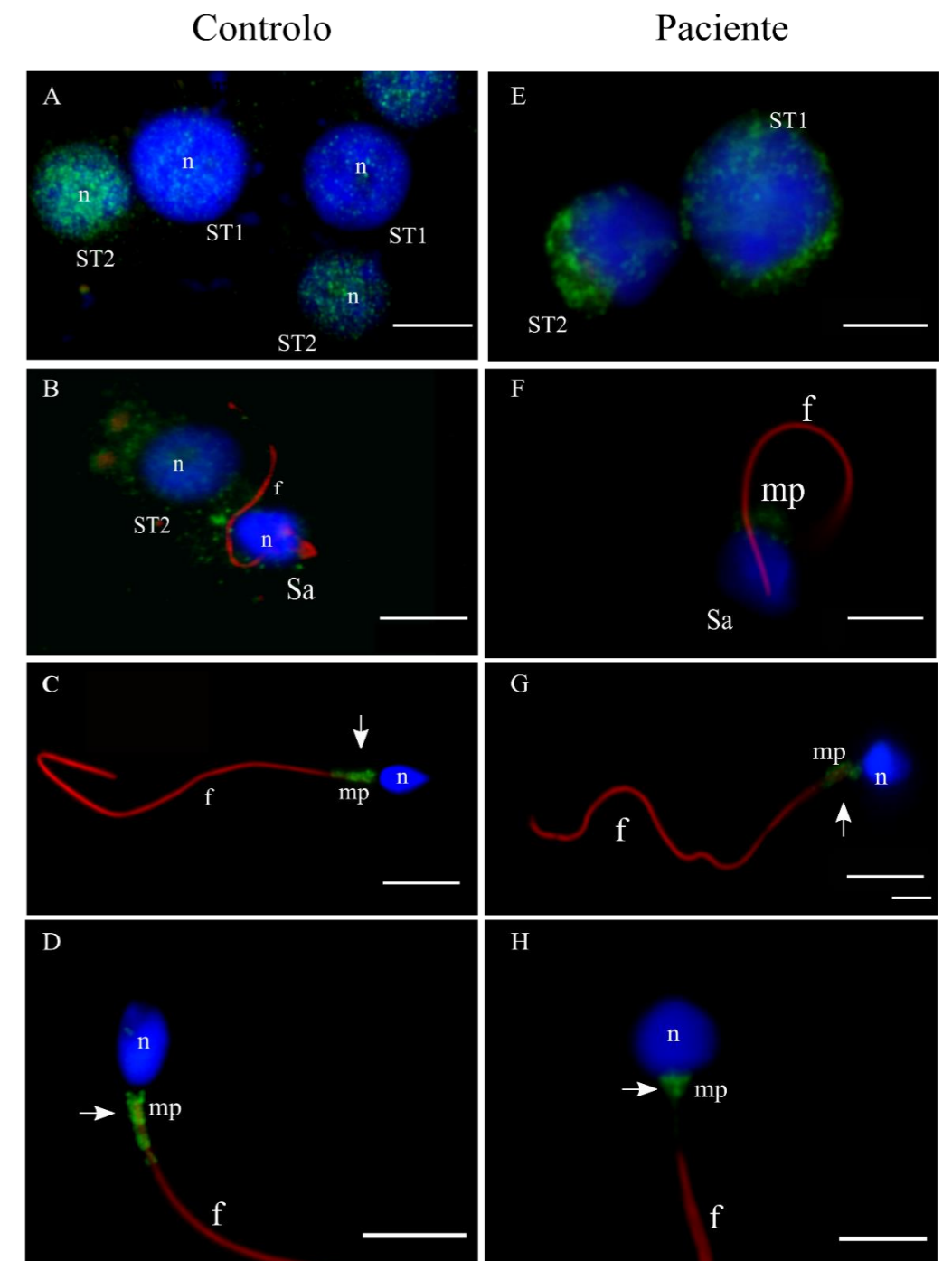


Figura 5. Detecção por imunofluorescência da proteína *CCDC103* (verde) e da proteína específica do axonema α -tubulina (vermelho), em células germinativas testiculares do paciente (A – D) e controlo (E – H). Marcação foi observada no citoplasma dos espermatócitos primários e secundários (ST1 e ST2: A vs E), e espermatídios redondos (Sa: B vs F). Foi também verificada marcação na peça intermédia (mp) dos espermatozoides (Sz: C, D vs G, H). Núcleo marcado com DAPI (azul). Setas brancas salientam a marcação na mp. Escala: 5 μ m (A-C; E-G) e 2 μ m (D, H).

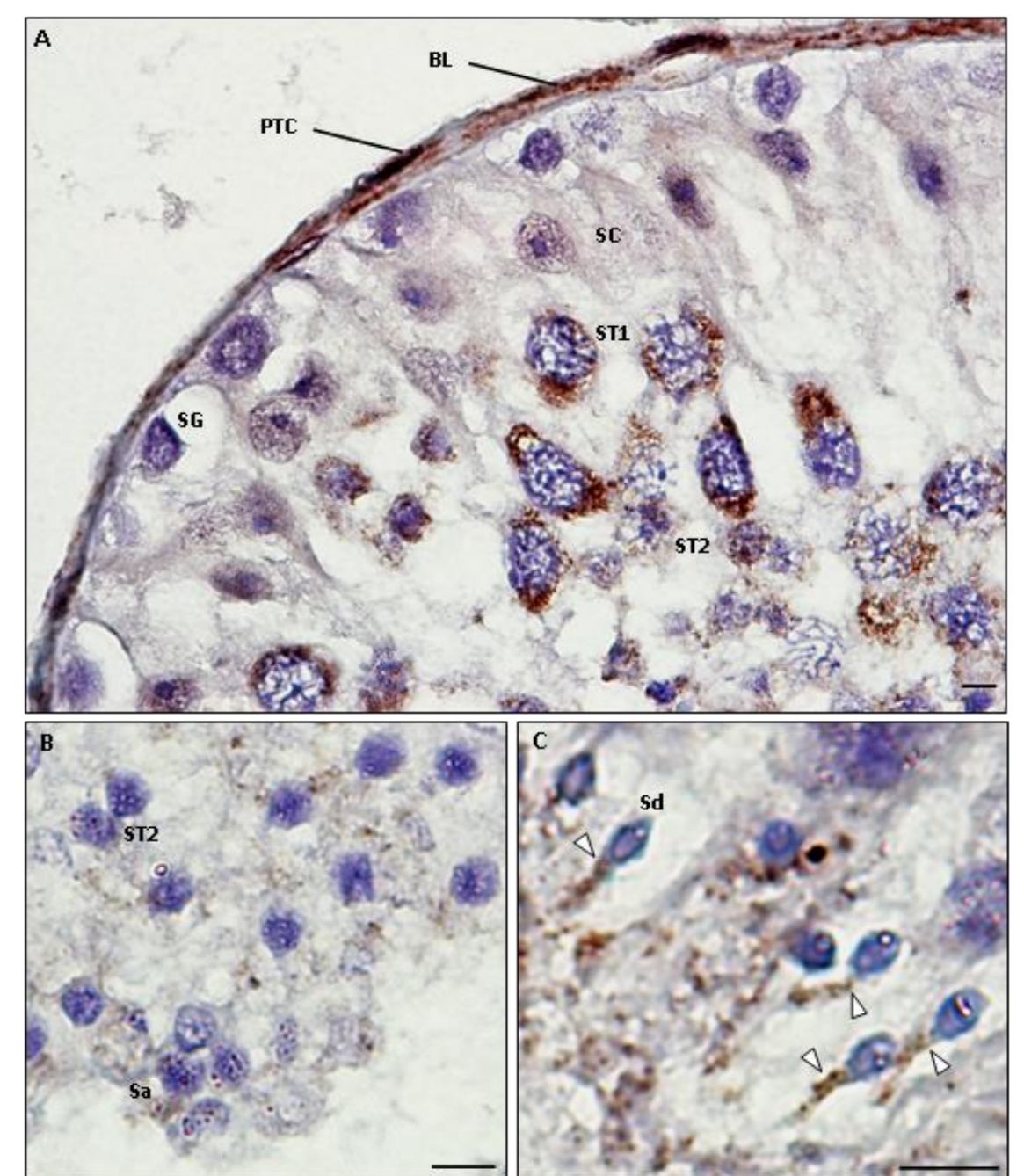


Figure 11. Detecção por imuno-histoquímica da proteína *CCDC103* em secções de parafina de túbulos seminíferos. Marcação reduzida nas espermatogónias (SG), intensa no citoplasma e região perinuclear de espermatócitos primários (ST1) e secundários (ST2), e moderado no citoplasma e região perinuclear das células de Sertoli (SC) e espermatídios redondos (Sa). Marcação também intensa na peça intermédia (mp) dos espermátides alongados (cabeça de seta branca). PTC-células peritubular peritubular cells, BL- lâmina basal. Escala: 10 μ m.

Estes resultados sugerem que o gene *CCDC103* apresenta uma regulação específica de tecido, e acrescentam novos dados para uma melhor compreensão da **patofisiologia da PCD**, em especial no que concerne à sua associação com a **infertilidade**.

Agradecimentos

Ana Rita Gonçalves,⁵ Elsa Oliveira,^{1,2} Ângela Alves,^{1,2} Raquel Bernardino,^{1,2} Tânia Dias,^{1,2} Ana Maria,^{1,2} Fátima Ferreirinha,¹ Rui Fernandes,³