

TESIS DOCTORAL

Análisis clínico y genético del síndrome de Alport y la nefropatía del colágeno IV($\alpha 3/\alpha 4$)



Consolación Rosado Rubio

2019



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Figura de portada: “Un niño enfermo traído al templo de Esculapio”,
John William Waterhouse. 1877.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



VNiVERSiDAD
DSALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS CLÍNICO Y GENÉTICO
DEL SÍNDROME DE ALPORT
Y LA NEFROPATÍA DEL COLÁGENO IV ($\alpha3/\alpha4$)

CONSOLACIÓN ROSADO RUBIO

2019



D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Análisis clínico y genético del síndrome de Alport y la nefropatía del colágeno IV($\alpha3/\alpha4$)**”, que presenta Dña. Consolación Rosado Rubio, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y en el Servicio de Nefrología del Complejo Hospitalario de Salamanca y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca, a 10 de febrero de 2019.

D. Rogelio González Sarmiento

Acaso...

*Como atento no más a mi quimera
no reparaba en torno mío, un día
me sorprendió la fértil primavera
que en todo el ancho campo sonreía.*

*Brotaban verdes hojas
de las hinchadas yemas del ramaje,
y flores amarillas, blancas, rojas,
alegraban la mancha del paisaje.*

*Y era una lluvia de saetas de oro,
el sol sobre las frondas juveniles;
del amplio río en el caudal sonoro
se miraban los álamos gentiles.*

*Tras de tanto camino es la primera
vez que miro brotar la primavera,
dije, y después, declamatoriamente:*

*¡Cuán tarde ya para la dicha mía!
Y luego, al caminar, como quien siente
alas de otra ilusión: Y todavía
¡yo alcanzaré mi juventud un día!*

Antonio Machado (1907)

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral representa la culminación de una etapa fundamental de mi vida, marcada por grandes cambios, que me han hecho aprender mucho, tanto de mí misma como de los demás. Asimismo, su lectura en este momento es el resultado de una larga y dura lucha, en la que he tenido que superar muchos obstáculos que creía insalvables. Por todo ello, me gustaría dar las gracias a las personas que, de una forma u otra, han contribuido a la realización de este trabajo y han estado presentes en el recorrido que me ha traído hasta aquí.

A Rogelio González, director de esta tesis doctoral, por la confianza depositada en mí, por su optimismo, su dedicación y porque, sin conocerme, me dio una oportunidad largamente buscada. También debo agradecerle su actitud intachable ante las adversidades, su gran capacidad de autocrítica y su sentido de la responsabilidad y de la justicia. No olvidaré nunca que eligió el camino correcto para que este trabajo tenga el reconocimiento que merece.

A los integrantes del Laboratorio de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca, muy especialmente a Elena Bueno, parte fundamental de este trabajo, por enseñarme todo lo necesario para poder llevarlo a cabo, siempre con una sonrisa y una palabra amable y por convertir un trabajo arduo en una experiencia divertida y enormemente enriquecedora.

A Gorka Esparza, por su profesionalidad, su humanidad y su esfuerzo incansable para reparar una enorme injusticia. Agradezco especialmente su optimismo y buen hacer a la hora de enfrentarse a una institución mucho más poderosa que un humilde y honrado abogado. Sin él sería imposible estar aquí.

A Isidoro Ramos, por iniciar este proyecto y compartir conmigo su trabajo de forma desinteresada.

A los pacientes afectados de síndrome de Alport, por su generosa colaboración. Sin ellos este trabajo no tendría sentido.

A Pedro García-Cosmes, José Luis Lerma, Luis Corbacho y José Luis Rodríguez Commes, por la formación y consejos que he recibido de ellos. Siempre serán un referente en mi vida profesional.

A Francisco D. Moronta, Catalina Lorenzo y Eufasio Pérez, mis adjuntos del Servicio de Medicina Interna, por acogerme como si fuera su residente, por ayudarme cuando lo necesito y por hacerme comprender que ese despacho siempre será mi casa.

A mis compañeros del Servicio de Nefrología de Ávila, por el buen trato que siempre me han dispensado, por su ayuda en el trabajo diario y su comprensión hacia los sacrificios que entrañaba este proyecto.

A mis amigos, que son mi otra familia, por todas las cosas buenas que me aportan, porque siempre están dispuestos a ayudarme y levantarme el ánimo. Y por demostrarme lo afortunada que soy al poder tenerlos a mi lado todos los días, aunque se encuentren lejos.

Y, sobre todo, a mi familia, en especial a mis padres, por haberme dado tanto, por apoyarme siempre y por demostrarme que con honestidad, trabajo y esfuerzo todo se puede conseguir.

*“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido
del experimento, madre de toda certidumbre”*

Leonardo da Vinci, 1452-1519

<u>INTRODUCCIÓN</u>	15
<u>1. Generalidades</u>	17
<u>2. Recuerdo histórico</u>	18
2.1. Síndrome de Alport	18
2.2. Hematuria Familiar Benigna	23
<u>3. Epidemiología</u>	24
<u>4. Genética</u>	25
4.1. Síndrome de Alport	25
4.2. Hematuria Familiar Benigna	29
4.3. Consejo genético y planificación familiar	29
<u>5. Patogenia</u>	33
5.1. Síndrome de Alport	33
5.2. Hematuria Familiar Benigna	40
<u>6. Anatomía Patológica</u>	41
6.1. Síndrome de Alport	41
Microscopio óptico	41
Inmunofluorescencia	41
Microscopio eléctrico	42
Inmunohistoquímica	42
6.2. Hematuria Familiar Benigna	44
<u>7. Clínica</u>	45
7.1. Síndrome de Alport	45
Manifestaciones renales	45
Manifestaciones extrarrenales	48
7.2. Hematuria Familiar Benigna	56
7.3. Correlación genotipo-fenotipo	56
<u>8. Diagnóstico</u>	61
8.1. Criterios clínicos	62
8.2. Biopsias renal y cutánea	64
8.3. Análisis genéticos	66
8.4. Algoritmo diagnóstico	68
8.5. Diagnóstico diferencial	69
<u>9. Tratamiento</u>	72
9.1. Síndrome de Alport	72
Generalidades	72
Control de la proteinuria	72
Tratamiento renal sustitutivo	74
Nuevas perspectivas de tratamiento	81
9.2. Hematuria Familiar Benigna	84

<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</u>	85
<u>1. Planteamiento del problema</u>	87
<u>2. Objetivos</u>	88
 <u>PACIENTES Y MÉTODOS</u>	89
<u>1. Generalidades</u>	91
<u>2. Seguimiento clínico</u>	91
<u>3. Estudio genético</u>	93
3.1. Obtención de muestras de ADN.....	93
3.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.....	94
3.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	101
3.4. Análisis de mutaciones mediante (CSGE)-heterodúplex.....	102
3.5. Secuenciación del ADN.....	104
3.6. Análisis bioinformático de secuencias.....	107
3.7. Estudios poblacionales.....	108
<u>4. Método estadístico</u>	110
 <u>RESULTADOS</u>	111
<u>1. Características generales de la población estudiada</u>	113
<u>2. Estudio clínico</u>	114
<u>3. Estudio genético</u>	121
3.1. Familia 1.....	124
3.2. Familia 2.....	131
3.3. Familia 3.....	135
3.4. Familia 4.....	140
3.5. Familia 5.....	144
3.6. Familia 6.....	149
3.7. Familia 7.....	153
3.8. Familia 8.....	157
 <u>DISCUSIÓN</u>	161
 <u>CONCLUSIONES</u>	175
 <u>ARTÍCULOS</u>	179
 <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	207
 <u>ABREVIATURAS</u>	223

Introducción

1. GENERALIDADES

El síndrome de Alport (SA) comprende un grupo heterogéneo de desórdenes hereditarios que afecta a la membrana basal glomerular (MBG) del riñón y frecuentemente produce también trastornos a nivel de la cóclea y del aparato ocular. Estas alteraciones son el resultado de mutaciones en los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5, responsables de la biosíntesis del colágeno¹. El modelo de herencia sigue tres patrones diferentes: ligado al cromosoma X (OMIM 301050) en el 80% de los casos, de forma autosómica recesiva (AR) (OMIM 203780), responsable del 15% y autosómica dominante (AD) (OMIM 104200) en el 5% restante. Actualmente las entidades de herencia AD, que son el síndrome de Alport autosómico dominante (SAAD) y la hematuria familiar benigna (HFB), así como los portadores del síndrome de Alport autosómico recesivo (SAAR) se engloban dentro del término “nefropatía del colágeno IV ($\alpha3$ - $\alpha4$)”, al estar causadas por mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4, responsables de la síntesis de las cadenas $\alpha3$ y $\alpha4$ del colágeno IV². También existe la posibilidad de mutaciones espontáneas, descritas en pacientes sin historia familiar de la enfermedad. El síndrome de Alport ligado a X (SALX) es consecuencia de mutaciones en el gen COL4A5, responsable de la síntesis de la cadena $\alpha5$ del colágeno IV. Dichas mutaciones impiden la producción o el correcto ensamblaje de la red de colágeno tipo IV, que es un componente fundamental de la estructura de la MBG del riñón, el oído interno y el ojo. El síntoma principal de la enfermedad es la hematuria, aunque también puede cursar con proteinuria. La consecuencia es el desarrollo de insuficiencia renal progresiva (ERC) y enfermedad renal crónica terminal (ERCT).

La clínica de la “nefropatía del colágeno IV ($\alpha3$ - $\alpha4$)” oscila de un fenotipo leve a otro intermedio. El fenotipo leve está representado por la HFB (OMIM 141200), entidad que cursa con función renal normal, microhematuria persistente, mínima proteinuria, MBG uniformemente adelgazada e historia familiar con herencia AD³. El término “enfermedad de la membrana basal del-

gada” (EMBD) no es apropiado para denominar a esta enfermedad, puesto que refleja una alteración ultraestructural común a muchas enfermedades renales, siendo la HFB responsable de la mayoría de los casos⁴. En cuanto al fenotipo intermedio, es necesario destacar que algunos casos de HFB no presentan un curso clínico tan benigno como cabría esperar, pues el 50% de los adultos y el 6% de los niños presentan proteinuria (en el 16% de adultos esta llega a ser mayor de 500 mg/día), el 17% de los adultos muestran hipertensión arterial (HTA) y se han descrito casos de progresión a ERCT⁵. El hecho de que esta clínica recuerde al SA y que se hayan encontrado mutaciones de estos genes que coinciden tanto en familias con HFB como en otras con SAAD o SAAR hace que se haya concluido que la HFB y el SAAD son extremos opuestos de una misma enfermedad, causada por mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4⁶. En estos casos la ERCT aparece en edades tardías, por lo que puede confundirse con una glomerulopatía avanzada, no llegándose a un diagnóstico concreto, lo que hace que la enfermedad esté infradiagnosticada. La diferente evolución de la misma se debe a las distintas consecuencias en la traducción proteica de los genes implicados y a la intervención de otras proteínas estructurales del podocito o del diafragma, como la nefrina, la podocina y la α -actinina, que interactúan con el colágeno IV.

Existen otras enfermedades hereditarias, cuyo síntoma más frecuente también es la hematuria, como la anomalía de May-Hegglin, los síndromes de Epstein y Fechtner, la nefropatía CFHR5 o glomerulonefritis hereditaria C3 o la nefropatía mesangial IgA⁷.

2. RECUERDO HISTÓRICO

Las enfermedades hereditarias son una parte importante de la nefrología actual. Ya en el siglo XVIII el patólogo Morgagni, en su obra *De sedibus et causes morborum* dijo que “en los casos donde las causas de las enfermedades son oscuras, la probabilidad de una enfermedad hereditaria debería ser investigada”⁸.

2.1. SÍNDROME DE ALPORT

La denominada inicialmente “nefritis hemorrágica familiar hereditaria congénita” ha pasado a la historia con el epónimo de SA. Sin embargo, los primeros casos descritos se remontan a Dickinson y Pel^{9,10} en el último tercio del siglo XIX. En 1875 Dickinson publicó un árbol genealógico con once casos de albuminuria en un total de dieciséis personas a lo largo de tres generaciones. A principios del siglo XX Attlee publicó tres nuevos casos de hematuria y albuminuria recurrentes en una familia.

En 1902, Leonard Guthrie estudió a varios miembros de una familia con claros antecedentes de enfermedad renal con hematuria. Acuñó el término “hematuria familiar hereditaria idiopática o congénita”. La llamó hematuria en vez de nefritis porque, a su juicio, persistía durante muchos años, pero podía variar en intensidad, debido a exacerbaciones paroxísticas, con síntomas pseudogripales. No se acompañaba de edema, ascitis o alteraciones cardiovasculares, no era debida a ácido úrico u oxalato y no cursaba con orina de densidad baja¹¹.

En 1915, Arthur F. Hurst describió a otros miembros de la misma familia con nefritis, caracterizada por densidad urinaria baja, albuminuria, hematuria y presencia de cilindros hialinos y granulosos en la orina. Los enfermos presentaban hipertensión arterial y, en el transcurso de la evolución, desarrollaron anemia, alteraciones cardiovasculares, edema, y muerte secundaria a uremia. Denominó a esta entidad “nefritis hemorrágica congénita familiar hereditaria”^{12,13}. En estos trabajos se hacía notar la tendencia familiar y hereditaria de la enfermedad.

El 25 de febrero de 1924, Arthur Cecil Alport examinó a un paciente de 14 años que presentaba hematuria macroscópica y sordera. La orina era ácida y contenía algunos cilindros granulosos, albuminuria, gran número de cristales de ácido úrico y densidad de 1015. La urea era normal y presentaba signos de una “anemia secundaria leve”¹⁴. El paciente pertenecía a la cuarta generación de una familia con claros antecedentes. Varios miembros tenían sordera y hematuria ocasional y algunos habían sido estudiados por Guthrie, Hurst y Eason.

En el árbol genealógico desarrollado por Hurst se podía apreciar la afectación de los distintos miembros de la familia. Alport añadió la cuarta generación, a la que pertenecía el primer paciente que estudió.

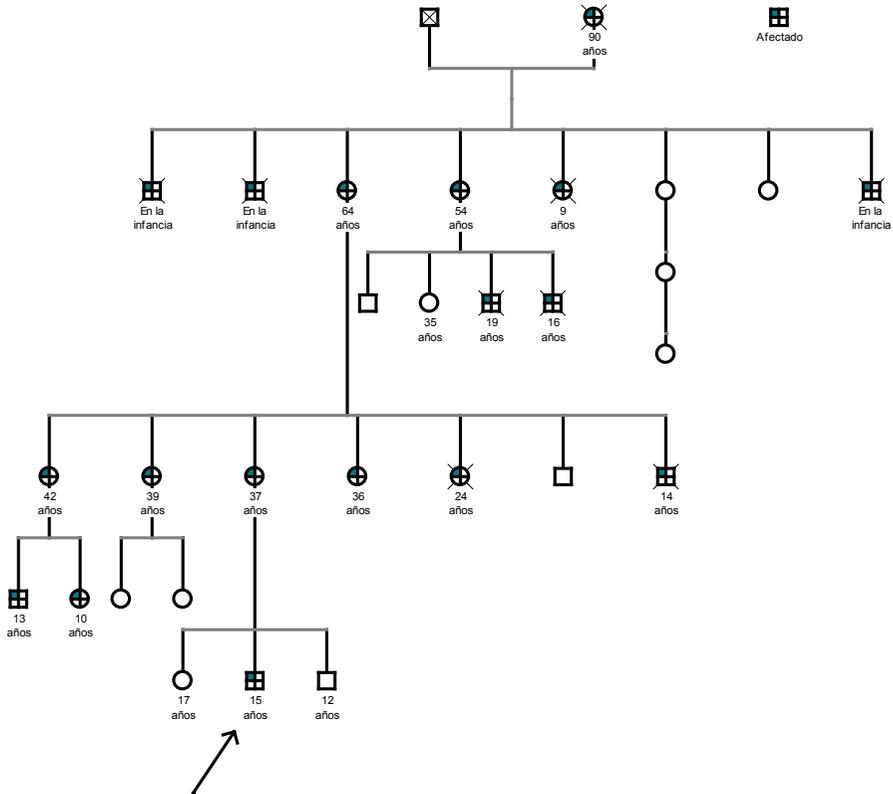


Figura 1: *Árbol genealógico de la familia, realizado por Hurst y completado por Alport. Varios miembros presentaban los signos clínicos de la enfermedad: sordera y hematuria y algunos fallecieron a edades tempranas (adaptado de Alport AC¹⁵).*

El término acuñado por Hurst de “nefritis hemorrágica congénita familiar hereditaria” era apropiado para la mayoría de los miembros afectados de las últimas generaciones de la familia.

Alport destacó que casi todos los niños de las tres generaciones sufrían hematuria o nefritis asociada a sordera neurosensorial. Le llamó la atención que la sordera, que antes no había sido señalada en la literatura, estaba considerada por los pacientes como uno de los rasgos más angustiosos de la enfermedad¹⁵. A pesar de la evidencia de tratarse de una enfermedad genética, pensó que el

trastorno observado en el paciente y su familia se desencadenaba por una infección, probablemente influenciado por los estudios de la época en los que se había demostrado la influencia del estreptococo β -hemolítico en la génesis de la glomerulonefritis aguda observada en niños con escarlatina^{13,16}.

Las conclusiones que extrajo de sus investigaciones fueron:

- La nefritis hereditaria familiar o congénita era una entidad definida.
- La sordera era un rasgo común en casi todos los casos.

Los miembros masculinos de la familia tendían a desarrollar nefritis y sordera y a fallecer. Los miembros femeninos presentaban sordera y hematuria, y vivían hasta edades avanzadas.

Un hecho fundamental para conocer la causa y el mecanismo patogénico de la enfermedad fue el descubrimiento de la familia del colágeno IV, formado por seis cadenas α , y su papel en las enfermedades renales, al que se llegó tras años de intensas investigaciones, siendo crucial la caracterización de la red $\alpha3$ - $\alpha4$ - $\alpha5$ ¹⁷.

En la mitad de la década de 1960 y los primeros años de la de 1970, diversos estudios se centraron en el aislamiento y caracterización bioquímica de la MBG de varias especies.

En 1966 Nicolas Kefalides expuso la primera evidencia de la existencia de un componente de colágeno en la MBG canina, al que llamó colágeno IV en un trabajo publicado en 1973¹⁸. En el mismo año, Robert Spiro puso de manifiesto que la MBG contenía polipéptidos similares al colágeno, interrumpidos por secuencias no colágenas¹⁹, rasgo confirmado en estudios posteriores.

Rupert Timpl aisló en 1981 una forma soluble del colágeno IV de tejido tumoral murino. Se trataba de un protómero con una disposición de triple hélice²⁰. Estos protómeros se asociaban mediante uniones término-terminal a sus dominios N-terminal (dominio 7S) para formar tetrámeros y mediante su dominio no colágeno carboxi-terminal (NC1) para formar dímeros.

Entre 1987 y 1989 se determinaron las secuencias completas de aminoácidos (aa) que forman parte de las cadenas de colágeno $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanas y murinas mediante clonación molecular y se estableció su existencia en la MBG. Se comprobó la presencia de estas cadenas de colágeno en diversas especies, como *Ascaris suum*, *Drosophila*, *C. Elegans* e *Hydra vulgaris*. Este hecho demostró que los rasgos estructurales necesarios para la asociación y formación de la red de colágeno se habían conservado durante más de 500 millones de años de evolución^{21,22}.

A finales de la década de 1980 y principios de la de 1990 se identificaron cuatro nuevas cadenas de colágeno IV: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$. Las cadenas $\alpha 3$ y $\alpha 4$ fueron descubiertas entre 1987 y 1988 por Butkowski, Saus y Gunward. La existencia de cuatro cadenas los llevó a proponer que había al menos dos protómeros diferentes del colágeno IV: uno compuesto por las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y el otro por la combinación de las cadenas $\alpha 3$ y $\alpha 4$ ^{23,24,25}.

En 1991 Karl Tryggvason²⁶ y Jeannie Myers²⁷ descubrieron la cadena $\alpha 5$ del colágeno IV y localizaron el gen COL4A5 en el locus del SA en el cromosoma X. Posteriormente se descubrieron mutaciones en el gen COL4A5 en una familia con SA, confirmando la identidad del gen defectuoso²⁸.

En 1992 se identificaron los genes COL4A4 y COL4A3, localizados en el cromosoma 2²⁹.

El gen COL4A6 se descubrió en 1993 por dos grupos independientes, liderados por Steve Reeders y Yoshifumi Ninomiya^{30,31}.

Los estudios ultraestructurales publicados en 1972 por Spear y Slusser permitieron la caracterización del SA como una alteración de la MBG³². Desde entonces dichas lesiones siguen siendo una prueba diagnóstica clave.

Estudios posteriores llevados a cabo a partir de la caracterización del colágeno IV han puesto de manifiesto la existencia de formas genéticamente diferentes del SA, todas debidas a mutaciones en los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5.

Las alteraciones genéticas y las causas subyacentes del SA permanecieron ocultas hasta la identificación del gen COL4A5, que codifica la cadena $\alpha 5$ del colágeno IV y la detección de las primeras mutaciones de la forma ligada al sexo, la más frecuente de la enfermedad; posteriormente se identificaron las primeras mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4, responsables de las formas autosómicas. Tras muchos años de investigación, estos avances mostraron que el SA es un desorden del colágeno tipo IV, heterogéneo desde el punto de vista genético. El desarrollo de anticuerpos (Ac) específicos contra las diferentes cadenas α (IV) y el análisis del DNA han mejorado el diagnóstico de la enfermedad³³.

2.2. HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

En 1926 Baehr estudió a 14 adultos jóvenes que presentaban hematuria microscópica indolora, que no se acompañaba de HTA o edema como en otras glomerulonefritis crónicas³⁴. Clasificó esta entidad en dos tipos: recurrente y persistente. El primero se caracterizaba por cortos episodios de hematuria macroscópica, a veces precipitados por una infección aguda del tracto respiratorio superior. El análisis de orina entre los brotes era normal o presentaba hematuria microscópica. En el tipo persistente la hematuria no se relacionaba con infecciones, se descubría de forma accidental y persistía durante varios meses. En ambos casos el pronóstico era excelente.

A partir de entonces, diversos investigadores realizaron estudios de seguimiento de niños con hematuria que no mostraban a largo plazo signos de enfermedad renal. En algunos casos la clínica era común en varios parientes, pero no había evidencias de la glomerulonefritis familiar descrita por Alport, por lo que se estableció la denominación de “hematuria familiar benigna” en 1966³⁵.

En 1996 las investigaciones de Lemmink concluyeron que los defectos del colágeno IV causaban tanto la HFB como el SA, al hallar alteraciones en los genes COL4A3 y COL4A4 y postularon que los pacientes con HFB podían ser portadores del SA³⁶.

3. EPIDEMIOLOGÍA

El SA tiene una prevalencia estimada de 1:50000 personas en la población general³⁷ y es responsable del 2% de las causas hereditarias de ERCT⁸. En la Polinesia Francesa, sin embargo, es la enfermedad de base del 18% de los pacientes sometidos a diálisis, por lo que es la enfermedad hereditaria monogénica más prevalente en esta zona geográfica. La razón de esta elevada prevalencia es una mutación específica: una duplicación en tándem de 35 exones del gen COL4A5, que se extiende desde el exón 2 hasta el 36³⁸.

El 80% de los pacientes con SA padecen la forma ligada al cromosoma X, causada por mutaciones en el gen COL4A5, aunque aproximadamente el 10-15% de casos del SALX son debidos a mutaciones de novo³⁹. El SALX es la forma más común de la enfermedad, estimándose que afecta a 1 de cada 5000 a 10000 varones en todo el mundo.

La forma autosómica recesiva es responsable del 15% de los individuos con SA y está causada por mutaciones homocigotas en los genes COL4A3 o COL4A4.

El 5% restante se hereda de forma autosómica dominante (SAAD), debido a mutaciones heterocigotas de los genes COL4A3 o COL4A4. Sin embargo, la mayoría de aquellos con mutaciones heterocigotas de estos dos genes presentan una forma de hematuria familiar que es no progresiva: HFB.

La EMBD es la causa más común de hematuria aislada persistente y recurrente en niños y adultos, con una prevalencia que oscila entre el 1 y 14%, en función de la población estudiada⁴⁰. Dos tercios de estos pacientes presentan una forma AD de la enfermedad, la HFB; en el 40% de estas familias la mutación se encuentra en el locus COL4A3/COL4A4. La prevalencia estimada de hematuria debida a la HFB alcanza el 1% de la población, lo que la convierte en una de las entidades que con mayor frecuencia afecta al riñón, tras las infecciones, las litiasis y la HTA⁴¹.

4. GENÉTICA

4.1. SÍNDROME DE ALPORT

Genes implicados

Los genes responsables del SA son COL4A3, COL4A4 y COL4A5, que se encargan de codificar las cadenas del colágeno IV $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Estas proteínas tienen una estructura común, en la que el extremo 5' del gen codifica un péptido señal y los 5 últimos exones del extremo 3' son los responsables de la codificación del dominio NC1 del producto proteico. Este último dominio está constituido por 12 residuos de cisteína (estructura común en todas las cadenas de colágeno IV), responsables de establecer los puentes disulfuro entre dominios NC1 para lograr así la unión entre las distintas cadenas α^1 . De esta forma, cuando se produce la sustitución de una cisteína por otro aa, se produce una red de colágeno defectuosa.

Los exones intermedios codifican el dominio colágeno, de 1430 aa. Este dominio contiene la secuencia repetitiva Gly-X-Y.

El dominio colágeno está interrumpido en 25 localizaciones, que están conservadas en las distintas cadenas⁴².

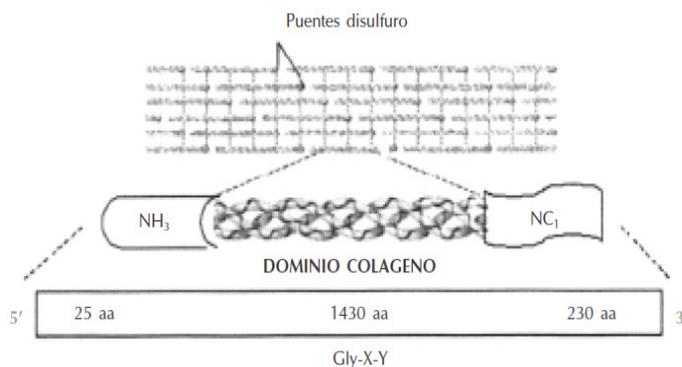


Figura 2: Estructura común de las cadenas de colágeno $\alpha(IV)$ (Extraído de Tazón et al.¹).

Estos genes tienen en común la ausencia de puntos calientes mutacionales y la presencia de multitud de polimorfismos. Las mutaciones patogénicas más comunes son las sustituciones de la glicina de los tripletes Gly-X-Y por

otro aa (missense). Como la glicina es aa el más pequeño que existe, es el único que cabe en los pliegues que se forman en la estructura de la triple hélice, por lo que, al ser sustituida por un aa de mayor tamaño, se altera la estructura proteica y no se puede formar la matriz de las membranas basales⁴³. Se han encontrado también mutaciones en el codón de inicio, (nonsenses y cambios de marco de lectura), que llevan a la pérdida de función, así como sustituciones de la glicina por alanina, que carecen de significado patológico porque, al ser la alanina el aa más parecido a la glicina, su sustitución provoca una mínima disrupción de la hélice de colágeno^{43,44}.

•GEN COL4A3

El gen COL4A3 está localizado en la posición 2q36-37. Codifica la cadena $\alpha 3(\text{IV})$, que es una proteína de 1670 aa, de la que se han descrito 5 isoformas. Este gen está compuesto por 52 exones, cuyos tamaños varían entre 27 y 210 pb excluyendo las regiones 5' y 3', que no se traducen.

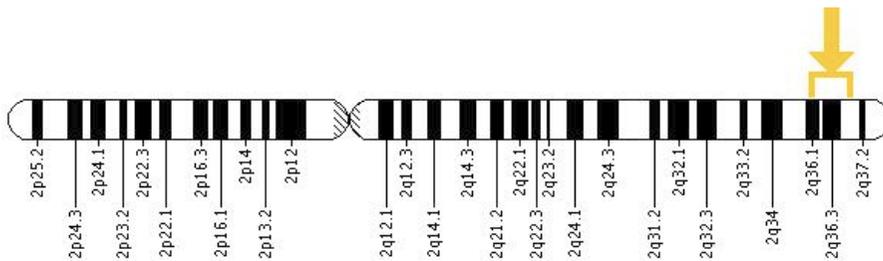


Figura 3: Localización del gen COL4A3 en el cromosoma 2.

El extremo no traducido 5' y los 28 aa que forman el péptido S están codificados por un exón de 249 pb, que también codifica el primer aa del dominio 7S. El extremo 3' del exón 2, los exones 3 a 47 y el extremo 5' del exón 48 codifican el dominio colágeno. El dominio NC1 tiene 232 aa y está codificado por el extremo 3' del exón 48 y del 49 al 52⁴⁴.

Las mutaciones descritas se extienden por todo el gen, son privadas (no las comparten distintas familias) y las más comunes son las que generan un codón prematuro de terminación.

•GEN COL4A4

Este gen se compone de 48 exones y, al igual que el COL4A3, está localizado en la posición 2q36-37. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es traducido a un polipéptido de 1690 aa, con un dominio no colágeno de 231 residuos, un dominio colágeno de 1421 residuos y un péptido de señal de 38 residuos. El extremo 3' tiene 6 exones⁴³.

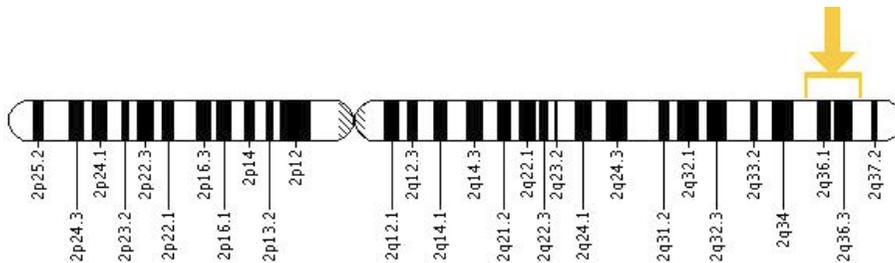


Figura 4: Localización del gen COL4A4 en el cromosoma 2.

Se han descrito distintas variantes alélicas normales y se han encontrado relativamente pocas mutaciones, algunas de las cuales no producen un fenotipo obvio. Las mutaciones descritas comparten las mismas características que las encontradas en el gen COL4A3.

•GEN COL4A5

El gen COL4A5 tiene 52 exones, que abarcan 250 kb de ADN genómico y está localizado en la región Xq22. Existe una variedad alélica normal y varias patológicas. Los 1685 aa de la proteína $\alpha 5$ contienen un dominio 7S N-terminal (exón 1) y un dominio NC1 (exones 47-51). Sin embargo, la parte proteica más larga está compuesta por un dominio colágeno (exones 2-47) que contiene la característica secuencia Gly-X-Y repetida, común a todos los colágenos, que también incluye 22 interrupciones no-colágeno cortas. Algunas mutaciones que ocurren cerca de las interrupciones naturales del dominio de la triple hélice de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ podrían causar fenotipos más leves, quizá porque provocan una disrupción menos drástica de la formación en cremallera de la triple hélice⁴⁵.

Se han descrito más de 600 mutaciones en este gen que, al igual que las halladas en los genes COL4A3 y COL4A4, se distribuyen por toda la estructura génica, ya que no existen puntos calientes mutacionales y suelen ser privadas.

El 10-15% son mutaciones de novo, al haber ocurrido en uno de los gametos de los progenitores del paciente. El 40% dan lugar a un codón prematuro de terminación, pudiendo ser mutaciones sin sentido (nonsense) o inserciones/deleciones que generan un cambio en la pauta de lectura (frame-shift). El 35% son missense y el 10% corresponden a pequeñas inserciones/deleciones que no dan lugar a un cambio en la pauta de lectura (in-frame) y mutaciones de splicing (ensamblaje), que son responsables de la pérdida de uno o varios exones. El 5-15% restantes son grandes reordenamientos, como grandes deleciones⁴⁶.

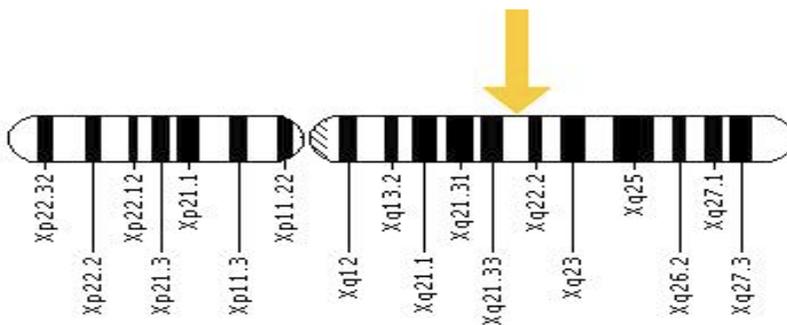


Figura 5: Localización del gen COL4A5 en el cromosoma X.

Modos de herencia

El SA es una enfermedad genéticamente heterogénea, pero la mayoría de las familias (85%) muestran una forma de herencia ligada al cromosoma X, causada por mutaciones en el gen COL4A5. Las formas AD y AR se dan con mucha menos frecuencia y son debidas a mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4. La forma AR es responsable del 10% de los casos de SA y la forma AD lo es del 5% restante. En la mayoría de casos de SAAR cada familia es portadora de una única mutación, aunque se han identificado individuos homocigotos para dos mutaciones en el gen COL4A3 o COL4A4⁴⁷.

4.2. HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

La EMBD, que lleva a HFB, es una condición hereditaria que ha sido atribuida en casi la mitad de los casos a una mutación heterocigota en los genes COL4A3 o COL4A4, que producen fenotipos similares. Las mutaciones encontradas son sustituciones simples de nucleótidos que llevan a mutaciones missense o nonsense, inserciones y deleciones^{48,49}.

Las dos terceras partes de los pacientes tienen una forma de herencia AD. El principal rasgo anatomopatológico es el adelgazamiento de la MBG, que es idéntico al observado en el estado de portador del SAAR (varones y mujeres heterocigotos) o del SALX (mujer portadora)^{50,51}. Esta entidad puede ser considerada como un fenotipo intermedio del SA⁴⁸ o representar el estado de portador del SAAR, pero es necesario identificar otros genes involucrados para conocer la patogenia de forma completa⁴⁷.

4.3. CONSEJO GENÉTICO Y PLANIFICACIÓN FAMILIAR

Distribución de la enfermedad en familias con SALX

•PADRES DE UN VARÓN ENFERMO

El padre no tendrá la enfermedad ni será portador de la mutación. En una familia con más de un varón afectado, la madre es una portadora obligatoria. Si solo un miembro varón de la familia está enfermo, la probabilidad de que la madre del individuo sea una portadora es del 85-90%. Aproximadamente el 10-15% de los varones tienen SALX como resultado de una mutación de novo.

•PADRES DE UNA MUJER ENFERMA

El padre o la madre de una mujer con SALX puede tener la mutación, o la enferma ser fruto de una mutación de novo.

•HERMANOS DE UN VARÓN ENFERMO

El riesgo para los hermanos depende del estado de portador de la madre. Si la madre es portadora, cada hermano tiene el 50% de posibilidades de heredar la mutación: los varones que la hereden estarán afectados y las mujeres

serán portadoras y podrán tener síntomas o no. Si la madre no es portadora, el riesgo para los hermanos es bajo, pero mayor que la población general, por la posibilidad de mosaicismo germinal.

• **HERMANOS DE UNA MUJER ENFERMA**

El riesgo para los hermanos depende del estatus genético de los padres. Si la madre es portadora, cada hermano tendrá el 50% de posibilidades de heredar la mutación: los varones que la hereden estarán afectados y las mujeres serán portadoras y podrán ser o no sintomáticas. Si el padre tiene la mutación causante de la enfermedad, todas sus hijas heredarán la mutación, y podrán o no tener síntomas. Ninguno de los hijos varones la heredará. Si ninguno de los padres tiene la mutación, el riesgo para los hermanos es bajo, pero mayor que la población general por la posibilidad de mosaicismo en la línea germinal.

• **DESCENDENCIA DE UN VARÓN ENFERMO**

Los varones afectados transmitirán la mutación a todas sus hijas y a ninguno de sus hijos.

• **DESCENDENCIA DE UNA MUJER ENFERMA**

Las mujeres con la mutación tienen el 50% de posibilidades de transmitirla a cada hijo: los hijos que la hereden estarán enfermos y las hijas tendrán un rango de expresión fenotípica.

• **OTROS FAMILIARES DE UN PROBANDO**

Las tías maternas de un varón enfermo pueden estar en riesgo de ser portadoras, y su descendencia, dependiendo de su género, puede estar en riesgo de ser portadores o enfermos.

Distribución de la enfermedad en familias con SAAR

• **PADRES DE UN ENFERMO**

Los padres de un niño afectado son heterocigotos obligados y, por tanto, portadores de un alelo mutado. Aproximadamente el 50% de los portadores

presentan microhematuria persistente o intermitente. Los portadores del SAAR rara vez desarrollan proteinuria, HTA o insuficiencia renal.

- **HERMANOS DE UN ENFERMO**

Una vez que un hermano en riesgo se sabe que está sano, el riesgo de ser portador es 2/3. Aproximadamente el 50% de portadores tienen microhematuria intermitente o persistente. Los portadores raramente desarrollan proteinuria, HTA o insuficiencia renal.

- **DESCENDENCIA DE UN ENFERMO**

Los descendientes de un individuo con SAAR son obligados portadores heterocigotos de la mutación.

- **OTROS FAMILIARES DEL ENFERMO**

Cada hermano de los padres del probando tiene un 50% de riesgo de ser portador.

Existe la posibilidad de que el SAAR pueda existir como una enfermedad digénica, con mutaciones del COL4A4 en un alelo y del COL4A3 en el otro.

Distribución de la enfermedad en familias con SAAD y HBF

- **PADRES DE UN ENFERMO**

La mayoría de individuos diagnosticados de nefropatía del colágeno IV, con herencia AD, tienen un progenitor afectado, aunque la enfermedad también puede ser debida a una mutación de novo, cuya proporción es desconocida. Aunque muchos individuos diagnosticados con una nefropatía relacionada con el colágeno IV AD tienen un progenitor afectado, la historia familiar puede parecer negativa a causa del fallo en el reconocimiento de la enfermedad en miembros de la familia, muertes tempranas de los padres antes del comienzo de los síntomas, o comienzo tardío de la enfermedad en los padres afectados.

- **HERMANOS DE UN ENFERMO**

El riesgo de los hermanos de un probando depende del estatus genético de los padres. Si un padre está afectado, el riesgo es del 50%. Cuando los padres

están clínicamente sanos, el riesgo de los hermanos de un probando parece ser bajo. No se han descrito ejemplos de mosaicismo germinal, aunque esa posibilidad existe.

- **DESCENDENCIA DE UN ENFERMO**

Cada hijo de un paciente con herencia AD tiene el 50% de probabilidades de heredar la mutación.

- **OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA**

El riesgo para otros miembros de la familia depende del estatus de los padres del probando. Si un padre es afecto, los miembros de su familia están en riesgo.

Una vez se ha hecho el diagnóstico, tanto el árbol genealógico como los análisis de ligamiento nos permiten responder la mayoría de las cuestiones importantes suscitadas por esta enfermedad: reconocimiento de portadores heterocigotos, consejo genético y diagnóstico prenatal y preimplantación (en embarazos de riesgo si se conoce la mutación), ya que se puede ofrecer al paciente y su familia información relacionada con el pronóstico y la progresión relacionada con el género y el modo de transmisión¹.

El momento óptimo para la determinación del riesgo genético es previo a la gestación. Es apropiado ofrecer consejo genético para los adultos jóvenes que estén afectados, sean portadores o estén en riesgo de ser portadores, en los tres tipos de herencia. Este debe incluir los potenciales riesgos para los descendientes y las distintas opciones reproductivas. Solo es posible realizar los test de portadores para miembros de familias en riesgo y test prenatales si la mutación causante de la enfermedad en la familia es conocida².

5. PATOGENIA

5.1. SÍNDROME DE ALPORT

Estructura de la MBG

La MBG es un tipo especial de membrana basal debido a su enorme grosor (300-350 nm) y su posición entre dos capas celulares: los podocitos y el endotelio fenestrado. Tiene un papel específico en el mantenimiento de la barrera de filtración glomerular. Sus principales componentes son el colágeno tipo IV, la laminina, el nidogen (entactina) y los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG). Las mutaciones en los genes del colágeno tipo IV y la laminina se asocian a enfermedades glomerulares hereditarias³³.

•COLÁGENO

La superfamilia del colágeno (que es la proteína más abundante del cuerpo humano) incluye 46 proteínas genéticamente distintas, clasificadas en 28 tipos, con 45 clases diferentes de cadenas α . Tres cadenas α se unen para formar una molécula de colágeno en forma de triple hélice, y esos trímeros se distribuyen en tejidos característicos⁵².

Cada cadena α consta de un dominio colágeno caracterizado por la repetición del triplete Gly-X-Y, flanqueado por dominios que no forman la triple hélice, llamados dominios no colágeno (NC) en el extremo 3' y un pequeño dominio 7S en el extremo 5'. En la formación de las moléculas de colágeno, el dominio NC1 de las tres cadenas α interacciona con los otros y el plegamiento del mismo en la triple hélice se produce en una dirección de carboxi-terminal a amino-terminal en forma de cremallera.

La mayoría de moléculas de colágeno forman estructuras como fibrillas y redes (mostrando así un alto grado de especificidad) y se clasifican dependiendo de esos ensamblajes, de la función y de la homología de los dominios. El colágeno tipo IV forma una red entrelazada en la unión dermo-epidérmica y en las membranas basales, actuando como una barrera de filtración, mientras

los tipos VIII y X forman una red hexagonal en la matriz vascular subendotelial y en la zona hipertrófica del cartílago de crecimiento³³.

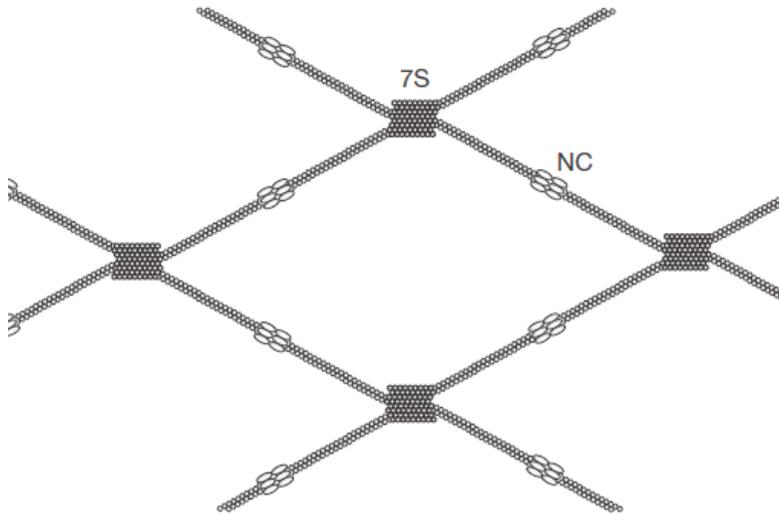


Figura 6: Organización de una red de colágeno tipo IV. Dos moléculas se unen mediante sus dominios no colágeno, y cuatro moléculas se unen mediante sus dominios 7S (Extraído de Gubler MC³³).

Se han identificado seis cadenas α del colágeno IV, cuyos genes están localizados en pares en distintos cromosomas: COL4A1 y COL4A2 en 13q34, COL4A3 y COL4A4 en 2q36-37, y COL4A5 y COL4A6 en el cromosoma X¹.

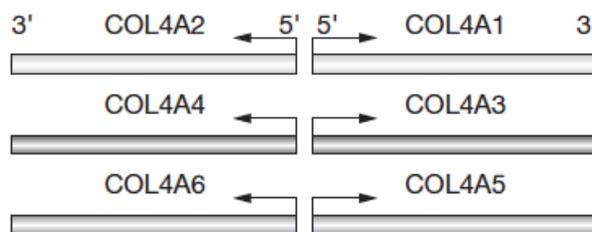


Figura 7: Representación esquemática de la distribución de los genes del colágeno tipo IV en los cromosomas 13, 2 y X (Extraído de Gubler MC³³).

Las combinaciones de las seis cadenas α permiten en teoría la creación de 56 protómeros diferentes. Sin embargo, solo se han descubierto tres: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ y $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$, que forman tres redes distintas: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ - $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ - $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ y $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ - $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(\text{IV})$ ¹⁷.

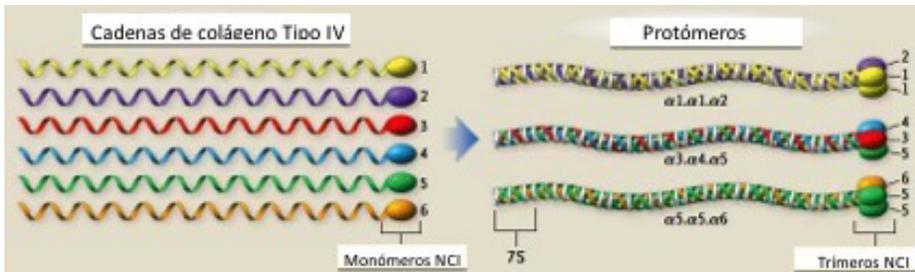


Figura 8: Descripción esquemática de las 6 cadenas de colágeno VI, con su unión en forma de protómeros en disposición de triple hélice (Extraído de Hudson BG¹⁷).

La red $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ - $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ se expresa en todas las membranas basales de las nefronas embrionarias. Durante la maduración glomerular se produce un cambio en las redes de colágeno IV de la MBG: el trímero $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(\text{IV})$ es reemplazado por $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$, que es más resistente a la proteólisis, lo que es clave para el mantenimiento de la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular.

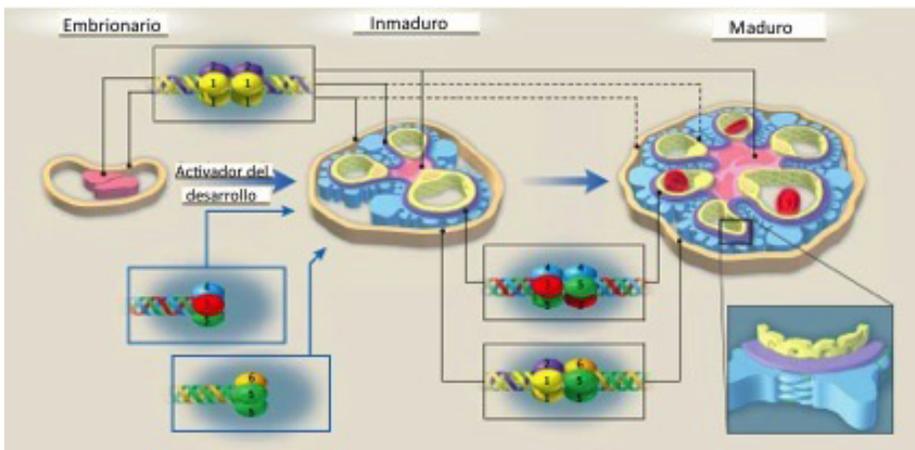


Figura 9: Desarrollo embrionario normal del glomérulo. Cambio de redes de colágeno (IV) para formar la MBG madura (Extraído de Hudson BG¹⁷).

La red $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ - $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ se encuentra en la MBG de las nefronas maduras, en la membrana basal del túbulo contorneado distal, en la membrana basal alveolar y en las membranas basales especializadas del aparato ocular y la cóclea, así como en los testículos.

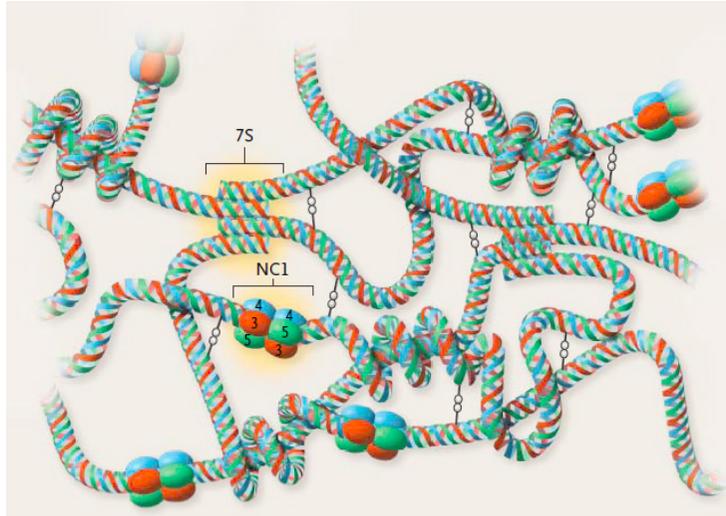


Figura 10: Disposición tridimensional de la red de colágeno $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ - $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ en la MBG (Extraído de Hudson BG¹⁷).

La red $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ - $\alpha5\alpha5\alpha6(IV)$ se expresa en la cápsula de Bowman, en la membrana basal del túbulo colector y en las membranas basales de la epidermis y del músculo liso.

•LAMININAS

Las lamininas son una gran familia de glicoproteínas heterotriméricas, compuestas por una cadena α , una β y una γ , organizadas en una estructura cruciforme. Son necesarias para la unión de las membranas basales a la superficie de las células e interactúan con el colágeno tipo IV a través del nidogen⁵³. También interactúan con las células adyacentes mediante diferentes receptores, entre los que se incluyen las integrinas. Se han descubierto aproximadamente 15 isoformas diferentes de lamininas. La laminina 11 ($\alpha5\beta2\gamma1$), que se conoce actualmente como laminina-521, es la isoforma presente en la MBG³³.

La MBG embrionaria contiene laminina $\alpha1\beta1\gamma1$ (laminina 111), mientras la del glomérulo maduro contiene laminina $\alpha5\beta2\gamma1$ (laminina 521). La razón de este cambio estriba en que la isoforma 521 es necesaria para el mantenimiento

del estado altamente diferenciado de las células del endotelio glomerular y los podocitos⁵³.

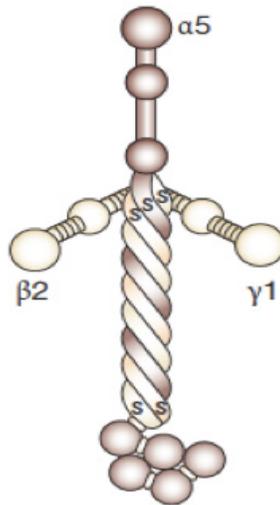


Figura 11: Estructura cruciforme de la laminina (Extraído de Gubler MC³³).

•NIDOGEN

El nidogen es un componente ubicuo de las membranas basales. Sirve de puente entre las redes de colágeno IV y laminina. También se une a otros componentes de la matriz extracelular y a otras células a través de los receptores de la integrina⁵⁴.

•PROTEOGLICANOS DE HEPARÁN SULFATO (HSPG)

Los HSPG, como la agrina y el perlecán, son macromoléculas compuestas por una proteína core sujeta a cadenas de glicosaminoglicanos de heparán sulfato. La naturaleza fuertemente aniónica del heparán sulfato es responsable de la selectividad de carga de la barrera de filtración glomerular³³.

Alteraciones de la MBG

El ensamblaje defectuoso del colágeno IV es la causa subyacente de varias enfermedades hereditarias en humanos y animales. Sin embargo, en el SA hay muchos agentes que participan en el proceso patogénico que tiene lugar en la MBG.

•COLÁGENO IV

Las mutaciones de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 producen defectos en las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ o $\alpha 5(\text{IV})$, por lo que no se puede formar una red estable $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ o $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(\text{IV})$. De esta forma, se produce un incorrecto plegamiento o ensamblaje de los monómeros, que son rápidamente degradados por endopeptidasas glomerulares⁵⁵. Así, una mutación en cualquier cadena de la triple hélice $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ hace que no se pueda formar dicha hélice.

En contraste, las cadenas $\alpha 1(\text{IV})$ y $\alpha 2(\text{IV})$, que están normalmente confinadas al mesangio y a la cara subendotelial de la MBG, se disponen en la totalidad de la MBG, siguiendo una distribución que recuerda a la de los riñones fetales, fenómeno conocido como “isotype switching”⁵³.

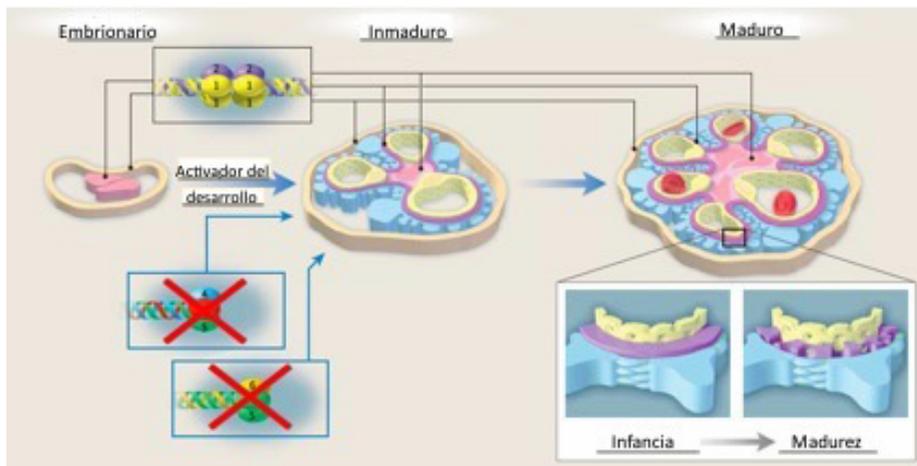


Figura 12: Mutaciones en los genes COL4A3, COL4A4 o COL4A5 impiden la formación de los monómeros correspondientes. Por tanto, en la MBG no se forman las redes de colágeno adulto y persisten las del colágeno fetal (Extraído de Hudson et al.⁵⁵).

La persistencia del colágeno embrionario confiere a la MBG del SA distintas propiedades físicas: al ser más delgada y menos cruzada es más elástica, lo que somete a los podocitos a una elevada tensión biomecánica, incluso bajo una presión arterial glomerular normal. Al progresar la enfermedad se produce la pérdida de masa nefronal y se desarrolla hipertensión glomerular. Estos factores exacerbaban la tensión biomecánica⁵⁵.

El predominio del colágeno fetal lleva a una mayor destrucción de la MBG, ya que es una red menos resistente a la proteólisis, lo que explica la hematuria y la proteinuria. La proteinuria, además de asociarse a daño en la MBG⁸ es, por si misma, un factor de progresión del SA, al producir tanto esclerosis como una respuesta fibrogénica con infiltración de fibroblastos en la transición epitelio-mesenquimal, lo que contribuye a la destrucción de la arquitectura renal⁵³.

La delección de las cadenas de colágeno IV produce también una significativa infiltración inmune, con activación de linfocitos B y T. Esta respuesta inmune está provocada por los defectos estructurales de la MBG y los problemas de comunicación resultantes de la interacción aberrante entre el endotelio, la MBG y los podocitos. La pérdida de fijación de los podocitos a la MBG defectuosa puede provocar la proliferación del epitelio visceral, además del derrame de mediadores inflamatorios dentro del espacio de Bowman. Eventualmente, el daño glomerular se propaga al intersticio renal con daño tubular, atrofia y fibrosis intersticial⁵⁶.

•LAMININAS

Además de la alteración del colágeno IV, la MBG en el SA contiene lamininas aberrantes, que son activadas por el estrés mecánico entre las superficies adhesivas de las células glomerulares y la MBG. Estas lamininas pueden contribuir al progresivo engrosamiento y división de la MBG, a la proteinuria y a la insuficiencia renal⁵⁷. Se localizan en áreas de engrosamiento de la MBG e incrementan el borramiento de los pies podocitarios, lo que contribuye a la deformidad de los podocitos y de la MBG y causa un incremento de la permeabilidad de la misma⁵⁸.

•METALOPROTEASAS DE LA MATRIZ MESANGIAL (MMP)

La red de colágeno tipo IV en la MBG del SA, al estar compuesta completamente por cadenas $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$, contiene menos uniones disulfuro intercatenarias que la MBG normal, por lo que es más susceptible a la degra-

dación proteolítica por metaloproteasas. Este ataque a la membrana puede contribuir al mecanismo de iniciación y progresión de la enfermedad glomerular⁵⁹.

Las MMP 2, 3, 9, 12 y 14 están sobreexpresadas en los glomérulos del SA. Esto juega un papel directo en la progresión de la enfermedad glomerular, probablemente a través de la degradación proteolítica de la MBG, pues existe un nexo entre la tensión biomecánica del penacho glomerular y la elevada expresión de MMP 3, 9 y 10, en podocitos y glomérulos⁵⁷. En estos procesos también intervienen otras proteínas como proteína morfogenética ósea, que induce a la MMP-12 en las células mesangiales o TGF- β 1, que está activado en los podocitos del SA.

•INTEGRINAS

Varias integrinas han sido implicadas en la patogenia del SA. Así, la disrupción de las interacciones adhesivas entre la integrina α 3 β 1 y la laminina 521 produce la destrucción del citoesqueleto de actina y pone en marcha respuestas maladaptativas que pueden causar degradación focal de la MBG, lo que da lugar a un aumento de la permeabilidad, con proteinuria y progresión de la glomeruloesclerosis⁵⁹. Las integrinas α 1 β 1 y α 5 β 1 están relacionadas con el remodelado de la matriz mesangial, al ser mediadoras de la angiogénesis y de la inflamación, lo que contribuye al daño glomerular crónico de la enfermedad⁶⁰.

5.2. HEMATURIA BENIGNA FAMILIAR

En contraste con el SALX y SAAR, las cadenas α 3(IV), α 4(IV) y α 5(IV) se expresan en la MBG, aunque de forma defectuosa, lo que es suficiente para alterar la arquitectura de la MBG, pues se produce la reducción o pérdida total de la porción subepitelial de la misma, lo que causa la clínica de hematuria, pero, al ser un trastorno heterocigoto están ausentes los demás rasgos del SA⁶¹.

6. ANATOMÍA PATOLÓGICA

El SA y la EMBD pueden ser indistinguibles en el microscopio óptico (MO), en la inmunofluorescencia (IF) y en el microscopio electrónico (ME) en los primeros estadios⁶².

6.1. SÍNDROME DE ALPORT

Microscopio óptico

La MO del SA no muestra alteraciones destacables en las fases iniciales, aunque puede verse hipertrofia de podocitos y rigidez de la pared capilar, asociadas o no a cilindros hemáticos tubulares.

En la tinción de plata puede apreciarse el engrosamiento focal y segmentario de la MBG, con progresiva dilatación de los pedúnculos mesangiales.

En estadios posteriores se encuentra una glomeruloesclerosis inespecífica con fibrosis intersticial y presencia de células espumosas intersticiales. Estas células son inespecíficas de la enfermedad. El desarrollo de esclerosis glomerular segmentaria y difusa en un número cada vez mayor de glomérulos lleva a una completa esclero-hialinosis del penacho. Se aprecian también focos de lesiones túbulo-intersticiales, que paulatinamente aumentan en tamaño y severidad⁴.

Inmunofluorescencia

La IF es inicialmente negativa, sin embargo, pueden observarse depósitos de IgG, IgM y/o C3 débiles e irregulares. Con mayor frecuencia se aprecian depósitos granulares de C3 irregularmente distribuidos en el penacho glomerular y las arteriolas aferentes. Con la progresión de las lesiones se producen depósitos de IgM, C1q y C3 en las lesiones segmentarias glomerulares.

Ninguna de las anomalías previas es específica. La identificación de cambios ultraestructurales de la MBG es, por tanto, de suma importancia, ya

que provee una característica específica de la enfermedad y sugiere que el SA es un desorden de la MBG⁶².

Microscopio electrónico

En el ME, la lesión diagnóstica corresponde a áreas irregulares de engrosamiento y adelgazamiento de las MBG con escisión y aspecto multilaminado e irregular de la lámina densa, con mezcla de fibrillas finas dentro de áreas irregulares engrosadas y translúcidas de la lámina densa y con pequeños brotes de fibrillas que se disponen en ángulo recto respecto a la MBG y dan lugar al aspecto enrejado. Entre estas láminas se reconoce un material moteado granular. En las fases precoces de la enfermedad (niños y mujeres portadoras) la MBG puede mostrar exclusivamente adelgazamiento difuso, sin áreas de engrosamiento. Esta es la única alteración observada en el 10-20% de los pacientes, la mayoría niños, pero también se da en adultos con SALX⁶³.

En todas las formas de herencia, los rasgos de la ultraestructura no se correlacionan de forma estricta con el tipo de mutación porque algunos pacientes con importantes reordenamientos genéticos no sufren lesiones significativas y las alteraciones ultraestructurales son variadas incluso dentro de la misma familia.

Inmunohistoquímica

La MBG está constituida por heterotrímeros $\alpha3\text{-}\alpha4\text{-}\alpha5(\text{IV})$, mientras la cápsula de Bowman y el túbulo colector contienen heterotrímeros $\alpha1\text{-}\alpha1\text{-}\alpha2(\text{IV})$ y $\alpha5\text{-}\alpha5\text{-}\alpha6(\text{IV})$ ⁶⁴.

•SÍNDROME DE ALPORT LIGADO AL CROMOSOMA X

En el 70-80% de los varones se aprecia la ausencia de las cadenas $\alpha5(\text{IV})$, $\alpha3(\text{IV})$ y $\alpha4(\text{IV})$ en la MBG y en la membrana basal del túbulo distal, donde normalmente están ensamblados en el mismo protómero, y de $\alpha5\text{-}\alpha5\text{-}\alpha6(\text{IV})$ en la cápsula de Bowman y la membrana basal del túbulo colector. Esta distribu-

ción anormal se asocia con una fuerte expresión de las cadenas $\alpha 1(\text{IV})$ y $\alpha 2(\text{IV})$ en toda la MBG, que, en condiciones normales, están confinadas al mesangio y a la cara endotelial de la MBG.

En mujeres emparentadas, la alteración es normalmente segmentaria a causa de la inactivación al azar del cromosoma X. Sin embargo, debido a esta distribución parcheada, puede observarse tanto una tinción normal como la completa falta de expresión⁶⁵.

•SÍNDROME DE ALPORT AUTOSÓMICO RECESIVO

En el SAAR, la MBG no presenta expresión de las cadenas $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5(\text{IV})$ porque un defecto en $\alpha 3(\text{IV})$ o $\alpha 4(\text{IV})$ impide que se forme el heterotrímero. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en el SALX, los casos AR muestran una intensa expresión de $\alpha 5(\text{IV})$ en la cápsula de Bowman y la membrana basal del túbulo colector, lo que refleja la incorporación normal de esa cadena no mutada en los heterotrímeros $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6(\text{IV})$ ⁶².

La sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica sobre la biopsia renal para el diagnóstico de SA son escasas, ya que hasta un 20% de los varones con SALX y los pacientes homocigotos con SAAR tienen una tinción débil e incluso normal de la MBG para $\alpha 3(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$. Se cree que esto es debido a que la mutación deja intacto el epítipo que reconocen los Ac comercializados. Por tanto, un patrón de tinción en apariencia positivo no descarta el diagnóstico. Además, la posible relación entre el SA y algunos casos de HFB por EMBD asociada a mutaciones de COL4A3 o COL4A4 complica más la interpretación de los patrones de tinción⁶⁵.

•SÍNDROME DE ALPORT AUTOSÓMICO DOMINANTE

En SAAD la expresión del colágeno tipo IV es normal en los pocos casos que han sido estudiados.

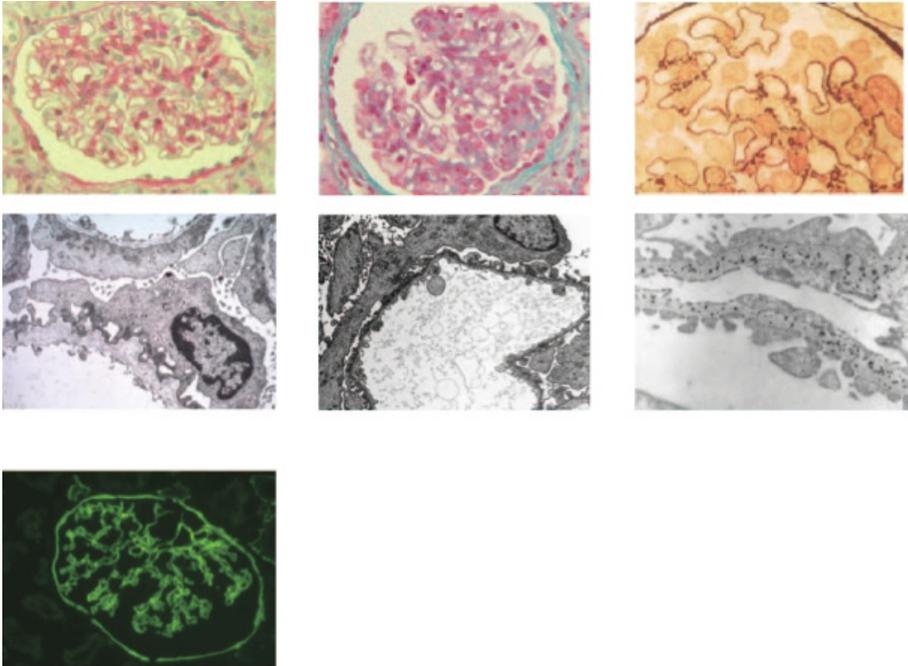


Figura 13: 1 MO: Hipertrófia de podocitos en una etapa inicial del SA (Tricrómico de Masson). 2 MO: Rigidez y moderado engrosamiento de la MBG y esclerosis glomerular segmentaria (Tricrómico de Masson). 3 MO: Engrosamiento irregular de la MBG (Plata metenamina). 4 ME: Distribución irregular de engrosamiento, laminación y adelgazamiento de la MBG. 5 ME: Adelgazamiento difuso de la MBG. 6 ME: Ac anti $\alpha 1(IV)$: distribución en la totalidad del engrosamiento de la MBG. 7 Inmunohistoquímica: distribución de la cadena $\alpha 1(IV)$ en la MBG (extraída de Heidet et al.⁶²).

6.2. HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

La membrana basal delgada es la base morfológica de la HFB³⁶. Esta lesión aparece en el 20-25% de los pacientes biopsiados por una hematuria aislada persistente, aunque también puede ser una manifestación inicial, e incluso la única en algunos casos de SA y en casos esporádicos de hematuria. La lesión puede coexistir además con otras enfermedades glomerulares, sobre todo nefropatía diabética (en la que existe alternancia de MBG delgada y gruesa) o nefropatía mesangial IgA.

El MO no muestra alteraciones específicas y la IF convencional es negativa. Por eso el diagnóstico de la EMBD se basa en la medida morfométrica

de la MBG al ME, que indica un marcado adelgazamiento de la lámina densa. El diagnóstico de adelgazamiento se realiza en comparación con controles de la misma edad, porque la MBG suele engrosarse con la edad en condiciones normales, siendo el espesor normal en adultos de 373 ± 42 nm en varones y 326 ± 45 nm en mujeres⁶².

7. CLÍNICA

7.1. SÍNDROME DE ALPORT

El SA se caracteriza por ser una enfermedad glomerular que cursa con hematuria, proteinuria e HTA, con progresión hacia la ERCT y otras manifestaciones como sordera neurosensorial, alteraciones oculares y vasculares y leiomiomatosis⁶².

Las manifestaciones son típicamente más graves en las formas ligadas a X, que se dan en el 80% de los pacientes y en la que casi todos los varones afectados desarrollarán ERCT, pero las mujeres portadoras presentan una amplia variabilidad en la gravedad de la enfermedad, aunque esta suele ser más leve y de aparición más tardía⁶⁶.

La forma autosómica recesiva puede presentar un fenotipo grave también, mientras que la dominante es típicamente un trastorno lentamente progresivo, donde la ERCT y la sordera neurosensorial se desarrollan en etapas relativamente tardías^{1,4}.

Manifestaciones renales

•HEMATURIA

La MBG es un componente esencial de la barrera de filtración glomerular y, junto con las células endoteliales y los podocitos, juega un papel fundamental como filtro selectivo según el tamaño molecular y la carga de las distintas

moléculas que entran en contacto con ella. La alteración de la misma, debida a la formación defectuosa de las cadenas de colágeno tipo IV conduce al paso anormal de hematíes a la orina⁶⁷.

De esta forma, la manifestación renal inicial es la hematuria microscópica asintomática y persistente, que se presenta en la infancia temprana en los varones con SALX. Los episodios recurrentes de hematuria franca no son infrecuentes, especialmente durante la infancia y pueden ser la forma inicial de presentación y la causa habitual del diagnóstico hasta en el 80% de los casos. Estos episodios de macrohematuria pueden exacerbarse por infecciones respiratorias o por el ejercicio y cursar con molestias abdominales o dolor en el flanco. Los niños sin hematuria a los 10 años es improbable que presenten SA². Más del 90% de las mujeres portadoras de SALX tienen hematuria microscópica, aunque puede ser intermitente. Los individuos con SAAR tienen microhematuria persistente, sin distinción entre sexos. Los pacientes heterocigotos para mutaciones en los genes COL4A3 o COL4A4 tienen una incidencia estimada del 50% de microhematuria persistente o intermitente, lo que puede corresponder, según la evolución posterior a SAAD o HFB⁶⁸.

•PROTEINURIA

Al igual que la hematuria, la proteinuria está causada por las alteraciones en la MBG producidas por la producción y ensamblaje defectuoso de las cadenas de colágeno tipo IV. Se asocia con esclerosis glomerular, lo que conduce paulatinamente a la insuficiencia renal⁵⁵.

Todos los varones con SALX y la mayoría de los varones y las mujeres con SAAR desarrollan proteinuria en la infancia tardía y adolescencia temprana. Los varones y las mujeres afectados de SAAD también presentan proteinuria, aunque suele presentarse en etapas posteriores.

La proteinuria suele comenzar siendo leve, pero se agrava de forma progresiva con la edad y puede llegar a ser de rango nefrótico, aunque de forma excepcional²⁷.

•INSUFICIENCIA RENAL

La disfunción renal es debida a la pérdida de las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ o $\alpha 5(\text{IV})$, componentes fundamentales de la MBG. Esto produce una disrupción de la misma, que lleva a la generación de hematuria y proteinuria. La proteinuria persistente destruye lentamente la arquitectura renal, al producir lesiones que evolucionan desde la nefritis intersticial hasta la fibrosis y esclerosis renal. Este proceso se ve agravado por la presencia de macrófagos y linfocitos en las áreas de disrupción de la membrana basal tubular, así como fibroblastos en la transición epitelio-mesenquimal⁵⁵.

Síndrome de Alport ligado a X

Prácticamente el 90% de los varones presentan insuficiencia renal de lenta progresión, que evoluciona a ERCT entre los 16 y 35 años, con una edad media de inicio de diálisis de 25 años. En algunas familias la evolución es más lenta y la ERCT no aparece hasta los 45-65 años. Esto puede ser debido a diferencias interfamiliares secundarias a las distintas mutaciones del gen COL4A5⁶⁹. Estas observaciones han llevado a establecer una distribución bimodal de la edad de inicio de la ERCT, de forma que se pueden dividir las familias con SALX en dos grupos: SA juvenil, con ERCT antes de los 31 años y SA adulto, que la presentan después de esa edad.

Los rasgos clínicos en varones son a menudo constantes dentro de la misma familia, lo que refleja una fuerte influencia genética. En las mujeres, sin embargo, son más variables, ya que la mayoría tienen pocos síntomas, pero en ocasiones pueden presentar una forma florida de la enfermedad⁷⁰. En las mujeres portadoras de SALX la clínica es moderada durante la infancia y la juventud. Un tercio llega a tener ERCT a los 60 años, entre estas, el 28% lo hacen entre los 19 y 30 años, el 31% entre los 31 y 40 años, y el 41% después de los

40 años. Estos datos confirman una carga sustancial de enfermedad renal en la población femenina, en marcado contraste con el estado de portador benigno⁷¹.

Son factores de riesgo de evolución a ERCT la presencia de hematuria macroscópica en la infancia, la proteinuria en rango nefrótico y el engrosamiento difuso de la MBG, por lo que las mujeres portadoras del SALX deben ser vigiladas de forma estrecha, de manera similar a los varones afectados, para vigilar la aparición temprana de estos signos clínicos⁶⁶.

Formas autosómicas

En el SAAR y SAAD no hay diferencias en la aparición de insuficiencia renal entre hombres y mujeres; los primeros suelen desarrollar ERCT en el mismo rango de edad que los varones con SALX, mientras que en las formas AD el curso clínico es más indolente y la ERCT aparece entre los 45 y 60 años⁷⁰.

•HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA se produce como manifestación tardía de la enfermedad, pues se trata de una manifestación secundaria a la proteinuria y a la insuficiencia renal crónica.

La proteinuria estimula la síntesis de compuestos vasoactivos por parte de las células tubulares, como factor de necrosis tumoral, factor transformante de crecimiento β (TGF β) y endotelina⁶⁶.

La ERC incrementa la concentración de todos los componentes del sistema renina-angiotensina II- aldosterona (SRAA).

Manifestaciones extrarrenales

•AUDITIVAS

La sordera neurosensorial bilateral es un rasgo común en pacientes con SA, pero su prevalencia real es desconocida, ya que los pacientes no se someten a una audiometría de forma rutinaria.

Nunca es congénita, pues comienza a detectarse en la infancia tardía o en la adolescencia temprana en varones con SALX, por lo que a los 40 años el 80-90% de los pacientes la han desarrollado. Sin embargo, en algunas familias no se detecta hasta etapas más avanzadas de la vida. La razón de estas diferencias en la edad de aparición y en el curso clínico es que ambos están relacionados con el tipo de mutación.

En mujeres con SALX, la pérdida de audición es menos frecuente, y tiende a ocurrir en etapas más tardías, ya que a los 15 años la presentan el 18% de ellas frente al 85% de varones y, a los 40 años, solo están afectadas el 45% de las mismas.

No parece haber diferencias en cuanto al sexo en la incidencia o el curso clínico en las formas autosómicas. En los pacientes con SAAR presenta un comienzo juvenil, pero en los casos de SAAD puede desarrollarse más tarde, aunque estos pacientes presentan una gran variabilidad clínica⁷².

En sus estadios iniciales, el déficit auditivo es detectable solo mediante audiometría, que muestra una reducción bilateral en la sensibilidad a tonos en el rango de 2000 a 8000 Hz. Esta pérdida de audición es progresiva y se extiende a otras frecuencias, que incluyen las del rango de la conversación, y puede llegar a ser incapacitante en la segunda década de la vida. El mecanismo fisiopatológico está relacionado con la adhesión defectuosa del órgano de Corti a la membrana basilar, lo que es consecuencia de las alteraciones en las membranas basales de los órganos afectados en el SA por la síntesis alterada del colágeno IV⁷³.

La sordera siempre va acompañada de insuficiencia renal, aunque puede comenzar antes de llegar a ERCT, lo que sugiere que no está determinada por la uremia. La tasa de pérdida de audición es paralela a la progresión de la insuficiencia renal y su progresión sugiere un pobre pronóstico renal, lo que acentúa el estrecho lazo entre la sordera y la insuficiencia renal tanto en hombres como en mujeres¹.

•**OCULARES**

Las manifestaciones oculares se producen en el 30-40% de los pacientes con SALX, dándose casi exclusivamente en las formas con SA juvenil y en familias que también presentan sordera neurosensorial. Están en relación con mutaciones truncantes⁷⁴.

Las alteraciones oculares típicas del SA son la retinopatía en puntos y flecos, el lenticono anterior y la distrofia corneal posterior polimorfa. Otros rasgos oculares adicionales incluyen otras distrofias corneales, microcórnea, erosión corneal recurrente, atrofia del iris, cataratas, rotura lenticular espontánea, lenticono posterior, pobre reflejo macular, pigmentación retiniana, agujero macular, desprendimientos de retina y, raramente, telangiectasias de la conjuntiva⁷⁵.

La prevalencia varía en la literatura, pues en algunas series la afectación corneal es la más frecuente, mientras que en otras lo son la lenticular o retiniana⁷⁶.

Los rasgos oculares del SA son idénticos en las formas ligadas a X y AR, sin embargo, la retinopatía y las cataratas son las únicas anormalidades descritas en los raros casos de SAAD.

Cristalino

La afectación del cristalino más frecuente en el SA es la presencia de lenticono (anterior y posterior) y cataratas.

El lenticono anterior ocurre en el 25% de los varones con SALX y es patognomónico de la enfermedad, ya que más del 90% de casos de lenticono anterior están asociados a SA. Es una anomalía rara y progresiva, y cuando aparece es bilateral en el 75% de los casos. No está presente al nacimiento y se manifiesta como un lento deterioro de la visión debido a miopía progresiva, por lo que los pacientes necesitan cambiar la prescripción de sus lentes correctoras frecuentemente⁷⁷.

Los mecanismos que causan el defecto en la MBG también son responsables de la fragilidad de la cápsula anterior, ya que se ha demostrado la existen-

cia de un papel fisiológico jugado por las cadenas α (IV) en la cápsula anterior y en la patogenia del lenticono anterior. Estas alteraciones pueden llevar a la rotura espontánea o tras mínimos traumas de la cápsula anterior⁷⁸.

El diagnóstico es esencialmente clínico, hecho por examen al biomicroscopio. El tratamiento incluye la corrección con lentes o la cirugía con facoemulsificación e implantación de lentes intraoculares plegables⁷⁹.

El lenticono posterior ha sido recientemente descrito como una rara manifestación del SA pues, aunque se han detectado pocos casos, se da con más frecuencia asociado a él. Su prevalencia se estima en 1-4/100000 niños. Aparece tardíamente, lo que refleja su naturaleza progresiva.

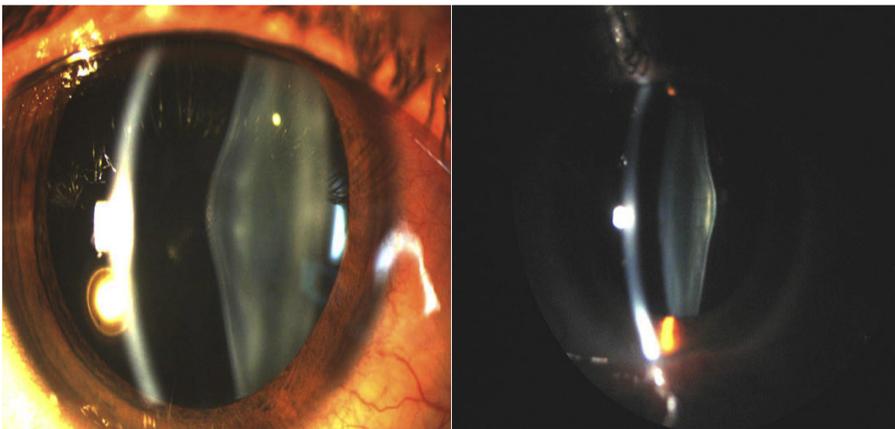


Figura 14: A: Lenticono anterior. B: Lenticono posterior (extraída de Seymenoğlu et al.⁷⁹).

El lenticono se puede complicar por la presencia de cataratas subcapsulares, que pueden llevar a pérdida de la agudeza visual⁷⁵.

Retina

La retinopatía central o perimacular es patognomónica del SA, y ocurre en el 40-70% de los hombres, en el 15-30% de las mujeres con SALX y en el 70% de pacientes con SAAR. La afectación retiniana es muy rara en el SAAD. Esta alteración no afecta a la visión ni requiere tratamiento. Normalmente se

acompaña de pérdida de audición y lenticono, está presente antes del desarrollo del mismo y de la insuficiencia renal y progresa hasta la mediana edad⁸⁰.

En raras ocasiones se aprecian agujeros maculares y un reflejo macular mate en forma de rombo. Este signo no es una variante normal, sino que sugiere una retinopatía perimacular grave y casi confluyente, diagnóstico de SA. Se asocia con ERCT de comienzo temprano, pérdida de audición y lenticono. Está presente en la adolescencia temprana en pacientes con SALX y SAAR⁸¹.

Otra alteración retiniana, menos frecuente, es la retinopatía periférica o medio-periférica, cuya patogenia es idéntica al resto de manifestaciones oculares. Puede ocurrir incluso en ausencia de cambios centrales, tanto en SALX como en SAAR, y como en la central, aparece en adolescentes y empeora hasta al menos mediana edad. También está presente en individuos con función renal normal.

Estas formas de retinopatía presentan una patogénesis idéntica: tras la pérdida del heterotrímero $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ (IV) se produce el adelgazamiento sin lamelización de la membrana de Bruch, por lo que los depósitos se producen en la retina superficial⁸².

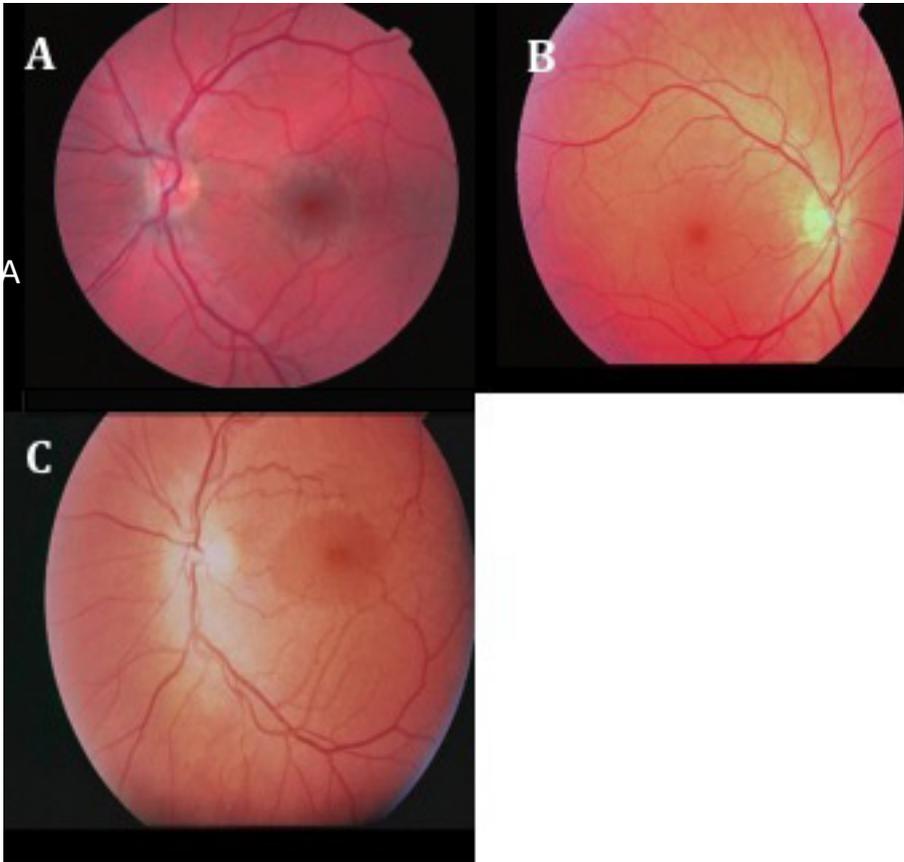


Figura 15: *A: Retinopatía central. B: Retinopatía periférica. C: Reflejo macular romboidal mate, sin puntos y flecos (A y B extraídas de Liu et al.⁸², C extraída de Colville et al.⁸¹).*

Córnea

Los cambios corneales no son específicos del SA. La alteración más frecuente es la distrofia posterior polimorfa⁸³. Está causada por la alteración del complejo TFC8 del protómero del SA del gen COL4A3. Los síntomas pueden variar desde una forma no progresiva y asintomática hasta formas muy agresivas, que aumentan considerablemente el riesgo de glaucoma. Suele diagnosticarse en la segunda o tercera décadas de la vida y es un rasgo muy sugerente, pero no diagnóstico del SA⁸².

•LEIOMIOMATOSIS

El SA con leiomiomatosis difusa (OMIM 308940) es una rara variante del SALX que se ha descrito en el 2-5% de pacientes. Se caracteriza por el sobrecrecimiento clonal benigno de las células del músculo liso visceral en los tractos gastrointestinal, respiratorio y reproductor femenino, junto a insuficiencia renal⁸⁴.

Los síntomas aparecen al final de la infancia e incluyen: disfagia, vómitos posprandiales, dolor epigástrico o retroesternal, bronquitis recurrente, disnea, tos y estertores. Las mujeres afectadas también presentan leiomiomas genitales que provocan una hipertrofia del clítoris con una variable implicación de los labios mayores y del útero.

La causa subyacente es un síndrome de genes contiguos caracterizado por la delección de los extremos 5' de los genes COL4A5 y COL4A6, lo que implica la pérdida de la zona reguladora intermedia que existe entre ellos. Esta delección es la responsable de que la leiomiomatosis se herede de forma dominante, mostrando una mayor penetrancia en mujeres, pues existe relación entre la lionización y la expresión específica en el esófago de los genes COL4A5-COL4A6 en la leiomiomatosis esofágica⁸⁵.

La pérdida de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ también lleva a la pérdida concomitante de las moléculas $\alpha 5$ - $\alpha 5$ - $\alpha 6(\text{IV})$ de la membrana basal del músculo liso, pero no se han encontrado casos de leiomiomatosis en el SA convencional.



Figura 16: Leiomiomatosis anorrectal (extraída de Claus et al.⁸⁴).

•ALTERACIONES VASCULARES

Se han descrito alteraciones vasculares en varones adolescentes y adultos jóvenes con SA, que van desde dilataciones asintomáticas hasta disecciones y aneurismas de la aorta torácica y abdominal, así como casos aislados de aneurismas intracraneales y defectos en la porción membranosa del tabique inter-ventricular⁸⁶. Estos hallazgos ponen de manifiesto la posible existencia de un fenotipo vascular en el SA, que se extiende más allá de la aorta, a las arterias braquial, axilar y subclavia, cuya frecuencia no ha sido estudiada.

La red $\alpha5$ - $\alpha5$ - $\alpha6$ (IV) se encuentra en la matriz extracelular que rodea al músculo liso de la aorta (murina y bovina), lo que sugiere la posibilidad de que juegue un papel en la conservación de funciones en la capa media de la aorta y en el mantenimiento de la integridad vascular de la misma⁸⁷.

Las anomalías aórticas asociadas con mutaciones en COL4A5 podrían ser el resultado de una predisposición hacia la debilidad en la pared vascular en combinación con factores ambientales como hipertensión o válvula aórtica bicúspide. Otra posible explicación para la variabilidad fenotípica es la existencia de factores genéticos, no identificados, que pueden influir en la integridad de la pared vascular⁸⁸.

En pacientes con ERCT secundaria a SALX e historia familiar de anomalías vasculares, podría estar indicado el cribado de las anomalías aórticas.

•SÍNDROME AMME

Se ha identificado un síndrome de genes contiguos que consiste en SALX, retraso mental, hipoplasia facial y eliptocitosis descrito en dos hermanos que presentaban una microdelección de Xq22.3, que afectaba a la totalidad del gen COL4A5 y se extendía más allá de su extremo 3'⁸⁹.

7.2. HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

Esta entidad se caracteriza, como el SA, por hematuria microscópica persistente, que a veces se observa en la infancia. En algunos individuos, esta es intermitente y no se detecta hasta la edad adulta. Los episodios de macrohematuria también son frecuentes, especialmente en asociación con infecciones del tracto respiratorio superior⁹⁰.

Las diferencias clínicas con el SA son:

- Aparece asociada con anomalías extrarrenales en muy pocas ocasiones.
- Cursa en menos del 7% con proteinuria, HTA y progresión a ERCT. Se han descrito casos que pueden corresponder a SAAD, por lo que estos son considerados signos de mal pronóstico y de progresión a ERCT⁹¹.
- No hay diferencias en el curso clínico entre varones y mujeres.

7.3. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Síndrome de Alport

• SÍNDROME DE ALPORT LIGADO A X

La expresión fenotípica del SALX es muy variable. Esto es debido tanto al elevado número de mutaciones encontradas en el gen COL4A5 como a la na-

turalidad y localización de las mismas. Así, deleciones largas, reordenamientos mayores (responsables del 5 al 15% de las mutaciones³⁸), mutaciones nonsense o de cambio de pauta de lectura y sustituciones de la glicina en los residuos carboxiterminal están asociadas con un comienzo temprano de la ERC (antes de los 30 años), pérdida de audición y lenticono en los varones afectados⁷⁰, pero no se correlacionan con ningún fenotipo concreto en mujeres.

Las deleciones y mutaciones truncantes que ocasionan la prematura terminación de la cadena de colágeno $\alpha 5(\text{IV})$, causan el fenotipo más grave al ocasionar la pérdida de todo el producto genético, sobre todo si se localizan en el extremo 5'⁷⁴. Las mutaciones que engloban el dominio NC1 también son responsables del fenotipo grave, aunque algunas sustituciones de aa en esa posición están descritas en familias con ERCT de comienzo tardío (mayores de 30 años⁷⁴).

Las mutaciones que dan lugar a un fenotipo más leve, con un comienzo más tardío de la enfermedad, son algunas mutaciones missense consistentes en sustituciones de la glicina en los tripletes Gly-X-Y, específicamente en los exones 1-20 y otras mutaciones que afectan a la región de splicing^{74,92}. En algunos varones con SALX con un fenotipo leve y ERCT después de los 60 años, se ha identificado la presencia de mosaicismo somático como consecuencia de que la mutación se ha producido durante la embriogénesis temprana, antes del compromiso de las células germinales. Estos varones presentan una tinción de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ en forma de mosaico, o incluso normal⁹².

Sin embargo, hay factores ambientales y genéticos que modifican la progresión de la enfermedad, sobre todo la nefropatía, por lo que la historia natural de la misma es muy variable. Así, la edad de establecimiento de la ERCT varía entre los varones de diferentes familias entre la segunda y tercera décadas, aunque en casos más leves puede retrasarse hasta la quinta o sexta.

Las correlaciones genotipo-fenotipo en relación a las alteraciones auditivas y oculares son similares a las de la nefropatía^{33,69}, todas las mutaciones

asociadas con SA de comienzo juvenil son también responsables del comienzo temprano de los defectos auditivos y de una elevada incidencia de lenticono⁷⁴.

El lenticono anterior ocurre en el 15% de varones con SALX, pero está casi íntegramente restringido a familias con SA con sordera y progresión a ERCT antes de los 30 años⁷⁸. Se ha observado que el lenticono es significativamente más común en individuos con deleciones o pequeñas mutaciones que resultan en un codón de stop prematuro que en aquellos con mutaciones missense o splicing. La retinopatía perimacular se asocia también a mutaciones severas, por lo que, cuando están presentes, indican un riesgo incrementado de presentar insuficiencia renal antes de los 30 años⁷⁰.

Tradicionalmente se ha pensado que la coexistencia de SALX y leiomiomatosis está causada exclusivamente por deleciones largas que engloban los extremos 5' adyacentes de COL4A5 y COL4A6⁶². Estas deleciones incluyen una longitud variable del COL4A5, pero el punto de ruptura de COL4A6 está siempre localizado en el segundo intrón, sin producirse la leiomiomatosis cuando la deleción de ambos genes se extiende más allá de dicho punto ni cuando las mutaciones afectan solo a este gen. Sin embargo, recientemente se ha comprobado la existencia de pacientes con SALX en los que el punto de ruptura en COL4A6 difería de lo anteriormente expuesto, llegando a sobrepasar el exón 3. La explicación de esta discrepancia podría estar en la falta de penetrancia o en el comienzo más tardío de la leiomiomatosis en los pacientes previamente estudiados⁹³.

Determinantes de la gravedad de la enfermedad en mujeres portadoras de SALX

En las mujeres no se observa una clara correlación genotipo-fenotipo, pues existe una gran variabilidad incluso dentro de las mujeres de la misma familia, por tanto, el genotipo parece no ser un determinante principal de la heterogeneidad fenotípica en las mujeres con SALX^{33,71}.

Varias investigaciones han sugerido que las diferencias en la inactivación del cromosoma X pueden influir en la gravedad de la enfermedad en mujeres heterocigotas. Este mecanismo, también conocido como lionización es usado por las células de los mamíferos para igualar la dosis genética entre las mujeres (XX) y los varones (XY)^{71,94}.

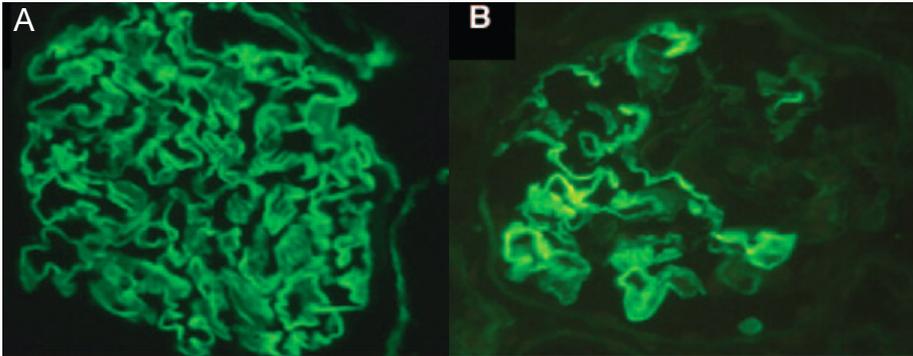


Figura 17: Mosaicismo celular en un glomérulo de una mujer heterocigota para el SALX (A). Control normal (B). Muestras teñidas para la cadena $\alpha 5(IV)$ (extraídas de Migeon BR⁹⁴).

Sin embargo, las ratios de inactivación pueden estar sesgadas debido a la posibilidad de anomalías en el cromosoma X, por lo que, en determinadas ocasiones se favorecería la expresión del cromosoma con el gen mutante, responsable de un fenotipo más grave en algunas pacientes⁶⁶.

Las mujeres portadoras de SALX con una clínica grave serán las que hayan sufrido una inactivación preferente del cromosoma X normal en sus células embrionarias y, por tanto, expresan en mayor proporción el cromosoma X con el gen COL4A5 mutado. De la misma manera, habrá mujeres portadoras que sean completamente asintomáticas por haber tenido una mayor inactivación del cromosoma X que lleva la mutación.

Las observaciones de que una inactivación favorable del cromosoma X mejora la supervivencia llevan a considerar la inactivación selectiva como una potencial opción terapéutica en portadores sintomáticos⁹⁵.

En estas pacientes es imposible predecir los resultados renales de forma segura basándonos en las medidas de la expresión de $\alpha 5(\text{IV})$ en la piel, pues existe una correlación negativa entre la expresión de $\alpha 5(\text{IV})$ en ambos órganos.

Las ratios de inactivación solo explican una parte de la variabilidad observada en las mujeres heterocigotas para el SALX, por lo que es necesario buscar otros determinantes de la progresión de la enfermedad.

•SÍNDROME DE ALPORT AUTOSÓMICO RECESIVO

Las mutaciones homocigotas de los genes COL4A3 y COL4A4 se extienden a lo largo de toda la estructura génica, al no existir puntos calientes mutacionales y dan un amplio rango de fenotipos⁹⁶, con similar expresión en hombres y mujeres. Lo más común es la existencia de manifestaciones clínicas similares a las que se dan en el SALX.

Existe la posibilidad de que el SAAR pueda existir como una enfermedad digénica, con mutaciones del COL4A4 en un alelo y del COL4A3 en el otro.

Se han encontrado mutaciones en el codón de inicio, nonsense y cambios de pauta de lectura, que llevan a la pérdida de función^{43,44,47}.

•SÍNDROME DE ALPORT AUTOSÓMICO DOMINANTE

El SAAD tiene el mismo curso clínico en hombres y mujeres, con una transmisión vertical de los síntomas. Las mutaciones heterocigotas en los genes COL4A3 y COL4A4 generan un amplio rango de fenotipos, que van desde la microhematuria aislada hasta la ERCT, por lo que es muy difícil hacer correlaciones genotipo-fenotipo y predecir el pronóstico⁹⁰. Esto se debe a que las mutaciones missense, splicing y de cambio de pauta de lectura son identificadas tanto en la microhematuria aislada, como en el fenotipo SAAD.

La falta de una correlación genotipo-fenotipo es responsable también del diferente curso clínico que se observa en pacientes de la misma familia, que se supone son portadores de la misma mutación. Si dicha mutación sola no puede explicar la variabilidad clínica, debemos suponer que su efecto podría estar influenciado por ciertos polimorfismos en los mismos genes o variantes funcionales en otras proteínas, como la nefrina, la podocina y la α -actinina, que son fundamentales en la filtración renal y pueden actuar como modificadores⁹⁷.

Hematuria familiar benigna

Las mutaciones encontradas son sustituciones simples de nucleótidos que llevan a mutaciones missense o nonsense, inserciones y deleciones^{48,49}. Algunas mutaciones en COL4A5 responsables de la presencia de EMBD en varones, como las que se localizan cerca de la duodécima interrupción natural del dominio de COL4A5 de la triple hélice, desestabilizan la red de colágeno en menor medida que otras, dando un fenotipo más leve^{45,50}.

La HFB predispone al envejecimiento glomerular prematuro, que incrementa la incidencia de hipertensión y ERC de comienzo tardío. Por tanto, su pronóstico no es tan benigno como se pensaba, ya que los portadores heterocigotos de mutaciones en COL4A3/COL4A4 pueden tener un mayor riesgo de proteinuria, glomerulonefritis focal y segmentaria e insuficiencia renal, sobre todo cuando se heredan al mismo tiempo otros modificadores genéticos: los pacientes con EMBD que también son portadores heterocigotos de la variante de la podocina de la barrera de filtración glomerular R229Q tienen un fenotipo más agresivo, con mayor proteinuria⁹⁰.

8. DIAGNÓSTICO

Tanto el SA como la HFB deberían formar parte del diagnóstico diferencial inicial de todos los niños y adolescentes con hematuria.

El diagnóstico inicial está basado en la clínica y en criterios morfológicos⁹⁸. Flinter definió en 1988 cuatro criterios, de los que deben darse al menos tres entre el caso índice y otros miembros de la familia para emitir el diagnóstico de SA⁹⁹:

- Historia familiar positiva de hematuria macro o microscópica con o sin progresión a ERCT.
- Sordera neurosensorial progresiva para tonos altos.
- Cambios oculares característicos (lenticono anterior y/o maculopatía).
- Cambios estructurales en la MBG (engrosamiento y laminación).

Posteriormente se han añadido como criterios adicionales la leiomiomatosis difusa gastrointestinal, observada en el 2-5% de las familias con SALX y la distribución anormal de las cadenas de colágeno IV en la MBG y/o membrana basal epidérmica (MBE) en el ME⁶⁵.

La frecuencia de detección de mutaciones es más alta cuando se dan tres o más criterios diagnósticos (64% con dos criterios y 82% con tres), lo que confirma que al menos se requieren tres de cuatro criterios para hacer un diagnóstico clínico de SA⁹⁹. Debido a la heterogeneidad genética de estos trastornos, se debe realizar un árbol genealógico de tres generaciones.

8.1. CRITERIOS CLÍNICOS

En la evaluación clínica de la familia tanto en el enfermo como en otros parientes cercanos debería realizarse un análisis de orina, un examen oftalmológico y una audiometría, pues la aparición temprana (antes de los 3 años de edad) de hematuria persistente de origen glomerular o la detección de defectos de audición o de anormalidades oculares de las características descritas en el SA, hacen este diagnóstico altamente probable⁶⁵.

En general, cualquier niño con hematuria que no se localice claramente en el tracto urinario inferior puede estar aquejado de una hematuria familiar. Una historia familiar cuidadosa, encaminada a identificar parientes con hematuria conocida, insuficiencia renal o sordera es un rasgo esencial en la evaluación de niños con hematuria, aunque una historia familiar negativa no excluye la presencia de estas entidades.

Si la hematuria es heredada de forma dominante, glomerular y aislada, con una historia familiar negativa para insuficiencia renal y proteinuria, puede asumirse el diagnóstico provisional de HFB y mantener una actitud expectante. Sin embargo, en una familia con un diagnóstico bien establecido de SA, se debe suponer que los niños con hematuria están afectados, aunque es conveniente realizar una ecografía renal para descartar anomalías en el tracto urinario inferior que pudieran alterar el pronóstico⁷.

La pérdida de audición es un rasgo inespecífico de varias nefropatías hereditarias, por lo que se recomienda la realización de una audiometría para descartar sordera neurosensorial para tonos altos en niños en torno a 10 años con sospecha de SA¹⁰⁰.

El examen oftalmológico debe ser realizado con una lámpara de hendidura para detectar los cambios patognomónicos del SA, lo que puede ser difícil en pacientes jóvenes, especialmente mujeres con SALX, donde no es útil para el diagnóstico. Sin embargo, el examen ocular puede ser anormal en niños con este mismo trastorno y sirve para el diagnóstico, ya que precede a la aparición de la insuficiencia renal. Por tanto, se recomienda el examen de retina en niños de una edad en torno a 10 años con sospecha de SA. Un examen cuidadoso de la retina, combinado con fotografía que incluya la periferia es un método seguro y barato que ayuda en el diagnóstico. Aunque no es muy sensible, el examen ocular de un niño y su madre es altamente específico y puede facilitar el diagnóstico de SA¹⁰¹.

Aunque el lenticono y la retinopatía son característicos de SA y nunca ocurren en individuos normales, no se conoce la edad en que aparecen.

8.2. BIOPSIAS RENAL Y CUTÁNEA

Ante la presencia de hematuria esporádica asociada con proteinuria, sin ningún otro síntoma que sugiera el diagnóstico de SA, la biopsia renal es la primera prueba diagnóstica que debe realizarse, pues permite la exclusión de otras enfermedades glomerulares que cursan con hematuria, como la nefropatía mesangial IgA y la identificación de lesiones típicas del SA. Las biopsias renales deben ser examinadas al MO y al ME, ya que el MO no da un diagnóstico definitivo en niños menores de 10 años de edad y es inespecífico en adultos⁶⁵.

La tinción con Ac monoclonales contra las cadenas de colágeno tipo IV de biopsias renales y cutáneas es una herramienta diagnóstica valiosa en pacientes con hematuria. Su utilidad deriva de los efectos de las mutaciones de los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 en la expresión de las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$ de las membranas basales, donde se encuentran formando un heterotrímero^{102,103}.

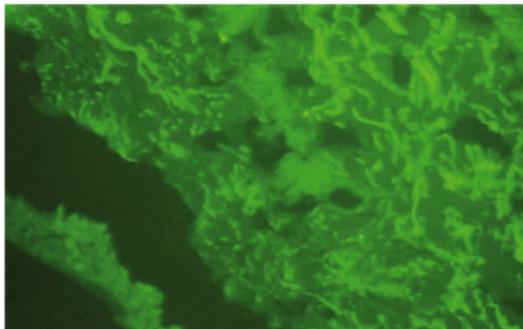


Figura 18: Biopsia cutánea en la que se aprecia que el Ac monoclonal contra la cadena $\alpha 5$ no produce ninguna reacción, a causa de la ausencia de la cadena en el tejido de la piel (extraída de Lagona et al.¹⁰³).

La información obtenida en la biopsia cutánea es importante para el diagnóstico y, en muchos casos, la tinción del colágeno tipo IV puede llevar al diagnóstico definitivo.

Síndrome de Alport ligado a X

En casi el 80% de los varones con SALX, la MBG muestra una completa ausencia, o al menos una tinción marcadamente reducida de las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$, y la MBE es negativa para la cadena $\alpha 5(\text{IV})$. Aproximadamente el 60-70% de las mujeres heterocigotas muestran una tinción en forma de mosaico de la MBG para $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$, y de la MBE para $\alpha 5(\text{IV})$. La tinción normal no puede excluir un diagnóstico de SALX.

Síndrome de Alport autosómico recesivo

En muchos pacientes, la MBG es completamente negativa para $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$. Sin embargo, la cápsula de Bowman, los túbulos distales y colectores permanecen positivos para $\alpha 5(\text{IV})$, porque en esas membranas basales $\alpha 5(\text{IV})$ está presente en forma de trímeros $\alpha 52\alpha 6$. Por esta misma razón, la MBE también es positiva para $\alpha 5(\text{IV})$.

Síndrome de Alport autosómico dominante

Estos pacientes muestran una tinción normal de la piel y los riñones para las cadenas de colágeno tipo IV.

Hematuria familiar benigna

La tinción para el colágeno tipo IV es normal en los riñones y la piel. Sin embargo, esto no excluye el diagnóstico de SA, pero apoya el diagnóstico de HFB en aquellos pacientes con hematuria, excreción urinaria de proteínas normal, ausencia de historia familiar de insuficiencia renal y adelgazamiento difuso de la MBG.

La biopsia de piel es un test barato, sencillo y menos invasivo que la renal, pero existe cierta discordancia en la expresión de la inmunofluorescencia entre la MBE y la MBG¹⁰⁴.

Se ha postulado que la biopsia gingival podría sustituir a la cutánea en el diagnóstico, ya que el principal componente estructural y fibrilar del tejido conectivo gingival humano es el colágeno, que comprende el 60% del total de proteínas tisulares. El colágeno tipo IV representa menos del 1% del componente colágeno total de dicho tejido. Esta biopsia no causaría problemas estéticos, pero aún no se ha evaluado en su totalidad el efecto del SA en el colágeno IV del tejido gingival¹⁰⁵.

8.3. ANÁLISIS GENÉTICOS

Desde la identificación de las bases moleculares de la enfermedad, la búsqueda de mutaciones se considera teóricamente la mejor aproximación diagnóstica, ya que evita el uso de biopsias renales o cutáneas. Sin embargo, por razones como la heterogeneidad genética de la enfermedad, el gran tamaño de los genes, la distribución aleatoria de las mutaciones, el elevado número de polimorfismos y el hecho de que este método es caro y laborioso, el análisis genético no es capaz de resolver todos los problemas diagnósticos. Por esta razón las biopsias renal y cutánea son las herramientas más utilizadas por los clínicos para el diagnóstico de estas entidades¹⁰⁶.

Los genes COL4A3, COL4A4 y COL4A5 han sido secuenciados en su totalidad y, aunque se trata de genes grandes, la tasa de detección de mutaciones es elevada. Es recomendable el análisis del gen COL4A5 en cualquier paciente que presente al menos dos criterios diagnósticos clínicos, ya que la mayoría de casos están ligados a este gen, considerando la búsqueda de mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4 si no se detectaran en COL4A5 y, de forma primaria, si se sospecha herencia autosómica (transmisión de hombre a hombre o consanguinidad)⁹⁹.

Existen diferentes métodos para la detección de dichas mutaciones:

- Análisis de polimorfismos:

Es la técnica más utilizada. Identifica el haplotipo de riesgo de la enfermedad en varios familiares afectados. Sin embargo, la sensibilidad es muy baja, pues solo detecta del 45 al 65% de las mutaciones y se requiere el estudio de un elevado número de familiares.

- Secuenciación directa tras la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada exón:

Identifica mutaciones en el 80% de individuos cuya historia familiar es consistente con herencia ligada al cromosoma X, pero no detecta deleciones exónicas, multiexónicas o duplicaciones en mujeres con mutaciones en el gen COL4A5. También sirve para diagnosticar mutaciones en individuos afectados con herencia AR probada. Esta técnica presenta una mayor tasa de detección de mutaciones, pero no está al alcance de todos los laboratorios. La secuenciación no siempre aporta un diagnóstico definitivo, ya que el hallazgo de una mutación en los genes COL4A3 o COL4A4 en un niño pequeño con expresión normal de las cadenas α (IV) puede corresponder a una forma recesiva donde la segunda mutación no ha sido encontrada, a HFB o a SAAD¹⁰⁷.

1. Análisis de deleción/duplicación:

La falta de amplificación por PCR antes del análisis de secuenciación puede sugerir una deleción multiexónica en el cromosoma X. Esta técnica identifica deleciones y duplicaciones (típicamente multiexónicas) en aproximadamente el 10% de las mujeres con historia familiar de herencia ligada al cromosoma X. En el caso de herencia AR, este ensayo está disponible para los dos genes, aunque la frecuencia de detección de mutaciones no se conoce.

2. Secuenciación directa usando mRNA (ácido ribonucleico) de COL4A5 de cultivos de fibroblastos de la piel:

Es una técnica sensible pero demasiado cara para ser utilizada en la práctica clínica diaria⁶⁵.

3. Amplificación del gen COL4A5 extraído de la raíz del pelo, mediante PCR con transcriptasa inversa, realizando posteriormente la secuenciación directa:

Es un método nuevo y más simple y rápido, sin embargo, no es aplicable al estudio de los genes COL4A3 o COL4A4, ya que estos no se expresan en la piel y el pelo¹⁰⁸.

Existe un ensayo especial con sondas de hibridación marcadas de forma fluorescente para detectar tres mutaciones concretas del COL4A5: L1649R, C1564S y R1677Q, siendo el efecto de C1564S más grave que el resto. El SALX está infradiagnosticado porque la herencia ligada a X frecuentemente oculta la naturaleza familiar de la enfermedad y porque la pérdida de audición es sutil en muchos casos. Este ensayo puede ayudar a identificar otras hematurias de etiología aparentemente desconocida, así como enfermedades renales crónicas en hombres y hematuria inexplicada en mujeres con historia familiar de ERC¹⁰⁹.

8.4. ALGORITMO DIAGNÓSTICO

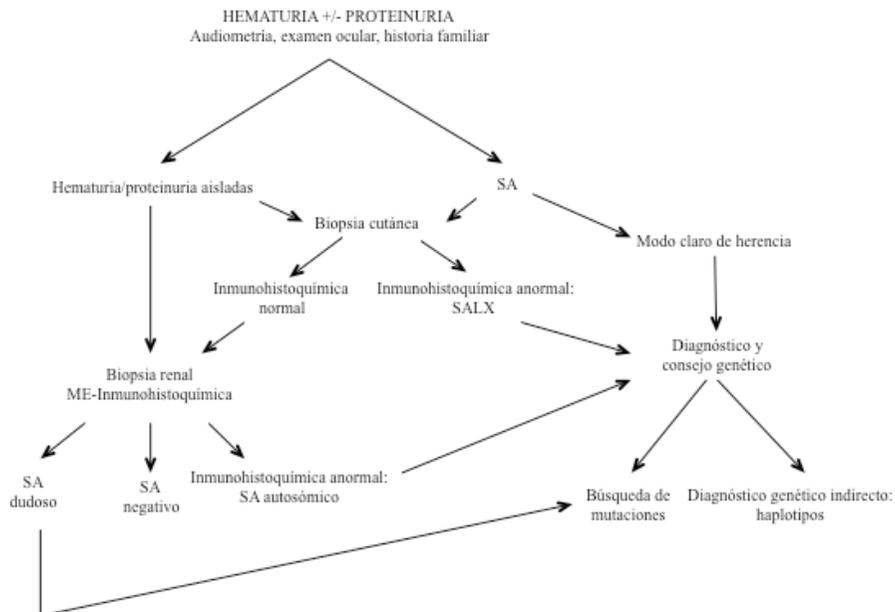


Figura 19: Posible algoritmo diagnóstico de SA ante la presencia de hematuria con o sin proteinuria.

8.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El SA se presenta la mayoría de las veces en la infancia, por lo que debe ser diferenciado de otras causas de microhematuria persistente (más de 6 meses de duración). La historia familiar es una herramienta fundamental de la evaluación inicial del niño con hematuria por lo que, si es posible, se debería obtener un análisis de orina de los parientes de primer grado²⁷.

El primer paso es intentar establecer la fuente de la misma: renal glomerular, renal post-glomerular o post-renal. Una vez que la hematuria está provisionalmente localizada en el glomérulo, las posibles etiologías comprenden varias glomerulopatías crónicas, que se clasifican en función de la existencia de historia familiar¹⁰⁹.

Historia familiar de hematuria negativa

En el niño sin historia familiar de hematuria, los diagnósticos más probables, aparte del SA y la HFB son:

•NEFROPATÍA MESANGIAL IGA

Es la causa más común de glomerulonefritis. Cursa con episodios de hematuria macroscópica tras infecciones del tracto respiratorio superior, seguidas de largos períodos de hematuria microscópica. También puede presentarse como anomalías urinarias persistentes, como hematuria y proteinuria no nefrótica. A veces se acompaña de HTA. El 20-40% de los adultos desarrollan insuficiencia renal lentamente progresiva, pero en los niños el curso clínico es más favorable, ya que menos del 1% presenta IRCT tras 10 años de evolución.

Esta entidad carece de historia familiar, pero se han observado agrupaciones familiares. En los últimos años se ha localizado un locus en el cromosoma 6q22-23, que puede ocasionar cierta susceptibilidad a la misma¹¹⁰.

• **GLOMERULONEFRITIS POST-INFECCIOSA**

Suele estar causada por una infección, más comúnmente localizada en la piel o en la faringe, causada por estreptococos del grupo A, aunque también puede estar precedida por la infección por otras bacterias, virus, parásitos y hongos.

La clínica aparece tras un período de latencia de 1-2 semanas en el caso de infecciones faríngeas o de 3-6 semanas si se trata de infecciones cutáneas. Se produce un síndrome nefrítico en el que predomina la hematuria, que es macroscópica hasta en el 50% de los casos. Se produce la activación del complemento, con descensos de C3 y, en menor medida de C4⁷.

• **DREPANOCITOSIS**

Es una hemoglobinopatía de origen genético que produce alteraciones en todos los segmentos de la nefrona. Así, altera la secreción y reabsorción de diversas sustancias en el túbulo proximal, y a nivel distal provoca, entre otras, acidosis tubular. El 5% de estos pacientes desarrollan hematuria¹⁰⁹ indolora y autolimitada, que puede ser microscópica o franca debida a infartos papilares.

• **OTRAS GLOMERULONEFRITIS**

Cualquier glomerulonefritis (además de las anteriormente citadas) es susceptible de cursar con hematuria¹¹¹. Así, entre las glomerulonefritis primarias podemos encontrarla en: glomerulonefritis membranoproliferativa, focal y segmentaria, proliferativa extracapilar, membranosa y de cambios mínimos del adulto.

Entre las glomerulonefritis secundarias destacan las vasculitis, la nefritis lúpica, la crioglobulinemia mixta esencial, el síndrome hemolítico urémico, la púrpura trombótica trombocitopénica, el síndrome de Goodpasture (SGP) y la púrpura de Schönlein-Henoch.

Historia familiar de hematuria positiva

- **ENFERMEDAD DE LA MEMBRANA BASAL FINA**

Es la causa más frecuente de hematuria de origen glomerular. Este término engloba todas las entidades que presentan adelgazamiento de la MBG. Aunque estas enfermedades cursen con distintas manifestaciones clínicas, la mayoría cursan con microhematuria crónica y con HTA, que se desarrolla sobre todo en la edad adulta⁶².

- **ENFERMEDADES RELACIONADAS CON MUTACIONES EN EL GEN MYH9**

Incluyen la anomalía de May-Hegglin y los síndromes de Epstein y Fechtner, que son debidas a mutaciones en el gen MYH9 que codifica la cadena IIA de la miosina y producen una expresión variable de la misma enfermedad.

El síndrome de Fechtner comprende la asociación de nefritis hereditaria, sordera neurosensorial, cataratas y la tríada de la anomalía de May-Hegglin (trombocitopenia, plaquetas aumentadas de tamaño y las características inclusiones en los leucocitos llamadas cuerpos Döhle-like) y se transmite de forma AD. El síndrome de Epstein es la combinación de nefritis, sordera, trombocitopenia y aumento de tamaño de las plaquetas. Hasta hace poco tiempo estos síndromes eran considerados como posibles variantes genéticas del SAAD, pues algunos pacientes presentaban cambios ultraestructurales en la pared capilar glomerular que recordaban a los observados en el SA. Sin embargo, el descubrimiento de su verdadera base genética ha desechado esa posibilidad¹¹².

- **NEFROPATÍA CFHR5**

También se la conoce como glomerulonefritis hereditaria C3. Es una forma rara de hematuria que se hereda de forma AD y se caracteriza por hematuria microscópica continua, proteinuria, HTA y ERCT¹¹³.

9. TRATAMIENTO

9.1. SÍNDROME DE ALPORT

Generalidades

En la actualidad, no existe un tratamiento específico para el SA. Se han probado distintas estrategias, como la reducción de la proteinuria y el control de la HTA, que podrían reducir la tasa de progresión de la enfermedad renal². La proliferación mesangial y la fibrosis intersticial son rasgos importantes de progresión del SA, por lo que se piensa que las terapias que retrasen estos procesos podrían ser beneficiosas¹⁴. Debido a que la mayoría de los pacientes progresarán hasta ERCT y requerirán un trasplante renal, parece prudente elegir drogas que protejan el sistema cardiovascular tanto como sea posible en las etapas tempranas de la enfermedad renal.

Control de la proteinuria

La proteinuria es uno de los factores de riesgo de progresión de las enfermedades renales, incluyendo el SA, por lo que los esfuerzos terapéuticos se centran en controlarla en un intento de enlentecer la progresión a ERCT. En pacientes y modelos animales se han probado varias drogas antiproteinúricas con resultados controvertidos.

• INHIBIDORES DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA II-ALDOSTERONA

Los ISRAA, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), los antagonistas de los receptores de angiotensina II y la espirolactona, solos o en combinación, retrasan la progresión a ERCT y tienen efectos antiproteinúricos, además de los antihipertensivos.

Los IECA reducen la proteinuria y atenúan el descenso de la TFG, por lo que aumentan significativamente la esperanza de vida. Asimismo, provocan

una disminución significativa de la acumulación de matriz extracelular y de los niveles de expresión del TGF- β ^{115,116}. Esos efectos positivos son más evidentes al introducir el fármaco en los estadios tempranos de la enfermedad^{57,117}.

- **CICLOSPORINA A (CsA)**

La CsA reduce la proteinuria en pacientes con SA en mayor medida que los ISRAA, por lo que podría retrasar más la progresión a ERCT. Los mecanismos responsables no están claramente definidos y pueden ser tanto inmunológicos como no inmunológicos:

- Cambios en la hemodinámica glomerular, con vasoconstricción renal.
- Acción directa sobre la permeabilidad selectiva de la MBG, particularmente en la barrera electroquímica que repele al anión de la albúmina. Esto se consigue al conferir estabilidad a la estructura de actina de los podocitos, hecho fundamental para la función de filtración del riñón normal¹¹⁴. Los efectos antiproteinúricos de la CsA son el resultado de un efecto directo en la sinaptopodina al impedir su degradación en los podocitos, lo que confiere estabilidad al citoesqueleto de actina.
- Inhibición directa de la señalización NFAT en los linfocitos T.

Estas tres vías diferentes podrían enlentecer la progresión de la enfermedad sin variación en la alteración del colágeno IV¹¹⁸.

En pacientes con SA se ha observado que reduce eficazmente la proteinuria¹¹⁴, aunque solo en los que no presentan deterioro de la función renal, pero el efecto es temporal y produce descensos pronunciados en la TFG y nefrotoxicidad por vasoconstricción de la arteriola aferente, así como estímulo de mediadores profibróticos como el TGF- β , que empeoran las lesiones de la MBG.

Las lesiones producidas por la CsA a veces se solapan con las causadas por la propia enfermedad y son más frecuentes en los pacientes que reciben

también ISRAA para tratar la HTA inducida por esta, lo que sugiere que los efectos acumulativos en la perfusión renal de ambas drogas pueden favorecer el desarrollo de lesiones isquémicas¹¹⁷.

La nefrotoxicidad limita su uso a largo plazo, por lo que no está recomendada como primera opción, ya que existen muchas cuestiones sin resolver, como el momento idóneo para iniciar el tratamiento, la dosis óptima y la eficacia de la combinación de estrategias (que asocian diferentes agentes antiproteínúricos con distintos y posiblemente complementarios mecanismos de acción).

Tratamiento renal sustitutivo

• DIÁLISIS

En el SA pueden utilizarse tanto la hemodiálisis como la diálisis peritoneal. La supervivencia en ambas técnicas es similar y no difiere de la de los pacientes con otras nefropatías crónicas. No está demostrado que el SA afecte a la membrana peritoneal, aunque se sabe que la esclerosis a ese nivel está asociada con un incremento de los depósitos de colágeno IV en el intersticio y el endotelio, por lo que se ha postulado que esos depósitos pueden deberse a la defectuosa síntesis de colágeno IV producida por el SA¹¹⁹.

• TRASPLANTE RENAL

Generalidades

Los pacientes con ERCT son candidatos a trasplante renal y presentan un excelente pronóstico a largo plazo, con tasas de supervivencia superiores al 80% a los 10 años¹²⁰, similares a las de pacientes trasplantados por ERCT de otra etiología. La mayoría de injertos fracasan a causa de nefropatía crónica del injerto (69%) y rechazo agudo (22%)¹²¹.

Glomerulonefritis por Ac anti-MBG

- Definición

Se trata de una complicación rara pero devastadora del SA. Se produce por la formación de Ac de tipo anti-MBG dirigidos contra las cadenas $\alpha(IV)$ de la MBG del injerto renal, que actúan como antígeno (Ag), lo que desencadena una glomerulonefritis por Ac anti-MBG con fallo del injerto^{122,123}. En el 75% de los casos la glomerulonefritis ocurre dentro del primer año del trasplante¹²¹.

Se da en el 3-5% de los pacientes, pero el 80% de los riñones afectados se pierden y el riesgo de recurrencia en trasplantes sucesivos es muy alto¹²⁴, se destruye el primer injerto tras meses o años, el segundo en semanas o meses y el tercero o siguientes en días o semanas¹²⁵.

Los varones con sordera e insuficiencia renal antes de los 30 años tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, mientras que los que presentan un comienzo tardío de la misma y las mujeres tienen menos posibilidades de presentarla¹²².

- Patogenia

La glomerulonefritis por Ac anti-MBG está causada por una reacción mediada por alo-Ac frente a los dominios NC1 de las distintas subunidades de la red de colágeno $\alpha3-\alpha4-\alpha5(IV)$ presente en la MBG del injerto renal que, al ser expuestos al sistema inmune del receptor, actúan como Ag, ya que no existen en los riñones nativos, por lo que no se ha establecido tolerancia inmune¹²⁶.

La glomerulonefritis por Ac anti-MBG en los injertos renales sigue un curso similar a la enfermedad por Ac anti-MBG autoinmune (SGP). Presentan hallazgos patológicos (Ac IgG anti-MBG unidos a las asas capilares de forma lineal) y presentaciones clínicas similares¹²⁶, pero se distinguen por el diferente trasfondo genético en el que ocurren¹²⁴.

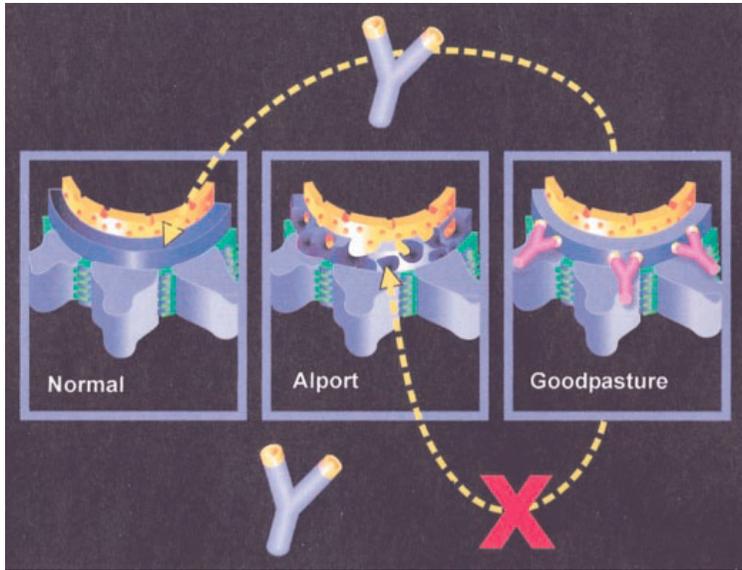


Figura 20: Similitud molecular en la MBG de pacientes con SA y SGP. Los autoAc de pacientes con SGP reaccionan contra la MBG de un riñón normal, pero no contra la de los pacientes con SA. Los aloAc que se desarrollan en un paciente con SA tras un trasplante renal reaccionan con la MBG de los riñones normales, pero no con la de los riñones con SA (extraída de Hudson BG¹⁷).

Los auto-Ac del SGP van dirigidos contra los dominios NC1 de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$, sin embargo, los alo-Ac de la glomerulonefritis por Ac anti-MBG postrasplante del SA tienen como diana los determinantes expuestos de los dominios NC de las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ o $\alpha 5(\text{IV})$, dependiendo del defecto genético subyacente¹²¹.

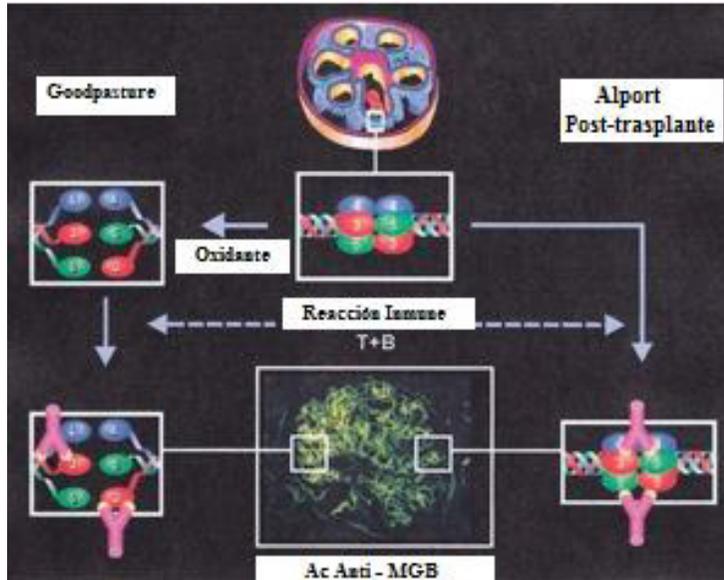


Figura 21: Los autoAg del SGP y los aloAc del SA se dirigen contra diferentes epítomos del hexámero $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)NC1$. Los epítomos para los autoAc del SGP son inaccesibles hasta que se produce una disociación en el hexámero, que puede estar causada por estrés oxidativo. Residen en el dominio $\alpha3(IV) NC1$ y están parcialmente secuestrados por los dominios adyacentes $\alpha4(IV)$ y $\alpha5(IV) NC1$. En contraste, los epítomos para los aloAc del SA son accesibles dentro de la superficie del hexámero, y residen en los dominios $\alpha3(IV)$, $\alpha4(IV)$ y $\alpha5(IV) NC1$ (extraída de Hudson BG¹⁷).

Los alo-Ac del SAAR y los auto-Ac del SGP se unen a distintos aloepítomos y autoepítomos dentro del dominio $\alpha3NC1$ ^{127,128}. Esta unión está influenciada por una compleja interrelación entre la genética del huésped y el proceso por el cual los epítomos $NC1\alpha3(IV)$ son presentados al sistema inmune.

En los casos de SALX se han identificado dos epítomos en la cadena $\alpha5NC1$ como aloantígenos implicados en la nefritis postrasplante, que se localizan en las regiones $\alpha5NC1$ 1-45 y 114-168 y están formados por los residuos: Asp-3, Thr-15, Ala-17, Gln-22, Leu-25, Gln-26, Glu-20, Val-116, His-129, Gln-132, y Asp-135, la mayoría de los cuales se agrupan en dos estrechas regiones de $\alpha5NC1$: los residuos 15-29 y 125-139, que se han llamado EA y EB por su homología con las respectivas regiones de epítomos de $\alpha3NC1$ ¹²⁸. De la

misma forma que los aloepítos del SAAR, los del SALX están dispuestos de una forma accesible en el hexámero $\alpha 3\text{-}\alpha 4\text{-}\alpha 5\text{NC1}$ ¹²⁶. La accesibilidad de los aloepítos del SALX en contraste con la forma críptica de disposición de los autoepítos, implica distintas formas moleculares del antígeno como iniciadores del proceso patogénico en la enfermedad por Ac anti-MBG aloinmune a diferencia de la autoinmune.

- Clínica

La presentación clínica más común es una glomerulonefritis rápidamente progresiva con semilunas que, de forma abrupta y agresiva, lleva a la pérdida del injerto¹²². Esto es debido a la asociación rápida y fuerte de los Ac anti-MBG al dominio NC1 $\alpha 3$ (IV) y a la baja tasa de disociación. El entorno glomerular es un ambiente particularmente favorable para este proceso, ya que la concentración de auto-Ac aumenta a medida que se produce la filtración a través del capilar glomerular.

La rápida acumulación de Ac depositados lleva al reclutamiento de mediadores inflamatorios, rasgo común de las enfermedades por Ac anti-MBG. La presencia continuada de estos Ac depositados en el glomérulo perpetúa la inflamación a pesar de la retirada de los Ac circulantes, prevaleciendo los efectos proinflamatorios y fibrogenéticos¹²⁹.

- Genética

Las deleciones genéticas que originan el SA están más comúnmente asociadas con esta complicación, ya que ocasionan la ausencia completa de la proteína¹²⁵. Así, el 54% de los pacientes que la presentan tienen deleciones en el gen COL4A5, mientras que esta mutación solo existe en el 16% de la población con SA.

Defectos menos graves como mutaciones puntuales producen una proteína anormal pero no alteran la expresión de partes vitales de la cadena $\alpha 5$ (IV) en la MBG, por lo que esta puede ser incorporada a la misma, estableciendo

así mecanismos de tolerancia, por lo que la tasa de glomerulonefritis anti-MBG será mucho menor¹²².

- Inmunología

La producción de Ac anti-MBG y su depósito lineal en la MBG del injerto tras el trasplante se da en la mayoría de pacientes con SA, pero raramente generan enfermedad¹²⁴. Esta falta de correlación entre los Ac circulantes y el desarrollo de glomerulonefritis postrasplante se explica por la naturaleza de la mutación genética subyacente, las diferencias en la especificidad de los Ac, en la afinidad, el tipo de inmunosupresión usado y la variabilidad de la respuesta inmune, genéticamente controlada¹²¹.

- Diagnóstico

El diagnóstico se realiza mediante biopsia renal. La identificación de depósitos lineales de IgG mediante IF directa es el método más sensible¹⁰⁷. En las biopsias renales es posible encontrar una respuesta inflamatoria que englobe algunos túbulos, ya que el colágeno $\alpha 5(IV)$ está presente en los túbulos distales y colectores. La tubulitis es también un rasgo del rechazo agudo humoral, por lo que, en ocasiones, es difícil distinguir entre las dos entidades. Asimismo, se ha planteado que un rechazo agudo humoral podría desencadenar la glomerulonefritis anti-MBG una vez que los túbulos han sido dañados y se han liberado los alo-Ag de las membranas basales tubulares¹²⁵. Esto implica que estos Ac deberían ser determinados cuando se dan episodios de rechazo agudo humoral en pacientes con SA.

- Tratamiento

Esta enfermedad es particularmente resistente al tratamiento, a pesar de lo cual es necesario instaurarlo.

Los esfuerzos terapéuticos deben estar dirigidos a suprimir la producción de Ac, remover los circulantes y reducir la inflamación en curso. Sin embargo, no se puede actuar sobre los que ya están unidos al glomérulo, que perpetúan la inflamación y la fibrosis¹²⁹.

Una pauta habitual es utilizar ciclofosfamida para reducir la producción de auto-Ac y suprimir la actividad de los linfocitos B y T, glucocorticoides contra la inflamación y plasmaféresis para remover los Ac circulantes y retrasar el curso clínico de la enfermedad.

También están indicados fármacos frente al complemento, anti-neutrófilos, Ac dirigidos contra los linfocitos T o contra la activación de marcadores o la adhesión de moléculas, pero estos fármacos son caros y es difícil mantener los Ac en niveles terapéuticos¹²⁰.

El micofenolato mofetil, empleado como inmunosupresor para prevenir el rechazo agudo en los trasplantes renales, reduce la formación de Ac anti-MBG¹²².

A pesar de las medidas instauradas, la insuficiencia renal irreversible es lo más frecuente, sobre todo cuando el tratamiento se instaura de forma tardía, en pacientes con una TFG reducida.

Las perspectivas futuras de tratamiento van encaminadas a la inducción de la tolerancia inmune a las cadenas de colágeno IV antes del trasplante renal¹²⁶. Estas terapias podrían ser especialmente útiles cuando hay una historia previa de glomerulonefritis por Ac anti-MBG postrasplante, o en pacientes con mayor riesgo de presentarla, como los portadores de delecciones largas.

Trasplante de donante vivo

La donación de familiares a pacientes con SA representa un tema controvertido, ya que casi el 1% de la población general es portadora de mutaciones heterocigotas de la enfermedad autosómica, y tanto ellos como las mujeres heterocigotas con mutaciones en el cromosoma X tienen un 5-20% de posibilidad

des de progresar hasta la insuficiencia renal. Asimismo, se desconoce el riesgo de desarrollar ERC en donantes con SA después de una nefrectomía⁵⁵.

La escasez de órganos disponibles para trasplante hace que la donación de portadores heterocigotos asintomáticos se plantee como una opción razonable, pero se requiere una evaluación exhaustiva de los mismos antes de llevar a cabo el trasplante. Una actitud recomendable es excluir como donantes a los heterocigotos sintomáticos menores de 45 años, así como considerar como última opción a los heterocigotos mayores de 45 años con hematuria aislada.

Los donantes portadores del SA tienen mayor riesgo de HTA de novo y/o microalbuminuria comparado con otros donantes vivos emparentados incluso en ausencia de hallazgos patológicos en la biopsia renal, por eso es conveniente instaurar estrategias nefroprotectoras en ellos tras la donación. Estas medidas incluyen la inhibición temprana del SRAA⁵⁷.

Nuevas perspectivas de tratamiento

• TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA (TMO)

Las terapias celulares están encaminadas a reparar el tejido dañado al producir la proteína ausente, a través de un proceso denominado transdiferenciación. Este consiste en la integración de las células implantadas en la médula ósea en el tejido renal para secretar marcadores específicos, una vez que el tejido dañado por la inflamación libera citoquinas que atraen a las células infundidas¹³⁰.

En modelos murinos con mutaciones en el gen COL4A3 se ha estudiado la potencial mejoría de la arquitectura y función renal mediante la generación de moléculas más estables de colágeno, debido a que las células circulantes derivadas de la médula ósea son reclutadas en los glomérulos alterados, donde pueden cruzar la MBG, convertirse en podocitos y células mesangiales, secretar las cadenas de colágeno ausentes, reparar los defectos estructurales y entener o revertir la progresión de la enfermedad¹³¹. De esta forma, los ratones

muestran una significativa mejoría en la arquitectura de la MBG asociada a la expresión de novo de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$, que se ensambla en protómeros $\alpha 3\text{-}\alpha 4\text{-}\alpha 5(\text{IV})$ y forma una triple hélice viable¹³². Algunos estudios no han demostrado que se pueda producir la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ ausente, pero concluyen que la función renal mejora porque se produce un protómero alternativo $\alpha 5\text{-}\alpha 6\text{-}\alpha 5(\text{IV})$, que rescata el fenotipo Alport¹³⁰.

Se ha comprobado también que las células madre mesenquimales de la médula ósea pueden aportar un efecto beneficioso sin diferenciarse en células glomerulares o tubulares, ya que secretan factores de crecimiento que pueden, parcialmente, restaurar la morfología y función renales. Las células de sangre periférica son capaces de comportarse de la misma forma, produciendo e incorporando la cadena de colágeno IV deficitaria¹³³, sin embargo, el riesgo de formación de teratomas en ratones tratados con células diferenciadas desaconseja su uso.

La radiación puede modular la expresión de los genes del colágeno IV, y así alterar la progresión del daño renal al disminuir la infiltración inmune, ya que la ablación de linfocitos mejora la fibrosis intersticial renal y disminuye los infiltrados intersticiales¹³³.

El uso de radiación antes del TMO puede inducir nefropatía a largo plazo, lo que puede obstaculizar su uso en pacientes¹³⁰, pero sin ese precondicionamiento las células sanguíneas son incapaces de injertarse en la médula ósea de forma permanente, lo que genera la pérdida de los efectos terapéuticos.

Esta interesante observación se suma al debate sobre si las células madre son de alguna utilidad terapéutica en el tratamiento de la afectación renal en el SA¹³². Al ser procedimientos agresivos que pueden comprometer la vida, necesitarán la demostración de que son superiores a terapias farmacológicas menos peligrosas.

- **OTRAS TERAPIAS**

El conocimiento cada vez mayor de la fisiopatología de la alteración de la MBG lleva al desarrollo de diferentes terapias para enlentecer la progresión de la enfermedad o corregir el defecto genético subyacente:

- Uso profiláctico de inhibidores específicos de la proteasa, bloqueo de la activación de células T, inmunomodulación con interleucinas (IL) IL-4 e IL-10 o inhibición de la migración de macrófagos⁵⁵, en un intento de disminuir la inflamación.

- Bloqueo de la vía del TGF β 1 para prevenir el engrosamiento de la MBG¹³⁴. El inhibidor de la HMG-CoA-reductasa, cervistatin, reduce significativamente la acumulación de matriz, la expresión de TGF β 1 y factor de crecimiento de tejido conectivo, mejora la función renal y aumenta la vida media en modelos murinos¹³⁵.

- Bloqueo simultáneo de las metaloproteinasas MMP2, MMP3 y MMP9 antes de la aparición de la proteinuria y el fracaso renal para enlentecer la progresión de la nefropatía.

- Inhibición de MMP12 o del receptor CCR2 para atenuar el engrosamiento de la MBG, ya que se ha comprobado un incremento de la expresión de esta metaloproteinasa en podocitos humanos, caninos y murinos, probablemente ligado a la activación de dicho receptor.

- Bloqueo de la integrina α 1, que tiene efectos similares al bloqueo del TGF β 1 en modelos murinos. El desarrollo de terapias que combinen ambas drogas en humanos es poco probable por el elevado riesgo de efectos secundarios⁵⁷.

- Terapia de reemplazo genético con vectores adenovíricos para proporcionar una correcta versión del gen del colágeno IV defectuoso, como alternativa al TMO. Esta estrategia ha sido efectiva en varios modelos animales, pero todavía no se ha conseguido una elevada eficiencia en la transducción de

los podocitos glomerulares. Además, comporta un elevado riesgo de efectos secundarios, ya que la introducción de los genes responsables de la enfermedad a veces causa la activación de linfocitos B o T alorreactivos y la producción de Ac contra la proteína transgénica¹³⁶.

9.2. HEMATURIA FAMILIAR BENIGNA

Los pacientes con HBF e insuficiencia renal progresiva necesitarán un trasplante renal. Este tiene un pronóstico comparable al resto de la población trasplantada, que depende de la naturaleza de las lesiones en los riñones nativos más que de la presencia de HFB. En el 5% de los pacientes con HFB coexisten otras enfermedades glomerulares, como glomerulonefritis membranosa, nefropatía mesangial IgA, glomerulonefritis mesangiocapilar, lupus eritematoso sistémico o diabetes, que pueden recurrir tras el trasplante. Sin embargo, los defectos genéticos propios de la EMBD están ausentes en el injerto, por lo que no influyen en su resultado.

Un tema controvertido es la aceptación de individuos con este trastorno como donantes de riñón. La idea más aceptada es que si además tienen factores de riesgo de enfermedad progresiva, como proteinuria, HTA o insuficiencia renal establecida deberían ser rechazados, ya que los riesgos a largo plazo de estos riñones son desconocidos. Muchos centros trasplantadores contemplan a los individuos con HFB como potenciales donantes marginales, cuyos riñones pueden utilizarse solo si no hay otros factores de mal pronóstico. Otros centros los excluyen, aunque cada caso debe ser evaluado en su contexto¹²¹.

Planteamiento del problema y objetivos

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SAAR y la nefropatía del colágeno IV ($\alpha3$ - $\alpha4$) representan aproximadamente el 20% de los casos de SA¹. Estas enfermedades se caracterizan por presentar un modo de herencia heterogéneo, que condiciona la variabilidad clínica. Así, en las formas recesivas suele observarse un fenotipo grave, mientras que en las dominantes el curso clínico es más indolente. Sin embargo, la elevada variabilidad fenotípica intrafamiliar hace que no puedan establecerse correlaciones genotipo-fenotipo², por lo que la influencia que el modo de herencia ejerce en la presentación clínica no está muy clara. Su escasa prevalencia puede ser debida, en parte, a que está infradiagnosticada en los casos en que el fenotipo es leve. Sin embargo, merecen una especial atención, puesto que, en determinados pacientes, la afectación renal conduce a ERCT, con graves consecuencias para el paciente y su familia.

El diagnóstico está basado en la clínica, la historia familiar y las alteraciones anatomopatológicas, pero el descubrimiento de las bases moleculares ha hecho del diagnóstico genético la herramienta más exacta. No obstante, este método no está exento de problemas, como la elevada heterogeneidad genética, el gran tamaño de los genes implicados y el hecho de que sea un método caro y laborioso. Aun así, podría ser utilizado como arma complementaria en determinados casos: diagnóstico precoz en individuos con antecedentes familiares, diagnóstico de confirmación en pacientes con clínica compatible y sin antecedentes familiares claros, consejo genético y para confirmar o descartar a posibles donantes de riñón.

Aunque el diagnóstico precoz no puede predecir el momento de debut ni el curso clínico de la enfermedad, sí podría tener un cierto papel en el pronóstico, al facilitar un seguimiento más estricto del paciente y un mejor control de los factores de riesgo de progresión^{50,51}.

2. OBJETIVOS

En nuestro trabajo nos hemos propuesto analizar la población diagnosticada de SAAR y nefropatía del colágeno IV ($\alpha3$ - $\alpha4$) en el Hospital Universitario de Salamanca.

Para ello nuestros objetivos han sido:

1. Analizar los aspectos clínicos de los pacientes con SAAR y nefropatía del colágeno IV ($\alpha3$ - $\alpha4$) seguidos en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca, durante el período 2000-2011, y compararlos con otras series publicadas, para determinar si nuestra población tiene un curso clínico similar a estas.

2. Identificar los individuos de riesgo afectados, realizando un diagnóstico precoz en aquellos sin manifestaciones clínicas.

3. Buscar la presencia de mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4 y compararlas con las descritas en la literatura, para intentar realizar correlaciones genotipo-fenotipo.

4. Comprobar la importancia del diagnóstico genético como herramienta para el diagnóstico de estas entidades.

Pacientes y métodos

1. GENERALIDADES

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

Se estudiaron 8 familias no emparentadas. En 7 de ellas se tomó como paciente índice aquel que cumplía criterios clínicos de SA de herencia autosómica, tanto dominante como recesiva. La familia restante presentaba clínica compatible con HFB, se tomó como paciente índice a la paciente que consultó por hematuria.

A los probandos se les extrajo una muestra de sangre periférica para obtener ADN y determinar la existencia de mutaciones patogénicas en los genes COL4A3 y COL4A4.

Estos pacientes habían precisado atención médica en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca, en la consulta general, de enfermedad renal crónica avanzada y de trasplante renal, en las unidades de hemodiálisis y diálisis peritoneal y seguimiento a través de interconsultas durante el período 2000-2011. En las familias en las que se demostró la existencia de una mutación patogénica en el gen COL4A3 o COL4A4 se extrajeron muestras de los familiares vivos.

Los enfermos fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivos del estudio y todos dieron su autorización para la extracción de una muestra de sangre para la realización del estudio genético, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

2. SEGUIMIENTO CLÍNICO

Se analizaron los parámetros clínicos y demográficos de las 8 familias incluidas en el estudio, diagnosticadas de SAAR, SAAD y HFB, obtenidos mediante la revisión de las historias clínicas del Hospital Universitario de Salamanca.

El diagnóstico de SA se estableció cuando se cumplían al menos dos de los siguientes criterios:

- Historia familiar positiva de hematuria macro o microscópica con o sin progresión a ERCT
- Sordera neurosensorial progresiva para tonos altos
- Manifestaciones oculares características del SA
- Alteraciones anatomopatológicas compatibles

Los parámetros estudiados se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 1: Relación de las variables clínicas y técnicas diagnósticas utilizadas que fueron analizadas

Sexo	Modo de herencia
Consanguinidad	Historia familiar
ERC/ERCT	HTA
Hematuria	Proteinuria
Hipoacusia neurosensorial	Afectación ocular
Audiometría	Biopsia renal / Estudio al ME
Diagnóstico clínico positivo	Diagnóstico genético positivo

Además de la presencia de los distintos síntomas, fueron analizados el grado, la edad de aparición de los mismos y si estaban o no presentes en el momento del diagnóstico clínico de la enfermedad.

3. ESTUDIO GENÉTICO

3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ADN

El ADN genómico de alto peso molecular se extrajo a partir la obtención de 10 ml de sangre periférica mediante venopunción antecubital y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre periférica fueron centrifugadas y resuspendidas para aislar la interfase de células leucocitarias, las cuales se resuspendieron posteriormente en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mMTris-HCl pH 7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl₂); EDTA 0.5 pH8, que es un quelante de iones divalentes necesario para la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20 mg/L, que degrada las proteínas y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, que provoca la lisis de las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° C durante 16 horas. Tras este procedimiento se procedió a purificar el ADN tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1). Así se consiguió que el ADN permaneciera en la fase acuosa, de la que se eliminaron otros residuos mezclándola con CIAA y centrifugando para separar las dos fases: la que contiene el ADN y la que contiene los detritos celulares. Tras esto se añadió etanol absoluto a la fase acuosa para provocar la precipitación del ADN, que fue recuperado, lavado con etanol al 70% y, finalmente, resuspendido en ddH₂O.

La concentración y el grado de contaminación proteico del ADN fueron calculados tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente en el espectrofotómetro automático de ADN / ARN (GeneQuant, Pharmacia), aplicando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de ADN /mL} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tienen 50 μg de ADN/mL.

El cociente DO260 / DO280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores indican un exceso de ARN, que se elimina tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente (Sambrook et al., 1989).

La muestra de ADN obtenida, con una concentración aproximada entre 1000 y 1500 µg/mL, se almacenó en tubos Eppendorf® a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como la posible contaminación bacteriana.

3.2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE PCR

Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

La amplificación se realizó con el producto comercial Master Mix (Pro-mega). En un volumen de 25 µL: 12.5 µL de Master Mix (ADN Taq polimerasa; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; MgCl₂); 9.5 µL de agua libre de nucleasas; 2 µL de cada oligonucleótido cebador (sentido y anti-sentido) y 1 µL de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración = 0,1-0,2µg/mL).

Para asegurar la ausencia de contaminación y la especificidad de las reacciones, para cada muestra se utilizó una reacción a modo de control negativo, que contenía todos los reactivos citados excepto el ADN molde.

Como control negativo se utilizó un tubo de reacción con todos los componentes excepto el ADN molde.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se llevó a cabo en un laboratorio distinto del utilizado para realizar la extracción del ADN.

Para amplificar los diferentes exones de los dos genes estudiados, partimos de un programa estándar de PCR, adaptando las condiciones a cada exón.

Tabla 2: Condiciones del programa estándar de PCR

	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	
Anillamiento	Adaptados a cada exón		
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Las condiciones específicas de amplificación del gen COL4A3 se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3: Condiciones de amplificación de los exones del gen COL4A3

Tª A. → Temperatura de anillamiento

TPO A. → Tiempo de anillamiento

CIC. → Ciclos

TAM. → Tamaño

EXÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª A.	TPO A.	CIC.	TAM.
1F	CGGACTCGCCAGGCTCTGA	67°C	30 segundos	35	176 pb
1R	GACGCGTGGAGGAGGGATG				
2F	AACAAAACCCTTTCTCTT	49°C	1 minuto	40	113 pb
2R	AAGCAGTATTAGGGTTTGTT				
3F	TGTGTGTTTCTCACCTCGT	49°C	1 minuto	40	151 pb
3R	GATTTCCAAGCTTGACAG				
4F	TTTCTTTTTCACTTGAACT	49°C	1 minuto	40	99 pb
4R	ACGATCAGGGTGGACTG				
5F	CCCCCTCCTTTTCCCTATGT	49°C	1 minuto	40	102 pb
5R	TTTCTAGCTACGGATTTTC				
6F	CCTCATTGAGACTTGTCT	49°C	1 minuto	40	106 pb
6R	TCATCTTCTGTGTGAAAAGT				
7F	AATAATAAGAACTTTGTATT	49°C	1 minuto	40	106 pb
7R	GGGAATTAGGCATGCAAA				
8F	GTTGTTTCATAGGTTGCTTTT	49°C	1 minuto	40	83 pb
8R	TCAGTGACAGCATTCCAC				

EXÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª A.	TPO A.	CIC.	TAM.
9F	GATGTTTGGATGAACCTTCTTC	49°C	1 minuto	40	134 pb
9R	ATAGGGACCTTCTCTGAA				
10F	TACTCTTATTCTTCTCTCAA	49°C	1 minuto	40	117 pb
10R	CTGTAGCAAGAATGACT				
11F	GTGATTTTCATTTGTGGATT	49°C	1 minuto	40	93 pb
11R	AGCTGTTACATCATATGAACT				
12F	AATAATTTGGTTTTGTGTT	49°C	1 minuto	40	100 pb
12R	CCTGCTAATAAAACATAGTA				
13F	ACTCCTGAGTGTTTTTGT	49°C	30 segundos	35	125 pb
13R	TAATCATAAAATCGCAGA				
14F	TTGTAACAATGTTGAACTGT	49°C	30 segundos	35	124 pb
14R	ATGGGGACAATATAACTTTA				
15F	ATAAAATTTGACATGGCTCT	49°C	30 segundos	35	133 pb
15R	GACTAATCAAACTGCACAT				
16F	TCATGCCTGAGGTCAAGAGGG	58°C	30 segundos	40	116 pb
16R	GAATGTGCTCAGATGATCTCT				
17F	GACCCATTTCTTTTTGTCT	49°C	30 segundos	35	110 pb
17R	AAAATAGGCTATTAGGGAGA				
18F	CACAATTTGTAAATGTCTT	49°C	30 segundos	35	94 pb
18R	GATATTGTCTTTAATCACAC				
19F	TCTGTATTGTTTCTTTCTC	49°C	30 segundos	35	141 pb
19R	AAATGCTTTAGGAAGAAAT				
20F	TTATATCTTTCTAAGCCATT	45°C	30 segundos	40	125 pb
20R	CCTTTGTAATAGCATTCTA				
21F	TCTCCATTGTGCAATTTTA	49°C	30 segundos	40	367 pb
21R	CTAAGCTGTGAGGAGGGTTT				
22F	ATTGTCTTTGGTGCTGTAT	49°C	30 segundos	40	156 pb
22R	GGCTTATCCTAATAACAACAT				
23F	AAGTAATGCTAGTATGCTCTC	49°C	30 segundos	40	162 pb
23R	TGTGCTTGCAAAAACACT				
24F	TTGGCGTTCAATGAGGAGTT	58°C	30 segundos	40	121 pb
24R	GGTATCTATTAAGTGCCTACG				
25F	ACAGATTCATTTGTGTAATA	49°C	30 segundos	40	234 pb
25R	GAGGGTAAAGTTGCTAAATA				
26F	ATCAAACACATTCCTGT	49°C	30 segundos	40	219 pb
26R	GGACTGGAAAGAAAATAA				
27F	ATCTTATGACCACAAATTC	49°C	30 segundos	40	142 pb
27R	CAGATTTGGCAGAGGATA				

EXÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª A.	TPO A.	CIC.	TAM.
28F	GACACAGAGAACTTAGAC	50°C	30 segundos	40	182 pb
28R	TATACATATGAACATCTTCT				
29F	CTAATCCTACAACAATGTTT	49°C	30 segundos	40	164 pb
29R *	TTCTGTGATAGCTTGAATTT				
30F	ATAGTAATAACACAATTTCT	49°C	30 segundos	40	209 pb
30R	GACAAAAGTAATGACACT				
31F	CCTGGGTATATACTTGTGCT	57°C	30 segundos	40	191 pb
31R	ATGTCTCCTGCCCTTCTGG				
* **					
32F	GGAAAGCATTGTGGGTTA	49°C	30 segundos	40	276 pb
32R	ACAGAGCCACCTTAAGAAGA				
33F	TGCTTTGTGTTAATTTGTTT	49°C	30 segundos	40	152 pb
33R	TCCTGCTATTTAGAAAGACA				
34F	AAGGACCTGATGTTGTTACT	49°C	30 segundos	40	152 pb
34R	TCTGATGTCCTGATCCA				
35F	TTCTTGTTAATACCTGGTTT	47°C	30 segundos	40	160 pb
35R	TGATATTTTTCTATTTGAGA				
36F	CAGGGCAATAACTACTTA	49°C	30 segundos	40	146 pb
36R	GCTCATAACAGGACCTTA				
37F	TACTCTATGTTTTCCCCCTA	49°C	30 segundos	40	106 pb
37R	TCCACCACTAAAATGTAAAT				
38F	TATGAGAATTTTAAAGGTAT	49°C	30 segundos	40	195 pb
38R	TCCAGCTTTTAGAATTGTAA				
39F	GGTGATCTTTTTTCTTCCTT	49°C	30 segundos	40	160 pb
39R	CCCACATGAAAAGGAAAAAG				
40F	TTTCAGGTCTTCCAGGATTC	58°C	30 segundos	40	159 pb
40R	TGAGAAAAGTTTAGTACACAC				
41F	CAATTATTAACATGCCAAGA	49°C	30 segundos	40	112 pb
41R	TACATTAGGACAGGGAAGAA				
42F	AAAGAACTTATTAAGCCTT	49°C	30 segundos	40	253 pb
42R	TTGTTATTTATGCTGTTTA				
43F	ATACTGACAGACTTTTCAT	49°C	30 segundos	40	191 pb
43R	TAATAATGAGTCAAATAAT				
44F	AAGTGCCAGAGGAGTTATA	58°C	30 segundos	40	135 pb
44R	GGAGCCTTCTACTTCACTCG				
45F	GGAAACCCATTGATCTAAGT	49°C	30 segundos	40	164 pb
45R	ACCTTTCTTCATTGACAGCA				

EXÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª A.	TPO A.	CIC.	TAM.
46F	TGAGGCCATCATCTTCTTCT	49°C	30 segundos	40	199 pb
46R	TCCTAGTGATCCAAGTCAAT				
47F	CCACCTTACTTTTCATCCTAT	49°C	30 segundos	40	190 pb
47R	ACTTCTTCGGTGAGGAAAC				
48F	CTTTGAAAAAACGAGTTTAAG	49°C	30 segundos	40	325 pb
48R	TTACAATCTGCATGTGGAA				
49F	CTAGTAACGATGCTGAAAATAAC	49°C	30 segundos	40	284 pb
49R	TCACTTGGTCCCATTTGTA				
50F	TTCCCTTGTAATGGAATGAAA	49°C	30 segundos	40	270 pb
50R	CACATTTTACCCAGCACAAAT				
51F	AACCCCAATGGACAGAGTGTT	49°C	30 segundos	40	272 pb
51R	TGAATAGTTCTGCAATTGAGT				
52F	CAGCAAAAATTCCTTTTATG	49°C	30 segundos	40	190 pb
52R	TGTTCTTTAGGATGAAAAAT				

* 0,5 µL MgCl₂. ** 0,3µL DMSO

Todos los exones del gen COL4A4 se amplificaron siguiendo el programa estándar, con unas condiciones de anillamiento de 35 ciclos y 30 segundos, por lo que solo se varió la temperatura de anillamiento de cada uno de los exones, como se detalla a continuación:

Tabla 4: Condiciones de amplificación del gen COL4A4

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA 5'-3'	Tª	TAM.
2F	TCTGGAAGAGAAGACTGGCA	55°C	152 pb
2R	AAGCAGGCAATCACACTGA		
3F	TGTTTAAATTAATCTGCGTT	52°C	105 pb
3R	GCAACCAGAGCTAGTG		
4F	CGATGAGTACTGGTATACTA	55°C	152 pb
4R	ATGCTGCCCATGTTGGTCTT		
5F	ACCCCATTTCTTTTAAATC	55°C	208 pb
5R	GGTGAGTCTTTCATGTGAAT		
6F	TCTCTTTGTTTTATTTCTG	50°C	127 pb
6R	GATGAGTACTTCTGCCTTTT		
7F	TTTCGAAAAATGCTTCACT	55°C	211 pb
7R	CCACAGGGCCTGTTCACTTA		

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA 5' - 3'	Tª	TAM.
8F	TACTGAAATGGTAATACGCT	55°C	184 pb
8R	CATGGGCTTACCTATTTGGA		
9F	TGTGTGGACTTAAAGCGATG	51°C	96 pb
9R	TAGAGCCTGCTCAGGAGACT		
10F	TTGGGTAACAGATGCACTGA	55°C	129 pb
10R	AAGGGATCACATCAGCAGTG		
11F	TTGTGTTTTTTTCTCCCTTG	49°C	110 pb
11R	TTTCATTGTTTCAAGGCTCTA		
12F	AGCCAGAAGTCTTAATTGCT	55°C	156 pb
12R	TCACCATTGCTCCTCAGAG		
13F	GGGTGGAAACCTTCAAAAACA	55°C	179 pb
13R	TACTTTCCAAGGTGACATAT		
14F	GGAGATGGAATTCAGTATGT	55°C	198 pb
14R	AAAGACCATGAGAAATAACA		
**			
15F	CCCCTCTAAATGTTGTCATC	57°C	180 pb
15R	TTTGAGCTTGTGGGACTACT		
16F	AATGATGCACTGAGCTGGTT	57°C	201 pb
16R	GCACGCAACAGTACAACCTC		
17F	ATTTGTCACCCCGTCACTTT	57°C	200 pb
17R	GAATGATTCTGGCAATACT		
18F	CCAGGCAACATGAGTAAAT	55°C	155 pb
18R	TGGAGGAACTGAATAGGAAC		
**			
19F	TGCACATACCATTTGTTTAT	55°C	175 pb
19R	CCAGGGCACATCAGGGCATC		
**			
20F	TTCTTCTACAGAGACGTTT	50°C	259 pb
20R	TGCTAATGGATATGAATAAG		
21F	TATAGAAGACAGTCAGAAAA	50°C	181 pb
21R	TAGAAATTCTACCTTTGGTG		
22F	AAATATGACAAATCTGCCAT	55°C	227 pb
22R	GGAAAGATGACTGGTAAGAG		
**			
23F	TGATCCATCACAATTAACCT	51°C	149 pb
23R	CAGGGAGTTAAGTGATTGAT		

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA 5' - 3'	Tª	TAM.
24F 24R **	ACTTTACCCTCTGCTGATAA GGGAAATAGTTGTTTGTATG	55°C	227 pb
25F 25R **	GACATTCAGTGGTTGGTAAT TAAACACTTGTACCCCAAAG	55°C	281 pb
26F 26R	TCAGTTATGTGAATGCCGCT TGGGAAGTATATAAGACAGT	51°C	146 pb
27F 27R **	TGAGTCTGTGTTTTGTTTTT AAAAAAAAAAACCTCAC	47°C	161 pb
28F 28R **	ATTGGTTCTATACTTGCACA TCTATGCACCAAAGGACAG	55°C	309 pb
29F 29R	TGGGCCATCTGTATAGTTTT TAATAGTAAGTAGGGTAAGC	52°C	269 pb
30F 30R * **	GCCTTCACACACTGTGGTCA ATGGGAGGACATCATGGAAA	55°C	240 pb
31F 31R	TCCTAAAAC TTTATGCTCTC TCAAATACCAGAAACAAATG	50°C	221 pb
32F 32R	CCTGTTCA TTTTGTCTTGC TG TCAACTTATTTGATATGG	52°C	187 pb
33F 33R	TTTCAGCAGAGACCTGTAAC AAGAACAGAAAGGTTTTATT	52°C	271 pb
34F 34R	GTTGTGCATGTGCCATTTGT GATGGCTTCTGTATCTCC	55°C	154 pb
35F 35R	TGAGACCAAATTA AATTGTC TCATTGCCAGCTAGAAGTAA	55°C	211 pb
36F 36R	CAAACGGCAACTCTGATGTT AGTGCTCAGGAAGTCTCCAG	52°C	183 pb
37F 37R	TATCTGGCCATCTGCAAAAC TTGTGGGATGGGCTTCATTT	55°C	173 pb
38F 38R	GCGTTTGTGGCTAGAGTGAG GAACCATGGACTGAAGCTCAG	55°C	189 pb
39F 39R	AGGCACTATAACAGGGACAAA CATCCTTTGTCATGATTCTCTC	54°C	420 pb

LOCALIZACIÓN	SECUENCIA 5' - 3'	Tª	TAM.
40F	ACCTTCCAAATGCAATGAGG	52°C	184 pb
40R	CATCCTTTGTCATGATTCTCTC		
41F	TTTTTGTCTCTTCTCTGTGG	42°C	218 pb
41R	AGTTATTACATATTACTTA		
*			
42F	GCCCTCAITTTTATGTTTTG	52°C	189 pb
42R	GTTGGAAGCTCACCTGGAAG		
43F	GACTGGCCTCGTTTG	49°C	178 pb
43R	TTAATATCCTTACAGCACCC		
44F	ATTACACAAGCGGTGATTCC	54°C	213 pb
44R	AGAATTTCAITTCAGCAATA		
45F	CACCAGCATCATAAACTT	49°C	186 pb
45R	AGGTTTACAGTGTGAGAGAA		
46F	AGTGCCAGAACAGAGGTGCT	55°C	297 pb
46R	GGAGATGGGCGATCCTGTA		
47F	ACACCAGCTGTCTTCTTCTTC	55°C	353 pb
47R	TGAATGAGCCAGGGTTT		
48F	GTGTGTGTCTGAGCCCTAAT	55°C	323 pb
48R	TGGTGAATTCGCAITTC		

* 0,5 µL MgCl₂, ** 0,3µL DMSO

3.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR fueron separados de acuerdo a su tamaño mediante la electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (Gibco-BRL) preparados con el tampón TBE (Tris 0.044 M, ácido bórico 0.044 M, EDTA 1.0mM pH=8.3).

El primer pocillo del gel fue reservado para separar en paralelo con las muestras un marcador de tamaño correspondiente al ADN del fago ΦX-174 cortado con la endonucleasa HaeIII. Este marcador genera fragmentos de 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118 y 0.072 Kb.

La electroforesis fue realizada con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.

Para monitorizar la migración del ADN en el gel se utilizaron dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: xileno cianol, que migra con los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8% y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb.

Los fragmentos amplificados fueron posteriormente visualizados en el gel de agarosa mediante Sybr Safe® (0,5 µL/mL), que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia con la exposición a la luz UV (254 nm).

Las imágenes se almacenaron mediante una cámara fotográfica digital (Kodak DC40) y el programa informático de tratamiento de imágenes Kodak Digital Science 1D.

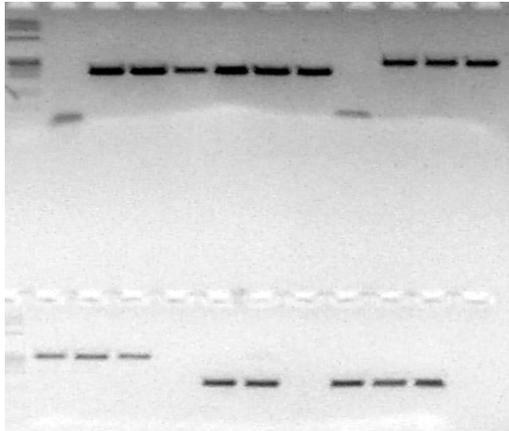


Figura 22: Amplificación de fragmentos de PCR de los distintos exones en gel de agarosa.

Tras la amplificación de los fragmentos, estos fueron analizados mediante la técnica de CSGE-Heterodúplex para determinar la existencia de mutaciones en las regiones exónicas.

3.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES SENSIBLES A LA CONFORMACIÓN (CSGE)-HETERODÚPLEX

Previamente a la realización del análisis, los fragmentos amplificados fueron desnaturalizados a 95°C durante 15 minutos, renaturalizándose posteriormente y de forma gradual durante una hora, hasta alcanzar una temperatura

final de 35°C. De esta manera se permite la formación de heterodúplex (apareamiento entre cadenas con distintas secuencias) en individuos heterocigotos. En estos casos los homodúplex y heterodúplex migran de forma diferente en los geles de MDE + Acrilamida.

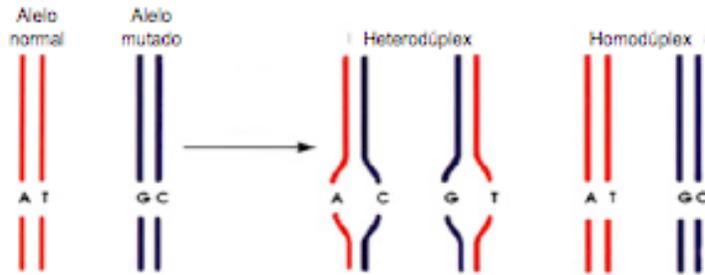


Figura 23: Representación esquemática de la formación de heterodúplex y homodúplex en un paciente heterocigoto.

Estos geles fueron preparados con agua destilada 7.705mL, formamida 99% 5.98mL, etilenglicol 99% 4.025mL, TBE 5X 4.8mL, MDE TM 2X 20.125mL, TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina) 36.8 µL, AMPS 25% 138 µL, y en ellos se cargó la mezcla de 2 µL del producto de PCR y 1 µL del tampón Triple Dye (FMC Bioproducts). La electroforesis se realizó a 170 voltios durante 18 horas. Tras ese período los geles fueron sometidos a una tinción de plata con el kit comercial DNA Silver Staining Kit de Amershan Pharmacia, con un volumen de 250 mL, siguiendo las instrucciones del comerciante.

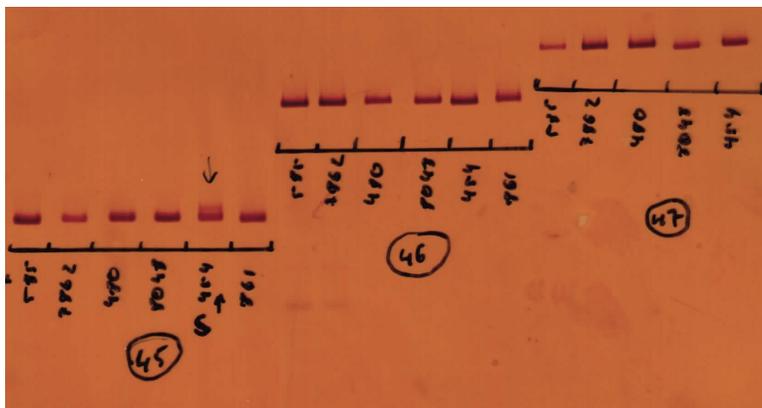


Figura 24: Patrón de migración alterado en el exón 45 del gen COL4A4 del paciente 23454, que indica la presencia de una mutación en heterocigosis a ese nivel.

3.5. SECUENCIACIÓN DEL ADN

Los productos de PCR en los que se detectaron patrones de migración anómalos en el gel de acrilamida fueron secuenciados en el analizador genético ABI 3100 en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN no permitían la visualización completa de los exones, por lo que fue necesario diseñar unos nuevos cebadores para solventar este problema.

Todos los exones del gen COL4A3 se amplificaron con los nuevos cebadores siguiendo las condiciones estándar del programa de PCR anteriormente descritas, con unas condiciones de anillamiento de 40 ciclos y 30 segundos. Las condiciones específicas de cada exón se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 5: Condiciones específicas de amplificación de los nuevos oligonucleótidos del gen COL4A3

EXÓN	SECUENCIA	TEMP. ANILLAMIENTO	TAMAÑO
1F	GACCGAGCCCTACAAAACC	62°C	358 pb
1R	CTCAGCCTCGCCACTAGC		
**			
2F	GTCACCTGGCTCCTAACAGATAGT	57°C	297 pb
2R	GGGAAATGGAACAACATACTGC		
3F	TGCAAAGAGTCACCATGAAGT	57°C	296 pb
3R	GATGTGGAATTCTCTCCAGGTT		
4F	AGCTTGGCATGTGACTGAGACT	55°C	300 pb
4R	ACCACTCCTTTGACATCTACCA		
5F	GCTATTCCCAGTTATAGTGGAGGA	55°C	374 pb
5R	ATCCTGTCCTGCTTGTATTCAGG		
6F	GATAAGTCTTCATATCAGTCAGCCTGT	55°C	372 pb
6R	CCTAAAGGAATGTTTTCAAGGGAAG		
7F	CATGACCCAGTAGCCATAAGGAAT	57°C	307 pb
7R	CTACCCCAGACTTCCCTAAAGTCAT		
8F	GAGAGGATACACAATAGCAGAGAGG	55°C	248 pb
8R	CTGAATGATTAAGGTCTGGATTATG		

EXÓN	SECUENCIA	TEMP. ANILLAMIENTO	TAMAÑO
9F	CTCTGAGTACATAACTTGAAAAGCA	58°C	287 pb
9R	GAAAAGAGAGACGAAGTAAAGAGAGG		
10-11F	GAGGTGTTATGCTCTTCTGATTTA	57°C	439 pb
10-11R	CTAACAGTGACCCACATGAAGAAG		
12-13F	ATTGGAACCTTTGATGGGTTTAG	54°C	443 pb
12-13R	TAATCATAAAATCGCAGA		
*			
14F	GTTAACACGAGGCACATTCATAGTT	55°C	338 pb
14R	ATAGCTGCTCTGCCTGTGGAGTA		
15F	TTCTCTCTTAGATGGCTCAGCACT	57°C	290 pb
15R	GAGCTAGTTTGAGTTGGGCATCTT		
16-17F	CCTGAGGTCAAGAGGAGATGAT	62°C	560 pb
16-17R	CCTTGACTTAGGTCCAGGGTTG		
**			
18F	GTAGATGGGATTCCTTACCCAGATAC	57°C	403 pb
18R	GTCAAAGGGACACATAGTGACCAG		
19F	GGGCCAAAATGAAGAAACTG	55°C	279 pb
19R	CTTTCCTCACCCATGTCAATC		
20F	TCTGATATTTGTCTAGGTGAGAGTAGG	55°C	311 pb
20R	AGCCTGGAAACACTTCTAGATCA		
21F	GTGTTATGTACCTCTCCATTGTGC	55°C	398 pb
21R	AAACCACACAGACTGATGGCTAAG		
22F	ACCATGCTTTCTCAGTTGCAG	57°C	357 pb
22R	CATCACTGACTGGTAGCTATTTGG		
23F	GTTCTTTCTGAGGACTCAATGTAGCTT	55°C	213 pb
23R	CTTCCAGTGTATTGACCCTTTTGT		
24F	CTGTCTACTTAGAGTTGGCGTTCA	55°C	222 pb
24R	AAGGCACCAAACCTGGTAAGTGT		
25F	TGAAAAGTTCTTGTCCACACTG	55°C	398 pb
25R	GTTTCATTCTGCAGTTAGAGTGATG		
26F	GATCTCAATGACAGCCTAACTGGT	55°C	348 pb
26R	GAGAAGCTTCGTTAGCTCTAGAAACC		
27F	TCGTATTTCCGCTATCGTC	55°C	227 pb
27R	AAGAGAGTCAGGGTGTGTGTGT		
28F	ATGAAGGAAAAGTTGCTGATGTG	55°C	201 pb
28R	GAACATCTTCTAAATATCCACAACAAA		
29F	GCATCTCTAGCTGGTTGAGAGATAAG	55°C	283 pb
29R	ATCTAGAGTGCTCTGCCAGATAAGTG		

EXÓN	SECUENCIA	TEMP. ANILLAMIENTO	TAMAÑO
30-31F	CTCCATAACAGAGAGTCAATATCAGTG		
30-31R	AGTCTCATGTCTCCTGCCCTTCT	62°C	693 pb
**			
32F	GTTAGTAGGGGAAAGCATTGTGG	55°C	298 pb
32R	CTATGTACAGTTGACAGAGCCACCT		
33-34F	CGACCCATCTCCTAGACTAATACAGT	55°C	841 pb
33-34R	CCTCACTGTCCTTATTTGTCAACC		
35F	TCCCACGTAGCTGGGATTAC	57°C	300 pb
35R	CTGCTGGAACACTATCAGAACAGA		
36F	CATGCATGCAAGCAACAAGT	55°C	241 pb
36R	ACACAGAAAATCTGGAGTCCTCAC		
37F	AGCCATTCTTGGGAGAAAAGC	55°C	321 pb
37R	ACACCGAATCTGGGTACTTGTT		
38F	GTGCTGGCAGATAGCAGATACTAA	55°C	323 pb
38R	GATTTCAGGAGGGCTATACTCTGA		
39F	CAGACCGTTTCAGTCACTGTTGTA	55°C	230 pb
39R	CAGAAATCCAAACCTCAGGAGA		
40-41F	CACTGGCAAGAAATAAAATCCTCTTT	55°C	488 pb
40-41R	ATATTCAACTGCTTTCTCTCCTTGA		
42F	GAGTCTCAACTCAGTTTTTGTAGCTCT	55°C	477 pb
42R	GGAAAGAAGAAGCAACAAGGTAACA		
43F	CTCCCTGGCTGGCAATACT	55°C	293 pb
43R	AACATCATGAGAATGGACTAATACAG		
44F	GTTCTAAGTGGCCAGAGGAGTTATAG	55°C	354 pb
44R	GTACTAACCCAGCTGTCTGTACTTC		
45-46F	GCACACTTCTAGTATTTGTCCTTAGAGTC	55°C	477 pb
45-46R	GAAGTTGATCAGCTGTTTCCAAAG		
47F	AGGTGACTAATCATCCTAGCTTGC	55°C	399 pb
47R	CATTTGATCCTTGGCCTTTG		
48F	CCACTCTTCTCTAGGATTGCTTTC	55°C	487 pb
48R	GGCCAGTGTTTTATTGCTCTC		
49-50F	GTTGTCTTTGTCCAGCTTTTGC	55°C	621 pb
49-50R	GACCCTGGGAATCACATTTTAC		
51F	CTCCCCTTTCTTTACTCACAGTTG	55°C	377 pb
51R	AAATCATGGCTACTCGTTGACC		
52F	ACGCCCGACCCTGTAATAAAT	55°C	397 pb
52R	CAGATTAGAGACCCAGATCACAGAAC		

0,5µL MgCl₂ ** 0,3µL DMSO

En el caso del gen COL4A4, la amplificación de los exones con los nuevos cebadores se llevó a cabo siguiendo las condiciones del programa estándar de PCR, con un anillamiento de 35 ciclos y 30 segundos. El resto de condiciones se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6: Condiciones específicas de amplificación de los nuevos oligonucleótidos del gen COL4A4

EXÓN	SECUENCIA	TEMP. ANILLAMIENTO	TAMAÑO
3F	GTCGGCTAGTAGGAGCAG	52°C	199 pb
3R			
9F	GACCACTGGATTGAGAAT	51°C	348 pb
9R			
10F	TTGGGTAACAGATGCACTGA	54°C	538 pb
10R	TTTCATTGTTCAGGGCTCTA		

Los productos de PCR fueron purificados previamente, para eliminar los restos de oligonucleótidos y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación, usando la enzima comercial EXOSAP-IT CLEAN UP de Affymetrics INC, siguiendo las instrucciones del comerciante.

Se preparó una muestra con el oligonucleótido sentido y otra con el antisentido, utilizando 40-60 ng del ADN amplificado y purificado con 3 pmol del oligonucleótido correspondiente, logrando un volumen final de 8 µL de reacción.

3.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó con la ayuda del programa 4Peaks 1.7.2 (1.7.1) para Mac: <http://www.mekentosj.com/science/4peaks>

Para la búsqueda de mutaciones en homocigosis se utilizó el programa UCSC Genome Bioinformatics:

<http://genome.ucsc.edu/index.html?org=Human&db=hg19&hgid=284765991>

Para la actualización bibliográfica se utilizó la base de datos Medline de la National Library of Medicine:

<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Para determinar si las mutaciones encontradas eran conocidas o no, se recurrió a la base de datos The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff “HGMD”: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

3.7. ESTUDIOS POBLACIONALES

Para confirmar el carácter patogénico de las mutaciones no descritas en la literatura y descartar que las alteraciones en el patrón de migración en los geles de acrilamida eran debidas a un polimorfismo presente en la población española, se procedió a su estudio en 50 pacientes control mediante un nuevo análisis de heterodúplex.

También se realizó un estudio In Sílico de las mutaciones missense no descritas, para conocer su comportamiento teórico y su grado de implicación en la función proteica. Se utilizaron los siguientes programas informáticos:

- **PolyPhen:** <http://www.bork.emblheidelberg.de/Polyphen>

Predice el posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y función de una proteína humana, empleando consideraciones físicas y comparativas. Para ello realiza un alineamiento de secuencias pertenecientes a proteínas homólogas en las especies que se encuentran descritas en BLAST. El resultado del mismo es empleado por el software PSIC (Position Specific Independent Counts) para calcular la matriz del perfil. Los elementos de la matriz (valores del perfil) son ratios logarítmicas que indican la probabilidad de que en una posición determinada se encuentre un aminoácido, frente a que este aminoácido se localice en cualquier posición (frecuencia de fondo). PolyPhen analiza los valores absolutos de la diferencia entre los valores de perfil de las dos variantes alélicas en la posición polimórfica. Un valor muy alto de esta diferencia podría indicar que la sustitución estudiada aparece poco o nada en la familia de proteínas.

Los resultados del estudio pueden determinar que el cambio es:

- Probablemente patogénico: existe una gran probabilidad de que afecte a la estructura o a la función de la proteína

- Posiblemente patogénico: se cree que podría afectar a la función o estructura proteica

- Benigno: es muy probable que carezca de efecto fenotípico

- Desconocido: en algunos casos, cuando por carencia de datos no se puede hacer una predicción

PolyPhen también muestra un número de secuencias alineadas en la posición de búsqueda para el análisis de la conservación interespecie ordenadas de mayor a menor homología en la secuencia de la proteína dada.

- **SNPS3D:** <http://www.snps3d.org/>

Este programa basa su predicción en la hipótesis de que muchos SNPs patogénicos afectan a la función de la proteína disminuyendo su estabilidad. Emplea el software SVM (support Vector Machine) para encontrar el patrón de diferenciación entre los SNPs asociados a enfermedad y los neutrales. La tasa de falsos positivos y negativos es de 15% y 26%, respectivamente.

También emplea un segundo modelo que se basa en el análisis de la homología de secuencia en familias de proteínas relacionadas con proteínas humanas. El nivel de conservación de una posición y la probabilidad de observar una variación en una familia hace posible distinguir entre mutaciones patogénicas y neutrales, con unas tasas de falsos positivos y negativos del 10 y 20%, respectivamente.

Un resultado positivo para el valor de SVM indica que se trata de una variante clasificada como neutral, mientras que un valor negativo la identifica como un cambio patogénico. Cuanto mayor es el valor, más probable es la clasificación. La precisión es significativamente mayor cuando los valores están por encima de 0,5 o por debajo de -0,5. Para las variantes que afectan más a la función de la proteína que a la estabilidad, el modelo de estabilidad es positivo y el modelo del perfil debe ser negativo. La precisión es significativamente mayor cuando los dos métodos coinciden.

- **SIFT:** <http://sift-dna.org>

Este programa es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína y predice si estos cambios provocarán un efecto en el fenotipo. Se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que los cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, SIFT escoge proteínas relacionadas y forma un alineamiento múltiple de estas y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento, realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas “no toleradas” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido.

Esta premisa se realiza calculando las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento.

Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas y las puntuaciones mayores o iguales a 0,05, “tolerables” o neutrales.

La precisión en las predicciones de SIFT oscila entre 60-80%, obteniéndose un 30% de falsos positivos, aproximadamente. No obstante, la precisión de las predicciones depende del alineamiento que se obtenga en cada caso.

4. MÉTODO ESTADÍSTICO

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.20.0 para MAC OS. Las variables cualitativas se expresan como porcentajes y las cuantitativas como mediana y rango intercuartílico.

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Hemos realizado un estudio clínico y genético de 8 pacientes con diagnóstico de presunción de Síndrome de Alport controlados en el Servicio de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca, excluyendo los casos con patrón de herencia ligado al sexo (que corresponden a tres pacientes procedentes de dos familias distintas). En los casos en los que se determinó la existencia de una mutación patogénica se estudiaron también los familiares que aceptaron incluirse en el estudio.

De los 8 probandos, 2 eran hombres (25%) y 6 eran mujeres (75%). Un total de 5 pacientes (65%) presentaban clínica compatible con SA de herencia AD, 1 enfermo tenía un patrón AR (12,5%), otro mostraba signos clínicos de HFB (12,5%) y en el último caso (12,5%) no se pudo establecer el modo de herencia, al no presentar antecedentes familiares de la misma.

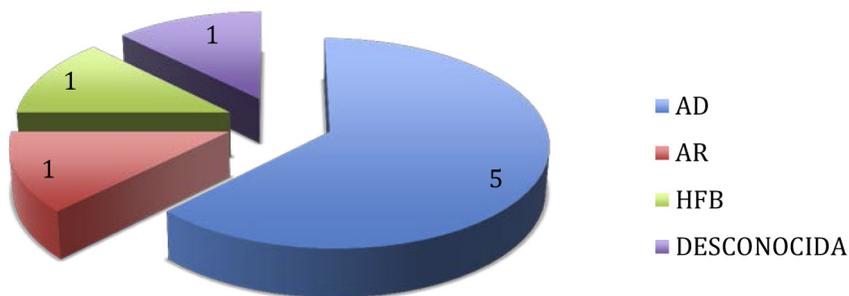


Figura 25: Distribución del modo de herencia de los probandos del estudio.

2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El análisis de los distintos parámetros clínicos arrojó los siguientes resultados:

Tabla 7: Frecuencia de aparición de las distintas manifestaciones clínicas

PARÁMETROS CLÍNICOS	ABSOLUTO	FRECUENCIA
CONSANGUINIDAD	1	12,5%
HISTORIA FAMILIAR	7	87,5%
ERC	6	75%
ERC AL DIAGNÓSTICO	4	50%
ERCT	3	37,5%
HEMATURIA	8	100%
HEMATURIA AL DIAGNÓSTICO	8	100%
PROTEINURIA	8	100%
PROTEINURIA AL DIAGNÓSTICO	8	100%
HTA	7	87,5%
HTA AL DIAGNÓSTICO	5	71,4%
HIPOACUSIA	6	75%
HIPOACUSIA AL DIAGNÓSTICO	5	83,3%
AFECTACIÓN OCULAR	2	25%
AFECTACIÓN OCULAR AL DIAGNÓSTICO	1	50%

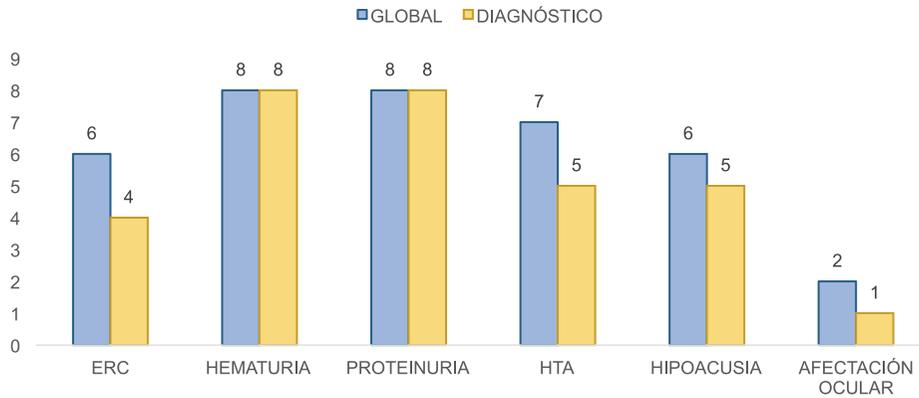


Figura 26: Distribución gráfica de los distintos síntomas, tanto de forma general como en el momento del diagnóstico.

La mediana de edad de aparición de la hematuria fue de 19 años (4,75-29,5). De los 8 pacientes, en la mitad de ellos esta se expresó en forma de microhematuria y en la otra mitad lo hizo como macrohematuria.

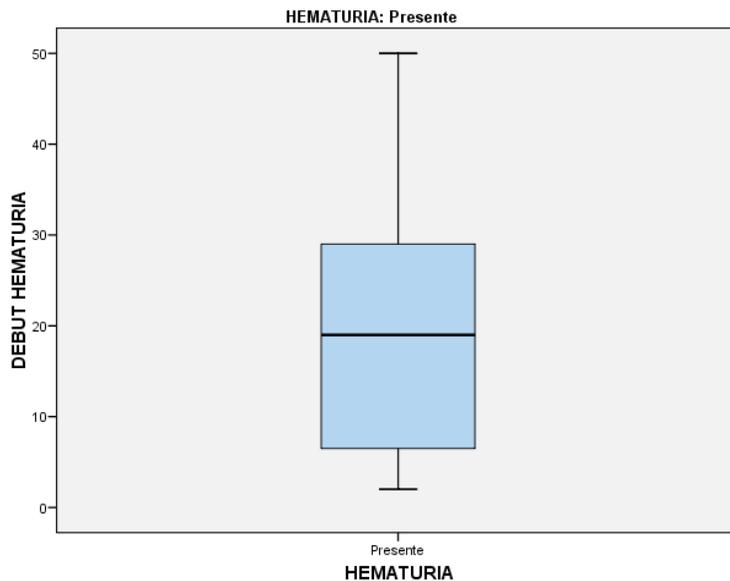


Figura 27: Mediana de edad de aparición de la hematuria.

El debut de la proteinuria tuvo lugar con una mediana de edad de 26 años (15,75-38). La mediana de proteinuria alcanzada fue de 1,3 g/24h (0,36-3,69), y la máxima cantidad alcanzada fue de 1,91 g/24h (0,67-6,61).

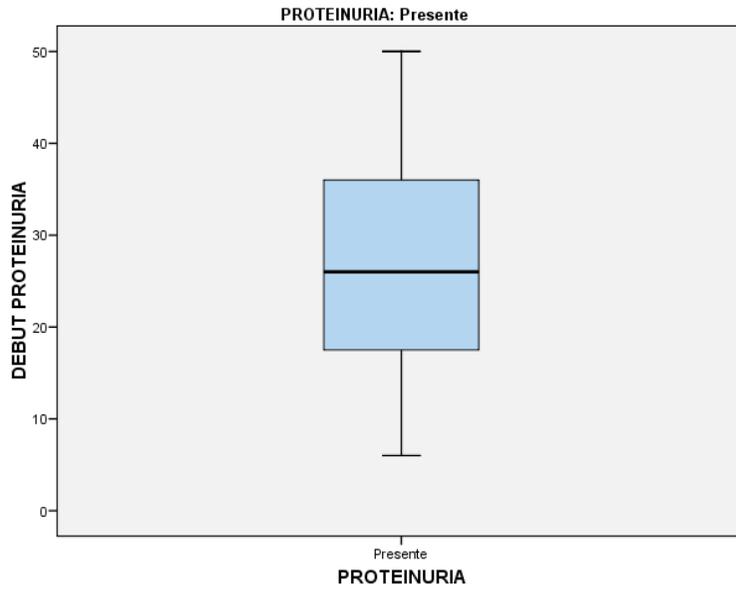


Figura 28: Mediana de edad de aparición de la proteinuria.

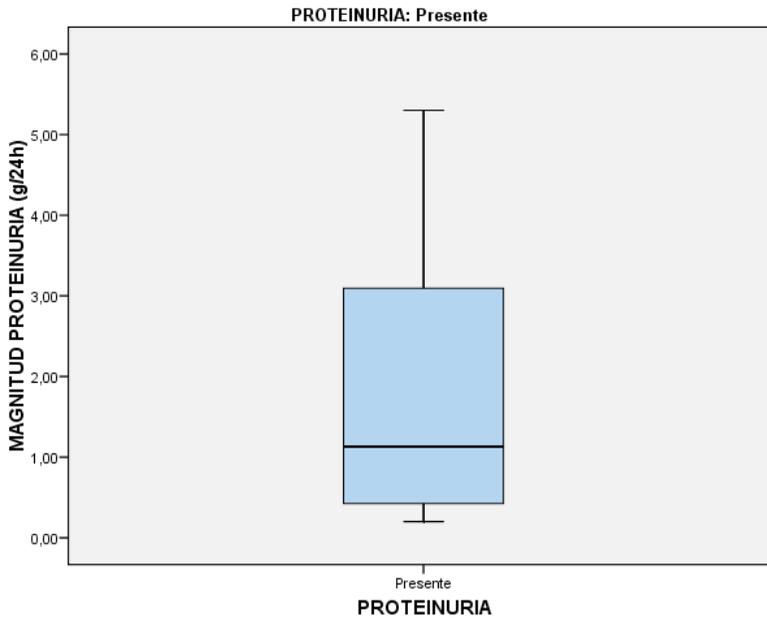


Figura 29: Mediana de la magnitud de la proteinuria alcanzada.

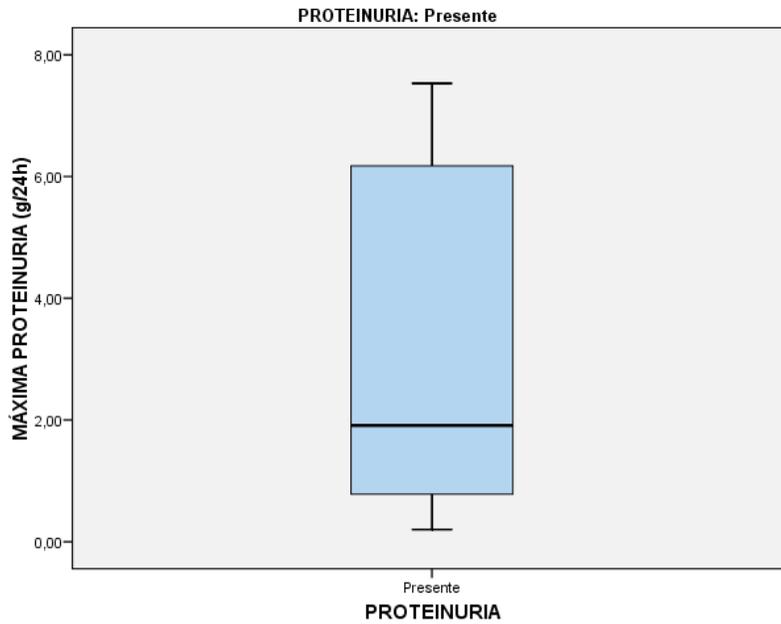


Figura 30: Máxima proteinuria alcanzada.

Nuestros pacientes alcanzaron el grado de ERC con una mediana de edad de 34 años (27-42) y, los que llegaron a ERCT lo hicieron a los 39 años (31-52), con una mediana de progresión de la enfermedad de 3 años (2-7).

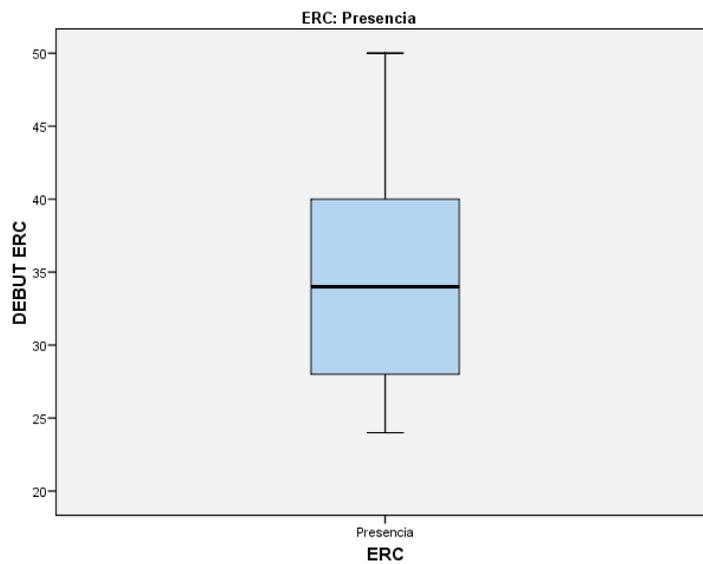


Figura 31: Edad de debut de la ERC.

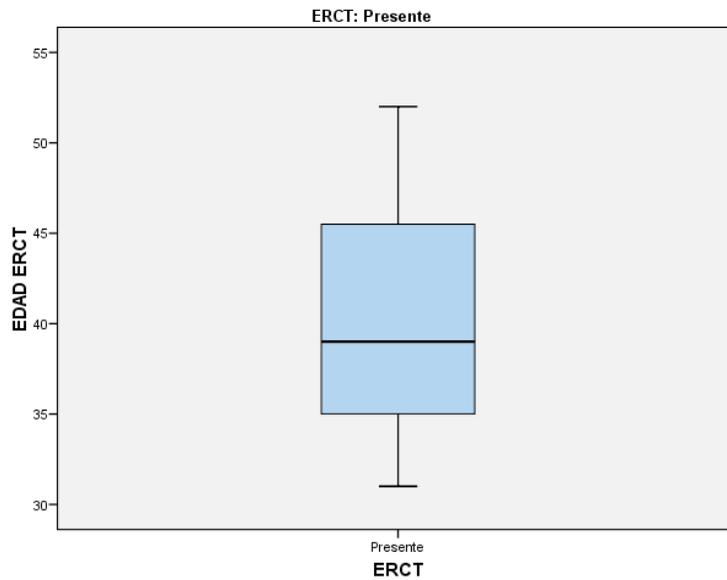


Figura 32: Debut de la ERCT.

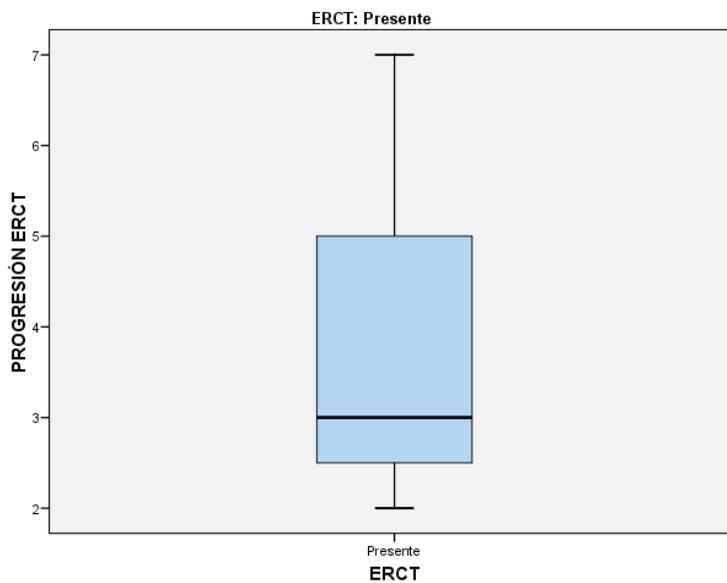
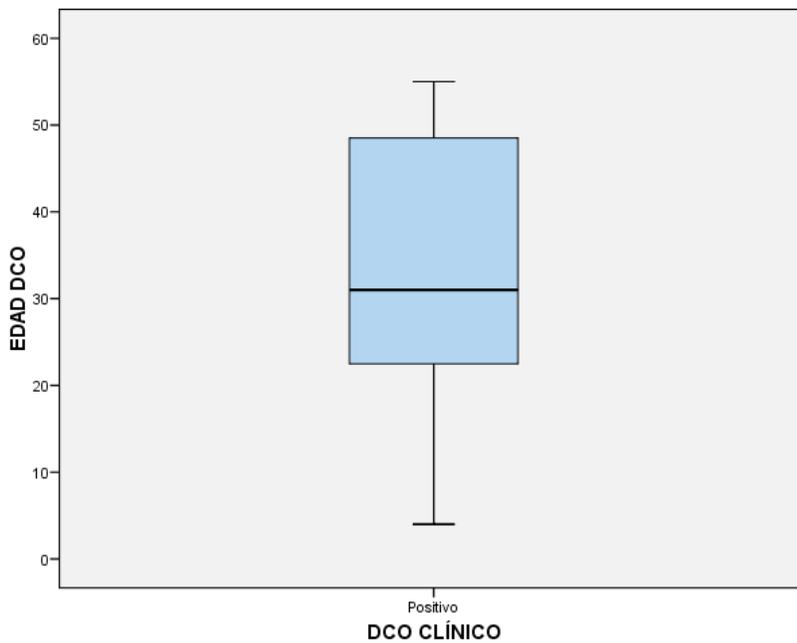


Figura 33: Mediana de progresión de la ERC a ERCT.

La edad de aparición del resto de variables clínicas se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 8: Mediana de la edad de diagnóstico y de la aparición del resto de síntomas

VARIABLE	RESULTADO
Edad DCO (años)	31 (17-50)
HTA (años)	32 (24-47)
Hipoacusia (años)	9 (5,75-42,25)
Alteraciones oculares (años)	45 (42-48)

**Figura 34:** Mediana de edad de diagnóstico del SA.

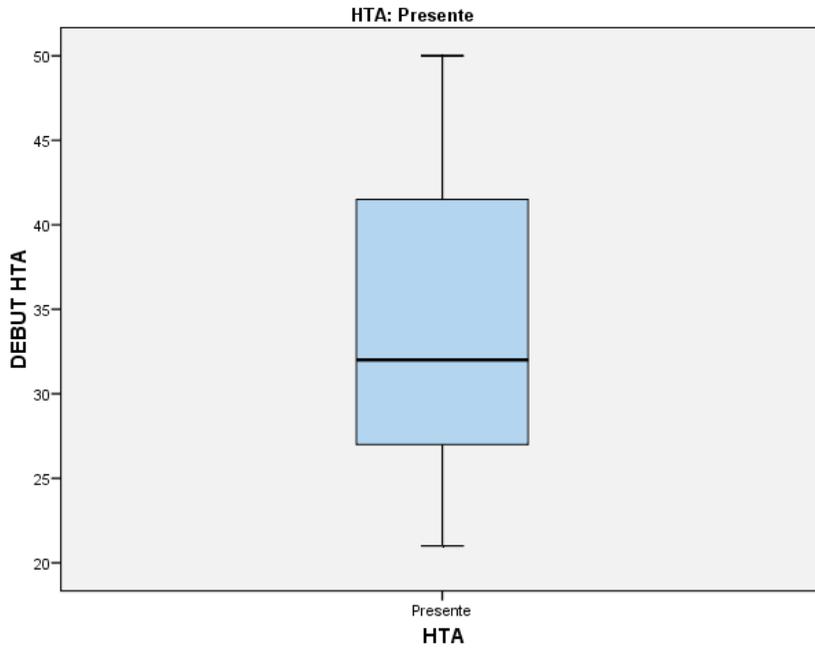


Figura 35: Edad de debut de la HTA.

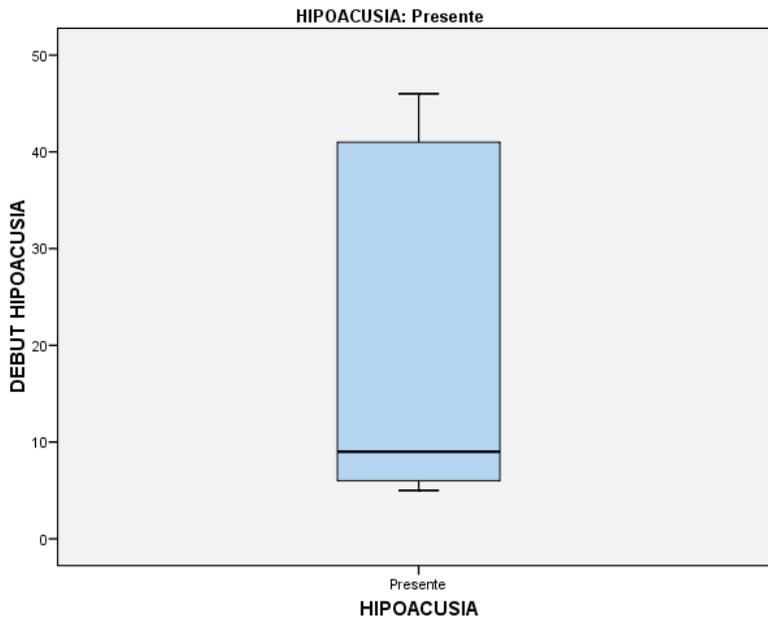


Figura 36: Mediana de edad de debut de la hipoacusia neurosensorial.

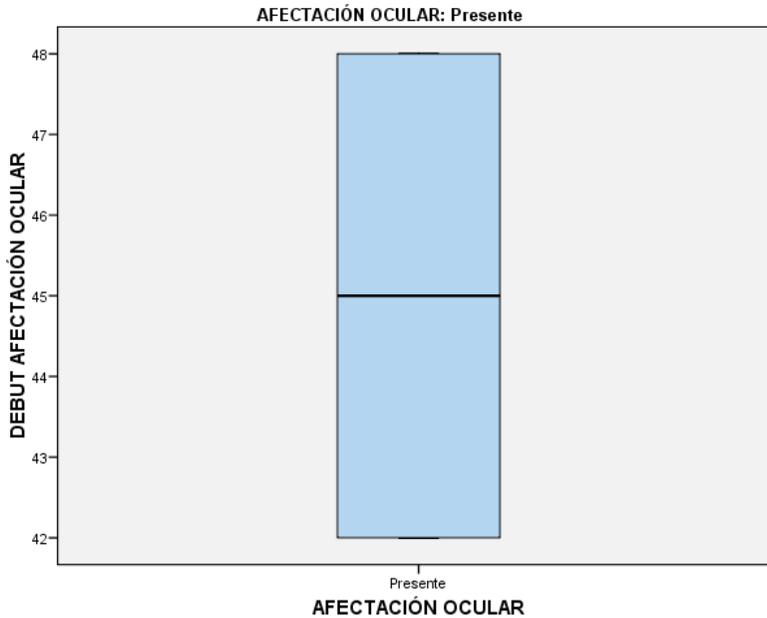


Figura 37: Edad de aparición de las manifestaciones oculares.

Las distintas técnicas diagnósticas realizadas se expresan en la siguiente tabla:

Tabla 9: Técnicas diagnósticas utilizadas

TÉCNICA DIAGNÓSTICA	ABSOLUTO	FRECUENCIA
AUDIOMETRÍA	7	87,5%
BIOPSIA RENAL	4	50%
BIOPSIA RENAL CON ME	1	25%

3. ESTUDIO GENÉTICO

De los 8 probandos incluidos en el estudio, 7 tenían antecedentes familiares, mientras que el paciente restante carecía de ellos. De esos 7 pacientes, en 4 se halló una mutación que podría explicar el cuadro clínico. En el resto de probandos el estudio genético solo evidenció la presencia de polimorfismos, por lo que no se pudo determinar la mutación patogénica causante de la enfermedad.

En todos los pacientes se analizó el gen COL4A3, del que se han descrito un número más elevado de mutaciones. Cuando el estudio del mismo fue negativo, se procedió al estudio del gen COL4A4. En el análisis de ambos genes determinamos la existencia de 32 mutaciones, 16 (50%) en cada uno de ellos, cuyo significado clínico se distribuye de la siguiente forma (Tabla 10):

A) 4 mutaciones (12,5%) son patogénicas: una (c.4235G>T; p.G1412V) está descrita en la literatura, en dos de ellas se ha demostrado su naturaleza patogénica en este estudio y la última puede ser considerada “posiblemente patogénica” en base a los resultados del modelo poblacional y del estudio “in silico”, realizados en este trabajo.

B) 14 mutaciones (43,7%) son polimorfismos poblacionales ya descritos en la literatura.

C) Las 14 mutaciones restantes (43,7%) son variantes de significado desconocido, pues no están descritas. Se encuentran localizadas en los intrones, en regiones que no implican señales de maduración del ARN (splicing), por lo que las hemos considerado como variantes naturales, que no entrañan patogenicidad.

Tabla 10: Relación de las mutaciones encontradas en los 8 probandos.

GEN	MUTACIÓN	BIBLIOGRAFÍA
Mutaciones Patogénicas		
COL4A3	c.345 Del G; p.G115GFSX37	Este trabajo
COL4A3	c.4235G>T; p.G1412V	Tazón Vega et al (2003) ²
COL4A4	IVS 3+1 G>C	Este trabajo
COL4A4	c.4267C>T; p.P1423S	Este trabajo
Polimorfismos previamente descritos		
COL4A3	c.127G>C; p.G43R	Heidet et al (2001) ⁴⁴
COL4A3	IVS 5+73 C>T	Voskarides et al (2007) ¹³⁷
COL4A3	c.422T>C; p.L141P	Longo et al (2002) ⁴⁷
COL4A3	c.485A>G; p.E162G	Heidet et al (2001) ⁴⁴
COL4A3	c.G976T; p.D326Y	Heidet et al (2001) ⁴⁴
COL4A3	c.1352A>G ; p.H451R	Heidet et al (2001) ⁴⁴
COL4A3	c.1721C>T; p.P574L	Heidet et al (2001) ⁴⁴
COL4A4	c.3011C>T; p.P1004L	Boye et al (1998) ⁴³
COL4A4	c.3594G>A; p.G1198G	Lemmink et al (1994) ¹³⁸
COL4A4	c.3684G>A; p.K1228K	Badenas et al (2002) ⁴
COL4A4	c.3979G>A; p.V1327M	Longo et al (2002) ⁴⁷
COL4A4	c.4080G>A; p.P1360P	Badenas et al (2002) ⁴
COL4A4	c.4207T>C; p.S1403P	Boye et al (1998) ⁴³
COL4A4	c.4932C>T; p.F1644F	Longo et al (2001) ⁴⁷
Polimorfismos hallados en este trabajo		
COL4A3	IVS 4-41 INSG	Este trabajo
COL4A3	IVS 16+14 T>C	Este trabajo
COL4A3	IVS 17+35 T>G	Este trabajo
COL4A3	IVS 30-66 C>T	Este trabajo
COL4A3	IVS 32+69 A>G	Este trabajo
COL4A3	IVS 39-4 Del TT	Este trabajo
COL4A3	IVS 46-69 C>T	Este trabajo
COL4A4	IVS 10-39 T>C	Este trabajo
COL4A4	IVS 12+30 G>A	Este trabajo
COL4A4	IVS 12-58 A>G	Este trabajo
COL4A4	IVS 17+24 A>T	Este trabajo
COL4A4	IVS 19+21 C>A	Este trabajo
COL4A4	IVS 37-61 G>T	Este trabajo
COL4A4	IVS 38+40 C>A	Este trabajo

3.1. FAMILIA 1

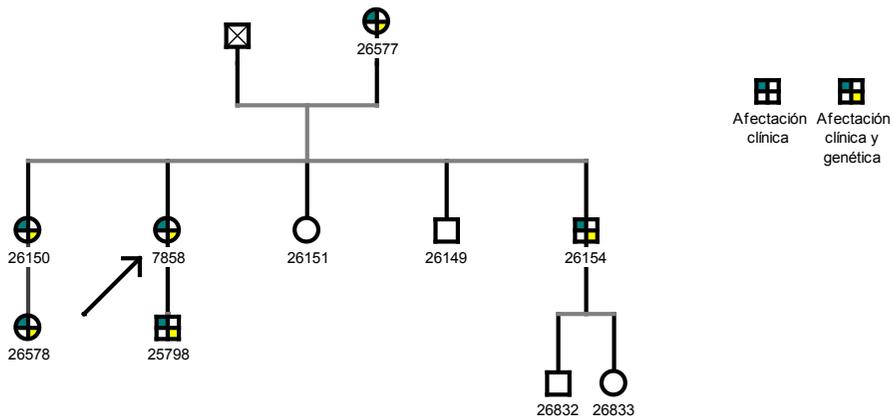


Figura 38: Árbol genealógico de la familia 1.

El caso índice es la paciente 7858. Se trata de una mujer de 48 años, de raza caucásica y natural de la provincia de Salamanca (Castilla y León, España) que seguía revisiones periódicas en la consulta general de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

A la edad de 2 años presentó un episodio de macrohematuria tras sufrir una amigdalitis aguda. No fue sometida a biopsia renal, por lo que se diagnosticó de glomerulonefritis aguda.

Desde ese momento padeció múltiples crisis de microhematuria, esporádicas o tras episodios febriles. A los 32 años desarrolló HTA. En el curso del estudio de la misma se constató la presencia de ERC, con TFG en torno a 45 ml/min, creatinina de 1,5-1,7 mg/dL y proteinuria de 1,92 g/día.

A los 46 años se realizó una audiometría al referir pérdida subjetiva de la audición, en la que se evidenció hipoacusia bilateral para tonos agudos de probable origen congénito.

El hijo de la paciente (caso 25798) presentó a los 6 años de edad un episodio de macrohematuria tras una infección respiratoria. Posteriormente y al

igual que su madre presentó crisis esporádicas de hematuria macro y microscópica. A la misma edad se objetivó proteinuria de 2,2 g/día. A los 9 años, tras la realización de una audiometría fue diagnosticado de hipoacusia neurosensorial para tonos altos y en un estudio oftalmológico se evidenció la existencia de lenticono anterior. Tampoco se realizó biopsia renal.

Con esta clínica se estableció el diagnóstico de SA, sin precisar el modo de herencia y siguió revisiones periódicas en la consulta, primero de Nefrología Pediátrica y, posteriormente, en la consulta general de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

A los 19 años desarrolló ERC, que evolucionó hasta la ERCT a los 22 años, momento en que se sometió a un trasplante renal de donante vivo emparentado (su padre). El paciente nunca desarrolló HTA.

El único síntoma que presentan los demás familiares con afección clínica es hipoacusia neurosensorial para tonos altos, con una mediana de edad de aparición de 37,5 años (14,25-49,75).

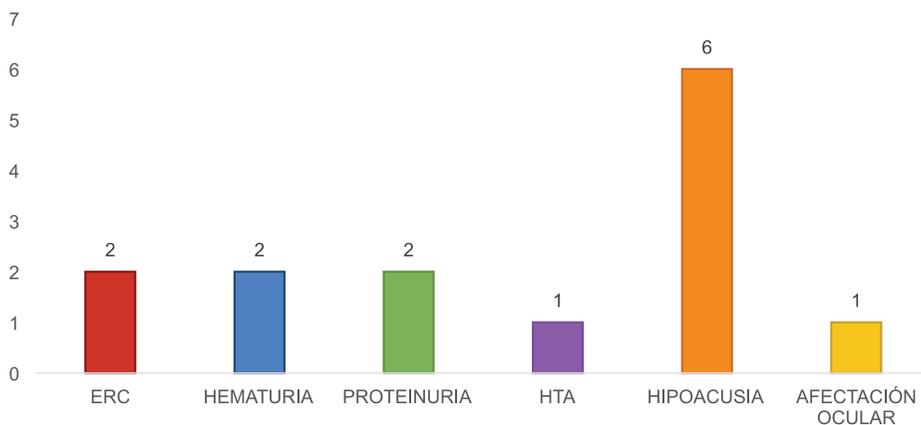


Figura 39: Distribución de los síntomas en la familia 1.

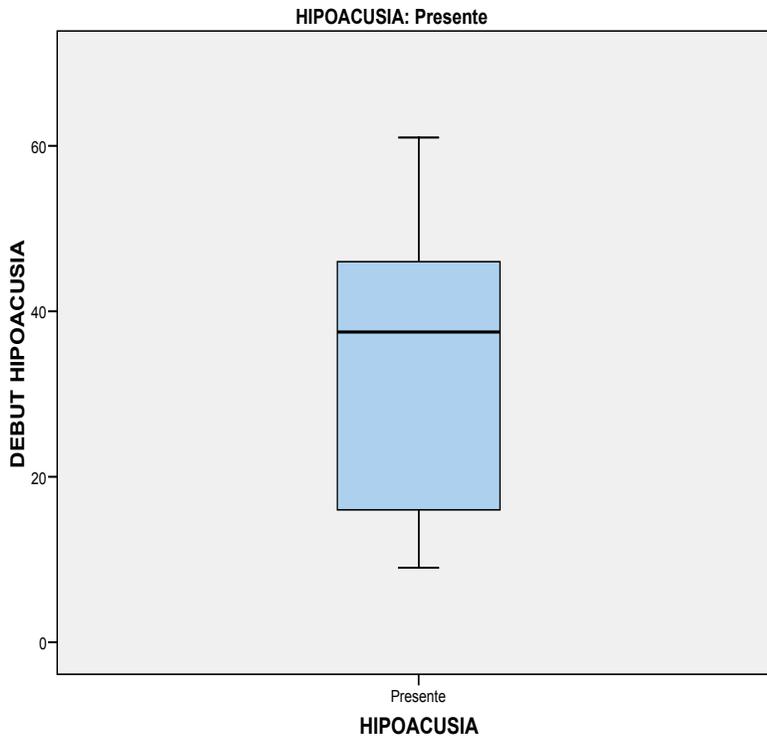


Figura 40: Mediana de edad de aparición de la hipoacusia neurosensorial en la familia 1.

Con los datos clínicos y familiares se estableció el diagnóstico clínico de SAAD y se procedió al estudio del gen COL4A3. El estudio del gen en la probando permitió caracterizar 6 mutaciones diferentes (Tabla 11):

Tabla 11: Mutaciones de la paciente 7858

GEN COL4A3
c.345 Del G; p.G115GFSX37
c.422T>C; p.L141P
c.485A>G; p.E162G
c.976 G>T; p.D326Y
IVS 17+35 T>G
IVS 39-4 Del TT

La mutación **c.345 Del G; p.G115GFSX37** es una delección en heterocigosis de una guanina situada en la posición 345, codificada por el exón 6, que produce un cambio en la pauta de lectura y genera un codón de stop 37 codones después. Esta mutación no está descrita en la literatura y la hemos considerado patogénica y responsable del SAAD que padece esta familia. La comparten todos los miembros de la familia con sintomatología y está ausente en los individuos sanos.

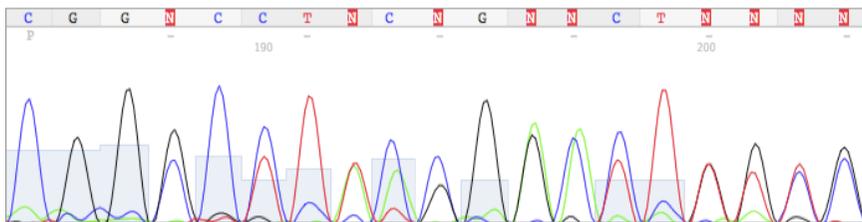


Figura 41: Mutación patogénica en el exón 6 del gen COL4A3 de la paciente 7858

El resto de mutaciones encontradas fueron consideradas polimorfismos poblacionales. La mutación **c.422T>C; p.L141P** es un cambio de timina por citosina en heterocigosis, situado en el exón 7, en la posición 422, que produce la sustitución de leucina por prolina en el codón 141. Esta mutación está descrita como polimorfismo por Longo et al (2002)⁴⁷. Se trata de una sustitución de residuos no-glicina en el dominio colágeno.

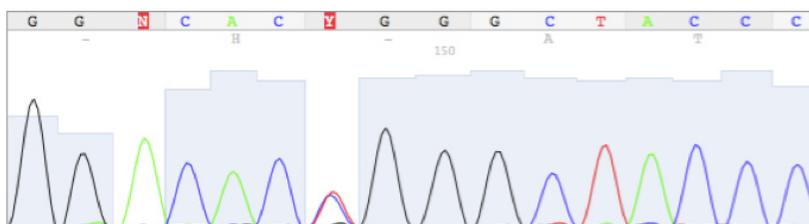


Figura 42: Polimorfismo en el exón 7 del gen COL4A3 de la paciente 7858.

La mutación **c.485A>G; p.E162G** corresponde al cambio puntual en heterocigosis de adenina por guanina en la posición 485, codificada por el exón 9, que genera el cambio de ácido glutámico a glicina. Dicho cambio está descri-

to como polimorfismo de la región codificante, que consiste en una sustitución no-glicina del dominio colágeno, por Heidet et al (2001)⁴⁴.

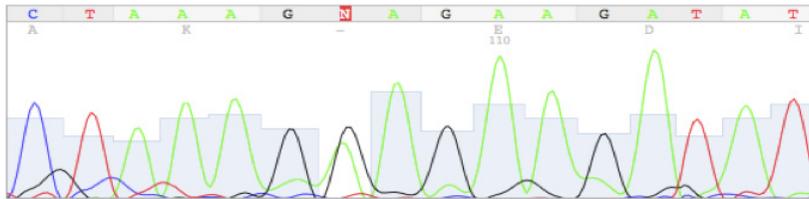


Figura 43: Polimorfismo en el exón 9 del gen COL4A3 de la paciente 7858.

La mutación **c.976G>T; p.D326Y** supone el cambio en heterocigosis de guanina por timina en la posición 976, codificada por el exón 17. Es una sustitución de residuo no-glicina en el dominio colágeno, que produce el cambio de aspartato por tirosina en la posición 326. Ha sido descrito como polimorfismo por Heidet et al (2001)⁴⁴.

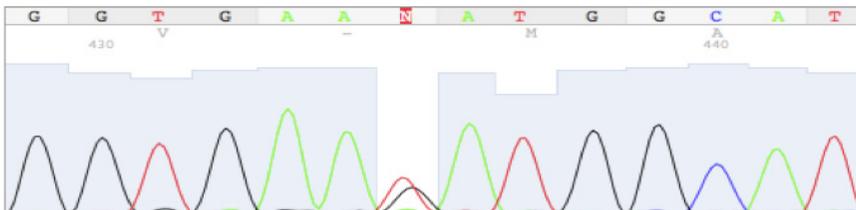


Figura 44: Polimorfismo en el exón 17 del gen COL4A3 de la paciente 7858.

Junto con estas mutaciones en la región codificante, hemos encontrado mutaciones en las regiones intrónicas adyacentes a las regiones exónicas incluidas en nuestro análisis.

La mutación **IVS 17+35 T>G** es una sustitución en heterocigosis de timina por guanina en la posición 35 del intrón 17. Este cambio no está descrito en la literatura y nosotros solo lo hemos encontrado en esta probando (y en algunos miembros de su familia). Dada la distancia a los sitios canónicos de procesamiento del ARN (splicing) lo hemos considerado no patogénico.

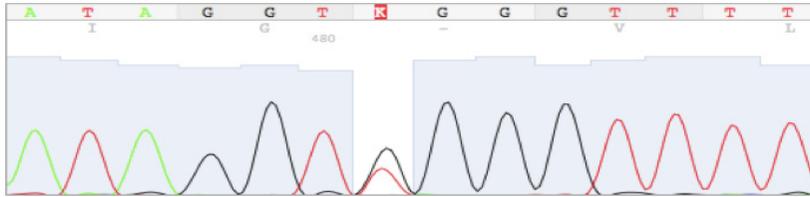


Figura 45: Mutación en el intrón 17 del gen COL4A3 de la paciente 7858.

La mutación **IVS 39-4 Del TT** consiste en la delección en heterocigosis de dos timinas en la posición -4 del intrón 40, no descrito previamente. Esta mutación aparece en todos los probandos estudiados.

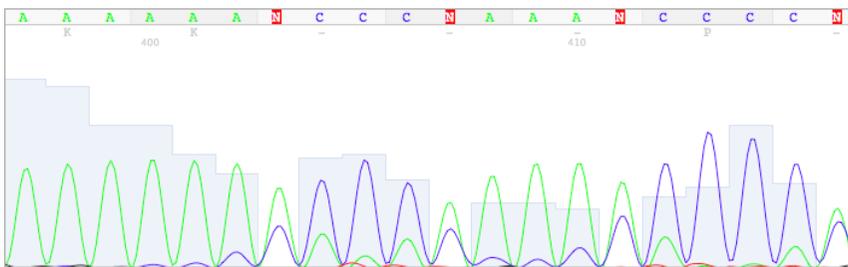


Figura 46: Mutación en el intrón 40 del gen COL4A3 de la paciente 7858.

Para determinar la posible influencia sobre la mutación patogénica de esta familia de los distintos polimorfismos hallados, determinamos la presencia de los mismos en los familiares (enfermos y sanos). Los resultados se detallan a continuación:

Tabla 12: Polimorfismos de la Familia 1

PACIENTE	p.G115GFSX37	p. L141P	p. E162G	p. D326Y	IVS17+35 T>G	IVS 39-DeIT
26577	SÍ	HOMO	HOMO	HOMO	NO	HETERO
26150	SÍ	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
26578	SÍ	HOMO	HOMO	HETERO	NO	HETERO
25798	SÍ	HOMO	HOMO	HETERO	NO	HETERO
26151	NO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
26149	NO	HOMO	HOMO	HETERO	HETERO	HETERO
26154	SÍ	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO	HETERO
26832	NO	NO	NO	NO	HETERO	HETERO
26833	NO	HETERO	HETERO	NO	HETERO	HETERO

3.2. FAMILIA 2

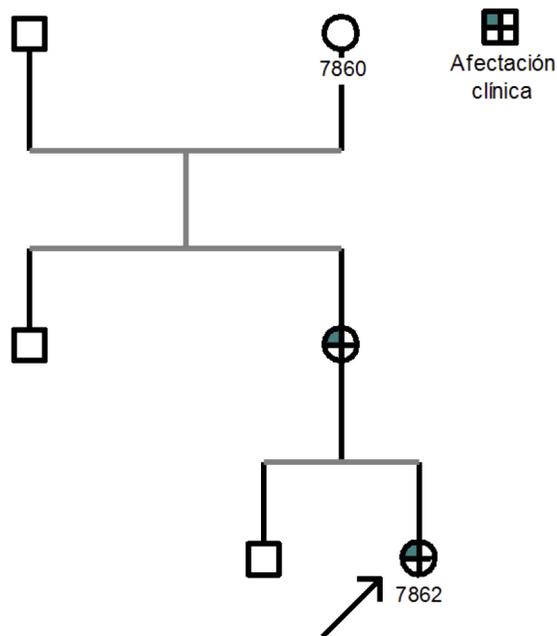


Figura 47: Árbol genealógico de la paciente 7862.

La paciente índice se identifica con el número 7862. Es una mujer caucásica de 23 años, natural de la provincia de Salamanca (Castilla y León, España), que presentó a los 14 años un episodio de macrohematuria y desde entonces ha sufrido microhematuria esporádica. A esa edad se constató también la presencia de proteinuria de 0,55 mg/día, que se ha mantenido estable a lo largo del tiempo. No ha presentado HTA, deterioro de la función renal ni alteraciones auditivas u oculares.

El estudio nefrológico completo y la biopsia renal (sin realización de ME) no arrojaron ningún resultado concluyente.

La madre de la paciente es una mujer de 48 años, que a los 42 años se diagnosticó de un episodio de microhematuria aislada, sin poder precisar si había presentado episodios similares previos. No presenta HTA, proteinuria, insuficiencia renal o alteraciones auditivas u oculares.

Los abuelos maternos de la probando son un varón de 87 años y una mujer de 78 años (7860), que no presentan ninguna manifestación clínica.

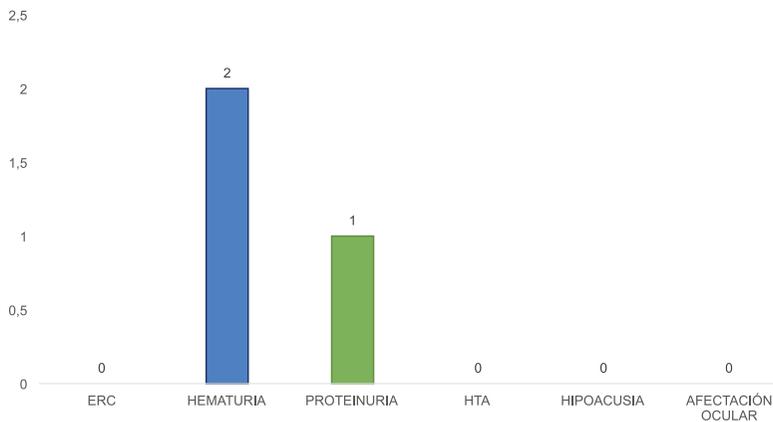


Figura 48: Distribución de los síntomas en la familia 2.

Los antecedentes personales y familiares hacían pensar en la existencia de un SAAR o HFB, por lo que fueron estudiados los genes COL4A3 y COL4A4. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13: Mutaciones encontradas en la paciente 7862

COL4A3	COL4A4
IVS 4-41 INSG	c.3594G>A; p.G1198G
IVS 39-4 Del TT	c.3684G>A; p.K1228K
	c.3979G>A; p.V1327M
	c.4080G>A; p.P1360P

El estudio del gen COL4A3 no detectó ninguna mutación en regiones codificantes y solo dos mutaciones intrónicas, una de ellas es la mutación **IVS 39-4 Del TT**, encontrada en todos los probandos de nuestra serie. La segunda mutación intrónica, **IVS 4-41 INSG**, supone la inserción en heterocigosis de una guanina en la posición -41 del intrón 5. No aparece descrita en la literatura.

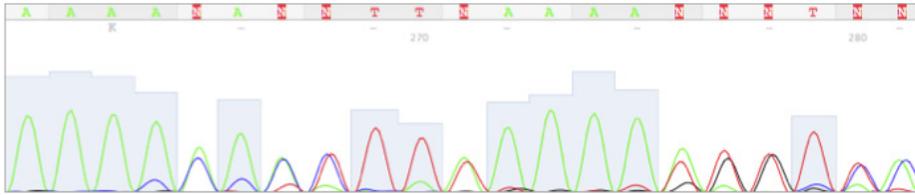


Figura 49: Mutación en el intrón 5 del gen COL4A3 de la paciente 7862.

El estudio del gen COL4A4 permitió caracterizar cuatro mutaciones en la región codificante, todas ellas comunicadas previamente por otros grupos y consideradas como polimorfismos poblacionales y ninguna mutación en las regiones intrónicas incluidas en nuestro análisis.

La mutación **c.3594G>A; p.G1198G** es una mutación silenciosa producida por la sustitución puntual en homocigosis de guanina por adenina en el exón 39, en la posición 3594, que no produce ningún cambio en la proteína resultante. Está descrito como polimorfismo silencioso por Lemmink et al (1994)¹³⁸.

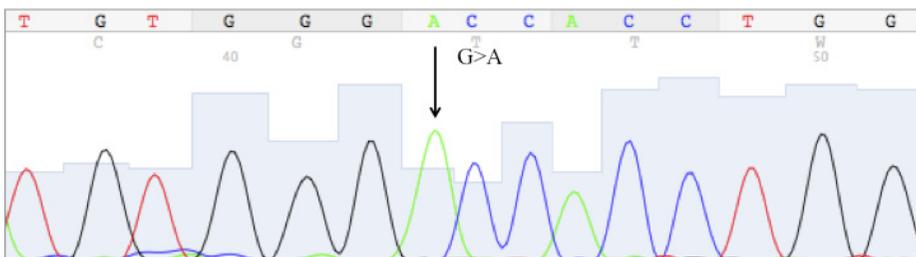


Figura 50: Polimorfismo en el exón 39 del gen COL4A4 de la paciente 7862.

La mutación **c.3684G>A; p.K1228K** es también una mutación silenciosa producida por un cambio en homocigosis de guanina por adenina en el exón 39, en la posición 3684, que no genera ningún cambio de aminoácido en la proteína resultante. Está descrito por Badenas et al (2002)⁴ como polimorfismo silencioso.

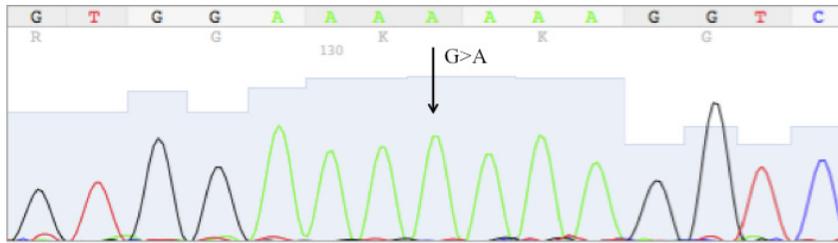


Figura 51: Segundo polimorfismo en el exón 39 del gen COL4A4 de la paciente 7862.

La mutación **c.3979G>A; p.V1327M** es el cambio puntual en homocigosis de guanina por adenina en el exón 42, en la posición 3979, que produce el cambio de valina por metionina en la posición 1327 de la proteína. Está descrito como polimorfismo por Longo et al (2002)⁴⁷.

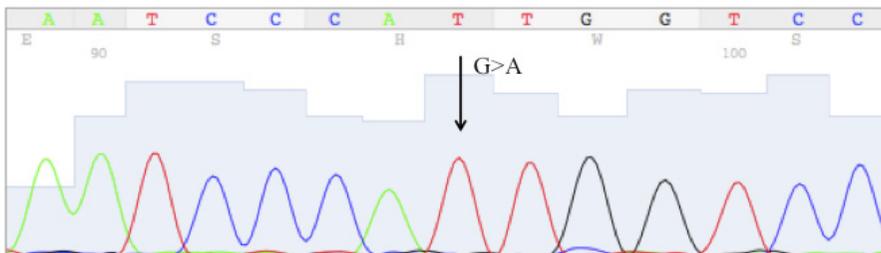


Figura 52: Polimorfismo en el exón 42 del gen COL4A4 de la paciente 7862.

La mutación **c.4080G>A; p.P1360P** es la sustitución puntual en homocigosis de guanina por adenina en el exón 42, en la posición 4080. Es una mutación silenciosa que mantiene la prolina en la posición 1360. Ha sido descrito como polimorfismo por Badenas et al (2002)⁴.

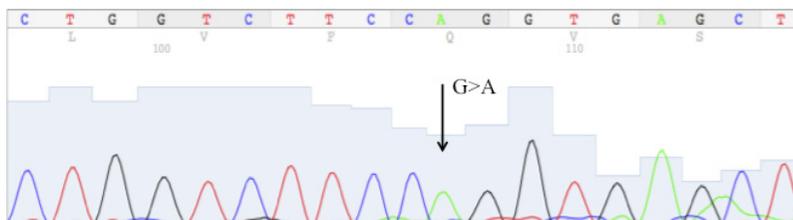


Figura 53: Segundo polimorfismo en el exón 42 del gen COL4A4 de la paciente 7862.

3.3. FAMILIA 3

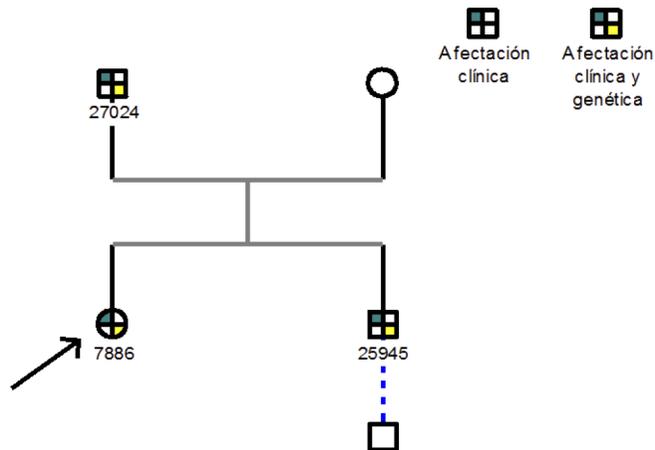


Figura 54: Árbol genealógico de la familia 3.

El caso índice es el probando 7886, una mujer caucásica de 52 años, residente en Salamanca (Castilla y León, España). A los 24 años presentó edema en miembros inferiores. Durante su estudio se constató la presencia de microhematuria, proteinuria en rango nefrótico (5,3 g/día), HTA y ERC, que evolucionó a ERCT a los 31 años. Debido al deterioro de la función renal no se realizó biopsia renal y se diagnosticó de glomerulonefritis crónica. A los 41 años se diagnosticó de hipoacusia neurosensorial para tonos altos y a los 42 años de maculopatía.

La paciente tiene un injerto renal en el momento actual.

Su hermano (25945) es un varón de 53 años residente en Zamora (Castilla y León, España), que a los 29 años presentó un episodio de macrohematuria, junto con edema. Los estudios realizados mostraron proteinuria en rango nefrótico (8,25 g/día) e HTA.

Se realizó biopsia renal sin ME, que no arrojó ningún resultado concluyente.

A los 30 años desarrolló ERC, que evolucionó a ERCT a los 34 años, por lo que ingresó en programa de hemodiálisis y, posteriormente, recibió un trasplante renal. No presenta sordera ni alteraciones oculares.

El padre de ambos pacientes (27024) es un varón de 83 años, diagnosticado de sordera neurosensorial a los 67 años. A los 75 años fue diagnosticado de HTA y ERC, con una TFG en torno a 40 ml/min, que se ha mantenido estable a lo largo del tiempo. No se ha constatado la presencia de proteinuria, hematuria o alteraciones oculares.

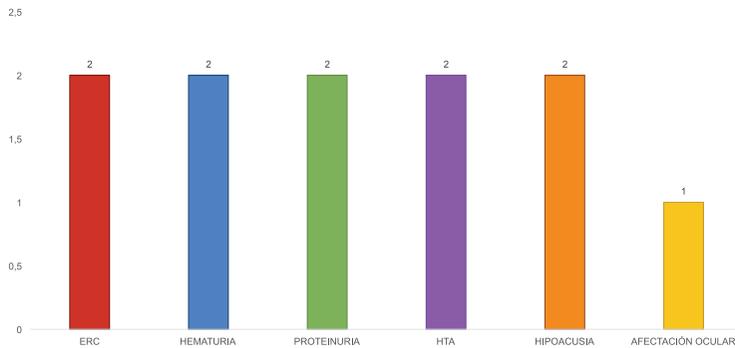


Figura 55: Distribución de los síntomas en la familia 3.

La historia clínica, tanto de la paciente como de los demás miembros de la familia, hace pensar en la existencia probable de un SAAR o SAAD, punto difícil de confirmar porque se trata de una familia con pocos miembros. Por ello se decidió estudiar el gen COL4A3, con los siguientes resultados:

Tabla 14: Mutaciones encontradas en la paciente 7886

GEN COL4A3
c. 127G>C; p.G43R
IVS 4-41 INSG
IVS 5+73 C>T
c.422T>C; p.L141P
IVS 16+14 T>C
IVS 39-4 Del TT
IVS 46-69 C>T
c.4235G>T; p.G1412V

El estudio del gen COL4A3 permitió detectar tres mutaciones en la región codificante. Una de ellas, **c.422T>C; p.L141P**, es una mutación polimorfa que encontramos también en las familias 1 y 7. La segunda mutación, **c.127G>C; p.G43R**, es una sustitución en heterocigosis de guanina por citosina en el exón 2, en la posición 127, lo que da lugar al cambio de glicina por arginina en el codón 43 de la proteína resultante. Ha sido descrita como polimorfismo de la región codificante por Heidet et al (2001)⁴⁴.

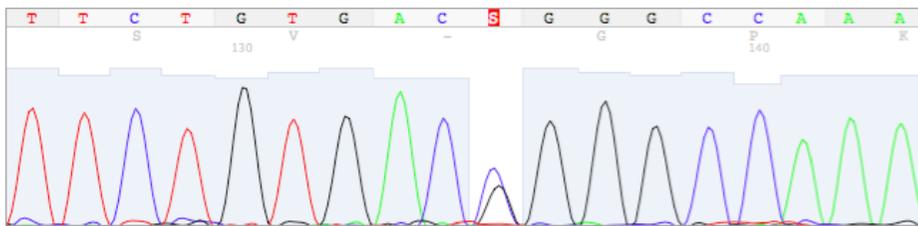


Figura 56: Polimorfismo en el exón 2 del gen COL4A3 de la paciente 7886.

La mutación **c.4235G>T; p.G1412V** es la sustitución puntual de guanina por timina en la posición 4235, en el exón 47, que genera el cambio de glicina por valina en la posición 1412 de la cadena $\alpha 3$ (IV). Se trata de una sustitución de cambio de sentido (missense) descrita como patogénica por Tazón Vega et al (2003)², pues afecta a los residuos de glicina.

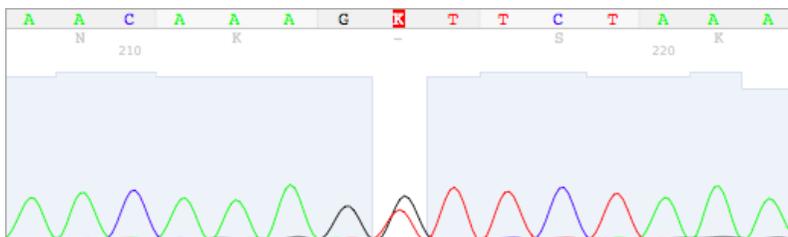


Figura 57: Mutación patogénica en el exón 47 del gen COL4A3 de la paciente 7886.

Esta mutación es compartida por los tres pacientes con manifestaciones clínicas, y confirma que el padre también está afectado por el SA.

Además de las mutaciones exónicas hemos encontrado cuatro mutaciones intrónicas, una de ellas es la recurrente **IVS 39-4 Del TT**, que hemos

encontrado en todos nuestros casos. Otra es la mutación **IVS 4-41 INSG**, que comparte con las familias 2 y 5.

La mutación **IVS 5+73 C>T** es el cambio en heterocigosis de citosina por timina en la posición +73 del intrón 5. Ha sido descrita como polimorfismo por Voskarides et al (2007)¹³⁷.

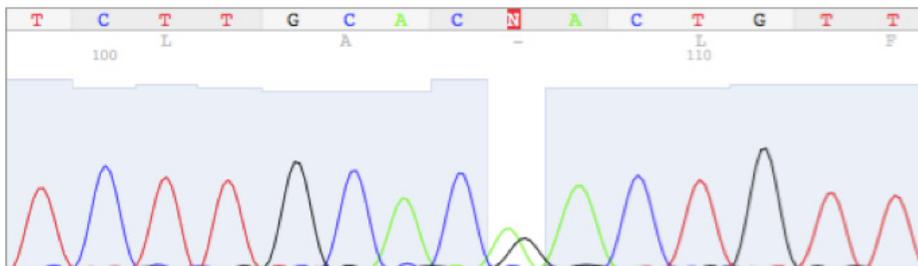


Figura 58: Polimorfismo en el intrón 5 del gen COL4A3 de la paciente 7886.

La mutación **IVS 16+14 T>C** es la sustitución en homocigosis de timina por citosina en la posición +14 del intrón 16, que no ha sido descrita.

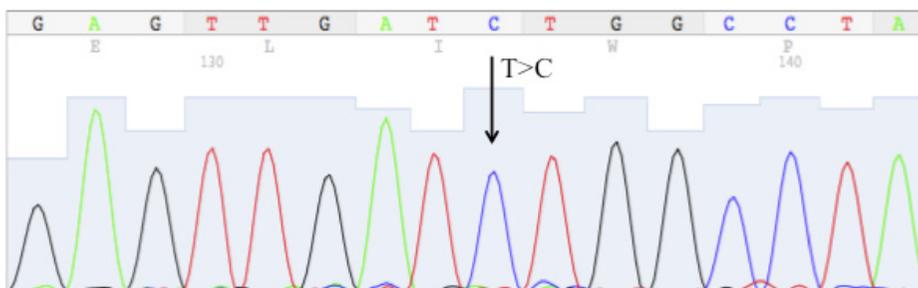


Figura 59: Mutación en homocigosis en el intrón 16 del gen COL4A3 de la paciente 7886.

Finalmente, la mutación **IVS 46-69 C>T** es la sustitución en homocigosis de citosina por timina en la posición -69 del intrón 47, del que no se tiene constancia en la literatura.

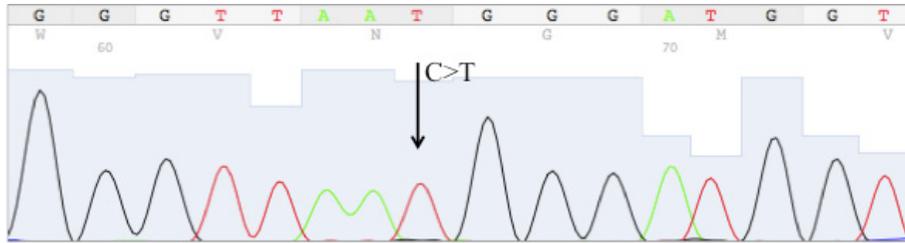


Figura 60: Mutación en homocigosis en el intrón 47 del gen COL4A3 de la paciente 7886.

3.4. FAMILIA 4

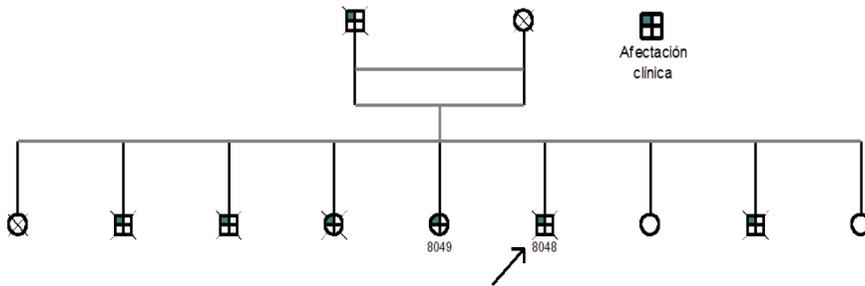


Figura 61: Árbol genealógico del paciente 8048.

El probando es un varón caucásico, natural de la provincia de Salamanca (Castilla y León, España), que falleció a los 54 años debido a las complicaciones de un episodio de sepsis de origen abdominal. Presentaba hipoacusia neurosensorial para tonos altos desde los 5 años de edad. A los 50 años se detectó la presencia de HTA, microhematuria y proteinuria de 1,9 g/día, junto con ERC, que evolucionó de forma rápida hasta llegar a ERCT dos años después, momento en que comenzó hemodiálisis. No se realizó biopsia renal, puesto que el paciente ya presentaba ERC en el momento del inicio del seguimiento clínico. Nunca sufrió alteraciones oculares.

El paciente procedía de una familia de 9 hermanos, cuyos padres estaban emparentados.

El padre era sordomudo y presentaba ERC, que no evolucionó a ERCT. No se estudió la existencia de hematuria, proteinuria ni alteraciones oculares.

La madre padeció diabetes mellitus tipo 2 y nunca tuvo enfermedad renal ni otra sintomatología relacionada con el SA.

La hermana mayor presentaba hipoacusia neurosensorial para tonos altos desde la infancia. Falleció a los 50 años a causa de una hemorragia cerebral. No presentaba alteraciones renales, oculares ni HTA.

Los tres hermanos siguientes, dos varones y una mujer fallecieron en la infancia por causa desconocida. Los tres presentaban hipoacusia neurosensorial.

La quinta hermana es la paciente 8049. Se trata de una mujer de 68 años de edad, que presenta HTA y diabetes mellitus tipo 2 desde los 53. A los 61 años fue diagnosticada de hipoacusia neurosensorial para tonos agudos, así como de ERC, con una TFG en torno a 50 ml/min, que se ha mantenido estable desde entonces. Se constató la presencia de hematuria microscópica y una cifra de proteinuria en torno a 0,2 g/día a la edad de 62 años. No presenta alteraciones oculares.

El octavo hermano presentaba sordera neurosensorial para tonos altos desde los 4 años de edad. A los 39 años presentó proteinuria en rango nefrótico (3,9 g/día), hematuria macroscópica y ERC, que evolucionó hasta ERCT a los 53 años, momento en que inició hemodiálisis. Falleció dos años después por complicaciones derivadas de la ERCT.

Nunca presentó HTA ni trastornos oculares.

Las dos hermanas restantes no presentan enfermedades reseñables.

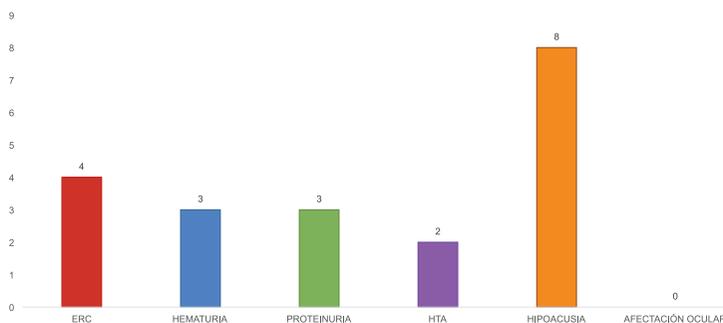


Figura 62: Distribución de los síntomas de la familia 4.

En esta familia el síntoma predominante es la hipoacusia neurosensorial, pero carecemos de datos concretos de la edad de debut de la misma puesto que la mayoría de enfermos fallecieron en la infancia y los datos no constaban en las historias clínicas.

La clínica del enfermo, los antecedentes familiares y el hecho de la consanguinidad de los padres hizo pensar en la existencia de un SAAR, por lo que

se estudiaron los genes COL4A3 y COL4A4. En la Tabla 15 se muestra un resumen de las alteraciones encontradas en esta familia.

Tabla 15: Mutaciones localizadas en el paciente 8048

COL4A3	COL4A4
c.485A>G; p.E162G	IVS 10-39 T>C
IVS 30-66 C>T	IVS 37-61 G>T
IVS 39-4 Del TT	IVS 38 +40 C>A

El estudio del gen COL4A3 mostró la mutación **c.485A>G; p.E162G**, que se localiza en la región codificante y que aparece también en los probandos de las familias 1, 5 y 8. Se considera un polimorfismo.

Asimismo, encontramos las mutaciones intrónicas **IVS 39-4 Del TT** e **IVS 30-66 C>T**, que aparece también en los casos 5, 6, 7 y 8, y que no ha sido comunicada hasta el momento.

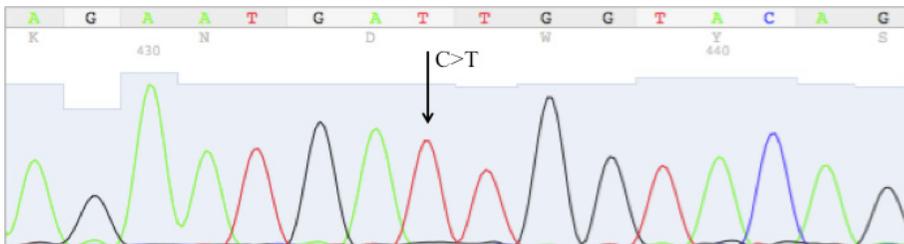


Figura 63: Mutación en el intrón 31 del gen COL4A3 del paciente 8048.

El estudio del gen COL4A4 no reveló ninguna mutación en la región codificante, pero sí tres mutaciones intrónicas localizadas lejos de las secuencias canónicas de maduración del ARN, por lo que fueron consideradas polimorfismos.

La mutación **IVS 10-39 T>C** es una sustitución puntual en homocigosis de timina por citosina en la posición -39 del intrón 11, que no está descrito en la literatura.

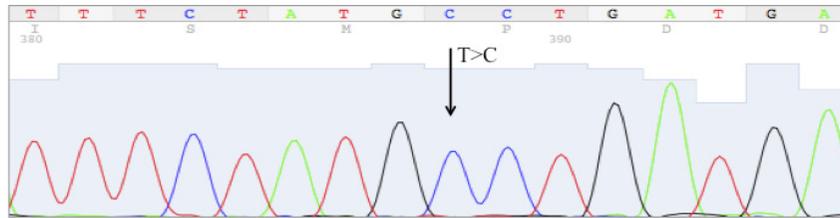


Figura 64: Mutación en el intrón 11 del gen *COL4A4* del paciente 8048.

La mutación **IVS 37-61 G>T** es el cambio en heterocigosis de guanina por timina en la posición -61 del intrón 38. No ha sido descrito previamente.

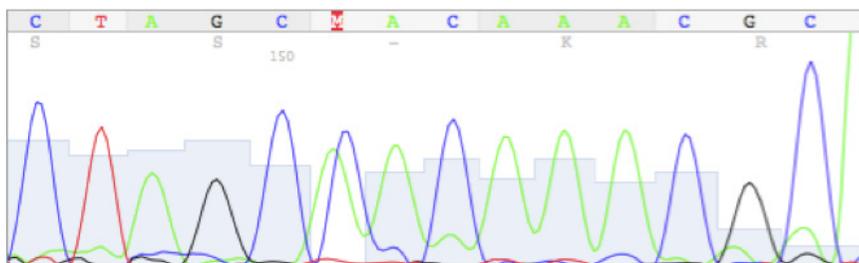


Figura 65: Mutación en intrón 38 del gen *COL4A4* del paciente 8048.

Finalmente, la mutación **IVS 38 +40 C>A** es una sustitución puntual en heterocigosis de citosina por adenina en la posición +40 del intrón 38, no descrito.

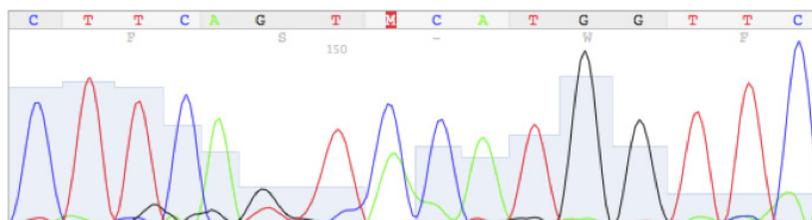


Figura 66: Segunda mutación en el intrón 38 del gen *COL4A4* del paciente 8048

3.5. FAMILIA 5

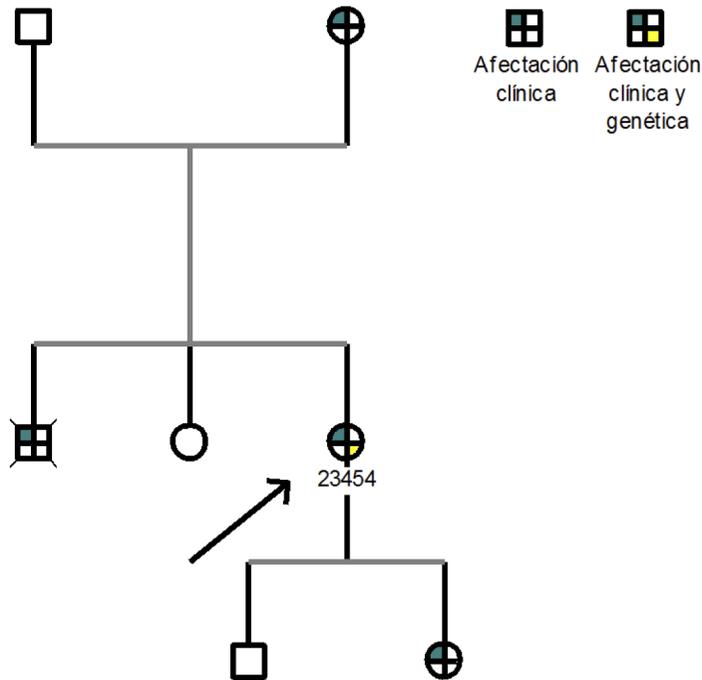


Figura 67: Árbol genealógico de la paciente 23454.

El caso índice es una mujer caucásica de 49 años, natural de la provincia de Segovia (Castilla y León, España) que seguía revisiones periódicas en la consulta general de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

A los 6 años fue diagnosticada de hipoacusia neurosensorial para tonos agudos, que progresó hasta la necesidad actual de audífonos. A los 28 años comenzó a ser estudiada en la consulta de Nefrología del hospital de Segovia por presentar, en una revisión rutinaria a causa de un embarazo, microhematuria, proteinuria de 0,5 g/día y deterioro de la función renal, con una TFG de 40 ml/min. Desde entonces presentó episodios de microhematuria, tanto espontánea como tras infecciones de diversa índole. Asimismo, la proteinuria se ha mantenido estable y la TFG oscila entre 40-50 ml/min. Nunca se ha realizado una biopsia renal debido al deterioro de la TFG que presentaba al inicio del seguimiento.

Posteriormente ha sido controlada en el Hospital Universitario de Salamanca, donde se diagnosticó de HTA a los 47 años y a los 48 se realizó un examen ocular al referir pérdida de visión en el ojo derecho. Dicho examen evidenció la existencia de una cicatriz atrófica pigmentada temporal inferior con afectación macular.

Su madre presentaba sordera desde la juventud, así como ERC, con hematuria y proteinuria. Su hermano sufrió ERCT de causa no filiada desde la adolescencia, recibió tratamiento con hemodiálisis durante 6 años y, posteriormente, recibió un trasplante renal de cadáver. Falleció a causa de las complicaciones de la hepatitis C que padecía. Presentaba hematuria y proteinuria, pero no padecía hipoacusia.

La hija de la paciente presenta hipoacusia neurosensorial desde la infancia, de probable origen congénito.

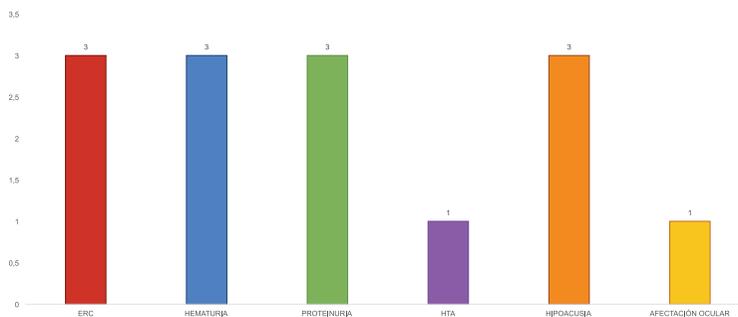


Figura 68: Distribución de los síntomas de la familia 5.

Los datos clínicos y familiares de la enferma sugieren que padece un SAAD, por lo que se estudió el gen COL4A3, pero, al no hallar ninguna mutación patogénica en él, se realizó el análisis del gen COL4A4 (Tabla 16):

Tabla 16: Mutaciones halladas en la paciente 23454

COL4A3	COL4A4
IVS 5+73 C>T	IVS 12+30 G>A
IVS 4-41 INSG	c.4267C>T; p.P1423S
c.485A>G; p.E162G	
c.1721C>T; p.P574L	
IVS 30-66 C>T	
IVS 39-4 Del TT	

El estudio del gen COL4A3 mostró dos mutaciones en regiones codificantes: la mutación **c.485A>G; p.E162G**, presente también en los casos 1, 4 y 8 y la mutación **c.1721C>T; p.P574L**, que corresponde al cambio puntual de citosina por timina en la posición 1721, codificada por el exón 25. Esta mutación genera la sustitución de prolina por leucina en la posición 574 de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV. Corresponde a una sustitución no-glicina del dominio colágeno. Ha sido descrito como polimorfismo de la región codificante por Heidet et al (2001)⁴⁴.

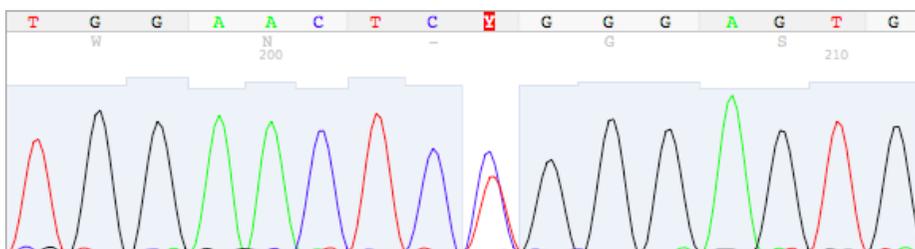


Figura 69: Polimorfismo en el exón 25 del gen COL4A3 de la paciente 23454.

Además de estas mutaciones en la región codificante del gen COL4A3, hemos encontrado cuatro mutaciones intrónicas. La ya descrita mutación **IVS 39-4 Del TT**, presente en todos los casos y la mutación **IVS 30-66 C>T**, que se detectó también en los casos 4, 6, 7 y 8. La **IVS 5+73 C>T**, también

se ha encontrado en la familia 3, así como la mutación **IVS 4-41 INSG**, ya descrita en las familias 2 y 3.

El estudio del gen COL4A4 puso de manifiesto la existencia de una mutación en el exón 45 del gen, **c.4267C>T; p.P1423S**, producida por la sustitución puntual en heterocigosis de citosina por timina en el exón 45 del gen COL4A4, en la posición 4267, que genera el cambio de prolina por serina en la posición 1423 de la cadena $\alpha 4$ del colágeno IV. Es una mutación de cambio de sentido (missense), que enmarcamos dentro de las variantes no clasificadas, al no estar descrita previamente. En este caso se llevó a cabo un estudio poblacional en 50 individuos sanos (100 alelos), empleando la técnica de heterodúplex, donde no encontramos la mutación en ninguno de ellos. También realizamos estudios “in silico” para predecir el comportamiento teórico de este cambio sobre la proteína. Los programas Polyphen y SNPs 3D predicen que la mutación es patológica (score de 0,989 en Polyphen y de -0,05 en SNPs 3D), mientras que el programa SIFT la considera tolerable.

Con los datos del estudio “in silico” y el estudio poblacional podemos sugerir que esta mutación es la causante del SAAD que padece la paciente. El estudio familiar no pudo realizarse por no disponer de muestras del resto de los familiares.

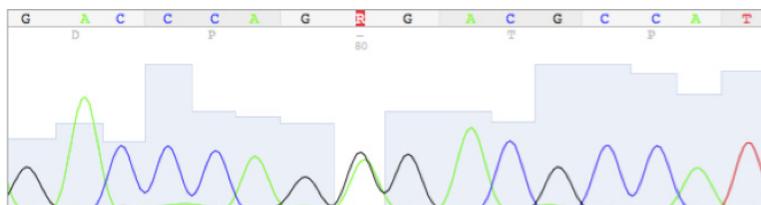


Figura 70: Mutación probablemente patológica en el exón 45 del gen COL4A4 de la paciente 23454.

Además de las mutaciones antes descritas, en este caso se encontró también la mutación intrónica **IVS 12+30 G>A**, que es la sustitución en homocigosis de guanina por adenina en la posición +30 del intrón 12 del gen COL4A4. No está descrita en la literatura.

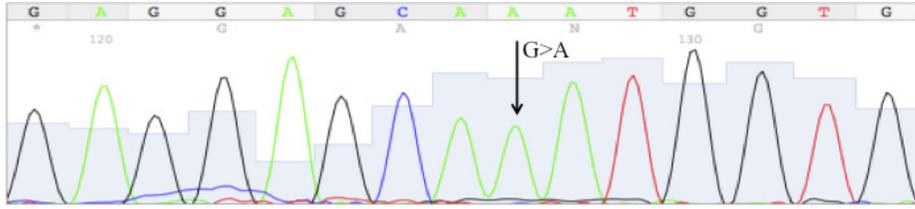


Figura 71: Mutación en el intrón 12 del gen COL4A4 de la paciente 23454.

3.6. FAMILIA 6

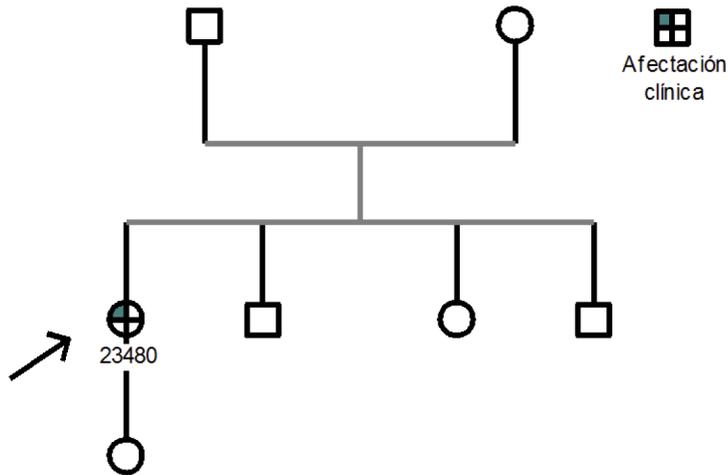


Figura 72: Árbol genealógico de la paciente 23480.

El probando es una mujer caucásica de 51 años, natural de la provincia de Salamanca (Castilla y León, España), que presentó su primer episodio de microhematuria esporádica a los 10 años de edad. Desde entonces fue estudiada en la consulta general de Nefrología del Hospital Universitario de Salamanca.

Presentaba sordera neurosensorial de origen congénito. A los 21 años se diagnosticó de HTA y proteinuria de 0,8 g/día, pero se incrementó progresivamente hasta alcanzar rango nefrótico, estando actualmente en torno a 7 g/día. El conjunto de hallazgos clínicos llevó al diagnóstico de presunción de SA, por lo que se sometió a una biopsia renal con estudio de ME, que reveló un desdoblamiento de la lámina densa de la MBG y signos de esclerosis mesangial difusa. A esa edad también se constató la presencia de macrotrombocitopatía en el 15% de las plaquetas.

A los 40 años comenzó a presentar deterioro progresivo de la TFG, la cual se encuentra actualmente en torno a los 45 ml/min.

La enferma carecía de sintomatología oftalmológica, así como de antecedentes familiares de clínica compatible con SA.

Los hallazgos clínicos y la falta de antecedentes familiares hacen imposible determinar el modo de herencia, puesto que puede tratarse de una mutación esporádica o un SAAR, por lo que se estudiaron los genes COL4A3 y COL4A4 (Tabla 17):

Tabla 17: Mutaciones encontradas en la paciente 23480

COL4A3	COL4A4
c.127G>C; p.G43R	IVS 12-58 A>G
c.1352A>G; p.H451R	IVS 19+21 C>A
c.1721C>T; p.P574L	c.4932C>T; p.F1644F
IVS 30-66 C>T	
IVS 39-4 Del TT	

El estudio del gen COL4A3 puso de manifiesto la existencia de tres mutaciones en la región codificante, todas ellas descritas previamente como polimorfismos poblacionales.

La mutación **c.127G>C; p.G43R** es un polimorfismo ya descrito también presente en las familias 3 y 7.

La mutación **c.1352A>G; p.H451R** es la sustitución en heterocigosis de adenina por guanina en el exón 22, en la posición 1352. El resultado es el cambio de histidina por arginina en la posición 451 de la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV. Ha sido descrito por Heidet et al (2001)⁴⁴ como polimorfismo de la región codificante, al ser una sustitución no-glicina en el dominio colágeno.

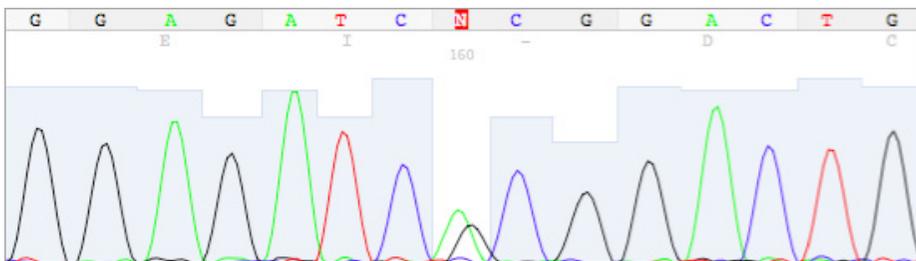


Figura 73: Polimorfismo en el exón 22 del gen COL4A3 de la paciente 23480.

La mutación **c.1721C>T**; **p.P574L** es la sustitución en heterocigosis de citosina por timina en el exón 25, en la posición 1721, que genera el cambio de prolina por leucina en la posición 574 de la proteína resultante. Este cambio está descrito por Heidet et al (2001)⁴⁴ como un polimorfismo de la región codificante, consistente en una sustitución no-glicina en el dominio colágeno.

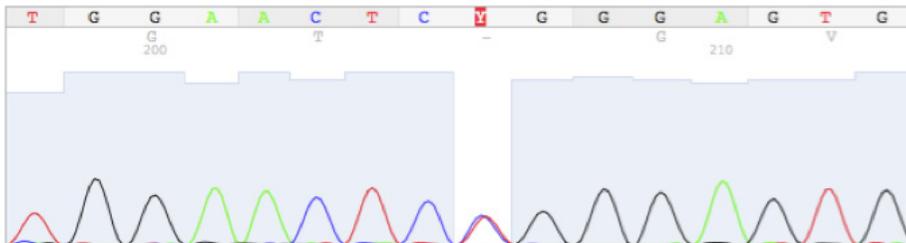


Figura 74: Polimorfismo en el exón 25 del gen COL4A3 de la paciente 23480.

Además de las mutaciones en regiones codificantes se encontraron las mutaciones intrónicas **IVS 30-66 C>T** y **IVS 39-4 Del TT**, ya descritas en otros casos.

El estudio del gen COL4A4 reveló la existencia de una mutación silenciosa en el exón 48 (**c.4932C>T**; **p.F1644F**), que está presente también en los casos 7 y 8 y que ha sido descrita como polimorfismo poblacional por Longo et al (2001)⁴⁷.

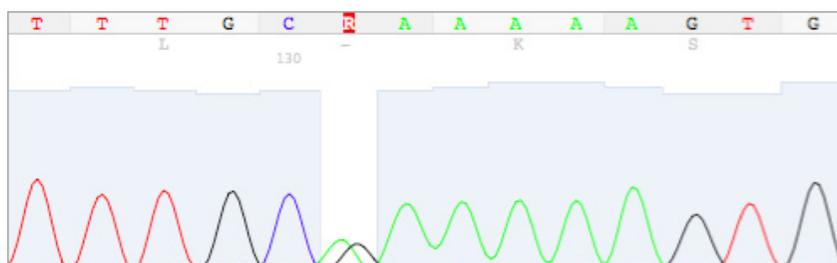


Figura 75: Polimorfismo en el exón 48 del gen COL4A4 de la paciente 23480.

Junto con esa mutación exónica encontramos dos mutaciones intrónicas no descritas previamente. La mutación **IVS 12-58 A>G**, que corresponde a la sustitución en homocigosis de adenina por guanina en la posición -58 del intrón 13, que no se ha descrito previamente.

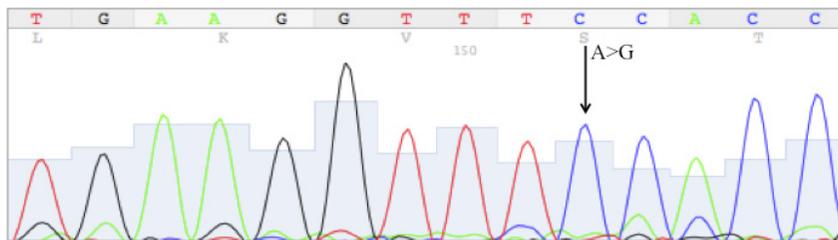


Figura 76: Mutación en homocigosis en el intrón 13 del gen COL4A4 de la paciente 23480.

La mutación **IVS 19+21 C>A** es la sustitución en heterocigosis de citosina por adenina en la posición +21 del exón 19, que no había sido descrita.

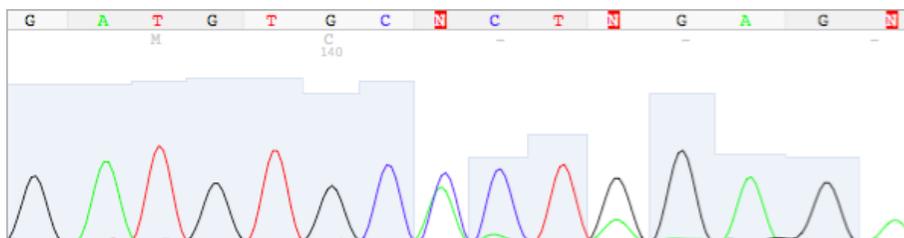


Figura 77: Mutación identificada en el intrón 19 del gen COL4A4 de la paciente 23480.

a 0,1 g/día. Desde los 79 años padecía HTA. A esa edad se sometió a una audiometría, en la que se objetivó hipoacusia neurosensorial para tonos altos. No padecía hematuria ni alteraciones oculares.

En la familia paterna había numerosos antecedentes de hipoacusia, como se aprecia en el árbol genealógico. Estos pacientes no han podido ser estudiados para determinar la presencia de los otros componentes del SA, debido a que algunos han fallecido y otros no residen en la provincia de Salamanca.

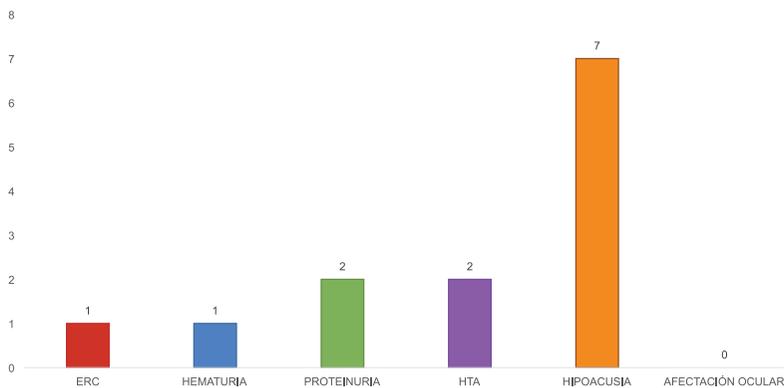


Figura 79: Distribución de la sintomatología en la familia 7.

La clínica del enfermo y el árbol genealógico nos hacían pensar en la presencia de un SAAD, por lo que se estudiaron los genes COL4A3 y COL4A4 (Tabla 18):

Tabla 18: Mutaciones del paciente 23585

COL4A3	COL4A4
c.127G>C; p.G43R	IVS 3+1 G>C
c.422T>C;p.L141P	c.4207T>C; p.S1403P
IVS 30-66 C>T	c.4932C>T; p.F1644F
IVS 32+69 A>G	
IVS 39-4 Del TT	

El estudio del gen COL4A3 mostró la presencia de las mutaciones exónicas **c.127G>C**; **p.G43R**, presente también en las familias 3 y 6 y **c.422T>C**; **p.L141P**, compartida con las familias 1 y 3, y las mutaciones intrónicas **IVS 30-66 C>T** e **IVS 32+69 A>G**. Esta última es consecuencia de un cambio de adenina por guanina en la posición +69 del intrón 32 y no ha sido descrita previamente.

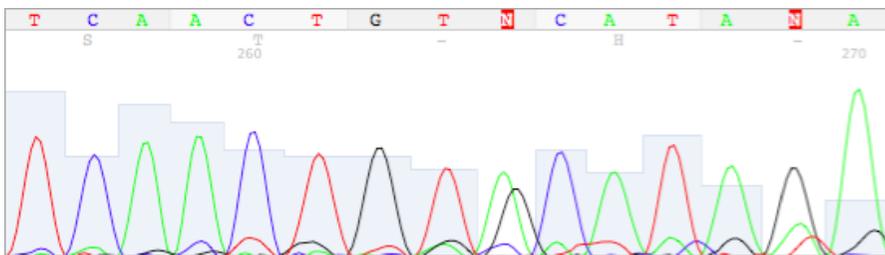


Figura 80: Mutación en el intrón 32 del gen COL4A3 del paciente 23585.

El estudio del gen COL4A4 detectó dos mutaciones exónicas. La mutación **c.4932C>T**; **p.F1644F**, que está presente también en los casos 6 y 8. La mutación **c.4207T>C**; **p.S1403P** es el cambio en heterocigosis de timina por citosina en el exón 44, en la posición 4207, lo que genera el cambio de serina por prolina en la posición 1403 de la cadena $\alpha 4$ (IV). Está descrito por Boye et al (1998)⁴³ como un polimorfismo de la región codificante, al ser una sustitución no-glicina en el dominio colágeno. También está presente en la familia 8.

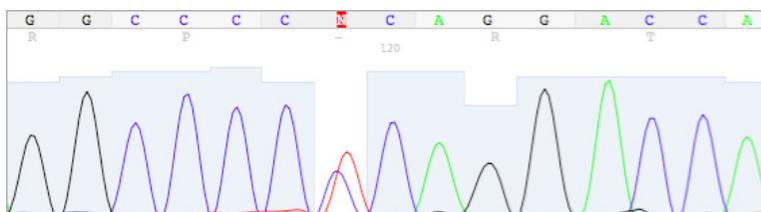


Figura 81: Polimorfismo en el exón 44 del gen COL4A4 del paciente 23585.

El estudio de las regiones intrónicas flanqueantes nos permitió carac-

terizar la mutación **IVS 3+1 G>C**, no descrita previamente. Debido a que afecta a la secuencia canónica de procesamiento del ARN debe ser considerada patogénica. La ausencia de ARN nos ha impedido realizar el estudio funcional de la misma. La mutación estaba presente en el paciente índice, pero no en su hermano.



Figura 82: Mutación en la región de splicing del intrón 3 del gen COL4A4 del paciente 23585.

3.8. FAMILIA 8

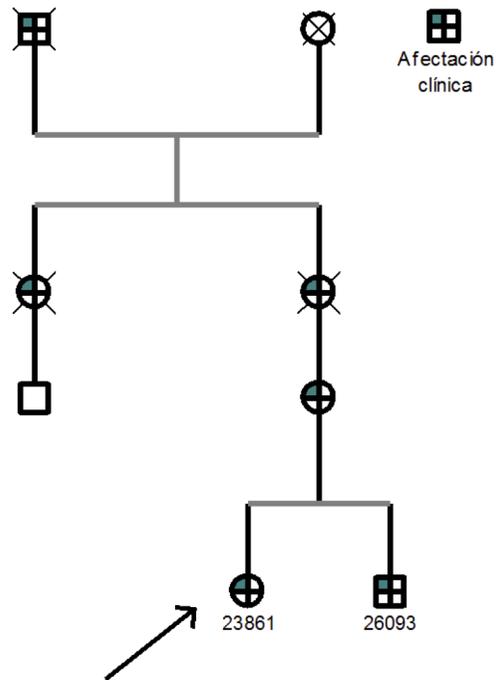


Figura 83: Árbol genealógico de la paciente 23861.

El caso índice es una mujer caucásica de 41 años, natural de Valladolid (Castilla y León, España), estudiada en el Hospital Universitario de Salamanca en las consultas interdepartamentales debido a un episodio de preeclampsia y en el programa de trasplante renal de donante vivo.

La enferma presentó un primer episodio de macrohematuria a los 3 años de edad, coincidente con una infección amigdalal. Desde entonces ha presentado microhematuria casi constante, con episodios de macrohematuria coincidentes con infecciones de diversos tipos. A los 6 años asoció proteinuria de 0,35 g/día, que ha aumentado progresivamente hasta hacerse de rango nefrótico a los 36 años, coincidiendo con la gestación. Se determinó la existencia de hipoacusia neurosensorial para tonos altos de carácter congénito a los 8 años.

Se realizó una biopsia renal a los 22 años, sin ME, por lo que no se llegó a ningún diagnóstico definitivo sobre la naturaleza de la enfermedad renal y fue

diagnosticada de glomerulonefritis crónica. Nunca ha presentado alteraciones oculares. A los 36 años y coincidiendo con la gestación, desarrolló HTA y ERC, que evolucionó de forma rápida, hasta alcanzar la ERCT en 3 años. Actualmente la enferma disfruta de un trasplante renal.

Su hermano (26093) es un varón de 33 años con macrohematuria y proteinuria en rango nefrótico desde los 9 meses de edad. Desarrolló ERC a los 14 años, con deterioro progresivo de la TFG, hasta la entrada en programa de diálisis peritoneal a los 19 años, edad a la que asoció HTA. Fue diagnosticado de hipoacusia neurosensorial al año de edad. Nunca se le ha realizado una biopsia renal y, al igual que su hermana, no presenta alteraciones visuales.

La madre de ambos pacientes presenta microhematuria, proteinuria no nefrótica, HTA e hipoacusia desde la adolescencia. No se ha podido hacer seguimiento clínico, puesto que reside fuera de la provincia de Salamanca.

El bisabuelo materno de la paciente falleció a los 20 años de edad. Estaba aquejado de hipoacusia y ERC, así como sus dos hijas (abuela y tía de la enferma). En estos pacientes no se pudo constatar la existencia de hematuria, proteinuria o alteraciones oculares por haber fallecido.

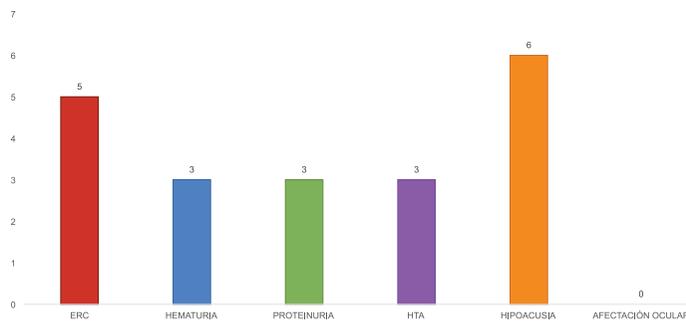


Figura 84: Distribución de la sintomatología de la familia 8.

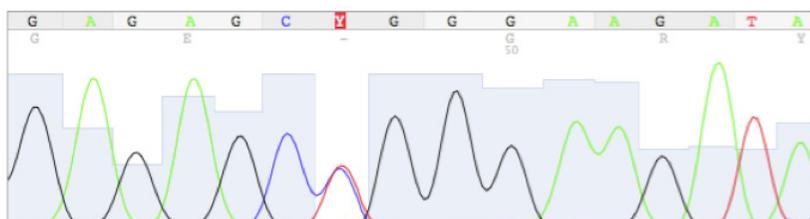
Tanto la clínica como la historia familiar sugieren la presencia de SAAD, por lo que se estudiaron los genes COL4A3 y COL4A4 (Tabla 19):

Tabla 19: Mutaciones aisladas en la paciente 23861

COL4A3	COL4A4
c.485A>G; p.E162G	IVS 17+24 A>T
IVS 30-66 C>T	c.3011C>T; p.P1004L
IVS 39-4 Del TT	c.4207T>C; p.S1403P
	c.4932C>T; p.F1644F

El estudio del gen COL4A3 mostró la presencia de la mutación codificante **c.485A>G; p.E162G**, presente también en los casos 1, 4 y 5, así como las mutaciones intrónicas **IVS 30-66 C>T** e **IVS 39-4 Del TT**.

El estudio del gen COL4A4 puso de manifiesto que la paciente era portadora de tres mutaciones exónicas consideradas polimorfismos y ya descritas previamente. Las mutaciones **c.4932C>T; p.F1644F** y **c.4207T>C; p.S1403P** están presentes en otros pacientes de nuestro trabajo. La mutación **c.3011C>T; p.P1004L** es la sustitución puntual en heterocigosis de citosina por timina en el exón 33, en la posición 3011, que genera el cambio de prolina por leucina en la posición 1004 de la cadena $\alpha 4$ del colágeno IV. Está descrito por Boye et al (1998) como polimorfismo de la región codificante, al ser una sustitución no-glicina en el dominio colágeno⁴³.

**Figura 85:** Polimorfismo en el exón 33 del gen COL4A4 de la paciente 23861.

También hemos encontrado una mutación intrónica no descrita previamente: **IVS 17+24 A>T** es la sustitución en homocigosis de adenina por timina en la posición +24 del intrón 17, que no está descrita.

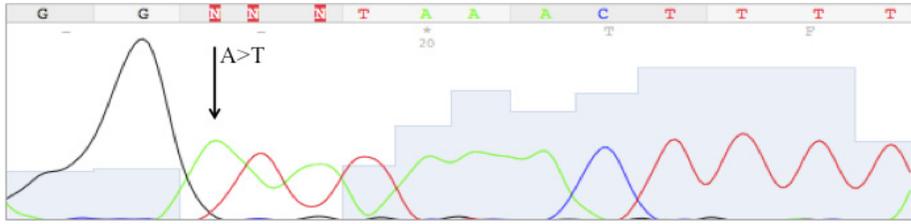


Figura 86: Mutación en el intrón 17 del gen COL4A4 de la paciente 23861.

Discusión

Las dos grandes entidades clínicas asociadas a trastornos de la membrana basal glomerular son la nefropatía de la membrana basal delgada o HFB, que es la causa más frecuente de enfermedad renal hereditaria, pudiendo afectar hasta al 1% de la población y el SA.

La HFB se define por un adelgazamiento de la membrana basal del glomérulo asociada a hematuria y mínima proteinuria, con una función renal normal, que se hereda con un patrón autosómico dominante. No obstante, el diagnóstico es difícil ya que se basa en la ausencia de hallazgos como proteinuria, insuficiencia renal o síntomas extrarrenales. El SA es una nefropatía hereditaria caracterizada por una glomerulonefritis que progresa a insuficiencia renal, con cambios ultraestructurales típicos en la membrana basal acompañados de hematuria, que se asocia con frecuencia a hipoacusia y lesiones oculares.

El colágeno tipo IV es el componente principal de las membranas basales; está formado por seis cadenas diferentes, $\alpha 1$ - $\alpha 6$, codificadas por genes diferentes pero homólogos que están localizados por parejas en direcciones opuestas. Las cadenas $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se expresan en la membrana basal de los glomérulos. Desde el punto de vista genético, el síndrome es heterogéneo y puede ser causado por mutaciones en los tres genes que codifican las diferentes cadenas del colágeno tipo IV ($\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$) que forman parte de la membrana basal de los glomérulos. Cada uno de estos genes está formado por unos 50 exones, lo que dificulta hasta el momento su estudio sistemático. Tanto la HFB como el SA se asocian con mutaciones en los genes que codifican las cadenas del colágeno. La HFB se hereda con un patrón autosómico dominante, y se asocia con mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4, mientras que la forma de transmisión más frecuente del SA es la ligada al sexo (SALX), asociada con mutaciones en el gen COL4A5 (80% de los casos). No obstante, hasta el 20% de los casos de SA se heredan con un patrón autosómico (SAAD o SAAR) y son consecuencia de mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4.

En nuestro trabajo, nos hemos centrado en el estudio de los casos de SA diagnosticados en el Servicio de Nefrología del Complejo Hospitalario de Sa-

lamanca entre los años 2000 y 2011 con un patrón de herencia autosómico. La revisión retrospectiva de los casos de este periodo nos ha permitido contactar con 8 probandos que presentaban un patrón de herencia autosómico, uno de ellos no presentaba antecedentes familiares, pero fue incluido en el estudio por sus características clínicas. En el estudio hemos incluido una paciente con HFB (familia 2).

Aunque clásicamente se ha admitido que el SAAD representa solo un 5% de los casos de SA, la mayor parte de los pacientes incluidos en nuestra serie pertenecen a familias en las que las manifestaciones clínicas, principalmente la sordera, se transmiten con un patrón de herencia autosómico dominante. La razón de la importante disparidad entre nuestros resultados y la literatura puede residir en que, en realidad, el SAAD está infradiagnosticado en la población general debido a la elevada variabilidad fenotípica intrafamiliar. Así, en una misma familia se dan casos de pacientes con una mínima expresión de la enfermedad, que hace que esta pase desapercibida, mientras que otros presentan una forma grave, con manifestaciones tempranas y rápida progresión a ERCT, lo que puede dar lugar al diagnóstico erróneo de SAAR, por lo que su prevalencia estaría falsamente incrementada, ya que muchos de estos casos presentarían, en realidad, una forma de herencia AD. También puede influir que pacientes con SA, a los que no se les realiza una biopsia renal y que presentan manifestaciones auditivas u oftalmológicas larvadas, sean diagnosticados de glomerulonefritis crónica, lo que puede justificar la disparidad en la prevalencia de nuestros resultados con lo publicado.

Hasta el momento no se han descrito ni en SAAD ni en SAAR diferencias clínicas dependiendo del sexo del paciente². En nuestro estudio predomina la afectación en el sexo femenino; sin embargo, el reducido tamaño de la muestra hace imposible extraer ninguna conclusión significativa respecto a este hecho.

Los enfermos incluidos en nuestro trabajo presentan una mediana de edad de diagnóstico de la enfermedad relativamente temprana (en torno a 31 años), teniendo en cuenta que se trata, en su mayoría, de casos de SAAD y que

los pacientes con este patrón de herencia suelen tener una edad de debut de la enfermedad más tardía que los pacientes con SALX y SAAR⁶. La causa de esta disparidad puede estribar en que, según lo expuesto anteriormente, los pacientes con SAAD presentan una clínica indolente que, en ocasiones, puede pasar desapercibida, por lo que muchas veces no son diagnosticados.

La hematuria fue el síntoma de presentación de la enfermedad en la totalidad de nuestros probandos y, junto con la hipoacusia, uno de los primeros en aparecer. Por lo tanto, la hematuria debe ser un signo de alerta en el diagnóstico de SA, tanto para el médico de Atención Primaria como para el Nefrólogo, independientemente de que el paciente tenga o no antecedentes familiares. Sería interesante realizar programas de formación en Atención Primaria, con el objetivo de conseguir una derivación temprana a la consulta de Nefrología de los pacientes con hematuria, para poder realizar un diagnóstico precoz del SA que permitiera instaurar medidas terapéuticas que retrasaran el deterioro de la función renal y mejoraran el pronóstico^{139,140,141}.

La proteinuria, aunque apareció a una edad más tardía que la hematuria, también estuvo presente en todos los pacientes en el momento del diagnóstico. Esto puede ser debido a que se realizó un diagnóstico tardío. En nuestro estudio, la proteinuria no alcanzó el rango nefrótico, lo que es concordante con lo publicado en otros estudios².

A pesar de que la mayoría de los enfermos presentó un modo de herencia AD, la ERC se dio en un elevado porcentaje y con un inicio relativamente temprano en comparación con los pacientes aquejados de SAAD estudiados por otros grupos, que sugieren que el deterioro de la función renal es un hallazgo raro en estos casos y que su inicio se da en torno a los 45-60 años¹⁴¹. Esta disparidad de resultados con los de nuestra serie puede ser debida a que los pacientes con clínica indolente pasan desapercibidos y sus familias son etiquetadas con un patrón de herencia recesivo. Nuestros resultados sugieren que la expresión fenotípica de las formas con herencia autosómica dominante (SAAD) podría

ser similar a la de las formas con herencia recesiva o ligada al cromosoma X. En nuestra muestra, la ERC estuvo presente en el momento del diagnóstico en un elevado porcentaje de los enfermos, lo que puede ser debido a que la hematuria y la proteinuria, al darse en edades relativamente tempranas, contribuyeron a la rápida instauración y progresión de la ERC, y también a que el diagnóstico se realizó de forma tardía, una vez que el daño renal ya estaba establecido.

Aunque no existe un tratamiento curativo para el SA, el diagnóstico temprano de la enfermedad brinda la posibilidad de instaurar medidas adyuvantes como los ISRAA^{115,139,140,141}, que, mediante el control de la proteinuria pueden enlentecer la progresión de la enfermedad renal y así postergar, en la medida de lo posible, la necesidad de terapias sustitutivas, con la consiguiente mejoría en el pronóstico renal y vital de los enfermos.

Nuestros pacientes presentaron una elevada prevalencia de HTA, que, en la mayoría de ocasiones, estaba presente en el momento del diagnóstico. En la literatura no hay datos sobre la prevalencia de esta manifestación clínica en el SA, siendo considerada un rasgo tardío asociado a la insuficiencia renal⁶⁸. El elevado número de casos de nuestra serie que presentaban HTA en el momento del diagnóstico apoya la idea del diagnóstico tardío de la enfermedad, cuando ya son evidentes los signos de nefropatía avanzada.

La hipoacusia neurosensorial bilateral para tonos agudos fue el síntoma de aparición más temprana en nuestra serie y estuvo presente en la mayoría de los enfermos. Su prevalencia real es desconocida, ya que la realización de audiometrías no es una práctica rutinaria¹⁴². Sin embargo, la mayoría de nuestros pacientes se había sometido a esta prueba diagnóstica, a pesar de lo cual el diagnóstico clínico se demoró hasta etapas más tardías en las que ya eran evidentes los signos de afectación renal. Este hecho nos lleva a incidir en la importancia de tener en consideración la hipoacusia neurosensorial como síntoma guía para el diagnóstico de SA en las nefropatías que cursan con hematuria y proteinuria, ya que su presencia en estos casos es muy sugestiva de este trastorno genéti-

co^{142,143}. Así, la audiometría debería ser, junto con la revisión oftalmológica y la biopsia renal con estudio de la MBG al ME, una prueba diagnóstica imprescindible a incorporar en el estudio de las hematurias. En la mayoría de las series la hipoacusia se observa en la infancia tardía o en la adolescencia en los pacientes con SAAR, (que son minoría en nuestra serie), mientras que en los casos de SAAD se manifiesta en la edad adulta^{1,2}. Sin embargo, entre nuestros enfermos, la mayoría presentó un modo de herencia AD y fueron diagnosticados de hipoacusia a una edad temprana, lo que puede explicarse por la importante variabilidad clínica que presenta este tipo de herencia.

No podemos descartar que las alteraciones auditivas de nuestros pacientes no estén ligadas al trastorno renal y que, por lo tanto, nos encontremos ante verdaderos SA con patrón de herencia AR. Sin embargo, la correlación que hemos encontrado entre los portadores de las diferentes mutaciones y la alteración sensorial auditiva nos inducen a pensar que esta alteración forma parte del SA de nuestros pacientes.

En nuestra serie las alteraciones oculares estaban presentes exclusivamente en pacientes con herencia AD, lo que está en contradicción con lo comunicado hasta el momento por otros grupos, que sugieren que estas alteraciones se reducen casi exclusivamente a formas ligadas al cromosoma X y a las AR^{140,141}. La razón puede ser que muchas series de pacientes aquejados de SAAD son etiquetados erróneamente como enfermos de SAAR debido a que sus familiares presenten una clínica tan leve que pasan desapercibidos, por lo que las manifestaciones clínicas del SAAD no son tan benignas como tradicionalmente se piensa. De este modo, se debería incluir un examen oftalmológico en el estudio de todo paciente sospechoso de padecer SA para intentar establecer un diagnóstico de la enfermedad lo más precoz posible.

La biopsia renal es una herramienta fundamental para establecer el diagnóstico clínico del SA, ya que el estudio de la MBG al ME pone de manifiesto la presencia de alteraciones patognomónicas de la enfermedad⁶². La realización

de esta técnica en los pacientes con hematuria y proteinuria que se someten a una biopsia renal proporcionaría un diagnóstico clínico de certeza de la enfermedad, que podría ser completado con un diagnóstico genético que indicara la mutación responsable. Nuestra serie pone de manifiesto la escasa frecuencia con la que se realizan biopsias renales a estos enfermos, y la casi total ausencia de estudios de ME, lo que lleva, en los pocos pacientes sometidos a biopsias renales, a diagnósticos anatomopatológicos erróneos, del tipo “glomerulonefritis crónica” o “glomerulonefritis sin filiar”. Esta razón hace que sea necesario instruir al clínico en la necesidad de realizar biopsias renales con estudio de la MBG al ME, lo que proporcionaría un diagnóstico clínico temprano y certero y evitaría posibles tratamientos innecesarios.

El estudio genético familiar facilita la detección de portadores en edades tempranas y permite el posterior control del desarrollo de la enfermedad. No obstante, hasta el momento no se ha encontrado una correlación entre la localización de las diferentes mutaciones y las características fenotípicas de los pacientes. Es más, dentro de una familia, los portadores de mutación no presentan las mismas características fenotípicas. Esto puede observarse claramente en la familia 1 incluida en nuestro trabajo, en la que, aunque hay 6 miembros portadores de la mutación, solo dos presentan afectación renal, siendo la alteración auditiva la manifestación clínica más frecuente. En la familia 3 solo dos de los tres individuos estudiados presentan alteración auditiva, aunque todos tienen alteraciones renales. Esta falta de correlación entre las alteraciones genéticas y las manifestaciones pone de manifiesto que, aunque la alteración genética en los genes COL4A3 y COL4A4 es imprescindible para el desarrollo de la enfermedad, otros genes deben de estar implicados en la misma modulando las manifestaciones fenotípicas.

En nuestro trabajo hemos estudiado la presencia de mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4 mediante amplificación por PCR de todos los exones de ambos genes y posterior detección de cambios de movilidad electroforética

en análisis de heterodúplex. En aquellos casos en los que hemos encontrado cambios en la movilidad de los fragmentos amplificados hemos procedido a su secuenciación. Esta técnica no permite detectar el 100% de las mutaciones y podría explicar que en las familias 4, 6 y 8, con un diagnóstico evidente de SAAD o SAAR, no hayamos detectado ninguna mutación.

En nuestra serie hemos incluido una familia (familia 2) diagnosticada de HFB en la que no hemos encontrado ninguna mutación en los genes COL4A3/COL4A4. Un 40% de los pacientes con esta enfermedad pueden ser portadores heterocigotos de mutaciones en los genes COL4A3/A4¹³⁷, pero no todos los casos presentan alteraciones en estos genes. Recientemente se ha descrito que mutaciones en el gen CFHR5, que codifica una proteína del complemento, se asocian con glomerulopatía con hematuria y riesgo de progresar a ERC⁹⁷. Por lo tanto, la no detección de mutación en esta paciente puede ser debido a la limitación de la técnica o a que sea portadora de mutación en un gen no incluido en nuestro estudio.

En el caso de la probando de la familia 6, la ausencia de mutaciones en los genes COL4A3/COL4A4 puede ser consecuencia de la limitación de la técnica, pero también puede tratarse de una entidad clínica diferente al SA. Se han descrito macrotrombocitopenias asociadas con microhematuria secundarias a mutaciones en el gen MYH9. Existen tres entidades clínicas, los síndromes de May-Hegglin, Fechtner y Epstein que comparten alteraciones ultraestructurales con el SA y se pueden asociar con trastornos auditivos y remedar este síndrome¹⁴³. Hasta el momento hemos realizado un estudio parcial del gen MYH9 y no hemos encontrado mutación en las regiones habitualmente mutadas en estas entidades clínicas. Por falta de financiación no hemos podido terminar este estudio.

En cuatro familias hemos encontrado mutaciones en heterocigosis asociadas a manifestaciones fenotípicas propias del SA. La mutación en el gen COL4A3 c.345delG; pG115Gfsx37, que se ha encontrado en la familia 1, está localizada en el dominio aminoterminal y da lugar a una proteína truncada que

carece del dominio de trimerización, por lo que se dificultaría la formación de la red $\alpha3\alpha4\alpha5$ que desempeña un papel crítico durante la embriogénesis y es responsable de la integridad de la membrana basal glomerular. La mutación aparece en heterocigosis y todos los individuos portadores de la misma presentan alguna alteración fenotípica, por lo que pensamos que el patrón de herencia es autosómico dominante. No obstante, excepto la probando y su hijo, que presentan alteraciones renales, el resto de familiares portadores de la mutación presenta sordera como único componente del síndrome.

En este gen se ha encontrado una segunda mutación c.5235G>T; p.G1412V ya descrita previamente (Tazón Vega et al. 2003), que se localiza dentro del dominio de unión al epitelio y próxima a la zona de unión a la integrina. La familia 3, portadora de la mutación, presenta un patrón bien definido de herencia autosómica dominante con afectación del padre y dos hermanos. No obstante, en este caso también existen diferencias fenotípicas entre los familiares; así, mientras que la alteración renal ha permanecido estable en el padre, ha evolucionado a ERCT en los dos hijos, poniendo de manifiesto la importante variabilidad de las manifestaciones clínicas asociadas a mutaciones en estos genes.

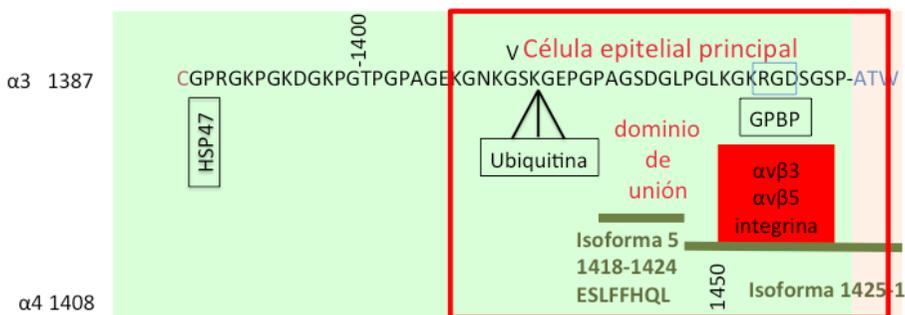


Figura 87: Región en la que se localiza la mutación p. G1412V y dominios situados en dicha zona.

En el gen COL4A4 hemos encontrado una mutación en el intrón 3. Aunque la mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento en los genes

COL4A3 y COL4A4 son mutaciones de cambio de sentido (*missense*), también se han descrito mutaciones intrónicas que modifican la maduración (*splicing*) del ARN. La mutación IVS 3+1 G>C del gen COL4A4 modifica el procesamiento del ARN al afectar a una de las secuencias canónicas de procesamiento. La ausencia de ARN procedente del probando portador de la mutación nos ha impedido determinar si la mutación supone la incorporación del intrón 3 o la pérdida del exón 3 a la secuencia codificante. En cualquiera de los dos casos, probablemente se produzca un cambio en la fase de lectura y un codón de parada prematuro que, como en el caso anterior, produciría una proteína incapaz de trimerizar adecuadamente. En la figura 88 mostramos el cambio de fase de lectura que se produce si se pierde el exón 3 o si se gana el intrón 3. Ambos casos dan lugar a un codón de parada prematuro que genera una proteína truncada.

a)

**Met WSLHIVL Met RCSFRLTKSLATGPWSLILIL
FSVQYVYGS GKKYIGPCGGRDCSVCHCVPEK GSR**

b)

Met WSLHIVL Met RCSFRLTKSLATGP Stop

c)

**Met WSLHIVL Met RCSFRLTKSLATGPWSLILILF
SVQYVYGVSTFTSSGCVVKIHFIECIIFVILSKKSPS
GTQFSYL Stop**

Figura 88: A) Secuencia inicial de la proteína COL4A4 en condiciones normales. B) Secuencia de la proteína COL4A4 sin el exón 3. C) Secuencia de la proteína COL4A4 con el intrón 3.

La familia portadora de esta mutación (familia 7) presenta un claro patrón de herencia autosómico dominante si tomamos como referencia el trastorno auditivo. De manera similar a las otras familias portadoras de mutación, en este caso hemos encontrado una gran variabilidad fenotípica y así, mientras el

probando presenta afectación renal pero no es portador de alteraciones auditivas ni oculares, el resto de familiares presenta trastornos auditivos, pero no renales. El padre presenta alteración renal crónica sin hematuria ni proteinuria, que no permite hacer un diagnóstico clínico definitivo de SA. No obstante, al ser portador de la mutación y presentar un trastorno auditivo podemos concluir que la enfermedad se transmite con un patrón autosómico dominante. La sordera del hermano, al estar asociada a un colesteatoma, no podemos incluirla dentro del SA.

Finalmente, el estudio del gen COL4A4 en la familia 5 nos ha permitido encontrar una mutación de cambio de sentido (missense) no descrita hasta el momento. La mutación c.4267C>T; pP1423S supone el cambio de una prolina por una serina en una región en la que no se ha descrito ningún dominio específico de la proteína. No obstante, la cadena $\alpha 4$ tiene 26 secuencias Gly-Xaa-Yaa en las que Xaa o Yaa es a menudo prolina o hidroxiprolina que le confieren flexibilidad a la proteína. La prolina 1423 está localizada en una secuencia Glicina-Valina-Prolina.

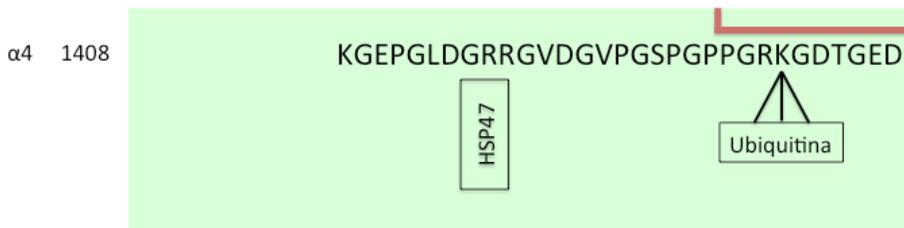


Figura 89: Región de la proteína COL4A4 en la que se localiza la mutación p.P423S.

Una observación intrigante en el estudio del SA en animales de experimentación es la influencia de la cepa de ratón en el desarrollo de la enfermedad. Estas observaciones reflejan que múltiples genes pueden influir en el desarrollo de las características fenotípicas de la misma. Los diferentes genes que contribuyen a un carácter cuantitativo se conocen como loci de caracteres cuantitativos (QTL) y su identificación permite comprender mejor la variabilidad fenotípica de la enfermedad.

En este sentido, es bien conocido que las alteraciones en el colágeno tipo IV no afectan la función glomerular durante los primeros años de vida, pero en algún momento durante la adolescencia aparece proteinuria, que indica los estadios iniciales de la enfermedad glomerular, que acaba progresando a insuficiencia renal. No se conoce bien el porqué de estos cambios. Estudios realizados en ratones, han puesto de manifiesto la implicación de las MMP en la degradación de la membrana basal glomerular. Los glomérulos de los ratones con Alport expresan más MMP-2, MMP-3 y MMP-9 y el tratamiento de estos ratones con inhibidores de las MMP mejoran la progresión de la enfermedad¹⁴⁴. Otro aspecto peculiar de la membrana glomerular en la enfermedad de Alport es la acumulación de lamininas¹⁴⁵. Los ratones knockout para las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$, muestran una acumulación de laminina en la membrana basal glomerular. Una posible explicación a la elevada variabilidad fenotípica encontrada en nuestros pacientes es que variaciones en los genes que codifican estas proteínas actúen como moduladores de las mutaciones en los genes COL4A3 y COL4A4.

La variabilidad fenotípica puede ser por tanto consecuencia de variaciones en otros genes asociados, por lo que la siguiente etapa de nuestro trabajo será analizar si variantes polimorfas de los genes que codifican metaloproteasas, integrinas o lamininas pueden modificar el fenotipo de los pacientes. Por otra parte, en nuestro trabajo hemos encontrado 7 polimorfismos en regiones codificantes del gen COL4A3 y 7 en exones del gen COL4A4, de las que 9 suponen un cambio en el aminoácido. Por motivos económicos no hemos podido analizar la incidencia de estas mutaciones en los familiares de los pacientes (excepto de la familia 1), pero cabe la posibilidad de que la presencia de estas mutaciones pueda modular a las mutaciones patogénicas y ayudar a explicar la variabilidad fenotípica intrafamiliar (en el estudio de la familia 1 se vio que la presencia o ausencia de los polimorfismos no se relacionaba con la enfermedad).

Con el objetivo de explicar esta gran variabilidad en las formas de presentación de estas patologías, hemos sido invitados por el profesor Deltas,

director del Centro de Investigación de Medicina Molecular del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Chipre, a participar en el estudio europeo “*Collaboration on Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy: In search for genetic modifiers*”, que intenta encontrar variantes genéticas en genes distintos a los del colágeno en pacientes con mutaciones heterocigotas de los genes COL4A3 y COL4A4, para buscar asociaciones que lleven a fenotipos leves (HFB) o más agresivos (SA)¹⁴⁶. En este estudio, nuestro grupo colabora con el envío de muestras de ADN de todos los pacientes en los que hemos encontrado una mutación patogénica.

Conclusiones

1. Nuestro trabajo confirma la gran variabilidad fenotípica de los pacientes con Síndrome de Alport, lo que dificulta el diagnóstico de la enfermedad y la asignación de un patrón de herencia bien definido en las familias.

2. En este estudio describimos tres nuevas mutaciones asociadas al Síndrome de Alport. Una delección en el gen COL4A3 que produce una proteína truncada y dos nuevas mutaciones en el gen COL4A4, de las cuales una es intrónica y altera el proceso de maduración del ARN. En ninguna de estas nuevas mutaciones hemos podido encontrar una correlación con las manifestaciones clínicas de los portadores de las mismas.

3. Nuestro trabajo subraya la importancia de realizar biopsias renales y estudio de microscopía electrónica para poder hacer un diagnóstico definitivo del Síndrome de Alport.

4. Nuestros datos confirman que los estudios genéticos permiten identificar individuos portadores dentro de una familia y hacer un seguimiento más riguroso de los mismos; permiten descartar a los portadores como donantes en trasplante renal y, además, permitiría realizar una selección de embriones en casos concretos.

Artículos

Los resultados del análisis clínico y las mutaciones encontradas han sido publicados en tres artículos en revistas científicas indexadas en el *Journal Citation Reports*. Las referencias completas de dichas publicaciones son las siguientes:

1. **Rosado C**, Bueno E, Felipe C, Valverde S, González-Sarmiento R. Study of the True Clinical Progression of Autosomal Dominant Alport Syndrome in a European Population. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(4):435-42.

2. **Rosado C**, Bueno E, Fraile P, García-Cosmes P, González-Sarmiento R. A new mutation in the COL4A3 gene responsible for autosomal dominant Alport syndrome, which only generates hearing loss in some carriers. *Eur J Med Genet.* 2015 Jan;58(1):35-8.

3. **Rosado C**, Bueno E, Felipe C, González-Sarmiento R. COL4A4 gene study of a European population: description of new mutations causing autosomal dominant Alport syndrome. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2014 Dec 15;5(4):177-84.

Original Paper

Study of the True Clinical Progression of
Autosomal Dominant Alport Syndrome in
a European PopulationConsolación Rosado^{a,b} Elena Bueno^{a,c} Carmen Felipe^b Sebastián Valverde^d
Rogelio González-Sarmiento^{a,c}^aMolecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca; ^bNephrology Unit, Care Complex of Ávila, SACYL, Ávila; ^cIBSAL and IBMCC, University of Salamanca, CSIC and SACYL, Salamanca; ^dDepartment of Urology, University Hospital, SACYL, Salamanca, Spain

Key Words

Alport syndrome • COL4A3 • COL4A4 • Autosomal dominant inheritance

Abstract

Background/Aims: Autosomal dominant Alport syndrome represents 5% of all Alport syndrome cases. This entity presents a different clinical expression from the recessive inheritance pattern and the X chromosome-linked pattern, because it is mild and it shows a late onset, which in many cases even goes unnoticed. **Methods:** We carried out a descriptive observational and retrospective clinical study on 19 patients from 5 families with a clinical diagnosis of autosomal dominant Alport Syndrome, and we analyzed the expression of the symptoms in the different families, comparing the results with what has been described in the literature. **Results:** Renal involvement appeared at a young age, with a progression towards end-stage chronic kidney disease at a median age of 31 years (20.5-36.5). Hearing involvement also appeared in early stages, at a median age of 28.5 years (7.5-62.5). Also, we observed ocular lenticonus-like injuries, which until now have only been described in other inheritance patterns. **Conclusions:** Our results suggest that dominant patterns are accompanied by a severe clinical expression that can be superimposed to the recessive and X chromosome-linked patterns, contrary to what has been classically stated. The high phenotypic variability observed in the families lead to the fact that many cases go unnoticed and the severest cases are erroneously diagnosed as recessive, which means that the real prevalence of dominant forms is probably higher than the current 5%.

Copyright © 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Autosomal dominant Alport syndrome (OMIM 104200) represents 5% of all cases of Alport syndrome and, with benign familial haematuria and the state of carrier of autosomal recessive Alport syndrome, it makes up the entity called "collagen type IV ($\alpha 3$ - $\alpha 4$)

Consolación Rosado

Nephrology Unit, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Av. Juan Carlos I s/n
05004 Ávila (Spain), Tel. +34-920358000
E-Mail croadorubio@hotmail.com

nephropathy" [1]. These entities are caused by mutations in the *COL4A3* and *COL4A4* genes, which are responsible for the synthesis of the $\alpha 3$ and $\alpha 4$ chains of the collagen IV network. Such mutations alter the production and assembly of this network, which is an essential component in the structure of the glomerular basement membrane of the kidney, the inner ear and the eye [1, 2].

Unlike the recessive and X chromosome-linked patterns, where a severe phenotype can be observed, in the few cases with a dominant pattern, the clinical evolution is less aggressive, the renal symptoms (haematuria and proteinuria) appear at later stages of life, with a slow evolution towards chronic kidney failure which, in very few cases, reaches an end-stage chronic kidney failure [3, 4]. Hearing loss in these cases is also mild and it also appears at adult age.

Lenticonus and maculopathy are the most common ocular injuries in recessive and X chromosome-linked Alport syndrome. However, in dominant cases, retinopathy and cataracts are the only anomalies that have been described [5]. In spite of these common features, there is a high intra-familial phenotypic variability, which is responsible for the fact that no correlations between genotype and phenotype can be established in this inheritance pattern [1]. The low prevalence of dominant cases can be partly due to under diagnoses because, when the phenotype is mild, they can go unnoticed. However, they deserve special attention, because, in some patients, the renal involvement may lead to end-stage chronic kidney disease [3].

In our study we analyze the clinical and phenotypic aspects of the population who has been diagnosed with autosomal dominant Alport syndrome in our hospital in the period 2000-2013, and we compare the results with those of other published series, in order to establish whether the clinical evolution of our patients matches what has been described in the literature.

Patients and Methods

We have carried out a descriptive, observational and retrospective clinical study, in which we have reviewed the clinical record of the patients who were diagnosed with autosomal dominant Alport syndrome and required medical assistance in the department of Nephrology of our hospital in the period 2000-2013.

The diagnosis of Alport syndrome was established when the index patient met at least two of the following criteria [6-8]:

- Positive family record of macro or microscopic hematuria with or without progression to end-stage chronic kidney disease.
- Progressive sensorineural deafness for high tones.
- Characteristic ocular manifestations (lenticonus or maculopathy).
- Compatible renal biopsy findings (laminated glomerular basement membrane).

In the group of patients who met those criteria, we selected those who presented an autosomal dominant inheritance pattern, in which we made an analysis of the *COL4A3* and *COL4A4* by heteroduplex with acrylamide gels, to detect the presence of mutations in exon regions and flanking intronic sequences. PCR fragments showing anomalous migration patterns in that analysis were sequenced on an ABI 3100 genetic analyser in order to find out any pathogenic mutation in these genes, that could confirm the diagnosis of Alport syndrome [9].

In each selected case, we analyzed the clinical and demographic parameters, including sex, family record (with the possible existence of consanguinity), haematuria, proteinuria, hypertension, hearing loss, compatible ocular impairment or chronic kidney disease. We also recorded the degree and age of appearance of these signs and whether they were present at the moment of the clinical diagnosis of the disease.

Statistical method

We carried out a retrospective, descriptive and observational study in which we used the SPSS 20.0 software pack for Mac OS X. Qualitative variables are expressed as percentages, whereas quantitative ones are expressed as a median and interquartile range.

Results

The study included 19 patients from 5 families with a diagnosis of autosomal dominant Alport syndrome. In this group, 9 of them were men (47.4%) and 10 were women (52.6%).

Family 1

We studied 10 patients, who shared the pathogenic mutation c.345 delG; p.G115GfsX37 in the *COL4A3* gene [10]. The study of the *COL4A4* gene did not show any pathogenic mutation.

The index case (patient 7858 of the Figure 1) is a 48 years old Caucasian Spanish woman, who has suffered multiple crises of microscopic haematuria, spontaneously or after febrile episodes since she was 2 years old. At the age of 32, she was diagnosed with hypertension, proteinuria (1.92 g/day) and chronic kidney disease (glomerular filtration rate 45 ml/min). At 46 years old, she was diagnosed with high tones bilateral hearing loss. Her son suffered from sporadic crises of macroscopic and microscopic haematuria and proteinuria (2.2g/24h) since he was 6 years old and, 3 years later, he was diagnosed with high tones sensorineural hearing loss and anterior lenticonus. At the age of 19, he developed chronic kidney disease, which evolved into the need for renal replacement therapy three years later. The patient never developed hypertension.

The rest of the affected family members only suffer high tones bilateral sensorineural hearing loss, without haematuria or impaired kidney function.

Family 2

There were 3 affected patients, who shared the pathogenic mutation c.4235G>T; p.G1412V of the *COL4A3* gene [1]. There were no pathogenic mutations in the *COL4A4* gene.

The index case (patient 7886 of the Figure 1) is a 52-year-old Caucasian woman, who suffered from microhaematuria, nephrotic range proteinuria (5.3 g/24h), arterial hypertension and chronic kidney failure since she was 24 years old. The kidney impairment evolved to end-stage chronic kidney disease at 31 years old. When she was 41 years old, she was diagnosed with high tones sensorineural bilateral hearing loss, and at 42 years old she was also diagnosed with maculopathy. The patient currently has a renal graft.

Her brother (25945 of the Figure 1) is a 53-year-old man who, at 29 years old suffered from an episode of macrohaematuria and edemas. The studies that were carried out showed nephrotic range proteinuria (8.25 g/24h) and arterial hypertension. One year later, he developed chronic kidney disease, which evolved towards end-stage chronic kidney failure at 34 years old. At that time, he was admitted into the hemodialysis program. He does not show deafness or ocular impairment.

The father of both patients (27024 of the Figure 1) is an 83-year-old man, diagnosed with sensorineural deafness when he was 67 years old. Eight years later, he was diagnosed with arterial hypertension and chronic kidney disease, with glomerular filtration rate around 40 ml/min, which has remained stable over time. No proteinuria, haematuria or ocular impairment have been observed.

Family 3

We analyzed one patient, with the pathogenic mutation c.4267C>T; p.P1423S of the *COL4A4* gene [11]. The study of the *COL4A3* gene did not revealed any pathogenic mutation.

The index case was a 49-year-old woman (patient 23454 of the Figure 1) who, at 6 years old, was diagnosed with high tones sensorineural hearing loss, which progressed to the current need of hearing aid. When she was 28 years old, she showed microhaematuria,

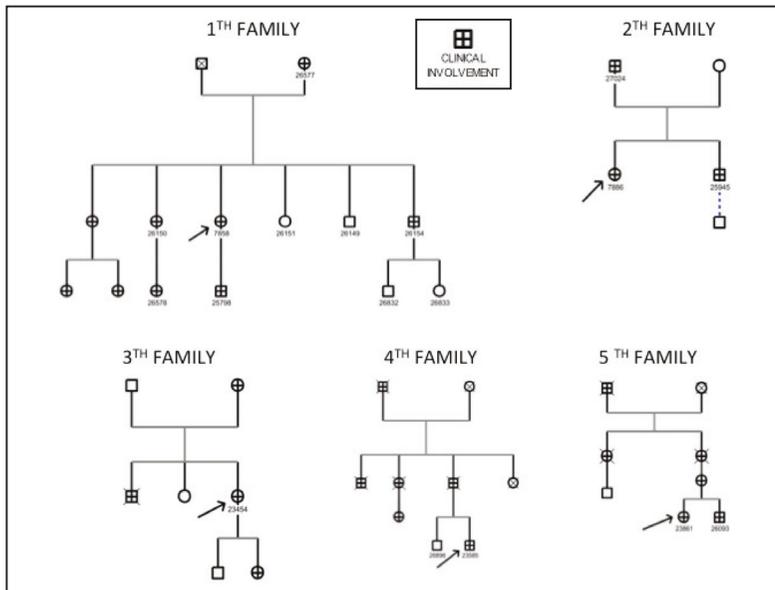


Fig. 1. Family trees of the studied families. Family 1 had lenticonus, hematuria, proteinuria, hearing loss and chronic kidney disease. Family 2 had retinopathy, hematuria, proteinuria, hearing loss and chronic kidney disease. Family 3 had retinopathy, hematuria, proteinuria, hearing loss and chronic kidney disease. Family 4 had hematuria, proteinuria, hearing loss and chronic kidney disease. Family 5 had hematuria, proteinuria, hearing loss and chronic kidney disease.

proteinuria (0,5g/24h) and kidney disease (creatinine clearance of 40 ml/min). These symptoms were continuous since then. She showed arterial hypertension at 47 years old and of macular flecks at 48 years old. A renal biopsy was never performed due to the impaired kidney function at the beginning of the study.

Her mother suffered from deafness since a young age, as well as stage III chronic kidney disease, haematuria and proteinuria. Her brother was diagnosed with haematuria, proteinuria and end-stage kidney disease of unknown origin since his adolescence, and he died because of medical complications of the kidney disease. He was never diagnosed with hearing loss or ocular injuries.

The index case's daughter suffered from high tones bilateral sensorineural hearing loss since childhood.

Family 4

We studied 2 patients who share the pathogenic mutation IVS3+1G>C of the *COL4A4* gene [11]. There were no pathogenic mutations in the *COL4A3* gene.

The index case was a 55-year-old man (patient 23585 of the Figure 1) who was diagnosed with arterial hypertension and microhaematuria when he was 30 years old. He developed proteinuria of 0.2g/24h ten years later, which had remained stable. The patient did not develop chronic kidney disease or visual or auditory impairment.

His father was diagnosed with chronic kidney disease at 75 years old, with creatinine

clearance around 30-40 ml/min with proteinuria (0.1 g/24h) and haematuria. He suffered from arterial hypertension and high tones sensorineural hearing loss since he was 79 years old. He did not show visual impairment.

The paternal family had a large history of sensorineural hearing loss, but we could not study the presence of other signs of Alport syndrome because some of them had passed away and other relatives did not live in the city of the study.

Family 5

We studied 3 patients, in which we could not find any pathogenic mutation after the analysis of the *COL4A3* and *COL4A4* genes.

The index case was a 41-year-old woman (figure 23861 of the Figure 1), who has suffered from several episodes of macrohaematuria and microhaematuria since she was 3 years old. At 6 years old, proteinuria of 0.35g/24h was diagnosed, which increased progressively until nephrotic range at 36 years old. At that age she also developed hypertension and chronic kidney disease, when she was pregnant. She entered a haemodialysis program at 39 years old. Nowadays she has a renal graft. A renal biopsy was performed at 22 years old, which showed the lamination of the glomerular basement membrane. The presence of high tones sensorineural hearing loss was established when she was 8 years old. She did never show any ocular impairment.

Her brother was a 33-year-old man diagnosed with macrohaematuria and nephrotic range proteinuria when he was 9 months old. He developed chronic kidney disease when he was 14 years old and he entered a program of peritoneal dialysis 5 years later. He was diagnosed with sensorineural hearing loss when he was one year old. He had no shown any ocular impairment. Their mother suffered from microhaematuria, non-nephrotic proteinuria, arterial hypertension, grade III chronic kidney disease and sensorineural hearing loss since her adolescence. The patient's maternal great-grandparent died when he was 20 years old. He suffered from sensorineural hearing loss and chronic kidney disease, and so did his two daughters (the patient's grandmother and aunt). The presence of haematuria, proteinuria or ocular impairment in these patients could not be determined because they had all passed away.

The family data suggested the existence of ADAS, but we could not find any pathogenic mutation after sequencing 43 exons of the *COL4A3* gene and 21 exons of the *COL4A4* gene, but the findings in the renal biopsy made us make the diagnosis of Alport syndrome.

Table 1 shows all the symptoms of the studied patients. The analysis of the different clinical parameters revealed that the most common injury in our series was hearing loss, followed by chronic kidney disease, proteinuria and haematuria, as can be seen in Table 2. The onset age of the different symptoms is detailed in Table 3.

The median value of proteinuria was 1.58 g/day (0.22-5.05), and the maximum value reached was 2.06 (0.29-6.97). Only 4 out of 19 patients (21%), belonging to 2th and 5th families, reached a nephrotic range of proteinuria. Between our 19 patients, only 8 (42,1%) suffered from haematuria, and 6 of them (75%) had episodes of gross haematuria (families 1, 2, 3 and 5). All of our patients were treated with inhibitors of the renin-angiotensin II-aldosterone system.

Discussion

We have studied 5 families with autosomal dominant Alport syndrome. This diagnosis has been suspected by the study of the family record and confirmed by genetic study or by the finding of compatible injuries in glomerular basal membrane [12].

The genetic study method we have performed has been the heteroduplex with acrylamide gels. Although the most accurate genetic method for the diagnosis of Alport syndrome is MPS, we could not use it because our laboratory did not have it. Nevertheless, we

Table 1. Clinical and laboratory data of the studied patients

		HAEMATURIA	PROTEINURIA	CKD	END-STAGE CKD	HEARING LOSS	OCULAR INJURIES
	7858 (index)	+	+	+	-	+	-
	26577	-	-	-	-	+	-
	26150	-	-	-	-	+	-
	26578	-	-	-	-	+	-
1 th FAMILY	25798	+	+	+	+	+	+
	26151	-	-	-	-	+	-
	26149	-	-	-	-	+	-
	26154	-	-	-	-	+	-
	26832	-	-	-	-	+	-
	26833	-	-	-	-	+	-
	7886 (index)	+	+	+	+	+	+
2 th FAMILY	25945	+	+	+	+	-	-
	27024	-	-	+	-	+	-
3 th FAMILY	23454	+	+	+	-	+	+
4 th FAMILY	23585 (index) FATHER	+	+	-	-	-	-
	23861 (index)	+	+	+	+	+	-
5 th FAMILY	26093 MOTHER	+	+	+	+	+	-

CKD: Chronic kidney disease

can ensure that these families suffer from autosomal dominant Alport syndrome, since we have studied the two genes and we have been able to exclude a second mutation in every patient. Besides, all the mutations responsible for the illness in our families are pathogenic mutations (frameshift, splicing and missense), described in different works [1, 10, 11].

This certain diagnosis of autosomal dominant Alport syndrome makes us reject another diseases, like thin membrane nephropathy with superimposed IgA glomerulonephritis.

Autosomal dominant Alport syndrome is characterized by a late onset age, between 40 and 60 years [6, 7]; however, the patients included in our sample had a relatively early median age at the moment of the diagnosis of the disease, around 29 years, and similar to what has been observed in other inheritance patterns. Haematuria and proteinuria were the renal signs of onset in most of our patients, which suggests that they must become an alert sign in the diagnosis of Alport syndrome, both for the general practitioner and for the nephrologist [13, 14], even when the patient does not present a positive family record, in order to reach an early diagnosis which, with an adequate

Table 2. Frequency of different clinical manifestations

CLINICAL PARAMETER	TOTAL	AT DIAGNOSIS
CKD	9 (47,4%)	6 (31,6%)
End stage ckd	5 (26,3%)	0
Haematuria	8 (42,1%)	8 (42,1%)
Proteinuria	9 (47,4%)	8 (42,1%)
Hypertension	9 (47,4%)	6 (31,6%)
Hearing loss	13 (68,4%)	9 (47,4%)
Ocular involvement	3 (15,8%)	2 (10,5%)

Table 3. Age of onset of the different symptoms

SYMPTOM	AGE OF ONSET (years)
Haematuria	15 (2,25-28,75)
Proteinuria	28 (6-36)
CKD	30 (21,5-55,5)
Progression to end stage CKD	4 (3-6)
End stage CKD	31 (20,5-36,5)
Hypertension	32 (26,5-61)
Hearing loss	28,5 (7,5-62,5)
Ocular involvement	42 (9-48)
Clinical diagnosis	29 (4-61)

therapeutic measures, such as inhibitors of the renin-angiotensin II-aldosterone system [9], could, in some cases, delay the impairment of renal function and improve prognosis [15, 16]. Proteinuria appeared at a relatively early age (in the third decade of life), but later than haematuria, probably because these patients (who presented this sign in the beginning of their disease) were diagnosed in advanced stages, when the renal damage was already clear. In our study, proteinuria did not reach a nephrotic range, which matches what has been described in other series [2].

Chronic kidney disease appeared in a high number of patients, and it presented a relatively early onset. The reason for the high prevalence of the impairment of renal function in our series can be due to the fact that haematuria and proteinuria appeared in relatively early ages and contributed to the fast establishment and progression of the renal disease, and also to the fact that the diagnosis was established late, once the renal damage had already been established. The high prevalence of hypertension at diagnosis in our series might be the result of the fact that the disease was diagnosed at an advanced age. There are no data in the literature on the prevalence of this sign in Alport syndrome, regardless of its inheritance pattern, and it is considered a late feature associated to renal failure [6], which matches our results.

The appearance of ocular and hearing injuries is not usually predominant in autosomal dominant patterns of Alport syndrome, which represents a difference compared with the recessive and sex-linked patterns [14, 17, 18]. Bilateral sensorineural high tones hearing loss was an early onset symptom in our series, and it was present in most of the patients. Its real prevalence is unknown, because audiometries are not common practice [18]. However, it is necessary to emphasize the importance of taking this symptom as a key factor in the diagnosis of the disease in cases of nephropathies accompanied by haematuria and proteinuria, because its presence in these cases is highly suggestive of this genetic disorder [10]. Hearing loss is observed in late infancy or adolescence in patients with recessive and X chromosome-linked patterns, whereas in the cases with a dominant inheritance pattern it appears in adult age [2, 19, 20]. However, our patients were diagnosed with hearing loss at an early age (before 30 years), which can be explained by the high clinical variability presented by this inheritance pattern [1]. In our series we found patients with ocular injuries, such as lenticonus, which until now had only been described in recessive and sex-linked inheritance patterns [10, 14, 17, 20].

Conclusion

Our results reflect the high variability in the clinical expression of autosomal dominant Alport syndrome, and they reveal that this illness is not as benign as it was traditionally thought. Instead, it can behave similarly to the recessive or X-linked disease. Until now, there is not a clear explanation for this great variability, but there are some hypothesis who affirm that mutations in other genes of the glomerular basal membrane, who encode different proteins such as laminin, podocin, integrins or metalloproteases could modulate the phenotypic expression of the *COL4A3* or *COL4A4* mutations in some patients, who would suffer a more severe illness, while their relatives, who only suffer the *COL4A3* or *COL4A4* mutations, would suffer a milder disease [10, 11].

A possible consequence of this may be that patients with autosomal dominant Alport syndrome with severe symptoms are erroneously labeled as patients with a recessive inheritance pattern because their relatives may show such mild symptoms that they are never diagnosed, due to the high phenotypic variability of this condition. This fact makes it difficult to reach an adequate diagnosis for this condition and to assign a well-defined inheritance pattern to the families. This leads us to suggest that dominant patterns are undiagnosed, which means that their real prevalence may be higher than the 5% of all Alport syndrome cases that are classically described.

Disclosure Statement

All authors declare no conflicts of interest.

References

- 1 Tazón Vega B, Badenas C, Ars E, Lens X, Milà M, Darnell A, Torra R: Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am J Kidney Dis* 2003;42:952-959.
- 2 Tazón B, Ars E, Torra R: The Alport Syndrome. *Nefrologia* 2003;23:S29-S39.
- 3 Cosgrove D: Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol* 2012;27:885-890.
- 4 Badenas C, Praga M, Tazón B, Heidet L, Arrondel C, Armengol A, Andrés A, Morales E, Camacho JA, Lens X, Dávila S, Milà M, Antignac C, Darnell A, Torra R: Mutations in the COL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1248-1254.
- 5 Hudson BG: The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2514-2527.
- 6 Pirson Y: Making the diagnosis of Alport syndrome. *Kidney Int* 1999;56:760-775.
- 7 Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F: Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:364-375.
- 8 Gubler MC: Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr Nephrol* 2007;22:621-625.
- 9 Fallerini C, Dosa L, Tita R, Del Prete D, Feriozzi S, Gai G, Clementi M, La Manna A, Miglietti N, Mancini R, Mandrile G, Ghiggeri GM, Piaggio G, Brancati F, Diano L, Frate E, Pinciaroli AR, Giani M, Castorina P, Bresin E, Giachino D, De Marchi M, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Ariani F: Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clin Genet* 2014;86:252-257.
- 10 Rosado C, Bueno E, Fraile P, García-Cosmes P, González-Sarmiento R: A new mutation in the COL4A3 gene responsible for autosomal dominant Alport syndrome, which only generates hearing loss in some carriers. *Eur J Med Genet* 2015;58:35-38.
- 11 Rosado C, Bueno E, Felipe C, Gonzalez-Sarmiento R: COL4A4 gene study in a European population. Description of new mutations causing autosomal dominant Alport syndrome. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014;5:177-184.
- 12 Miner JH, Baigent C, Flinter F, Gross O, Judge P, Kashtan CE, Lagas S, Savige J, Blatt D, Ding J, Gale DP, Midgley JP, Povey S, Prunotto M, Renault D, Skelding J, Turner AN, Gear S: The 2014 International Workshop on Alport Syndrome. *Kidney Int* 2014;86:679-684.
- 13 Kashtan CE: Familial hematuria. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1951-1958.
- 14 Izzedine H, Tankere F, Launay-Vacher V, Deray G: Ear and kidney syndromes: molecular versus clinical approach. *Kidney Int* 2004;65:369-385.
- 15 Webb NJ, Lam C, Shahinfar S, Strehlau J, Wells TG, Gleim GW, Le Bailly De Tillegem C: Efficacy and safety of losartan in children with Alport syndrome. Results from a subgroup analysis of a prospective, randomized, placebo- or amlodipine-controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2521-2526.
- 16 Temme J, Peters F, Lange K, Pirson Y, Heidet L, Torra R, Grunfeld JP, Weber M, Licht C, Müller GA, Gross O: Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int* 2012;81:779-783.
- 17 Seymenoğlu G, Baser EF: Ocular manifestations and surgical results in patients with Alport syndrome. *J Cataract Refract Surg* 2009;35:1302-1306.
- 18 Thodi C, Thodis E, Danielides V, Pasadakis P, Vargemzis V: Hearing in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3023-3030.
- 19 Marcocci E, Uliana V, Bruttini M, Artuso R, Silengo MC, Zerial M, Bergesio F, Amoroso A, Savoldi S, Pennesi M, Giachino D, Rombolà G, Fogazzi GB, Rosatelli C, Martinhago CD, Carmellini M, Mancini R, Di Costanzo G, Longo I, Renieri A, Mari F: Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1464-1471.
- 20 Hanson H, Storey H, Pagan J, Flinter F: The value of clinical criteria in identifying patients with X-linked Alport syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:198-203.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>

Clinical report

A new mutation in the COL4A3 gene responsible for autosomal dominant Alport syndrome, which only generates hearing loss in some carriers



Consolación Rosado^{a,b,*,1}, Elena Bueno^{a,c}, Pilar Fraile^b, Pedro García-Cosmes^b, Rogelio González-Sarmiento^{a,c,***}

^a Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

^b Department of Nephrology, University Hospital, SACYL, Salamanca, Spain

^c IBSAL and IBMCC, University of Salamanca, CSIC and SACYL, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2014

Accepted 12 October 2014

Available online 28 October 2014

Keywords:

Alport syndrome
Autosomal dominant
COL4A3 gene
Lenticonus

ABSTRACT

Bilateral sensorineural hearing loss is a characteristic feature of Alport syndrome, which is always linked to renal manifestations so they have a parallel evolution and prognosis, and deafness helps to identify the renal disease. We report a family that suffers an autosomal dominant Alport syndrome caused by a previously undescribed mutation in the COL4A3 gene, in which several members have hearing impairment as the only clinical manifestation, suggesting that in this family deafness can occur independent of renal disease. This mutation is also present in a patient with anterior lenticonus, an observation only found in families with recessive and sex-linked Alport disease.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Background

Autosomal dominant Alport syndrome accounts for 5% of all cases of Alport syndrome [Torra, 2011; Tazón Vega et al., 2003 Nov]. His clinical expression is more benign than in the recessive and sex-linked forms and its features appear in the later stages of life [Tazón Vega et al., 2003 Nov].

The disease causes haematuria, proteinuria and progressive kidney disease, which leads, in rare cases, to end stage renal disease.

Autosomal dominant Alport syndrome generates a form of late-onset mild sensorineural hearing loss. As in the other forms of Alport syndrome, this is in most cases accompanied by renal failure, the rate of hearing loss is directly linked to the progression of renal

failure, and its progression suggests a poor prognosis of kidney disease [Buzza et al., 2003 Feb].

The only ocular abnormalities described in the dominant forms of Alport syndrome are retinopathy and cataracts. No cases of lenticonus [Bekheirnia et al., 2010 May; Zeisberg et al., 2006] have been described.

We have studied a Spanish family with a new mutation in the COL4A3 gene in which most of its members are suffering from isolated hearing loss. One of the members also presents lenticonus (Fig. 1A).

2. Methods

All parameters of renal function, ocular, hearing and laboratory tests were measured under standard conditions of clinical practice, and repeated at different stages of the patients' life in order to verify them.

High molecular weight DNA was obtained from peripheral blood after venipuncture. The study protocol was approved by the local Ethics Committee and followed the tenets of the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the patients.

DNA was amplified by polymerase chain reaction with Master Mix (Promega) in an automated thermal cycler. To amplify the different exons of the COL4A3 and COL4A4 genes, a standard PCR program was used and conditions were adapted to each exon

* Corresponding author. Nephrology Unit, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Av. Juan Carlos I s/n, 05004 Ávila, Spain. Tel.: +34 920358000.

** Corresponding author. Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Campus Miguel Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 923294553.

E-mail addresses: rosadorubio@hotmail.com (C. Rosado), gonzalez@usal.es (R. González-Sarmiento).

¹ Present address: Nephrology Unit, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, SACYL, Ávila, Spain.

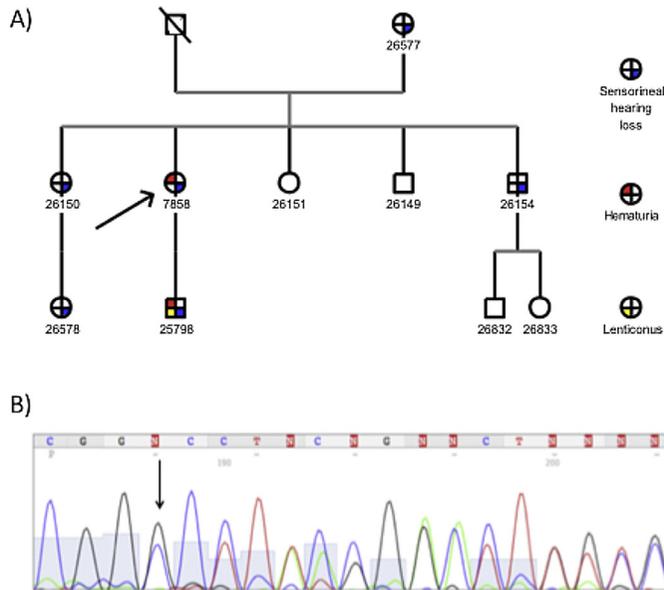


Fig. 1. A) Family tree showing mutation carriers and phenotypic characteristics. B) Automatic sequencing showing mutation c.345 DelG; p.G115GFSX37 in exon 6 of the COL4A3 gene.

(Supplementary Tables I and II). The samples obtained after amplification of these DNA fragments were analysed by heteroduplex with acrylamide gels to detect the presence of mutations in exon regions. PCR fragments showing anomalous migration patterns were sequenced on an ABI 3100 genetic analyser. Reading and processing of automatic sequences were performed with the 4Peaks 1.7.2 (1.7.1) program for Mac OS X (<http://www.mekentosj.com/science/4peaks>).

3. Results

3.1. Clinical case

The index case (patient 7858 of Fig. 1A) is a 48 years old Caucasian Spanish woman, who at 2 years old had an episode of gross haematuria after suffering acute tonsillitis. No renal biopsy was performed so she was diagnosed with acute glomerulonephritis. Since then she has suffered multiple crises of microscopic haematuria, spontaneously or after febrile episodes. At the age of 32, she was diagnosed with hypertension, proteinuria (1.92 g/day) and chronic kidney disease (glomerular filtration rate 45 ml/min and creatinine ranging from 0.13–0.15 mmol/L). At 46 years old, loss of hearing motivated an audiometry that revealed the presence of bilateral hearing loss for high tones.

The patient's son (25,798) suffered an episode of gross haematuria at the age of six, following a respiratory infection. Later, he suffered from sporadic crises of macroscopic and microscopic haematuria and proteinuria (2.2 g/24 h) was observed. At nine years old, he was diagnosed with sensorineural hearing loss for high tones and anterior lenticornus. At the age of 19, he developed chronic kidney disease, which evolved into the need for renal replacement therapy at 22 years old, when he underwent a kidney transplant. The patient never developed hypertension.

The rest of the family members have periodically undergone to routine blood and urine tests (included the study of the urinary sediment), which have proven the absence of haematuria and impaired renal function. They only suffer bilateral sensorineural hearing loss for high tones, with a median age of onset of 37.5 years (14.25–49.75).

These familiar and clinical data made us propose the clinical diagnosis of autosomal dominant Alport syndrome. Consequently, COL4A3 and COL4A4 genes were studied.

3.2. Genetic analysis

DNA sequencing of the COL4A3 gene in the index patient revealed the presence of six DNA changes. Exonic changes c.422T > C; p.L141P; [Abrahamson et al., 2003] c.485A > G; p.E162G; [Gubler, 2007 May] c.976G > T; p.D326Y [Gubler, 2007

May] and intronic changes IVS17 + 35 T > G and IVS 39–4 delTT are considered polymorphisms and they are present in members of the family having clinical symptoms as well as in those who were healthy.

We also found the mutation c.345 delG; p.G115GfsX37, a heterozygous deletion of a guanine at position 345, encoded by exon 6. It produces a change in the reading frame, which generates a stop codon 37 codons from that point. The result is a truncated protein (Fig. 1B). This mutation was found in all patients with symptoms as hearing loss, kidney disease and/or lenticonus, but it was absent in the healthy members of the family. DNA sequencing of the COL4A4 gene did not show any pathogenic mutation in the proband.

In order to rule out the existence of an autosomal recessive Alport syndrome in the proband's son, we sequenced all exons of COL4A3 and COL4A4 genes of both the proband and her son in order to find any single mutated allele from his father and the result was negative.

4. Discussion

Alport syndrome includes a group of hereditary disorders that affect the glomerular basement membrane and can induce disturbances of the cochlea and the eye. These injuries are the result of mutations in the COL4A3, COL4A4 and COL4A5 genes, which are responsible for the biosynthesis of the $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains of the type IV collagen [Torra, 2011; Tazón Vega et al., 2003 Nov]. The inheritance model follows three different patterns: associated to the X chromosome in 80% of the cases (caused by mutations in the COL4A5 gene, which is responsible for the synthesis of the $\alpha 5$ chain of type IV collagen); autosomal recessive in 15% of the cases (caused by homozygous mutations in the genes COL4A3 and COL4A4) and autosomal dominant in the remaining 5% of the cases (whose cause is a heterozygous mutation in one of these two genes, which are responsible for the synthesis of the $\alpha 3$ and $\alpha 4$ chains of type IV collagen) [Buzza et al., 2003 Feb]. Those mutations inhibit either the production or assembly of the collagen chains to generate the complete type IV collagen network, which is a structural component of the glomerular basement membrane of the kidney, inner ear and eye.

We describe a family with autosomal dominant Alport syndrome who carries the novel COL4A3 c.345 delG gene mutation.

This mutation generates a frameshift (pG115GfsX37) that gives rise to a truncated protein $\alpha 3$ (IV), lacking the trimerization domain, making difficult the formation of the $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ network. This process plays a critical role during embryogenesis and it is responsible for the integrity of the glomerular basement membrane [Torra, 2011]. The mutation appears as a heterozygous one, and all carriers show some phenotypic disturbance, indicating that the pattern of inheritance is autosomal dominant. However, despite showing clear dominant inheritance, there is an extraordinary variety of clinical presentation between the different family members and, while most of them are clinically indolent, patient 25,798 has a very aggressive phenotype, with all the features of Alport syndrome at an early age, which contradicts the idea that the dominant forms have a latent asymptomatic period, and features appears at a very late age in life [Bekheirnia et al., 2010 May].

We do not know the reason of this high phenotypic variability in people who share the same mutation. It could be the possible existence of mutations in other genes, which encode different proteins of the glomerular basal membrane, such as podocin, metalloproteases, integrins or laminins [Abrahamson et al., 2003; Zeisberg et al., 2006]. These mutations can promote the onset of the kidney disease in some patients (our index patient and her son), since they can act as modulators of the mutation in the COL4A3 gene.

Since this new mutation generates a truncated protein, it is shared by all family members with clinical involvement and it is the only mutation found in the proband and his son, after sequencing all exons of the COL4A3 and COL4A4 genes, makes us think that it is very possible that the proband's son is also affected by an autosomal dominant Alport syndrome, caused by this novel mutation, not by a recessive one [Gubler, 2007 May].

This could be demonstrated by the ultrastructural analysis of the glomerular basement membrane, which would evidence the presence of the $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 5$ collagen network [Heidet and Gubler, 2009 Jun], but the family refused to perform this diagnostic test.

The mutation here reported has two important particularities, the first is that in almost all family members carrying the mutation, deafness appears at a single manifestation of the disease (except for the testing patient and her son, in whom renal impairment is associated.). This shows that deafness could be independent of kidney failure in this syndrome and, contrary to traditional thoughts, it does not mark the prognosis of renal disease [Longo et al., 2002 Jun; Heidet et al., 2001 Jan].

The other distinguishing feature of this mutation is the presence of anterior lenticonus in one of the patients carrying the mutation, which is described for the first time associated to autosomal dominant pattern of inheritance in a family with Alport disease. This eye disorder has been previously found only in families with recessive and sex-linked forms [Amiranzadeh, 2008 Jan; Ghosh et al., 2014 Feb].

In conclusion, we describe a new pathogenic mutation in the COL4A3 gene, associated to autosomal dominant Alport syndrome, characterized by different phenotypic expression in the affected family members. Moreover, we show that lenticonus is a condition that could be also present in the forms of autosomal dominant Alport syndrome. We also report that hearing loss and renal impairment could be independent symptoms, because this is the first case of a family in which hearing loss occurs amongst several members who do not show kidney impairment.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Nieves Mateos for technical help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.10.003>.

References

- Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL. Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int.* 2003;3:826–34.
- Amiranzadeh G. Is anterior lenticonus the most common ocular finding in Alport syndrome? *J. Cataract. Refract. Surg.* 2008 Jan;34(1):5.
- Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, et al. Genotype–phenotype correlation in X-linked alport syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 May;21(5):876–83.
- Buzza M, Dagher H, Wang YY, Wilson D, Baboon JJ, Cotton RG, et al. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int.* 2003 Feb;63(2):447–53.
- Ghosh S, Singh M, Sahoo R, Rao S. Alport syndrome: a rare cause of uraemia. *BMJ Case Rep.* 2014 Feb;13:2014.
- Gubler MC. Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr. Nephrol.* 2007 May;22(5):e21–5.
- Heidet L, Arrondel C, Forestier L, et al. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001 Jan;12(1):97–106.
- Heidet L, Gubler MC. The renal lesions of Alport syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009 Jun;20(6):1210–5.

- Longo I, Porcedda P, Mari F, et al. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):1947–56.
- Tazón Vega R, Badenas C, Ars E, et al. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am. J. Kidney Dis.* 2003 Nov;42(5):952–9.
- Torra R. Alport syndrome and collagen IV ($\alpha3/\alpha4$) nephropathy. *Nefrol. Sup. Ext.* 2011;2(1):29–37.
- Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, et al. Stage specific action of matrix metalloproteinases influence progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med.* 2006;4:e100.

Int J Mol Epidemiol Genet 2014;5(4):177-184
www.ijmeg.org /ISSN:1948-1756/IJMEG0003814

Original Article

COL4A4 gene study of a European population: description of new mutations causing autosomal dominant Alport syndrome

Consolación Rosado^{1,2}, Elena Bueno^{1,3}, Carmen Felipe², Rogelio González-Sarmiento^{1,3}

¹Department of Medicine, Molecular Medicine Unit, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Department of Nephrology, Ávila Hospital, Ávila, Spain; ³BSAL and IBMCC, University of Salamanca, CSIC and SACYL, Salamanca, Spain

Received November 13, 2014; Accepted November 28, 2014; Epub December 15, 2014; Published December 30, 2014

Abstract: Background: Autosomal forms of Alport syndrome represent 20% of all patients (15% recessive and 5% dominant). They are caused by mutations in the COL4A3 and COL4A4 genes, which encode α -3 and α -4 collagen IV chains of the glomerular basement membrane, cochlea and eye. Thin basement membrane nephropathy may affect up to 1% of the population. The pattern of inheritance in the 40% of cases is the same as autosomal dominant Alport syndrome: heterozygous mutations in these genes. The aim of this study is to detect new pathogenic mutations in the COL4A4 gene in the patients previously diagnosed with autosomal Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy in our hospital. Methods: We conducted a clinical and genetic study in eleven patients belonging to six unrelated families with aforementioned clinical symptoms and a negative study of COL4A3 gene. The molecular study was made by conformation of sensitive gel electrophoresis (CSGE) and direct sequencing of the fragments that show an altered electrophoretic migration pattern. Results: We found two pathogenic mutations, not yet described: IVS3 + 1G > C is a replacement of Guanine to Cytosine in position +1 of intron 3, in the splicing region, which leads to a pathogenic mutation. c.4267C > T; p.P1423S is a missense mutation, also considered pathogenic. We also found seven new polymorphisms. Conclusions: We describe two new pathogenic mutations, responsible for autosomal dominant Alport syndrome. The other families of the study were undiagnosed owing to problems in the method employed and the possibility of mutations in other genes, giving rise to other diseases with similar symptoms.

Keywords: Autosomal alport syndrome, COL4A4 gene, splicing, missense

Introduction

Thin basement membrane nephropathy (TBMN) and Alport syndrome [1] are the two major clinical entities associated with disorders of the glomerular basement membrane occurring with haematuria. TBMN affects up to 1% of the population and is defined by a thinning of the glomerular basement membrane associated with haematuria and minimal proteinuria, with normal kidney function. It is inherited in an autosomal dominant pattern [1, 2].

Alport syndrome (AS) is a hereditary nephropathy characterized by progressive glomerulonephritis resulting in kidney failure, with typical ultrastructural changes in the glomerular basement membrane and haematuria, which is

often associated with sensorineural hearing loss and damage to the eye [2].

Both entities may be caused by mutations in COL4A3 or COL4A4 genes, which encode α 3(IV) and α 4(IV) collagen chains [3], which are present in the glomerular basement membrane, the cochlea and the eye. Autosomal recessive Alport syndrome (ARAS) (15% of cases of AS) is a consequence of homozygous mutations in COL4A3 and COL4A4 gene, or a result of compound heterozygous mutations in these genes. Autosomal dominant Alport syndrome (ADAS) and TBMN (5% of cases of AS) result from heterozygous mutations in these genes [4]. ARAS carriers and those affected by the dominant forms are included in the term "collagen type IV (α 3- α 4) nephropathy" [2].

COL4A4 gene in European population

Table 1. Distribution and age of onset of symptoms studied

Clinical symptoms	Number of patients	Onset (years)
Chronic kidney disease	8 (72.7%)	39.5 (30-58, 25)
End-stage chronic kidney disease	4 (36.4%)	45.5 (24-52, 75)
Haematuria	10 (90.9%)	29 (8, 25-44)
Proteinuria	10 (90.9%)	39 (17, 5-56)
Hypertension	8 (72.7%)	41.5 (23, 25-52, 25)
Hearing loss	8 (72.7%)	8 (5-61)
Macular flecks	1 (9.1%)	48 (48-48)

The main indication of the disease is haematuria, but it can also cause proteinuria. The result is the development of chronic renal failure and end stage renal disease. The impairment of renal function is rapid and severe in both men and women with the recessive form, while symptoms for patients with ADAS may be milder and more gradual, which means the kidney disease may only become apparent around the 7th decade [5, 6].

We searched mutations in the COL4A4 gene in 6 families who suffer from autosomal forms of the disease, which had no pathogenic mutations in the COL4A3 gene. We describe seven, as yet unreported polymorphisms and two new pathogenic mutations in the COL4A4 gene associated with ADAS.

Material and methods

Eleven patients who belonged to six unrelated families with clinical symptoms of ARAS or collagen type IV ($\alpha 3$ - $\alpha 4$) nephropathy were selected. The clinical diagnosis of Alport syndrome was established when the index patient met at least two of the following criteria [7]: (1) Positive family history of macro or microscopic hematuria with or without progression to end-stage chronic kidney disease; (2) Progressive sensorineural high tone hearing loss; (3) Characteristic ocular injuries (lenticonus or perimacular retinopathy); (4) Compatible anatomopathological injuries.

The COL4A3 gene was previously analysed in all index patients and we did not find any pathogenic mutation. We made a descriptive analysis of the clinical data of the families in order to determine the characteristics of disease presentation. Results are expressed as percentages, median and interquartile range. The variables studied are listed in **Tables 1, 2**.

Molecular analysis

High molecular weight DNA was extracted from peripheral blood in all index patients. Coding regions and flanking intronic sequences of the COL4A4 gene were studied after amplification by polymerase chain reaction with Master Mix (Promega), under standard conditions (**Table S1**). The samples obtained were analysed by heteroduplex with acrylamide gels to detect the possible mutations in these regions. Direct sequencing of the fragments that showed an altered electrophoretic migration pattern was performed in both directions, using an ABI 3100 Genetic Analyzer. Reading and processing of automatic sequences were performed with the 4Peaks 1.7.2 (1.7.1) program for Mac OS X (<http://www.mekentosj.com/science/4peaks>).

Results

We studied 11 patients, five males (45.5%) and six females (54.5%). Analysis of family trees (**Figure 1**) showed that seven patients (63.6%) had an autosomal dominant mode of inheritance. Five of them had clinical ADAS (family 6) and the remaining two patients suffered from BHF (family 1). Three patients (27.3%) suffered from ARAS and had a history of consanguinity (family 2) and the last patient (9.1%) had no family history, so the mode of inheritance could not be determined. The median age of clinical diagnosis was 51.5 years (19.75 to 55.75).

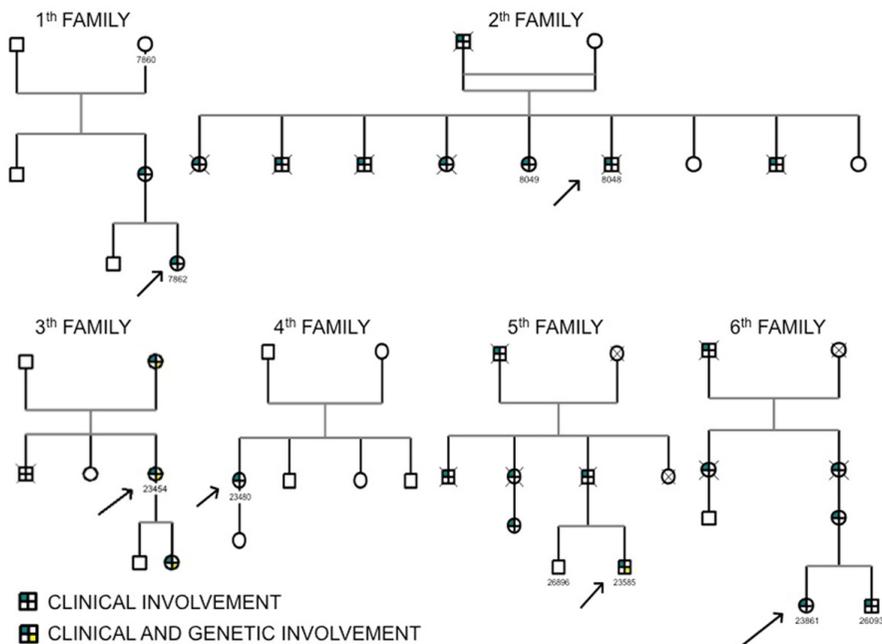
First family: The index patient was a 23-year-old woman who had an episode of microhematuria and proteinuria of 0.55 mg/24 h at the age of 14, which remained stable. Since that time she suffered from sporadic episodes of microhematuria. There were no signs of arterial hypertension, impairment of renal function, hearing loss, lenticonus or macular flecks. The complete kidney study and the renal biopsy did not reveal any conclusive results.

Her mother was a 48-year-old woman who was diagnosed with an isolated episode of microhematuria at the age of 42. Any previous episodes had not been reported. She did not show arterial hypertension, proteinuria, kidney failure or hearing or visual impairment. The maternal grandparents of the index case did not show any clinical symptom.

COL4A4 gene in European population

Table 2. Distribution of the symptoms in each family

Family	1	2	3	4	5	6
Hamaturia	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Proteinuria	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Chronic kidney disease	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
End-stage chronic kidney disease	No	Yes	Yes	No	No	Yes
Hearing loss	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Macular flecks	No	No	Yes	No	No	No
Macrothrombocytopenia	No	No	No	Yes	No	No
Laminated glomerular basement membrane	No	Not studied	Not studied	Yes	Not studied	Yes

**Figure 1.** Genealogic trees of the studied families. Family 2 shows an autosomal recessive pattern of inheritance. The rest of them have an autosomal dominant one.

The personal and family record led us to suspect TBMN, but we did not find any pathogenic mutation after sequencing 25 exons of the COL4A4 gene.

Second family: The index case was a 54-year-old man. He had high tones sensorineural hearing loss from the age of 5. At the age of 50, he suffered from arterial hypertension, microhematuria and proteinuria of 1.9 g/24 h, with chronic kidney disease, which resulted in the

need of dialysis two years later. No renal biopsy was performed because he suffered from severe kidney impairment at the beginning of clinical monitoring. He was never diagnosed with visual impairment.

The patient came from a family of 9 children and his parents were related.

The father had been deaf since childhood and suffered from chronic kidney disease, which did

COL4A4 gene in European population

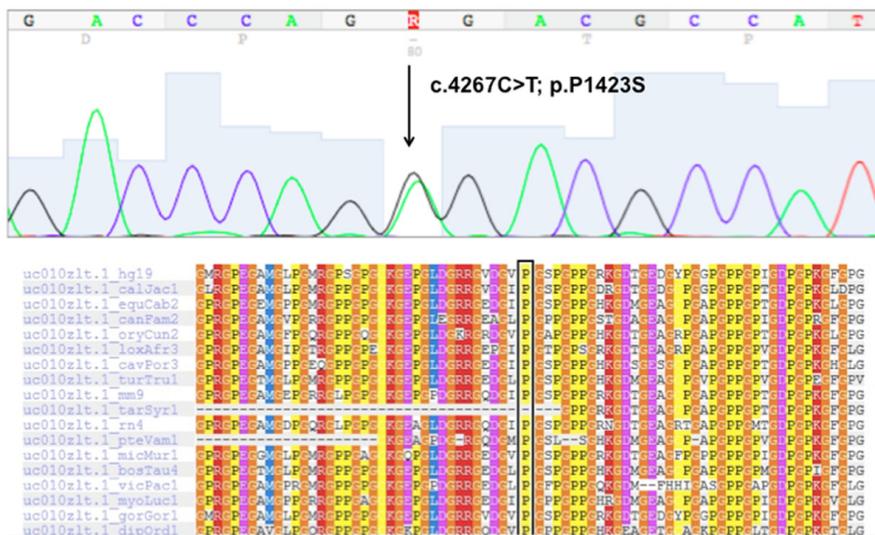


Figure 2. Genetic sequence of the c.4267C > T; p.P1423S mutation and the polypheny multiple sequence alignment, in which we can see the high degree of conservation of proline among different species. This fact leads us to think that the change of proline to serine could have a critical effect on the resulting protein.

not evolve to an end-stage one. The existence of hematuria, proteinuria or ocular injuries like lenticonus or macular flecks could not be studied.

The mother only suffered from type 2 diabetes.

The eldest sister had suffered from high tones sensorineural hearing loss since childhood. She died at the age of 50 due to a cerebral hemorrhage. She did not have renal disorders, visual impairment or arterial hypertension.

The next three siblings, two males and one female, suffered from sensorineural hearing loss and died during childhood due to unknown causes. The fifth sister was a 68-year-old woman who had had arterial hypertension and type 2 diabetes mellitus since she was 53. At 61 years old, she was diagnosed with high tones sensorineural hearing loss as well as chronic kidney disease, with creatinine clearance around 50 ml/min, which remained stable since that time. At the age of 62, a urinalysis showed microscopic hematuria and proteinuria (0.2 g/24 h). She refused to undergo a renal biopsy. She did not suffer ocular impairment.

The eighth brother had had high tones sensorineural hearing loss from the age of 4. At 39, he was diagnosed with nephrotic range proteinuria (3.9 g/24 h), macroscopic hematuria and chronic kidney disease, which evolved to end-stage kidney disease at the age of 53. It was then he started hemodialysis. He died two years later due to complications derived from the aforementioned kidney disease. He never suffered from hypertension or ocular injuries.

The two remaining sisters did not show any significant symptoms or abnormalities on testing.

The main symptom of the family was sensorineural hearing loss. However, we did not have any specific data regarding the continued development of this condition as most of the patients died during childhood and the information was not included in their medical records.

The clinical and familial data suggested the presence of ARAS, but no pathogenic mutation was found after sequencing 20 exons of the studied gene.

Third family: The index case was a 49-year-old woman who, at the age of 6 was diagnosed with

COL4A4 gene in European population

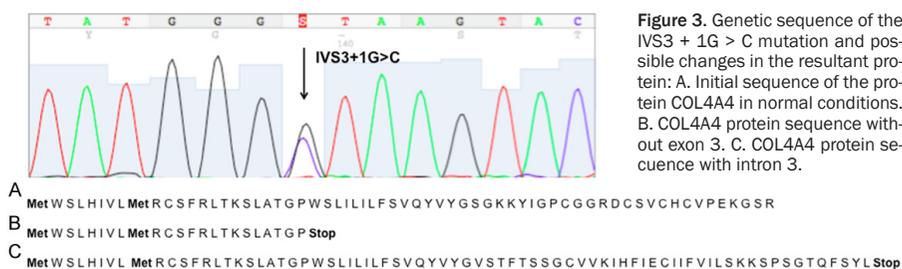


Figure 3. Genetic sequence of the IVS3 + 1G > C mutation and possible changes in the resultant protein: A. Initial sequence of the protein COL4A4 in normal conditions. B. COL4A4 protein sequence without exon 3. C. COL4A4 protein sequence with intron 3.

high tones sensorineural hearing loss, resulting in the current need for a hearing aid. When she was 28 she showed microhematuria, proteinuria (0.5 g/24 h) and kidney disease (creatinine clearance of 40 ml/min). These symptoms were continuous from that time on.

She showed arterial hypertension at the age of 47 and macular flecks at 48.

A renal biopsy was never performed due to the impaired kidney function at the beginning of the study.

Her mother had been deaf from an early age, as well as suffering from stage III chronic kidney disease, hematuria and proteinuria. Her brother was diagnosed with hematuria, proteinuria and end-stage kidney disease of unknown origin since adolescence and died because of medical complications from this. He was never diagnosed with hearing loss or ocular injuries.

The index case's daughter suffered from sensorineural hearing loss since childhood, probably with a congenital origin.

This data led us to suspect the existence of ADAS. We found the change c.4267C > T; p. P1423S in exon 45 of the COL4A4 gene. This is a missense mutation that should be categorised within unclassified variants, since it has not been previously described. We conducted a population-based study in 100 alleles using the CSGE technique and the mutation was not present in any of the healthy subjects. "In silico" studies were also carried out to predict the behaviour of this mutation on the protein. Polyphen and 3D SNPs predicted the mutation to be pathogenic (score of 0.989 in Polyphen and -0.05 in 3D SNPs). SIFT program also considered it deleterious. The mutation is present in the index case, her mother and her daughter.

We could not look for it in her brother owing to the fact that he had already died by the time of the research.

Fourth family: The index patient was a 51-year-old woman who had her first episode of sporadic microhematuria at the age of 10. Thereafter, she was diagnosed with congenital sensorineural hearing loss. At the age of 21, she showed arterial hypertension and proteinuria of 0.8 g/24 h, which increased progressively until nephrotic range being, at the time of the study, around 7 g/24 h. The renal biopsy with electron microscopy study revealed a laminated glomerular basement membrane. At this age the presence of macrothrombocytopenia was also observed. She had suffered from chronic kidney disease since the age of 40, with a creatinine clearance around 45 ml/min. She did not show any ocular impairment or a family history of AS symptoms.

This data led us to surmise that the patient was affected by ARAS or a sporadic mutation. We could not find any pathogenic mutation in COL4A4 gene (we sequenced 24 exons).

Fifth family: The index case was a 55-year-old man who was diagnosed with arterial hypertension and microhaematuria at the age of 30. He developed proteinuria of 0.2 g/24 h ten years later, which remained stable. A renal biopsy without electron microscopy revealed unspecified changes, probably secondary to nephroangiogenesis. The patient did not develop chronic kidney disease or visual or auditory impairment.

His father was diagnosed with chronic kidney disease at 75, with creatinine clearance around 30-40 ml/min with proteinuria (0.1 g/24 h) and haematuria. He had suffered from arterial hypertension and high tones sensorineural

COL4A4 gene in European population

Table 3. Mutations found in our patients

Mutation	Meaning	Bibliography	Families
IVS 3 + 1 G > C	Splicing	This work	5
IVS10-39 T > C	Polimorfism	This work	2
IVS 12-58 A > G	Polimorfism	This work	4
IVS 12 + 30 G > A	Polimorfism	This work	3
IVS 17 + 24 A > T	Polimorfism	This work	6
IVS 19 + 21 C > A	Polimorfism	This work	4
IVS 37-61 G > T	Polimorfism	This work	2
IVS 38 + 40 C > A	Polimorfism	This work	2
c.3011C > T; p.P1004L	Polimorfism	[8]	6
c.3594G > A; p.G1198G	Polimorfism	[15]	1
c.3684G > A; p.K1228K	Polimorfism	[16]	1
c.3979G > A; p.V1327M	Polimorfism	[17]	1
c.4080G > A; p.P1360P	Polimorfism	[11]	1
c.4207T > C; p.S1403P	Polimorfism	[8]	5, 6
c.4267C > T; p.P1423S	Missense	This work	3
c.4932C > T; p.F1644F	Polimorfism	[17]	4, 5, 6

hearing loss from the age of 79. He did not show visual impairment.

The paternal family had a significant history of sensorineural hearing loss, as can be seen in the family tree. These patients could not be studied to determine the presence of other components of AS, as some of them had already passed away and others did not live in the city where the study was conducted.

The data of this family suggested the presence of ADAS. We found, in COL4A4 gene, the mutation IVS3 + 1G > C (c.192 + 1C in HGVS nomenclature) which had not been previously described. It should be considered pathogenic since the canonical sequence in RNA is affected. The absence of RNA prevented us from performing a functional study. However, the index case's brother who had no AS symptoms did not have it.

Sixth family: The index case was a 41-year-old woman who had her first episode of macrohematuria when she was 3 years old, after a tonsillar infection. From that time on, she suffered almost constantly from microhematuria, with episodes of macrohematuria due to different kinds of infections. At the age of 6, proteinuria of 0.35 g/24 h was diagnosed, which increased progressively until nephrotic range at 36 years old. A renal biopsy was performed at 22 years

old, which showed the lamination of the glomerular basement membrane.

She developed arterial hypertension and chronic kidney disease when she was pregnant (aged 36) which evolved rapidly and she was included in a hemodialysis program 3 years later.

The presence of high tones sensorineural hearing loss was established when she was 8 years old. She never showed any ocular impairment. Her brother was a 33-year-old who had had macrohematuria and nephrotic range proteinuria from the age of 9 months. He developed chronic kidney disease at 14 with a progressive worsening of his creatinine clearance. He began a program of peritoneal dialysis 5 years later. He never underwent renal biopsy. He was diagnosed with sensorineural hearing loss

when he was one year old and, like his sister did not show any visual impairment.

The mother of both patients suffered from microhematuria, non-nephrotic proteinuria, arterial hypertension, grade III chronic kidney disease and sensorineural hearing loss since adolescence. The patient's maternal great-grandfather died when he was 20 years old. He suffered from sensorineural hearing loss and chronic kidney disease, as did his two daughters (the patient's grandmother and aunt). The existence of hematuria, proteinuria or ocular impairment in these patients could not be determined because they had all passed away.

The family data suggested the existence of ADAS, but we could not find any pathogenic mutation after sequencing 21 exons of the COL4A4 gene.

Besides the two new pathogenic mutations, we have also found seven new intron variants (Table 3) in the different families. These variants are also present in healthy controls.

Discussion

In our work, we have searched pathogenic mutations in COL4A4 gene in families with phenotypic signs of ARAS, ADAS and TBMN, which had a previous diagnosis of absence of mutations in COL4A3 gene.

COL4A4 gene in European population

The study of family 3 led us to the discovery of a missense mutation, not yet described. Mutation c.4267C > T; pP1423S involves the change of a proline by a serine in a region in which there has been no specific protein domain described (**Figure 2**). However, the $\alpha 4$ chain has 26 sequences Gly-Xaa-Yaa, wherein Xaa and Yaa is often proline or hydroxyproline. This confers flexibility to the protein [8]. Proline 1423 is located in a sequence Glycine-Valine-Proline. So this change could reduce that flexibility.

Although it was not possible to perform a functional study (due to the lack of availability in our laboratory) we can, however, speculate, from the population study in silico data and family segregation, that there is a high probability that this is the causative mutation of ADAS in this family.

The phenotype caused by this mutation is variable, since some members have mild disease (hearing loss and mild impairment of renal function) and other relatives have an aggressive form, with the need for renal replacement therapy early in life. The possible reason for this phenotypic heterogeneity may be the presence of pathogenic mutations in genes encoding other proteins of the glomerular basement membrane (integrins, metalloprotease, Laminins or podocin), and, by modulating the COL4A4 mutation, promote the onset of the kidney impairment [9, 10].

In family 5 (who suffer from ADAS) a mutation in intron 3 of the COL4A4 gene was found. Although most of the mutations described so far in the COL4A3 and COL4A4 genes are missense mutations, intronic mutations that modify the RNA maturation (*splicing*) have also been described [11]. The mutation IVS3 + 1G > C of the COL4A4 gene changes RNA processing, which affects a canonical sequence processing. The absence of RNA from the proband prevented us from determining whether the mutation involves the incorporation of intron 3 or loss of exon 3 in the coding sequence. Regardless, a change in the reading frame and a premature stop codon, which would produce a protein unable of adequately trimerizing, would likely occur. **Figure 3** shows the reading phase change if exon 3 is lost, and the premature stop codon that is produced in the case of the inclusion of intron 3 in RNA, which generates a truncated protein.

In this family, the mutation generates a mild phenotype, in which chronic kidney disease appears at an advanced age and there is no development to end stage chronic kidney disease. This phenotype coincides with the one traditionally described for ADAS [1, 2].

The main limitation of our study is that the technique used to detect mutations (PCR amplification of all exons, detection of changes in their electrophoretic mobility in heteroduplex and sequencing these exons) does not detect 100% of mutations [12]. This fact could explain why in families 2 and 6, with a clear clinic diagnosis of ARAS and ADAS, no pathogenic mutation was detected.

However, in families 1 and 4, this lack of diagnosis may be due to the technique's shortcomings or because of other diseases that may present with similar symptoms.

Family 1 had the diagnostic of TBMN, and only 40% of patients with this disease are heterozygous carriers of mutations in genes COL4A3/A4 [6], but the remaining members do not present any impairment in these genes. It has recently been reported that mutations in the CFHR5 gene, which encodes a complement protein, are associated with glomerulopathy with haematuria and risk of progressing to chronic kidney disease [13].

In the index case of family 4, the absence of COL4A3/COL4A4 gene mutations may also be related to a different clinical entity than AS. Macrothrombocytopenia has been associated with microhematuria, secondary to mutations in the MYH9 gene. There are three clinical entities: the May-Hegglin, Fechtner and Epstein syndromes, which share ultrastructural lesions with AS [14] and may be associated with hearing impairment and mimic this syndrome.

The seven undescribed intronic variants detected have been considered as population polymorphisms, because they are located in intronic regions, far from the splicing sites, which are shared by different families, as well as from randomly selected healthy individuals.

Conclusions

We describe two new pathogenic mutations in the COL4A4 gene, responsible for autosomal dominant Alport syndrome and 7 new intronic variants, considered as demographic polymorphisms.

COL4A4 gene in European population

Genetic diagnosis of autosomal Alport syndrome is hampered by the large presence of polymorphisms [8, 15-17] (both in the exons and in the intronic regions), and by the possibility that other genes are involved in generating very similar clinical syndromes.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Consolación Rosado, Nephrology Unit, Ávila Hospital, Av. Juan Carlos I s/n, 05004 Ávila, Spain. Tel: 34-920358000; E-mail: crosadorubio@hotmail.com

References

- [1] Tazón B, Ars E, Torra R. The Alport syndrome. *Nefrología* 2003; 23 Suppl 1: 29-39.
- [2] Tazón Vega B, Badenas C, Ars E, Lens X, Milà M, Darnell A, Torra R. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 952-9.
- [3] Buzza M, Dagher H, Wang YY, Wilson D, Babon JJ, Cotton RG, Savige J. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int* 2003; 63: 447-53.
- [4] Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, Schröder CH, Brunner HG, van Oost BA, Monnens LA, Smeets HJ. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest* 1996; 98: 1114-8.
- [5] Marcocci E, Uliana V, Bruttini M, Artuso R, Silengo MC, Zerial M, Bergesio F, Amoroso A, Savoldi S, Pennesi M, Giachino D, Rombolà G, Fogazzi GB, Rosatelli C, Martinhago CD, Carmellini M, Mancini R, Di Costanzo G, Longo I, Renieri A, Mari F. Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1464-71.
- [6] Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V, Ioannou K, Athanasiou Y, Patsias C, Alexopoulos E, Pierides A, Kyriacou K, Deltas C. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 3004-16.
- [7] Pirson Y. Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney Int* 1999; 56: 760-75.
- [8] Boye E, Mollet G, Forestier L, Cohen-Solal L, Heidet L, Cochat P, Grünfeld JP, Palcoux JB, Gubler MC, Antignac C. Determination of the genomic structure of the COL4A4 gene and of novel mutations causing autosomal recessive Alport syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1329-40.
- [9] Zeisberg M, Khurana M, Rao VH, Cosgrove D, Rougier JP, Werner MC, Shield CF 3rd, Werb Z, Kalluri R. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med* 2006; 3: e100.
- [10] Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL. Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 2003; 63: 826-34.
- [11] van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens LA, Schröder CH, Smeets HJ. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 2000; 58: 1870-5.
- [12] Miner JH, Baigent C, Flinter F, Gross O, Judge P, Kashtan CE, Lagas S, Savige J, Blatt D, Ding J, Gale DP, Midgley JP, Povey S, Prunotto M, Renault D, Skelding J, Turner AN, Gear S. The 2014 International Workshop on Alport Syndrome. *Kidney Int* 2014; 86: 679-84.
- [13] Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, Martinez-Barriarte R, Hadjisavvas A, McLean AG, Pusey CD, Pierides A, Kyriacou K, Athanasiou Y, Voskarides K, Deltas C, Palmer A, Frémeaux-Bacchi V, de Cordoba SR, Maxwell PH, Pickering MC. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet* 2010; 376: 794-801.
- [14] Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J, Denison JC, Gregory MC, White JG, Barker DF, Greinacher A, Epstein CJ, Glucksman MJ, Martignetti JA. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1033-45.
- [15] Lemmink HH, Mochizuki T, van den Heuvel LP, Schröder CH, Barrientos A, Monnens LA, van Oost BA, Brunner HG, Reeders ST, Smeets HJ. Mutations in the type IV collagen a3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1269-1273.
- [16] Badenas C, Praga M, Tazón B, Heidet L, Arrondel C, Armengol A, Andrés A, Morales E, Camacho JA, Lens X, Dávila S, Milà M, Antignac C, Darnell A, Torra R. Mutations in the COL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1248-54.
- [17] Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C, Brusco A, Bosio M, Massella L, Lavoratti G, Roccatello D, Frascá G, Mazzucco G, Muda AO, Conti M, Fasciolo F, Arrondel C, Heidet L, Renieri A, De Marchi M. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 2002; 61: 1947-56.

COL4A4 gene in European population

Table S1. Primers and amplification conditions of the COL4A4 gene

Exon	Secuency 5'-3'	Anealing Temperature	Size
2F	TCTGGAAGAGAAGACTGGCA	55 °C	152 pb
2R	AAGCAGGCAATCACACTGA		
3F	TGTTTAAATTAATCTGCGTT	52 °C	105 pb
3R	GCAACCAGAGCTAGTG		
4F	CGATGAGTACTGGTATACTA	55 °C	152 pb
4R	ATGCTGCCCATGTTGGTCTT		
5F	ACCCCCATTCTTTTAAAT	55 °C	208 pb
5R	GGTGAGTCTTTCATGTGAAT		
6F	TCTCTTTGTTTATTTCTG	50 °C	127 pb
6R	GATGAGTACTTCTGCCTTTT		
7F	TTTCGCAAAAATGCTTCACT	55 °C	211 pb
7R	CCACAGGGCCTGTCACTTA		
8F	TACTGAAATGGTAATACGCT	55 °C	184 pb
8R	CATGGGCTTACCTATTGGGA		
9F	TGTGTGGACTTAAAGCGATG	51 °C	96 pb
9R	TAGAGCCTGCTCAGGAGACT		
10F	TTGGGTAACAGATGCACTGA	55 °C	129 pb
10R	AAGGGATCACATCAGCAGTG		
11F	TTGTGTTTTTTCTCCCTTG	49 °C	110 pb
11R	TTTCATTGTTCAAGGCTCTA		
12F	AGCCAGAAGTCTTAATGCT	55 °C	156 pb
12R	TCACCATTGCTCCTCAGAG		
13F	GGGTGGAAACCTTCAAAACA	55 °C	179 pb
13R	TACTTTCCAAGGTGACATAT		
14F	GGAGATGGAATCAGTATGT	55 °C	198 pb
14R	AAAGACCATGAGAAATAACA		
**			
15F	CCCCTCTAAATGTTGCATC	57 °C	180 pb
15R	TTTGAGCTTGTGGACTACT		
16F	AATGATGCACTGAGCTGGTT	57 °C	201 pb
16R	GCACGCAACAGTACAACCTC		
17F	ATTTGTCACCCCGTCACTTT	57 °C	200 pb
17R	GAATGATTCTGGCAATACT		
18F	CCAGGCAACATGAGTAAAAT	55 °C	155 pb
18R	TGGAGGAAGTGAATAGGAAC		
**			
19F	TGCACATACCATTGTTTAT	55 °C	175 pb
19R	CCAGGGCACATCAGGGCATC		
**			
20F	TTCTTCTACAGAGACGTTT	50 °C	259 pb
20R	TGCTAATGGATATGAATAAG		
21F	TATAGAAGACAGTCAGAAAA	50 °C	181 pb
21R	TAGAAATTCTACCTTTGGTG		
22F	AAATATGACAAATCTGCCAT	55 °C	227 pb
22R	GGAAAGATGACTGGTAAGAG		
**			

COL4A4 gene in European population

23F	TGATCCATCACAATTAACCT	51 °C	149 pb
23R	CAGGGAGTTAAGTGATTGAT		
24F	ACTTTACCCTCTGCTGATAA	55 °C	227 pb
24R	GGGAAATAGTTGTTTGTATG		
**			
25F	GACATTCACTGGTTGGTAAT	55 °C	281 pb
25R	TAAACACTTGTACCCCAAAG		
**			
26F	TCAGTTATGTGAATGCCGCT	51 °C	146 pb
26R	TGGGAAGTATATAAGACAGT		
27F	TGAGTCTGTGTTTTGTTTTT	47 °C	161 pb
27R	AAAAAAAAAACCTCAC		
**			
28F	ATTGGTTCTATACTTGACACA	55 °C	309 pb
28R	TCTATGCACCAAAGGACAG		
**			
29F	TGGGCCATCTGTATAGTTTT	52 °C	269 pb
29R	TAATAGTAAGTAGGGTAAGC		
30F	GCCTTCACACACTGTGGTCA	55 °C	240 pb
30R	ATGGGAGGACATCATGAAA		
*, **			
31F	TCCTAAAACTTTATGCTCTC	50 °C	221 pb
31R	TCAAATACCAGAAACAAATG		
32F	CCTGTTCATTTTGTTCTTGC	52 °C	187 pb
32R	TGTCAACTTATTTGATATGG		
33F	TTTCAGCAGAGACCTGTAAC	52 °C	271 pb
33R	AAGAACAGAAAGGTTTTATT		
34F	GTTGTGCATGTGCCATTTGT	55 °C	154 pb
34R	GATGGCTTCTGTATCTCC		
35F	TGAGACCAATTAATTTGTC	55 °C	211 pb
35R	TCATTGCCAGCTAGAAGTAA		
36F	CAAACGGCAACTCTGATGTT	52 °C	183 pb
36R	AGTGCTCAGGAAGTCTCCAG		
37F	TATCTGGCCATCTGCAAAAC	55 °C	173 pb
37R	TTGTGGGATGGGCTTCATTT		
38F	GCGTTTGTGGCTAGAGTGAG	55 °C	189 pb
38R	GAACCATGGACTGAAGCTCAG		
39F	AGGCACTATAACAGGGACAAA	54 °C	420 pb
39R	CATCCTTTGTCATGATTCTCTC		
40F	ACCTTCAAATGCAATGAGG	52 °C	184 pb
40R	CATCCTTTGTCATGATTCTCTC		
41F	TTTTTGCTCTTCTCTGTGG	42 °C	218 pb
41R	AGTTATTCACATATTACTTA		
*			
42F	GCCCTCATTTTTATGTTTTG	52 °C	189 pb
42R	GTTGGAAGCTCACCTGGAAG		
43F	GACTGGCCTCGTTTG	49 °C	178 pb
43R	TTAATATCCTTACAGCACCC		
44F	ATTACACAAGCGGTGATTCC	54 °C	213 pb
44R	AGAATTTCAATTCAGCAATA		

COL4A4 gene in European population

45F	CACCAGCATCATAAACTT	49 °C	186 pb
45R	AGGTTTACAGTGCAGAGAA		
46F	AGTGCCAGAACAGAGGTGCT	55 °C	297 pb
46R	GGAGATGGGCGATCCTGTA		
47F	ACACCAGCTGTCTTCTTTC	55 °C	353 pb
47R	TGAATGAGCCAGGGTTT		
48F	GTGTGTGTCTGAGCCCTAAT	55 °C	323 pb
48R	TGGTGAATTCGCATTCT		

Investigators: Consolación Rosado, Elena Bueno, Rogelio González-Sarmiento. In this table we show the amplification conditions of the primers of the COL4A4 gene in our laboratory. *0.5 mL MgCl₂ **0.3 mL DMSO.

Bibliografía

1. Tazón B, Ars E, Torra R. The Alport Syndrome. *Nefrologia*. 2003;23 Suppl 1:29-39.
2. Tazón Vega B, Badenas C, Ars E, Lens X, Milà M, Darnell A et al. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am J Kidney Dis*. 2003 Nov;42(5):952-9.
3. Buzza M, Dagher H, Wang YY, Wilson D, Babon JJ, Cotton RG, et al. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int*. 2003 Feb;63(2):447-53.
4. Badenas C, Praga M, Tazón B, Heidet L, Arrondel C, Armenogol A et al. Mutations in the COL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. *J Am Soc Nephrol*. 2002 May;13(5):1248-54.
5. Tiebosch AT, Frederik PM, van Breda Vriesman PJ, Mooy JM, van Rie H, van de Wiel TW et al. Thin-basement-membrane nephropathy in adults with persistent hematuria. *N Engl J Med*. 1989 Jan 5;320(1):14-8.
6. Dische FE, Weston MJ, Parsons V. Abnormally thin glomerular basement membranes associated with hematuria, proteinuria or renal failure in adults. *Am J Nephrol* 1985;5(2):103-9.
7. Kashtan CE. Familial hematuria. *Pediatr Nephrol*. 2009 Oct;24(10):1951-8.
8. Cohan EP. Alport syndrome: a specific case of hereditary nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 1999 Jan-Mar;10(1):1-6.
9. Dickinson WH. Diseases of the kidney and urinary derangements. London: Langmans; 1875. part 1, p. 379.
10. Pel PK. Die erblichkeit der chronischen nephritis. *Ziet Klin Med* 1899;38:127.
11. Guthrie LG. "Idiopathic" or congenital hereditary and familial hematuria. *Lancet* 1902;1:1243-6.
12. Hurst AF. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Medical Chronicle* 1915;213-7.
13. Eason J, Smith M, Buchanan G. Hereditary and familial nephritis. *Lancet* 1924;2:639-46.
14. García V. Historias acerca del Síndrome de Alport. *NefroPlus* 2011;4(1):58-60.

15. Alport AC. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J*. 1927 Mar 19;1(3454):504-6.
16. Dick GF, Dick GH. Experimental scarlet fever. *J Am Med Assoc* 1923;81:1166-7.
17. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Oct;15(10):2514-27.
18. Kefalides NA: Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 1973; 6: 63–104.
19. Spiro RG: Biochemistry of the renal glomerular basement membrane and its alterations in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1973; 288:1337–1342.
20. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 1981; 120: 203–211.
21. Soininen R, Haka-Risku T, Prockop DJ, Tryggvason K. Complete primary structure of the alpha 1-chain of human basement membrane (type IV) collagen. *FEBS Lett* 1987; 225: 188–194.
22. Saus J, Quinones S, MacKrell A, Blumberg B, Muthukumar G, Pihlajaniemi T, et al. The complete primary structure of mouse alpha 2(IV) collagen. Alignment with mouse alpha 1(IV) collagen. *J Biol Chem* 1989; 264: 6318–6324.
23. Butkowski RJ, Langeveld JP, Wieslander J, Hamilton J, Hudson BG: Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1987; 262: 7874–7877.
24. Saus J, Wieslander J, Langeveld JP, Quinones S, Hudson BG: Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 1988; 263: 13374–13380.
25. Gunwar S, Saus J, Noelken ME, Hudson BG: Glomerular basement membrane. Identification of a fourth chain, alpha 4, of type IV collagen. *J Biol Chem* 1990; 265: 5466–5469.
26. Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K: Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1606–1610.

27. Myers JC, Jones TA, Pohjolainen ER, Kadri AS, Goddard AD, Sheer D et al: Molecular cloning of alpha 5(IV) collagen and assignment of the gene to the region of the X chromosome containing the Alport syndrome locus. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 1024–1033.
28. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, et al: Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990; 248: 1224–1227.
29. Mariyama M, Zheng K, Yang-Feng TL, Reeders ST: Colocalization of the genes for the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) chains of type IV collagen to chromosome 2 bands q35–q37. *Genomics* 1992; 13: 809–813.
30. Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, et al: Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993; 261: 1167–1169.
31. Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, Ninomiya Y: Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem* 1994; 269: 7520–7526.
32. Spear GS, Slusser RJ. Alport's syndrome. Emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. *Am J Pathol.* 1972 Nov;69(2):213-24.
33. Gubler MC. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008 Jan;4(1):24-37.
34. Baehr G. Benign and curable form of hemorrhagic nephritis. *JAMA.* 1926; 86:1001.
35. McConville JM, McAdams AJ. Familial and nonfamilial benign hematuria. *J Pediatr.* 1966 Aug;69(2):207-14.
36. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, Schröder CH, Brunner HG, van Oost BA et al. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest.* 1996 Sep 1;98(5):1114-8.
37. Rigden SP, Mehls O, Jones EH, Valderrábano F. Report on management of renal failure in Europe, XXV, 1994. The child-adult interface. The EDTA-ERA Registry. European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11 Suppl 1:22-36.

38. Arrondel C, Deschênes G, Le Meur Y, Viau A, Cordonnier C, Fournier A et al. A large tandem duplication within the COL4A5 gene is responsible for the high prevalence of Alport syndrome in French Polynesia. *Kidney Int.* 2004 Jun;65(6):2030-40.
39. Oni AO, Eweka AO, Otuaga PO, Odia JO. Alport's syndrome. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2009 Nov;20(6):1087-9.
40. Savage J, Rana K, Tonna S, Buzzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int* 2003;64(4):1169-78.
41. Tiebosch AT, Frederik PM, Breda Vriesman PJ, Mooy JM, van Rie H, van de Wiel TW et al. Thin-basement membrane nephropathy in adults with persistent hematuria. *N Engl J Med* 1989;320(1):14-8.
42. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech.* 2008 May;71(5):357-70.
43. Boye E, Mollet G, Forestier L, Cohen-Solal L, Heidet L, Cochat P et al. Determination of the genomic structure of the COL4A4 gene and of novel mutations causing autosomal recessive Alport syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998 Nov;63(5):1329-40.
44. Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutierrez B, et al. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jan;12(1):97-106.
45. Demosthenous P, Voskarides K, Stylianou K, Hadjigavriel M, Arsali M, Patsias C et al. X-linked Alport syndrome in Hellenic families: phenotypic heterogeneity and mutations near interruptions of the collagen domain in COL4A5. *Clin Genet.* 2012 Mar;81(3):240-8.
46. Endreffy E, Ondrik Z, Iványi B, Maróti Z, Bereczki C, Haszon I et al. Collagen type IV nephropathy: genetic heterogeneity examinations in affected Hungarian families. *Mol Cell Probes.* 2011 Feb;25(1):28-34. Epub 2010 Oct 14.
47. Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C et al. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int.* 2002 Jun;61(6):1947-56.
48. Baek JI, Choi SJ, Park SH, Choi JY, Kim CD, Kim YL, et al. Identification of novel variants in the COL4A4 gene in Korean patients

- with thin basement membrane nephropathy. *Indian J Med Res.* 2009 May;129(5):525-33.
49. Buzza M, Wilson D, Savige J. Segregation of hematuria in thin basement membrane disease with haplotypes at the loci for Alport syndrome. *Kidney Int.* 2001 May;59(5):1670-6.
 50. Buzza M, Wang YY, Dagher H, Babon JJ, Cotton RG, Powell H, et al. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int.* 2001 Aug;60(2):480-3.
 51. Pirson Y. Making the diagnosis of Alport syndrome. *Kidney Int.* 1999 Aug;56(2):760-75.
 52. Kobayashi T, Uchiyama M. Effect of HSP47 expression levels on heterotrimer formation among type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$ chains. *Biomed Res.* 2010 Dec;31(6):371-7.
 53. Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, St John PL. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jul;20(7):1471-9.
 54. Van Agtmael T, Bruckner-Tuderman L. Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res.* 2010 Jan;339(1):167-88.
 55. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med.* 2003 Jun 19;348(25):2543-56.
 56. Lebleu VS, Sugimoto H, Miller CA, Gattone VH 2nd, Kalluri R. Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease. *Lab Invest.* 2008 Mar;88(3):284-92.
 57. Cosgrove D. Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol.* 2012 Jun;27(6):885-90.
 58. Abrahamson DR, Isom K, Roach E, Stroganova L, Zelenchuk A, Miner JH et al. Laminin compensation in collagen alpha3(IV) knockout (Alport) glomeruli contributes to permeability defects. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Sep;18(9):2465-72.
 59. Meehan DT, Delimont D, Cheung L, Zallocchi M, Sansom SC, Holzclaw JD, et al. Biomechanical strain causes maladaptive gene regulation, contributing to Alport glomerular disease. *Kidney Int.* 2009 Nov;76(9):968-76.

60. Cosgrove D, Meehan DT, Delimont D, Pozzi A, Chen X, Rodgers KD et al. Integrin alpha1beta1 regulates matrix metalloproteinases via P38 mitogen-activated protein kinase in mesangial cells: implications for Alport syndrome. *Am J Pathol.* 2008 Mar;172(3):761-73.
61. Aarons I, Smith PS, Davies RA, Woodroffe AJ, Clarkson AR. Thin membrane nephropathy: a clinico-pathological study. *Clin Nephrol.* 1989 Oct;32(4):151-8.
62. Heidet L, Gubler MC. The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jun;20(6):1210-5.
63. Hisano S, Kwano M, Hatae K, Kaku Y, Yamane I, Ueda K et al. Asymptomatic isolated microhaematuria: natural history of 136 children. *Pediatr Nephrol.* 1991 Sep;5(5):578-81.
64. Guan N, Yu LX, Wu GH, Xing Y, Ding J. Antigen retrieval with protease digestion applied in immunohistochemical diagnosis of Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Nov;23(11):3509-13.
65. Gubler MC. Diagnosis of Alport syndrome without biopsy? *Pediatr Nephrol.* 2007 May;22(5):621-5.
66. Rheault MN. Women and Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2012 Jan;27(1):41-6.
67. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s). *Pediatr Nephrol.* 2012 Aug;27(8):1221-31.
68. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC et al. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Aug;12(8):1595-9.
69. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(4):649-57.
70. Tan R, Colville D, Wang YY, Rigby L, Savige J. Alport retinopathy results from "severe" COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Jan;5(1):34-8.
71. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A et al. X-Linked Alport Syndrome: Natural History and Genotype- Phenotype Correlations in Girls and Women Belonging to 195

- Families: A “European Community Alport Syndrome Concerted Action” Study. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Oct;14(10):2603-10.
72. Izzedine H, Tankere F, Launay-Vacher V, Deray G. Ear and kidney syndromes: molecular versus clinical approach. *Kidney Int*. 2004 Feb;65(2):369-85.
73. Gubler M, Levy M, Broyer M, Naizot C, Gonzales G, Perrin D et al. Alport’s syndrome. A report of 58 cases and a review of the literature. *Am J Med*. 1981 Mar;70(3):493-505.
74. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoume A et al. Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2010 May;21(5):876-83.
75. Al-Mahmood AM, Al-Swailem SA, Al-Khalaf A, Al-Binali GY. Progressive posterior lenticonus in a patient with Alport syndrome. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2010 Oct;17(4):379-81.
76. Amiraslanzadeh G. Is anterior lenticonus the most common ocular finding in Alport syndrome? *J Cataract Refract Surg*. 2008 Jan;34(1):5.
77. Aslanzadeh GA, Gharabaghi D, Naderi N. Clear lens phacoemulsification in the anterior lenticonus due to Alport Syndrome: two case reports. *J Med Case Rep*. 2008 May 27;2:178.
78. Ohkubo S, Takeda H, Higashide T, Ito M, Sakurai M, Shirao Y et al. Immunohistochemical and molecular genetic evidence for type IV collagen alpha 5 chain abnormality in the anterior lenticonus associated with Alport syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2003 Jun;121(6):846-50.
79. Seymenoğlu G, Baser EF. Ocular manifestations and surgical results in patients with Alport syndrome. *J Cataract Refract surg*. 2009 Jul;35(7):1302-6.
80. Shaw EA, Colville D, Wang YY, Zhang KW, Dagher H, Fasset R et al. Characterization of the peripheral retinopathy in X-linked and autosomal recessive Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jan;22(1):104-8.
81. Colville D, Wang YY, Tan R, Savige J. The retinal “lozenge” or “dull macular reflex” in Alport syndrome may be associated with a severe retinopathy and early-onset renal failure. *Br J Ophthalmol*. 2009 Mar;93(3):383-6.

82. Liu J, Colville D, Wang YY, Baird PN, Guymer RH, Savige J. The dot-and-fleck retinopathy of X linked Alport syndrome is independent of complement factor H (CFH) gene polymorphisms. *Br J Ophthalmol*. 2009 Mar;93(3):379-82.
83. Zarranz Ventura J, De Nova E, Moreno-Montañés J. Corneal manifestations in systemic diseases. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31 Suppl 3:155-70.
84. Claus F, Geboes K, D'Hoore A. Clinical Challenges and Images in GI: image 2. Anorectal leiomyomatosis in Alport-(like) syndrome. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1053,1432.
85. Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N et al. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol*. 2011 Jan;30(1):3-8.
86. Vaicys C, Hunt CD, Heary RF. Ruptured intracranial aneurysm in an adolescent with Alport's syndrome—a new expression of type IV collagenopathy. *Surg Neurol* 2000;54: 68-72.
87. Bassareo PP, Marras AR, Mercurio G. Ventricular septal defect in a child with Alport syndrome: a case report. *BMC Cardiovascular Disord*. 2010 Oct 5;10:48.
88. Kashtan CE, Segal Y, Flinter F, Mekanjuola D, Gan JS, Watnick T. Aortic abnormalities in males with Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Nov;25(11):3554-60.
89. Viteli F, Piccini M, Caroli F, Franco B, Malandrini A, Pober B et al. Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME). *Genomics*. 1999 Feb 1;55(3):335-40.
90. Deltas C. Thin basement membrane nephropathy: is there genetic predisposition to more severe disease? *Pediatr Nephrol*. 2009 Apr;2484):877-9.
91. van Paassen P, van Breda Vriesman PJ, van Rie H, Tervaert JW. Signs and symptoms of thin basement membrane nephropathy: a prospective regional study on primary glomerular disease-The Limburg Renal Registry. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):909-13.
92. Krol RP, Nozu K, Nakanishi K, Iijima K, Takeshima Y, Fu XJ et al. Somatic mosaicism for a mutation of the COL4A5 gene is a cause

- of mild phenotype male Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Aug;23(8):2525-30.
93. Uliana V, marcocci E, Mucciolo M, Meloni I, Izzi C, Manno C et al. Alport syndrome and leiomyomatosis: the first deletion extending beyond COL4A6 intron 2. *Pediatr Nephrol*. 2011 May;26(5):717-24.
94. Migeon BR. X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2052-9.
95. Rheault MN, Kren SM, Hartich LA, Wall M, Thomas W, Mesa HA et al. X-inactivation modifies disease severity in female carriers of murine X-linked Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Mar;25(3):764-9.
96. Torra R, Badenas C, Cofán F, Callis L, Pérez-Oller L, Darnell A. Autosomal recessive Alport syndrome: linkage analysis and clinical features in two families. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Mar;14(3):627-30.
97. Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, Martinez-Barricarte R, Hadjisavvas A, McLean AG et al. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet*. 2010 Sep 4;376(9743):794-801.
98. Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. Genetics of classic Alport's syndrome. *Lancet*. 1988 Oct 29;2(8618):1005-7.
99. Hanson H, Storey H, Pagan J, Flinter F. The value of clinical criteria in identifying patients with X-linked Alport syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Jan;6(1):198-203.
100. Thodi C, Thodis E, Danielides V, Pasadakis P, Vargemezis V. Hearing in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Nov;21(11):3023-30.
101. Zang KW, Colville D, Tan R, Jones C, Alexander SI, Fletcher J et al. The use of ocular abnormalities to diagnose X-linked Alport syndrome in children. *Pediatr Nephrol*. 2008 Aug;23(8):1245-50.
102. Van der Loop FT, Monnens LA, Schröder CH, Lemmink HH, Breuning MH, Timmer ED et al. Identification of COL4A5 defects in Alport's syndrome by immunohistochemistry of skin. *Kidney Int*. 1999 Apr;55(4):1217-24.

103. Lagona E, Tsartsali L, Kostaridou S, Skiathitou A, Georgaki E, Sotsiou F. Skin biopsy for the diagnosis of Alport syndrome. *Hipokratia*. 2008 apr;12(2):116-8.
104. Naito I, Nomura S, Inoue S, Kagawa M, Matsubara T, Araki T et al. X-linked Alport syndrome with normal distribution of collagen IV alpha chains in epidermal basement membrane. *Contrib Nephrol*. 1997;122:134-9.
105. Toygar HU, Toygar O, Guzeldemir E, Cilasun U, Nacar A, Bal N. Alport syndrome: significance of gingival biopsy in the initial diagnosis and periodontal evaluation after renal transplantation. *J Appl Oral Sci*. 2009 Nov-Dec;17(6):623-9.
106. Slajpah M, Meglic A, Furlan P, Glavac D. The importance of non-invasive genetic analysis in the initial diagnostics of Alport syndrome in young patients. *Pediatr Nephrol*. 2005 sep;20(9):1260-4.
107. Copelovitch L, Kaplan BS. Is genetic testing of healthy pre-symptomatic children with possible Alport syndrome ethical? *Pediatr Nephrol*. 2006 Apr;21(4):455-6.
108. Tazon-Vega B, Ars E, Burset M, et al. Genetic testing for X-linked Alport syndrome by direct sequencing of COL4A5 cDNA from hair root RNA samples. *Am J Kidney Dis* 2007;50(2):257-14.
109. Pont-Kingdon G, Sumner K, Gedge f, Miller C, Denison J, Gregory M, Lyon E. Molecular testing for adult type Alport syndrome. *BMC Nephrol*. 2009 Nov 17;10:38.
110. Paterson AD, Liu XQ, Wang K, Magistroni R, Song X, Kappel J et al. Genome-wide linkage scan of a large family with IgA nephropathy localizes a novel susceptibility locus to chromosome 2q36. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Aug;18(8):2408-15.
111. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Feb;26(2):414-30.
112. Heath KE, Campos-Barros A, Toren A, Rozenfeld-Granot G, Carlsson LE, Savige J et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein and Alport-like syndromes. *Am J Hum Genet*. 2001 Nov;69(5):1033-45.
113. Marcocci E, Uliana V, Bruttini M, Artuso R, Silengo MC, Zerial M et al. Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis

- of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 May;24(5):1464-71.
114. Callís L, Vila A, Carrera M, Nieto J. Long-term effects of cyclosporine A in Alport's syndrome. *Kidney Int*. 1999 Mar;55(3):1051-6.
115. Webb NJ, Lam C, Shahinfar S, Strehlau J, Wells TG, Gleim GW et al. Efficacy and safety of losartan in children with Alport syndrome results from a subgroup analysis of a prospective, randomized, placebo- or amlodipine-controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Aug;26(8):2521-6.
116. Li JG, Ding J, Wang F, Zhang HW. Drugs controlling proteinuria of patients with Alport syndrome. *World J Pediatr*. 2009 Nov;5(4):308-11.
117. Massella L, Muda AO, Legato A, Di Zazzo G, Giannakakis K, Emma F. Cyclosporine A treatment in patients with Alport syndrome: a single-center experience. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jul;25(7):1269-75.
118. Bensman A, Niaudet P. Non-immunologic mechanisms of calcineurin inhibitors explain its antiproteinuric effects in genetic glomerulopathies. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jul;25(7):1197-9.
119. Sampimon DE, Vlijm A, Phoa SS, Krediet RT, Struijk DG. Encapsulating peritoneal sclerosis in a peritoneal dialysis patient using biocompatible fluids only: is Alport syndrome a risk factor? *Perit Dial Int*. 2010 Mar-Apr;30(2):240-2.
120. Byrne MC, Budisavljevic MN, Fan Z, Self SE, Ploth DW. Renal transplant in patients with Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2002 Apr;39(4):769-75.
121. Ierino FL, Kanellis J. Thin basement membrane nephropathy and renal transplantation. *Semin Nephrol*. 2005 May;25(3):184-7.
122. Mojahedi MJ, Hekmat R, Ahmadnia H. Kidney transplantation in patients with Alport syndrome. *Urol J*. 2007 Fall;4(4):234-7.
123. Shah B, First MR, Mendoza NC, Clyne DH, Alexander JW, Weiss MA. Alport's syndrome: risk of glomerulonephritis induced by anti-glomerular-basement-membrane antibody after renal transplantation. *Nephron*. 1988;50(1):34-8.
124. Kashtan C. Autotopes and allotopes. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Dec;16(12):3455-7.

125. Browne G, Brown PA, Tomson CR, Fleming S, Allen A, Herriot R et al. Retransplantation in Alport post-transplant anti-GBM disease. *Kidney Int.* 2004 Feb;65(2):675-81.
126. Kang JS, Kashtan CE, Turner AN, Heidet L, Hudson BG, Borza DB. The alloantigenic sites of alpha3alpha4alpha5(IV) collagen: pathogenic X-linked Alport alloantibodies target two accessible conformational epitopes in the alpha5NC1 domain. *J Biol Chem.* 2007 Apr 6;282(14):10670-7.
127. Wang XP, Fogo AB, Colon S, Giannico G, Abul-Ezz SR, Miner JH et al. Distinct epitopes for anti-glomerular basement membrane Alport alloantibodies and Goodpasture autoantibodies within the non-collagenous domain of alpha3(IV) collagen: a janus-faced antigen. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Dec;16(12):3563-71.
128. Heidet L, Borza DB, Jouin M, Sich M, Mattei MG, Sado Y et al. A human-mouse chimera of the alpha3alpha4alpha5(IV) collagen protomer rescues the renal phenotype in Col4a3^{-/-} Alport mice. *Am J Pathol.* 2003 Oct;163(4):1633-44.
129. Rutgers A, Meyers KE, Canziani G, Kalluri R, Lin J, Madaio MP. High affinity of anti-GBM antibodies from Goodpasture and transplanted Alport patients to alpha3(IV)NC1 collagen. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):115-22.
130. Wong CJ, Rogers I. Cell therapy for Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Nov;20(11):2279-81.
131. Gross O, Borza DB, Anders HJ, Licht C, Weber M, Segerer S et al. Stem cell therapy for Alport syndrome: the hope beyond the hype. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Mar;24(3):731-4.
132. LeBleu VS, Kalluri R. Stem cell-based therapy for glomerular diseases: an evolving concept. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Sep;19(9):1621-3.
133. LeBleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E, Miller CA et al. Stem cell therapies benefit Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Nov;20(11):2359-70.
134. Tanaka M, Asada M, Higashi AY, Nakamura J, Oguchi A, Tomita M et al. Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):768-77.

135. Koepke ML, Weber M, Schulze-Lohoff E, Beirowski B, Segerer S, Gross O. Nephroprotective effect of the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Apr;22(4):1062-9.
136. Heikkilä P, Tibell A, Morita T, Chen Y, Wu G, Sado Y et al. Adenovirus-mediated transfer of type IV collagen alpha5 chain cDNA into swine kidney in vivo: deposition of the protein into the glomerular basement membrane. *Gene Ther*. 2001 Jun;8(11):882-90.
137. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V et al. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Nov;18(11):3004-16.
138. Lemmink HH, Mochizuki T, van der Heuvel LP et al: Mutations in the type IV collagen A3(COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1269–1273.
139. Savva I, Pierides A, Deltas C. RAAS inhibition and the course of Alport syndrome. *Pharmacol Res*. 2016 May;107:205-210.
140. Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Feb;24(3):364-75.
141. Miner JH, Baigent C, Flinter F, Gross O, Judge P, Kashtan CE, Lagas S, Savige J, Blatt D, Ding J, Gale DP, Midgley JP, Povey S, Prunotto M, Renault D, Skelding J, Turner AN, Gear S. The 2014 International Workshop on Alport Syndrome. *Kidney Int*. 2014 Oct;86(4):679-84.
142. C. Rosado. Hearing loss and Alport Syndrome. *ENT & audiology news*. 2015;24(2):71-72.
143. Rosado Rubio C, Dominguez Bravo A. Genetic kidney diseases with sensorineural hearing loss. En: Hughes JD, editor. *Hearing Loss: etiology, management and societal implications*. Nueva York: Nova Science Publishers, Inc.; 2017. p. 87-103.
144. Zeisberg M, Khurana M, Rao VH et al. Stage specific action of matrix metalloproteinases influence progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med* 4: e100. 2006.

145. Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL, laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 3:826-834. 2003.
146. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O, Deltas C, Flinter F, Ding J, Gale DP, Nagel M, Yau M, Shagam L, Torra R, Ars E, Hoefele J, Garosi G, Storey H. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2018 Jul 9. doi: 10.1007/s00467-018-3985-4. [Epub ahead of print].

ABREVIATURAS

α (IV): Cadena α del colágeno IV
A: Alanina
aa: Aminoácido
Ac: Anticuerpo
AD: Autosómico dominante
ADN: Ácido desoxirribonucleico
Ag: Antígeno
AR: Autosómico recesiva
ARN: Ácido ribonucleico
C: Citosina
CsA: Ciclosporina A
EMBD: Enfermedad de la membrana basal delgada
ERC: Enfermedad renal crónica
ERCT: Enfermedad renal crónica terminal
G: Guanina
HFB: Hematuria familiar benigna
HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato
HTA: Hipertensión arterial
IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IF: Inmunofluorescencia
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucinas
ISRS: Inhibidores del sistema renina-angiotensina II-aldosterona
MBE: Membrana basal epidérmica
MBG: Membrana basal glomerular
ME: Microscopio electrónico
MMP: Metaloproteasas de la matriz mesangial
MO: Microscopio óptico
mRNA: Ácido ribonucleico mensajero
NC: Dominio no colágeno carboxiterminal
Pb: Pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
SA: Síndrome de Alport
SAAD: Síndrome de Alport autosómico dominante
SAAR: Síndrome de Alport autosómico recesivo
SALX: Síndrome de Alport ligado al cromosoma X
SGP: Síndrome de Goodpasture
SNP: Polimorfismo de nucleótido simple
T: Timina
TGF: Factor transformante de crecimiento
TMO: Trasplante de médula ósea



VNiVERSiDAD
DSALAMANCA