



El síndrome de Alport

B. Tazón, E. Ars y R. Torra

Laboratorio Experimental y Servicio de Nefrología. Enfermedades Renales Hereditarias. Fundació Puigvert. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Alport (SA) es una enfermedad hereditaria que afecta a las membranas basales, causada por alteraciones en una de sus proteínas estructurales: el colágeno tipo IV. Se estima que su prevalencia en la población general es de 1:50.000¹.

En 1902, L. Guthrie fue uno de los primeros autores en describir una familia en la que 12 individuos presentaban hematuria recurrente². Posteriormente, A.F. Hurst notificó que algunos miembros de esta misma familia habían desarrollado uremia,³ pero no fue hasta 1927, que A. Cecil Alport⁴ describió la aparición de sordera asociada a insuficiencia renal en la familia, en la que los hombres afectados morían con uremia y las mujeres afectadas vivían hasta edades avanzadas. A partir de este momento, el nombre de «Síndrome de Alport» se convirtió en sinónimo de nefropatía familiar progresiva asociada a sordera que es manifestada de forma particularmente severa por los hombres.

Actualmente se conoce que la alteración molecular responsable del SA son mutaciones en los genes que codifican algunas de las diferentes cadenas del colágeno tipo IV, de manera que la enfermedad está causada por anomalías en las membranas basales compuestas por proteínas que codifican estos genes.

PATRONES DE HERENCIA

El SA se transmite mediante tres patrones de herencia diferentes: la herencia ligada al cromosoma X, la herencia autosómica recesiva y la herencia autosómica dominante. Todos comparten unas características clínicas comunes pero la historia familiar varía para cada uno de ellos.

Síndrome de Alport ligado al cromosoma X: SALX (MIM 301050)

El SA se caracteriza por: hematuria, proteinuria significativa, hipertensión, sordera neurosensorial y progresión hacia insuficiencia renal crónica terminal (IRCT)⁴. Estos síntomas son generales a todas las formas de SA, pero en el caso del SALX se limitan únicamente a aquellos pacientes que sean hombres, como toda enfermedad ligada al cromosoma X sólo los hombres la padecen y las mujeres son portadoras. Sin embargo, las mujeres portadoras de SALX tienen una clínica muy variable (desde enfermedad asintomática hasta una presentación severa) que se cree debida a diferentes patrones de inactivación del cromosoma X⁵.

Síndrome de Alport autosómico recesivo: SAAR (MIM 203780)

El SAAR se caracteriza por los síntomas clásicos de SA, pero éstos están presentes por igual en hombres y en mujeres. La prevalencia y el patrón clínico en los individuos portadores están aún por determinar, aunque la hematuria parece ser uno de los síntomas mayoritarios. El SAAR debe sospecharse cuando un individuo exhibe el cuadro clínico y patológico de la enfermedad pero carece de antecedentes familiares, especialmente cuando una mujer posee síntomas indicativos de enfermedad grave como sordera, insuficiencia renal o proteinuria severa en la juventud. La sospecha de un patrón de herencia autosómico recesivo debe ser especialmente fuerte cuando se dé consanguinidad entre los padres.

Síndrome de Alport dominante: SAAD (mim 104200)

Clínicamente es igual al SAAR (es decir, un SA que se puede presentar tanto en varones como en mujeres) pero con una herencia autosómica dominante. Además, se postula que en los casos de SAAD la progresión a IRCT pudiera ser más lenta que en

Correspondencia: Dra. Roser Torra
Enfermedades Renales Hereditarias
Servicio de Nefrología
Fundació Puigvert
Cartagena, 340-350
08025 Barcelona
E-mail: rtorra@fundacio-puigvert.es

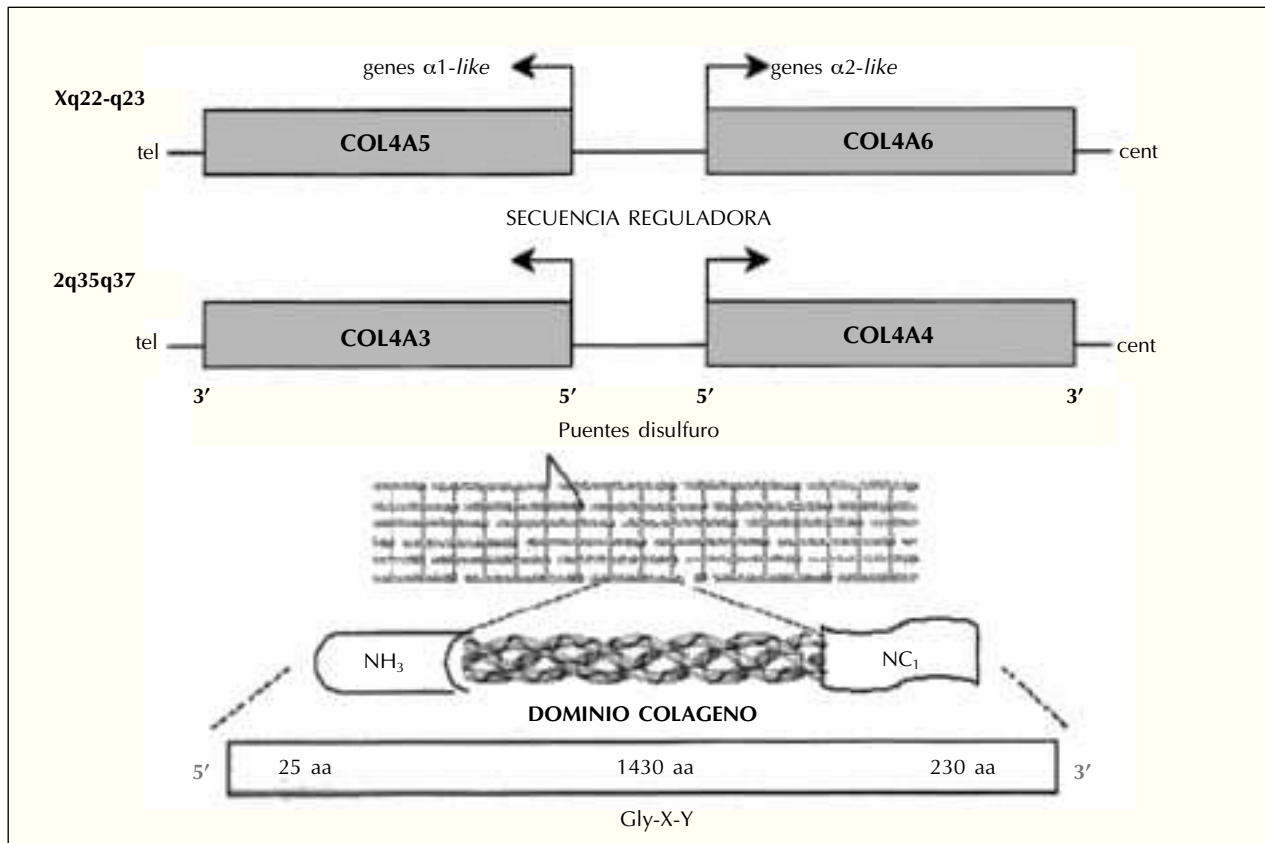


Fig. 1.—Estructura de los genes del colágeno tipo IV implicados en el síndrome de Alport.

otros tipos de SA⁶. Para aceptar este patrón de herencia se exige una transmisión varón-varón de la enfermedad.

BASES MOLECULARES

Se han identificado, hasta el momento, seis cadenas genéticamente diferentes de colágeno IV, cada una de ellas codificada por un gen: COL4A1-COL4A6. Estos genes se localizan por parejas en tres cromosomas diferentes: cromosoma 13 (COL4A1-COL4A2), cromosoma 2 (COL4A3-COL4A4) y cromosoma X (COL4A5-COL4A6). Los 6 genes del colágeno tipo IV se clasifican en dos grupos: los $\alpha 1$ -like (al que pertenecen las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$) y los $\alpha 2$ -like (al que pertenecen las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$). Estos genes están dispuestos de manera que cada gen codificante para una cadena $\alpha 1$ -like está emparejado con un gen codificante para una cadena $\alpha 2$ -like, pero se transcriben en direcciones opuestas de manera que comparten entre ellos las secuencias reguladoras que modulan su actividad (ver figura 1).

El extremo 5' de cada gen del colágeno IV codifica para un péptido señal y los 5 últimos exones en el extremo 3' codifican para el dominio no-colágeno carboxi-terminal (NC1) del producto proteico. Este dominio posee 12 residuos de cisteína completamente conservados en las diferentes cadenas de colágeno IV, que son las encargadas de establecer los puentes disulfuro entre dominios NC1 para la unión entre cadenas α . Si una mutación sustituye una de estas cisteínas por otro aminoácido, la formación de la triple hélice quedará afectada⁷. El resto de exones intermedios codifican para el dominio colágeno de la proteína (unos 1.430 residuos) que contiene la secuencia repetitiva Glicina (Gly)-X-Y, en la que X e Y representan una gran variedad de aminoácidos. El dominio colágeno está interrumpido, por diferentes secuencias, en unas 25 localizaciones altamente conservadas⁸. Las mutaciones más comunes en estos genes son mutaciones de sentido erróneo (*missense*) en que una glicina del dominio colágeno es sustituida por otro aminoácido. Al ser la glicina el aminoácido más pequeño que existe, se cree que es el único que cabe en los pliegues den-

tro de la estructura de triple hélice que forman las proteínas del colágeno tipo IV. Si alguna de estas glicinas es sustituida por un aminoácido mayor, la triple hélice quedará desestructurada y no podrá formar la matriz típica de las membranas basales⁹. Sustituciones de las glicinas del dominio colágeno son la causa de numerosas enfermedades provocadas por alteraciones de diferentes tipos de colágeno: I, II, III, IV, IX, X y XI¹⁰.

Las cadenas $\alpha 1$ (IV) y $\alpha 2$ (IV) se expresan normalmente en todas las membranas basales, por el contrario, las cadenas $\alpha 3$ (IV) y $\alpha 4$ (IV) son específicas y altamente expresadas en: membrana basal glomerular (MBG), cápsula de Bowman, membrana basal del túbulo distal, cápsula de Lens, membrana de Descemet, membrana de Bruch y varias membranas basales de la cóclea. Estos tejidos son los afectados en los pacientes con SA. Todas las membranas basales que expresan las cadenas $\alpha 3$ (IV) y $\alpha 4$ (IV) también expresan la cadena $\alpha 5$ (IV), y ésta está también presente en la membrana basal epidérmica (MBE). La coausencia de las tres cadenas es un marcador irrefutable de SA, sin embargo, su expresión normal en la MBG no permite la exclusión de la enfermedad^{7,9,11-13}. Una mutación en cualquiera de las tres cadenas $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV) o $\alpha 5$ (IV) puede provocar la coausencia de las otras dos cadenas en la MBG, por lo que los pacientes con SA tienen una sobreexpresión de las cadenas $\alpha 1$ (IV) y $\alpha 2$ (IV) (distribución que recuerda a la fetal) debido a que estas cadenas van ocupando progresivamente la MBG (fenómeno denominado *isotype switching*). Se cree que este hecho confiere a la MBG una mayor susceptibilidad al ataque proteolítico por parte de colagenasas y catepsinas, por lo que en un principio el riñón de un paciente con SA es normal, pero se va deteriorando progresivamente¹⁴.

Síndrome de Alport ligado al cromosoma X: SALX

Mutaciones en el gen *COL4A5* son la base molecular del SALX que representa el 80-85% de los casos familiares de SA.

Hoy por hoy, se han descrito unas 300 mutaciones diferentes en el gen *COL4A5* como causantes del SALX¹⁵. Estas mutaciones están distribuidas a lo largo de todo el gen sin haberse encontrado ninguna región especialmente rica en mutaciones, y son mutaciones privadas, es decir, salvo algunas excepciones ninguna familia comparte la misma mutación. Aproximadamente el 10-15% de las mutaciones son *de novo*, habiendo ocurrido en uno de los gametos de los progenitores. Las mutaciones más frecuentes en el gen *COL4A5*, con un 40%, son aquellas que

dan lugar a un codón prematuro de terminación (*stop*): mutaciones sin sentido (*nonsense*) y deleciones/inserciones que provocan un cambio de la pauta de lectura (*frame-shift*). Aproximadamente un 35% de las mutaciones son de sentido erróneo (*missense*) y un 10% son pequeñas deleciones/inserciones que no provocan un cambio de la pauta de lectura (*in-frame*) junto con mutaciones de ensamblaje (*splicing*) que causan la pérdida de uno o varios exones. Por último, el 5-15% de las mutaciones consisten en grandes reordenamientos del gen como por ejemplo grandes deleciones¹⁶. Se ha estudiado la región intermedia entre los genes *COL4A5* y *COL4A6* en 30 pacientes de SALX, y no se ha encontrado ninguna mutación en ella, lo que sugiere que esta región pudiera no estar implicada en el SA¹⁷.

Correlación genotipo-fenotipo

Jais y cols.¹⁸ y Gross y cols.¹⁹ son los dos grupos que han realizado, hasta el momento, estudios completos sobre la correlación genotipo-fenotipo, ambos basados en el SALX y por tanto, en el análisis mutacional del gen *COL4A5*. Ambos estudios concluyen que existe una correlación significativa entre la edad de inicio de IRCT y el genotipo de los pacientes. Tras estos estudios, los pacientes de SALX se pueden dividir en tres grupos:

- Fenotipo severo: (IRCT = $19,8 \pm 5,7$ años).

Se trata de pacientes que sufren grandes reordenamientos del gen, mutaciones de cambio de la pauta de lectura, mutaciones sin sentido y mutaciones en secuencias donantes de *splicing*. El 90% de los pacientes con alguno de estos genotipos alcanzará la IRCT antes de los 31 años, el 80% de ellos sufrirán sordera y el 40% lesiones oculares.

- Fenotipo severo-moderado (IRCT = $25,7 \pm 7,2$ años).

Se trata de pacientes que padecen mutaciones de sentido erróneo (en las que el aminoácido que es sustituido no es una glicina o es una glicina en el extremo 3' (carboxi-terminal) del gen, deleciones /inserciones que no varían la pauta de lectura o mutaciones de secuencias aceptoras de *splicing*. El 75% de los pacientes con estas mutaciones llegarán a la IRCT antes de los 31 años, el 65% padecerán sordera y el 30% lesiones oculares.

- Fenotipo moderado (IRCT = $30,1 \pm 7,2$ años).

Se trata de los pacientes que presentan mutaciones de sentido erróneo que afectan a glicinas del dominio colágeno a 5' del gen. Las mutaciones en estas glicinas (en el extremo amino-terminal), se cree que son más benignas fenotípicamente debido a que el mecanismo de plegamiento de las cadenas α del

colágeno tipo IV se inicia en el extremo 3' de la proteína (el extremo carboxi-terminal). Por tanto, una mutación de una glicina a 3' del gen será mucho más grave que una en una glicina a 5' que interrumpirá el plegamiento de las cadenas cuando éste esté casi finalizado. El 50% de estos pacientes llegará a la IRCT antes de los 31 años, el 70% padecerá sordera y el 30% lesiones oculares.

Síndrome de Alport autosómico recesivo: SAAR

Mutaciones en los genes *COL4A3/4* son la base molecular del SAAR que representa el 10%-15% de los casos familiares de SA.

La existencia del SAAR fue postulada por primera vez en 1985 por Feingold y cols.²⁰ y confirmada posteriormente por Mochizuki y cols.²¹ que describió mutaciones en el gen *COL4A3* en dos niños con SA y mutaciones en el gen *COL4A4* en otros dos niños con SA, todos ellos con una herencia autosómica recesiva de la enfermedad. Desde entonces se han descrito 36 mutaciones en el gen *COL4A3* y 24 mutaciones en el gen *COL4A4* como causantes del SAAR. Al igual que en el gen *COL4A5*, las mutaciones en estos dos genes del colágeno IV están también repartidas a lo largo de todo el gen, se trata de mutaciones privadas y las más comunes parecen ser aquellas que dan lugar a un codón prematuro de terminación. En estos genes no se han detectado grandes reordenamientos debido principalmente a que no se han realizado estudios exhaustivos mediante *Southern blot*, al igual que no se han realizado estudios de su región reguladora intermedia^{15, 22-25}.

Síndrome de Alport autosómico dominante: SAAD

Mutaciones en los genes *COL4A3/4* son la base molecular del SAAD que representa el 1-5% de los casos familiares de SA.

En 1997 Jefferson y cols.²⁶ describieron por primera vez una familia con SA en la que el patrón de herencia era autosómico dominante (estudio de ligamiento). Recientemente, se han descrito dos familias con SAAD, una con una mutación en el gen *COL4A3* (mutación de *splicing*)²⁷ y la otra en el *COL4A4* (mutación de sentido erróneo)⁶.

MODELOS ANIMALES

Los modelos animales principales para el SA son los modelos caninos (que desarrollan un glomerulopatía hereditaria de forma natural) como son la raza

Samoyed (SALX)²⁸, los perros de Navasota (SALX)²⁹, los cocker spaniel ingleses (SAAR)³⁰ y los bull terrier (SAAD)³¹. Además existen modelos murinos obtenidos por manipulación genética como el ratón transgénico OVE250 modelo de SAAR³² y un ratón *knockout* para el gen *COL4A3* modelo de SAAR³³.

CLÍNICA

Manifestaciones renales

La característica ultraestructural definitoria de SA en una biopsia renal es la alternancia de engrosamiento y adelgazamiento de la MBG del riñón en la que la lámina densa se ha transformado en una red heterogénea con áreas claramente electrón-lúcidas que pueden contener gránulos de densidad variable con un diámetro de 20 a 90 nm¹⁶.

SALX

Prácticamente todos los hombres con SALX desarrollan IRCT, pero la progresión de la insuficiencia renal presenta una variabilidad significativa interindividual. Se ha observado una distribución bimodal de la edad de inicio de la IRCT, de forma que se pueden dividir las familias de SALX en dos grupos: las que padecen el llamado SA juvenil (IRCT antes de los 31 años) y las que padecen el SA adulto (IRCT después de los 31 años)³⁴. Sin embargo, se han descrito familias con una marcada variabilidad intrafamiliar para la edad de IRCT en el caso de mutaciones de significado erróneo en el gen *COL4A5*³⁵.

En el caso de las mujeres portadoras de SALX, la clínica es moderada durante la infancia y la juventud. Un 90% de ellas presentan microhematuria pero la incidencia de IRCT antes de los 40-50 años es del 10-15%¹⁶. Debido a la gran variabilidad clínica de las mujeres portadoras de SALX, existe una controversia sobre si considerar el SALX como una enfermedad ligada al cromosoma X dominante o recesiva. Esta variabilidad puede explicarse por el fenómeno de inactivación del cromosoma X o lionización³⁶, que tiene lugar en las mujeres para alcanzar una compensación de dosis. Durante el desarrollo embrionario, uno de los dos cromosomas X de cada célula es inactivado permanentemente y al azar, principalmente mediante procesos de metilación del DNA. El patrón de inactivación en cada célula progenitora se transmite con una alta estabilidad a sus células descendientes. Por tanto, es de esperar una tasa de 1:1 entre las células que expresen el cromosoma X normal y las que expresen el

cromosoma X que lleva la copia del gen *COL4A5* mutada. Las mujeres portadoras de SALX con una clínica severa serán aquellas que hayan sufrido una inactivación preferencial del cromosoma X normal en sus células embrionarias, y por tanto, expresen en mayor proporción el cromosoma X con el gen *COL4A5* mutado⁵. De la misma manera, habrá mujeres portadoras que sean completamente asintomáticas por haber tenido una inactivación preferencial del cromosoma X que lleva la mutación. Sin embargo, la relación fenotipo severo-inactivación preferencial del cromosoma X mutado, no está totalmente establecida ya que existen autores que no han encontrado esta relación en estudios de portadoras de SALX³⁷. Además, aunque actualmente no se hayan encontrado factores modificadores que afecten al desarrollo natural del SALX, esta posibilidad no puede descartarse en el caso de las mujeres portadoras. La presencia de hematuria importante en la infancia, síndrome nefrótico y un engrosamiento difuso de la MBG son signos de mal pronóstico en mujeres portadoras de SALX³⁸.

SA autosómico

Los pacientes con SAAR presentan una edad de inicio normalmente juvenil de IRCT, independientemente del sexo^{23,24}.

Los pacientes con SAAD parecen progresar más lentamente a IRCT que los pacientes con SALX, pero existen pocos datos por el momento⁶.

Trasplante renal

Actualmente, el trasplante renal constituye el único tratamiento eficaz para los pacientes con SA y según los datos del estudio cooperativo norteamericano del trasplante renal pediátrico (NAPRTCS), la supervivencia del injerto en pacientes con nefritis familiar es igual a la de pacientes de otras enfermedades³⁹. Sin embargo, un 3-4% de los pacientes trasplantados desarrollan el llamado síndrome de Goodpasture. El daño tisular está mediado por autoanticuerpos que se unen a la MBG. En 1992, Turner y cols.⁴⁰, demostraron que el antígeno Goodpasture era en realidad el dominio NC1 (no colágeno) de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ de la MBG, codificada por el gen *COL4A3*. Kalluri y cols.⁴¹ confirmaron que es el dímero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ el antígeno que hace reaccionar al sistema inmune, sin embargo, el hexámero no es patogénico. Por tanto, estos autores sugieren que es necesaria la disociación de los hexámeros en dímeros como ocurriría en las

membranas basales de pacientes con SA o en pacientes con intoxicación por disolventes orgánicos, infección vírica o infección por *Streptococcus* (otras causas que se postulan como desencadenantes del síndrome de Goodpasture), para que el sistema inmune actúe contra el antígeno $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Recientemente, Kalluri y cols.⁴² han descrito que todos los pacientes de SA trasplantados desarrollan una respuesta inmune humoral contra los cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$. Sin embargo, no todos desarrollan un síndrome Goodpasture por lo que se cree que el desarrollo de este síndrome debe depender de la capacidad de cada individuo de poner en marcha una respuesta celular contra la cadena $\alpha 3(\text{IV})$.

Sordera

La sordera neurosensorial de alta frecuencia (tonos de 2.000 Hz a 8.000 Hz) está frecuentemente pero no universalmente asociada al SA. La padecen un 80-90% de los hombres con SALX antes de los 40 años¹⁸ y un 45% de las mujeres con la enfermedad⁴³. La sordera nunca es congénita y su incidencia real en el SA pudiera estar infravalorada ya que no todos los pacientes son sistemáticamente evaluados mediante audimetrías, y la prevalencia de la sordera aumenta con la edad. En el caso de hombres con SALX, presentan sordera más temprano que las mujeres portadoras de SALX, y para la forma autosómica del SA no existe ninguna diferencia entre sexos.

Anomalías oculares

Se han descrito lesiones de la córnea, lente y retina en pacientes con SA. Tienen lugar casi exclusivamente en formas de SA juvenil aunque existen algunas excepciones⁴⁴. Las lesiones oculares parecen exclusivas de familias que también presenten sordera neurosensorial. El lenticono anterior, por el cual la parte central del cristalino forma una protuberancia que se introduce en la cámara anterior, es el único signo patognomónico del SA y también parece restringido a familias con SA juvenil y sordera^{34,45}. El lenticono anterior aparece como resultado de un debilitamiento mecánico de la cápsula anterior del cristalino que aparece atenuada y fracturada bajo microscopía óptica y electrónica⁴⁶. Otras lesiones oculares son: cambios en la pigmentación perimacular, flecos retinianos (anomalías de la membrana de Bruch), vesículas endoteliales en la córnea (anomalías de la membrana de Descemet), erosión de la córnea y miopía⁴⁷⁻⁵¹.

Leiomiomatosis

La asociación del SA y leiomiomatosis difusa del esófago y del árbol traqueobronquial (tumores de la musculatura lisa) ha sido descrita en unas 20 familias⁵²⁻⁵⁷. Normalmente los síntomas aparecen al final de la infancia e incluyen: disfagia, vómitos post-prandiales, dolor epigástrico o retroesternal, bronquitis recurrente, dispeña, tos y estertores. Las mujeres afectadas por este desorden también presentan leiomiomas genitales que provocan una hipertrofia del clítoris con una variable implicación de los labios mayores y del útero¹⁶. Se sabe que todas las familias con SA y leiomiomatosis, presentan deleciones de los extremos 5' del gen *COL4A5* y 5' del gen *COL4A6* que implican la pérdida de la zona reguladora intermedia que existe entre los dos genes. El punto de rotura en el gen *COL4A6* es siempre el mismo: el intrón 2, y si la deleción se extiende más allá de este punto, se ha descrito que los pacientes no sufren leiomiomatosis^{55,58}. Mutaciones en el gen *COL4A6* no están implicadas en el SA siendo esto coherente con la ausencia de cadenas $\alpha 6(IV)$ en la MBG normal, sin embargo, la patogénesis de la leiomiomatosis está todavía sin clarificar.

Anomalías hematológicas

Existen dos síndromes en los que la macrotrombocitopenia está asociada a insuficiencia renal y sordera típicas de SA: el síndrome de Fechtner (OMIM+153640) y el síndrome de Epstein (OMIM+153650). Estos dos síndromes presentan mutaciones en el gen que codifica la cadena pesada de la miosina 9: *MYH9*, al igual que otros dos síndromes que se caracterizan por la macrotrombocitopenia pero que no presentan insuficiencia renal: el síndrome de Sebastian (OMIM+605249) y la anomalía de May-Hegglin (OMIM+155100)⁵⁹. La asociación de estas anomalías granulocíticas y la nefritis hereditaria permanece sin esclarecer, ya que estos pacientes presentan una expresión normal de las cadenas α del colágeno IV en sus membranas basales⁶⁰.

DIAGNÓSTICO

Criterios diagnósticos generales

Los tejidos diana del SA son: membranas basales de los riñones, los ojos, los oídos y la epidermis. En el caso que existan antecedentes familiares, para que un paciente sea diagnosticado definitivamente de SA debe cumplir al menos 2 de los siguientes criterios diagnósticos y al menos 4 si no existen tales antecedentes (modificado de Gregory y cols.³⁴):

1. Historia familiar de nefritis o hematuria idiopá-

tica en un familiar de primer grado del paciente índice o en un familiar varón emparentado con él a través de cualquier número de generaciones de mujeres.

2. Hematuria persistente sin la evidencia de cualquier otra posibilidad de nefropatía hereditaria como la enfermedad de la membrana basal fina, poliquistosis renal o nefropatía por IgA.

3. Sordera bilateral neurosensorial en el rango de 2.000-8.000 Hz. La sordera se desarrolla gradualmente, no está presente en la infancia temprana y normalmente se presenta antes de los 30 años.

4. Una mutación en *COL4A6* ($n = 3, 4$ ó 5).

5. Evidencia inmunohistoquímica de ausencia parcial o total del epítipo de Alport en la membrana basal glomerular (MBG), en la membrana basal epidérmica (MBE), o en ambas.

6. Anomalías ultraestructurales repartidas por toda la MBG, en particular: engrosamiento, adelgazamiento y lamelación.

7. Lesiones oculares incluyendo: lenticono anterior (característica patognomónica de SA), catarata subcapsular posterior, distrofia polimórfica posterior y flecos retinianos.

8. Progresión gradual a IRCT en el paciente índice o como mínimo en dos de los miembros de su familia.

9. Leiomiomatosis difusa del esófago, genitales femeninos o ambos.

Diagnóstico anatomopatológico

Biopsia renal

El procedimiento diagnóstico habitual que confirma la sospecha clínica es la biopsia renal. A pesar que la microscopía óptica es absolutamente inespecífica apreciándose tan sólo la presencia de células espumosas, la microscopía electrónica permite discernir alteraciones de la MBG altamente sugestivas de SA, como son: el engrosamiento y adelgazamiento variable de la MBG y su lamelación.

Mediante inmunohistoquímica (con anticuerpos monoclonales que reconocen los diferentes dominios NC1 de las cadenas α del colágeno tipo IV), se ha podido estudiar la expresión de estas cadenas en los diferentes tejidos afectados en el SA⁶¹⁻⁶⁵.

Biopsia de piel

Actualmente, debido a que la cadena de colágeno $\alpha 5(IV)$ también está presente en la MBE, se están realizando estudios de inmunohistoquímica en biopsia de piel como procedimiento poco invasivo y alterna-

Tabla I. Diagnóstico de síndrome de Alport mediante inmunohistoquímica del colágeno tipo IV⁷⁸

	MBG	CB	MBTd	MBE
Normal (hombres y mujeres)				
α3(IV)	SÍ	SÍ	SÍ	NO
α4(IV)	SÍ	SÍ	SÍ	NO
α5(IV)	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
SALX (hombres)				
α3(IV)	NO	NO	NO	NO
α4(IV)	NO	NO	NO	NO
α5(IV)	NO	NO	NO	NO
SALX (mujeres)				
α3(IV)	MOSAICO			NO
α4(IV)	MOSAICO			NO
α5(IV)	MOSAICO			MOSAICO
SAAR (hombres y mujeres)				
α3(IV)	NO	NO	NO	NO
α4(IV)	NO	NO	NO	NO
α5(IV)	NO	SÍ	SÍ	SÍ

MBG: Membrana basal glomerular; MBTd: Membrana basal del túbulo distal; CB: Cápsula de Bowman; MBE: Membrana Basal epidérmica.

* En algunos pacientes de SA y en algunas mujeres portadoras de SALX la inmunohistoquímica de las membranas basales para las cadenas de colágeno IV es normal, por tanto, un resultado normal no descarta el diagnóstico de SA o de portadora de SALX.

tivo a la biopsia renal^{5,66,67}. La MBE expresa normalmente la cadena α5(IV). En la mayor parte de las biopsias de piel hechas a hombres con SALX se ha comprobado que hay una ausencia completa de esta cadena^{68,69}, sin embargo, en las mujeres portadoras de SALX se ha observado un mosaicismo en la expresión de la cadena α5(IV) en piel, lo que concuerda con el fenómeno de inactivación del cromosoma X que puede ser diferente en cada una de sus células⁵.

La expresión de las cadenas α del colágeno tipo IV en los diferentes tejidos afectados en el SA está resumida en la tabla I.

Diagnóstico molecular

El protocolo general para un enfoque ajustado del diagnóstico molecular del SA está resumido en la figura 2. Debe tenerse en cuenta la historia familiar de cada paciente índice para una mejor utilización de las técnicas de biología molecular.

Análisis de ligamiento (indirecto)

El análisis de ligamiento está totalmente basado en el diagnóstico clínico, por lo que es de vital im-

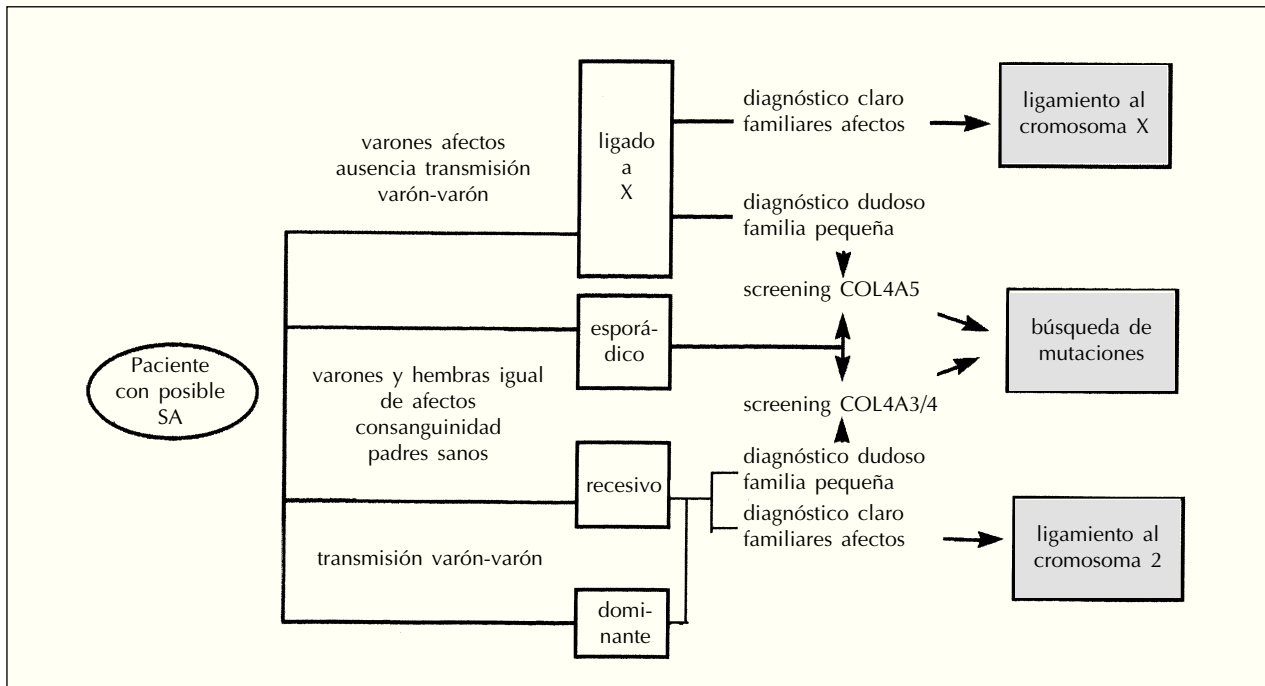


Fig. 2.—Algoritmo del diagnóstico molecular del síndrome de Alport.

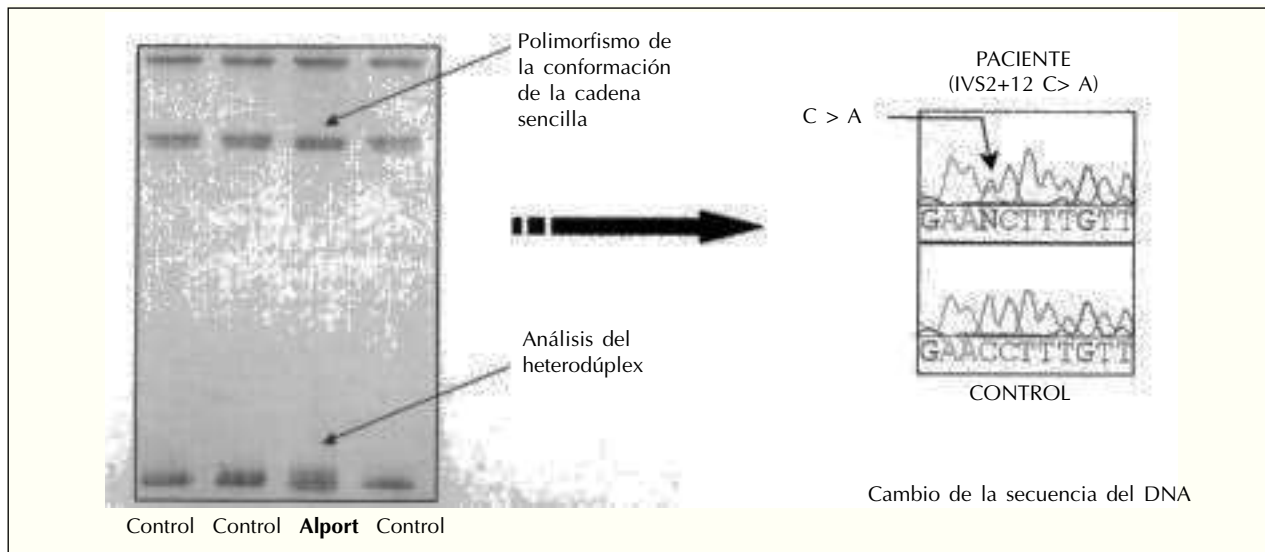


Fig. 3.—Ejemplo del análisis SSCP-HA y secuenciación directa del DNA del intrón 2 del gen COL4A3.

portancia disponer de una historia clínica lo más completa posible de la familia a estudiar. Este análisis permite identificar el patrón de herencia de una enfermedad mediante el establecimiento del haplotipo de riesgo en una familia. Debido a que la búsqueda de la mutación causante de la enfermedad en los genes del colágeno IV implicados en el SA no es viable como diagnóstico de rutina, se utiliza el ligamiento para la confirmación del diagnóstico, el diagnóstico presintomático y el prenatal.

– SALX:

Para aquellas familias en las que se sospecha una herencia ligada al cromosoma X se utilizan 4 microsatélites, dos de ellos intragénicos, situados en el cromosoma X a Xq22-q23 y en el siguiente orden: cent-DXS178-COL4A5/2B6 (intragénico)-COL4A5/2B6/2B20 (intragénico)-DXS456-tel. Además, se realiza un ligamiento con tres marcadores del cromosoma 2 con el fin de excluir la posibilidad de una herencia autosómica.

– SA autosómico:

Para el SA autosómico, independientemente de si se sospecha que pueda ser recesivo o dominante, se utilizan 7 microsatélites, uno de ellos intragénico, situados en el cromosoma 2 a 2q35-q37 y en el siguiente orden: cent-D2S130-D2S360-D2S351-D2S159-COL4A3-CA11 (intragénico)-D2S401-D2S396-tel. Además, se realiza un ligamiento con los microsatélites intragénicos del gen COL4A5 para excluir la posibilidad de una herencia ligada al cromosoma X.

Análisis mutacional (directo)

Los genes del colágeno tipo IV son de gran longitud (una media de 50 exones por gen) y una gran complejidad que dificulta su estudio exhaustivo para la detección de la mutación causante de la enfermedad. Existen diferentes técnicas de biología molecular que pueden ser aplicadas:

– Southern blot:

Se utiliza para la detección de grandes reordenamientos del gen⁷⁰, que en el caso del COL4A5 representan el 10-15% de sus mutaciones¹⁶. Para los genes COL4A3 y COL4A4 no existen estudios sistemáticos mediante esta técnica.

– Polimorfismo de la conformación de la cadena sencilla y análisis del heterodúplex (SSCP-HA):

El SSCA-HA es la técnica más comúnmente utilizada para la búsqueda de mutaciones en los genes del colágeno IV, seguida de la confirmación mediante secuenciación del DNA de los cambios detectados en este análisis (ver fig. 3). La tasa de detección de mutaciones por esta técnica para los genes del colágeno es de un 60%⁷¹⁻⁷³. Se trata de una técnica compleja debido a que el 70-80% de los cambios detectados en los genes del colágeno corresponden a polimorfismos⁷¹, lo que dificulta enormemente la interpretación de los diferentes patrones de bandas para cada exón del gen estudiado. Es una técnica laboriosa que requiere un tiempo excesivo como para ser utilizada en el laboratorio de rutina.

– Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE):

Al igual que el SSCA-HA, esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores en el estudio de mutaciones de los genes del colágeno IV¹⁹.

– Análisis del RNA mensajero (mRNA):

Debido a que el estudio del DNA de los genes del colágeno IV es tan laborioso y complejo, el estudio del mRNA es una aproximación alternativa en la búsqueda de mutaciones en estos genes. Los estudios más extensos de mRNA de SA se han realizado para el gen *COL4A5*⁷⁴⁻⁷⁷.

CONCLUSIÓN

El mejor conocimiento de las bases moleculares del síndrome de Alport deberá permitir la elaboración de estrategias terapéuticas que en un futuro deberían evitar la evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Levy M, Feingold J: Estimating prevalence in single-gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int* 58: 925-943, 2000.
- Guthrie L: «Idiopathic», or congenital, hereditary and familial hematuria. *Lancet* 1243-1246, 1902.
- Hurst A: Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis occurring in sixteen individuals in three generations. *Guy's Hosp Rec* 368-370, 1923.
- Alport A: Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J* 504-506, 1927.
- Nakanishi K, Iijima K, Kuroda N, Inoue Y, Sado Y, Nakamura H, Yoshikawa N: Comparison of alpha 5(IV) collagen chain expression in skin with disease severity in women with X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9: 1433-1440, 1998.
- Ciccarese M, Casu D, Ki WF, Faedda R, Arvidsson S, Tonolo G, Luthman H, Satta A: Identification of a new mutation in the alpha 4(IV) collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 16: 2008-2012, 2001.
- Zhou J, Reeders ST: The alpha chains of type IV collagen. *Contrib Nephrol* 117: 80-104, 1996.
- Tryggvason K: Mutations in type IV collagen genes and Alport phenotypes. *Contrib Nephrol* 117: 154-171, 1996.
- Kashtan CE, Michael AF: Alport syndrome. *Kidney Int* 50: 1445-1463, 1996.
- Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ: Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 9: 300-315, 1997.
- Griffin CA, Emanuel BS, Hansen JR, Cavenee WK, Myers JC: Human collagen genes encoding basement membrane alpha 1(IV) and alpha 2(IV) chains map to the distal long arm of chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 512-516, 1987.
- 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* 13: 809-813, 1992.
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K: Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268: 26033-26036, 1993.
- Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG: Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest* 99: 2470-2478, 1997.
- Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LA, Smeets HJ: The clinical spectrum of type IV collagen mutations. *Hum Mutat* 9: 477-499, 1997.
- Kashtan CE: Alport syndromes: phenotypic heterogeneity of progressive hereditary nephritis. *Pediatr Nephrol* 14: 502-512, 2000.
- Lambrecht R, Gross O, Netzer KO, Seibold S, Weber M: Intergenic region between the collagen genes *COL4A5* and *COL4A6* is probably not affected in Alport Syndrome: a study with 110 families [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 6: 723, 1995.
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A, Weber M, Gross O, Netzer KO, Flinter F, Pirson Y, Verellen C, Wieslander J, Persson U, Tryggvason K, Martin P, Hertz JM, Schroder C, Sanak M, Krejcova S, Carvalho MF, Saus J, Antignac C, Smeets H, Gubler MC: X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 11: 649-657, 2000.
- Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M: Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1218-1227, 2002.
- Feingold J, Bois E, Chompert A, Broyer M, Gubler MC, Grunfeld JP: Genetic heterogeneity of Alport syndrome. *Kidney Int* 27: 672-677, 1985.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ: Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8: 77-81, 1994.
- Knebelmann B, Forestier L, Drouot L, Quiñones S, Chuet C, Benessy F, Saus J, Antignac C: Splice-mediated insertion of an Alu sequence in the *COL4A3* mRNA causing autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet* 4: 675-679, 1995.
- Boye E, Mollet G, Forestier L, Cohen-Solal L, Heidet L, Cochat P, Grunfeld 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* 63: 1329-1340, 1998.
- Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutiérrez B, Stavrou C, Gubler MC, Antignac C: Structure of the human type IV collagen gene *COL4A3* and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12: 97-106, 2001.
- Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C, Brusco A, Bosio M, Massella L, Lavoratti G, Roccatello D, Frasca 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* 61: 1947-1956, 2002.
- Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC, Maxwell AP: Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (*COL4A3* and *COL4A4*). *Nephrol Dial Transplant* 12:1595-1599, 1997.
- Van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens

- LA, Schroder CH, Smeets HJ: Autosomal dominant Alport syndrome caused by a *COL4A3* splice site mutation. *Kidney Int* 58: 1870-1875, 2000.
28. Zheng K, Thorner PS, Marrano P, Bauman R, McInnes RR: Canine X chromosome-linked hereditary nephritis: a genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the alpha 5 chain of collagen type IV. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3989-3993, 1994.
 29. Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Camacho ZT, Templeton JW, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y: New form of X-linked dominant hereditary nephritis in dogs. *Am J Vet Res* 60: 373-383, 1999.
 30. Lees GE, Helman RG, Kashtan CE, Michael AF, Homco LD, Millichamp NJ, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Kim Y: A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney Int* 54: 706-719, 1998.
 31. Hood JC, Savige J, Hendtlass A, Kleppel MM, Huxtable CR, Robinson WF: Bull terrier hereditary nephritis: a model for autosomal dominant Alport syndrome. *Kidney Int* 47: 758-765, 1995.
 32. Lu W, Phillips CL, Killen PD, Hlaing T, Harrison WR, Elder FF, Miner JH, Overbeek PA, Meisler MH: Insertional mutation of the collagen genes *COL4A3* and *COL4A4* in a mouse model of Alport syndrome. *Genomics* 61: 113-124, 1999.
 33. Cosgrove D, Meehan DT, Grunkemeyer JA, Kornak JM, Sayers R, Hunter WJ, Samuelson GC: Collagen *COL4A3* knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev* 10: 2981-2992, 1996.
 34. Gregory MC, Terreros DA, Barker DF, Fain PN, Denison JC, Atkin CL: Alport syndrome-clinical phenotypes, incidence, and pathology. *Contrib Nephrol* 117: 1-28, 1996.
 35. Renieri A, Meroni M, Sessa A, Battini G, Serbelloni P, Torri TL, Seri M, Galli L, De Marchi M: Variability of clinical phenotype in a large Alport family with Gly 1,143 Ser change of collagen alpha 5(IV)-chain. *Nephron* 67: 444-449, 1994.
 36. Lyon MF: X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 47: 1-35, 1972.
 37. Vetrie D, Flinter F, Bobrow M, Harris A: X inactivation patterns in females with Alport's syndrome: a means of selecting against a deleterious gene? *J Med Genet* 29: 663-666, 1992.
 38. Grunfeld JP, Noel LH, Hafez S, Droz D: Renal prognosis in women with hereditary nephritis. *Clin Nephrol* 23: 267-271, 1985.
 39. Kashtan CE, McEnery PT, Tejani A, Stablein DM: Renal allograft survival according to primary diagnosis: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol* 9: 679-684, 1995.
 40. Turner N, Mason PJ, Brown R, Fox M, Povey S, Rees A, Pusey CD: Molecular cloning of the human Goodpasture antigen demonstrates it to be the alpha 3 chain of type IV collagen. *J Clin Invest* 89: 592-601, 1992.
 41. Kalluri R, Gattone VH, Noelken ME, Hudson BG: The alpha 3 chain of type IV collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6201-6205, 1994.
 42. Kalluri R, Torre A, Shield CF, III, Zamborsky ED, Werner MC, Suchin E, Wolf G, Helmchen UM, Van den Heuvel LP, Grossman R, Aradhye S, Neilson EG: Identification of alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains of type IV collagen as alloantigens for Alport posttransplant anti-glomerular basement membrane antibodies. *Transplantation* 69: 679-683, 2000.
 43. Wester DC, Atkin CL, Gregory MC: Alport syndrome: clinical update. *J Am Acad Audiol* 6: 73-79, 1995.
 44. Chance JK, Stanley JA: Alport's syndrome: case report and review of ocular manifestations. *Ann Ophthalmol* 9: 1527-1530, 1977.
 45. Nielsen CE: Lenticonus anterior and Alport's syndrome. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 56: 518-530, 1978.
 46. Kato T, Watanabe Y, Nakayasu K, Kanai A, Yajima Y: The ultrastructure of the lens capsule abnormalities in Alport's syndrome. *Jpn J Ophthalmol* 42: 401-405, 1998.
 47. Zylbermann R, Silverstone BZ, Brandes E, Drukker A: Retinal lesions in Alport's syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 17: 255-260, 1980.
 48. Sabates R, Krachmer JH, Weingeist TA: Ocular findings in Alport's syndrome. *Ophthalmologica* 186: 204-210, 1983.
 49. Thompson SM, Deady JP, Willshaw HE, White RH: Ocular signs in Alport's syndrome. *Eye* 1 (Pt 1): 146-153, 1987.
 50. Rhys C, Snyers B, Pirson Y: Recurrent corneal erosion associated with Alport's syndrome. Rapid communication. *Kidney Int* 52: 208-211, 1997.
 51. Pajari H, Setälä K, Heiskari N, Kaariainen H, Rosenlof K, Koskimies O: Ocular findings in 34 patients with Alport syndrome: correlation of the findings to mutations in *COL4A5* gene. *Acta Ophthalmol Scand* 77: 214-217, 1999.
 52. Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Roussel B, Deschenes G, Gros F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason KN: Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the *COL4A5* collagen gene. *Kidney Int* 42: 1178-1183, 1992.
 53. Antignac C, Heidet L: Mutations in Alport syndrome associated with diffuse esophageal leiomyomatosis. *Contrib Nephrol* 117: 172-182, 1996.
 54. Heidet L, Cai Y, Sado Y, Ninomiya Y, Thorner P, Guichardaud L, Boye E, Chauvet V, Solal LC, Beziau A, Torres RG, Antignac C, Gubler MC: Diffuse leiomyomatosis associated with X-linked Alport syndrome: extracellular matrix study using immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Lab Invest* 76: 233-243, 1997.
 55. Heidet L, Cohen-Solal L, Boye E, Thorner P, Kemper MJ, David A, Larget PL, Zhou J, Flinter F, Zhang X, Gubler MC, Antignac C: Novel *COL4A5/COL4A6* deletions and further characterization of the diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome (DL-AS) locus define the DL critical region. *Cytogenet Cell Genet* 78: 240-246, 1997.
 56. Thorner P, Heidet L, Moreno MF, Edwards V, Antignac C, Gubler MC: Diffuse leiomyomatosis of the esophagus: disorder of cell-matrix interaction? *Pediatr Dev Pathol* 1: 543-549, 1998.
 57. Mothes H, Heidet L, Arrondel C, Richter KK, Thiele M, Patzer L, Sado Y, Gubler MC, Antignac C, Scheele J: Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: *COL4A5-COL4A6* deletion associated with a mild form of Alport nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 17: 70-74, 2002.
 58. Heidet L, Dahan K, Zhou J, Xu Z, Cochat P, Gould JD, Lepzig KA, Proesmans W, Guyot C, Guillot M: Deletions of both alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in Alport syndrome and in Alport syndrome associated with smooth muscle tumours. *Hum Mol Genet* 4: 99-108, 1995.
 59. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo NC, Ghiggeri GM, Ravazzolo R, Savino M, Del Vecchio M, D'Apolito M, Iolascon A, Zelante LL, Savoia A, Balduini CL, Noris P, Magrini U, Belletti S, Heath KE, Babcock M, Glucksman MJ, Aliprandis E, Bizzaro N, Desnick RJ, Martignetti JA: Mutations in *MYH9* result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet* 26: 103-105, 2000.
 60. Naito I, Nomura S, Inoue S, Kagawa N, Kawai S, Gunshin Y, Joh K, Tsukidate C, Sado Y, Osawa G: Normal distribution of collagen IV in renal basement membranes in Epstein's syndrome. *J Clin Pathol* 50: 919-922, 1997.
 61. Cheong HI, Kashtan CE, Kim Y, Kleppel MM, Michael AF: Immunohistologic studies of type IV collagen in anterior lens capsules of patients with Alport syndrome. *Lab Invest* 70: 553-557, 1994.

62. Peissel B, Geng L, Kalluri R, Kashtan C, Rennke HG, Gallo GR, Yoshioka K, Sun MJ, Hudson BG, Neilson EG: Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. *J Clin Invest* 96: 1948-1957, 1995.
63. Cosgrove D, Kornak JM, Samuelson G: Expression of basement membrane type IV collagen chains during postnatal development in the murine cochlea. *Hear Res* 100: 21-32, 1996.
64. Heidet L, Cai Y, Guicharnaud L, Antignac C, Gubler MC: Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. *Am J Pathol* 156: 1901-1910, 2000.
65. Kalluri R, Gattone VH, Hudson BG: Identification and localization of type IV collagen chains in the inner ear cochlea. *Connect Tissue Res* 37: 143-150, 1998.
66. Van der Loop FT, Monnens LA, Schroder CH, Lemmink HH, Breuning MH, Timmer ED, Smeets HJ: Identification of COL4A5 defects in Alport's syndrome by immunohistochemistry of skin. *Kidney Int* 55: 1217-1224, 1999.
67. Grunfeld JP: Contemporary diagnostic approach in Alport's syndrome. *Ren Fail* 22: 759-763, 2000.
68. Yoshioka K, Hino S, Takemura T, Maki S, Wieslander J, Takekoshi Y, Makino H, Kagawa M, Sado Y, Kashtan CE: Type IV collagen alpha 5 chain. Normal distribution and abnormalities in X-linked Alport syndrome revealed by monoclonal antibody. *Am J Pathol* 144: 986-996, 1994.
69. Kashtan CE, Kleppel MM, Gubler MC: Immunohistologic findings in Alport syndrome. *Contrib Nephrol* 117: 142-153, 1996.
70. Netzer KO, Renders L, Zhou J, Pullig O, Tryggvason K, Weber M: Deletions of the COL4A5 gene in patients with Alport syndrome. *Kidney Int* 42: 1336-1344, 1992.
71. Badenas C, Praga M, Tazón B, Heidet L, Arrondel C, Armengol A, Andrés A, Morales E, Camacho JA, Lens X, Davila S, Mila M, Antignac C, Darnell A, Torra R: Mutations in the COL4A4 and COL4A3 Genes Cause Familial Benign Hematuria. *J Am Soc Nephrol* 13: 1248-1254, 2002.
72. Barker DF, Denison JC, Atkin CL, Gregory MC: Efficient detection of Alport syndrome COL4A5 mutations with multiplex genomic PCR-SSCP. *Am J Med Genet* 98: 148-160, 2001.
73. Hertz JM, Juncker I, Persson U, Matthijs G, Schmidtke J, Petersen MB, Kjeldsen M, Gregersen N: Detection of mutations in the COL4A5 gene by SSCP in X-linked Alport syndrome. *Hum Mutat* 18: 141-148, 2001.
74. Guo C, Van Damme B, Damme-Lombaerts R, Van den BH, Cassiman JJ, Marynen P: Differential splicing of COL4A5 mRNA in kidney and white blood cells: a complex mutation in the COL4A5 gene of an Alport patient deletes the NC1 domain. *Kidney Int* 44: 1316-1321, 1993.
75. Antignac C, Knebelmann B, Drouot L, Gros F, Deschenes G, Hors-Cayla MC, Zhou J, Tryggvason K, Grunfeld JP, Broyer M: Deletions in the COL4A5 collagen gene in X-linked Alport syndrome. Characterization of the pathological transcripts in nonrenal cells and correlation with disease expression. *J Clin Invest* 93: 1195-1207, 1994.
76. Nakazato H, Hattori S, Ushijima T, Matsuura T, Karashima S, Uemura T, Endo F, Matsuda I: Splicing mutations in the COL4A5 gene in Alport's syndrome: different mRNA expression between leukocytes and fibroblasts. *Am J Kidney Dis* 26: 732-739, 1995.
77. Sasaki S, Zhou B, Fan WW, Kim Y, Barker DF, Denison JC, Atkin CL, Gregory MC, Zhou J, Segal Y, Sado Y, Ninomiya Y, Michael AF, Kashtan CE: Expression of mRNA for type IV collagen alpha 1, alpha 5 and alpha 6 chains by cultured dermal fibroblasts from patients with X-linked Alport syndrome. *Matrix Biol* 17: 279-291, 1998.