



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN COL4A5
DE PACIENTES CON SINDROME DE ALPORT**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

BIOL. DAVID CRUZ ROBLES

Director de Tesis:
Co-Director de Tesis:
Asesor:

Dra. Lorena S. Orozco Orozco.
Med. Esp. Romeo García Torres.
Dr. Miguel Betancourt Rule.

MEXICO, D. F.

JULIO DE 1998

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, S.S., bajo la dirección de la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco, jefe de dicho laboratorio y del Dr. Romeo García Torres, Investigador titular "C" del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", S.S., y bajo la asesoría del Dr. en Ciencias Miguel Betancourt Rule, jefe del Laboratorio de Biología Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

DEDICATORIA

Principalmente a ti Gaby, por darme la confianza y el apoyo necesario para iniciar y concluir este nivel de mi preparación profesional.

A mis hijas Marisol y Anita, por el tiempo que les robé para atender sus tareas, juegos, diabluras y paseos.

A mis padres, Rosario y Luis, y a mi abuelita Luisa, por la ayuda incondicional que nos ofrecen a mi familia y a mi persona.

A mis hermanos, Lis, Martín y Miguel, como un estímulo más en la superación cultural y humanista que debemos tener.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco por la dirección de esta tesis y la confianza que depositó en mí durante la estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del INP.

Al Dr. Romeo García Torres, por invitarme a participar en el proyecto de investigación motivo de esta tesis, por sus consejos y asistencia en el desarrollo de la misma.

A los Doctores Alberto Aranda, Agustín Chévez y a la Dra. Ma. del Carmen Ávila, por el apoyo que me otorgaron, cada quien en su tiempo, para poder realizar los estudios de maestría en la UAM-I.

A mis compañeros del Departamento de Patología del INCICH, desde el personal del Anfiteatro, hasta el laboratorio de Microscopía Electrónica, pasando por el laboratorio de Fotografía, Histología e Inmunohistoquímica, las secretarías, el archivo y el intendente; gracias por su compañerismo y su amistad.

De manera especial, al personal del Laboratorio de Biología Molecular del INP: Araceli y Arturo, Ricardo, Miguel M., Yola, Tere, Emilio, Gaby y Memo, Liz, Cesa, Margarita y Elizabeth; por aceptarme como compañero y compartir sus experiencias en las técnicas del “DNA recombinante”.

Un reconocimiento especial a Manuel Moreno por sus cuestionamientos, su organización y destreza en la administración del laboratorio en todos sus ámbitos.

A los Mixgeles: Miguel Reyes y Miguel A. Alcántara, por su amistad y los momentos “festivos, futboleros y de esparcimiento cultural” que compartimos.

Gracias a mis compañeros de la UAM-I (Karla, Gaby, Silvia, Fernando, Víctor, Ricardo y José) por haber formado un gran equipo de estudiantes. A mis profesores, en especial a la Dra. Concepción Gutiérrez, por darme la oportunidad de hacer esta maestría y al Dr. Miguel Betancourt por sus enseñanzas y asesoramiento de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, cuenta con el apoyo del CONACyT según el registro número 309-0, por considerársele un posgrado con nivel de excelencia.

Al CONACyT, por el apoyo económico que me otorgó durante el desarrollo de esta Maestría, con la beca 91608, y por el financiamiento brindado a este proyecto, con el número de registro 0620PM.

A la Dra. Marie-Claire Gubler y a la Dra. Corinne Antignac del INSERM U-423, por la donación de los oligonucleótidos empleados en este estudio y por su ayuda en la secuenciación de los exones mutados que aquí se muestran. A Lionel Forestier del INSERM U-423, por la asistencia técnica y su disponibilidad de asesoría.

A todos los pacientes y sus familiares que amablemente cooperaron en este estudio, mil gracias.

Al Dr. Ricardo Correa del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”; Dr. Silvestre García de la Puente, del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Pediatría; Dra. Elvia García López del departamento de Nefrología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S. XXI; Dra. Jeannette Estefan del departamento de Nefrología del Hospital Regional del Sur de PEMEX y al Dr. Jaime Herrera del departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”; por su ayuda en el reclutamiento de los pacientes que aquí se analizan.

I N D I C E

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Agradecimientos especiales	v
Abreviaturas	viii
Lista de Tablas y Figuras	x
Resumen	xi
I. Introducción	1
II. Marco Teórico	4
II.1 Colágena Tipo IV	5
II.1.1 Estructura	5
II.1.2 Biosíntesis	7
II.1.3 Ensamble	9
II.1.4 Localización	10
II.1.5 Función	11
III. Antecedentes	12
III.1 Patogenia	13
III.2 Síndrome de Alport ligado al cromosoma X	16
III.2.1 Genética clínica	16
III.3 Estructura Molecular del gen COL4A5	17
III.3.1 Gen COL4A5	17
III.3.2 mRNA	19
III.3.3 Proteína	20
III.3.4 Mutaciones en el gen COL4A5	22
IV. Justificación	25
V. Objetivos	26
V.1 General	26
V.2 Particulares	26

VI. Material y Métodos	27
VI.1 Diseño del estudio	27
VI.2 Estrategia general	27
VI.3 Estudio clínico	29
VI.3.1 Criterios de inclusión	29
VI.3.2 Criterios de exclusión	29
VI.3.3 Criterios de eliminación	29
VI.4 Estudio molecular	29
VI.4.1 Extracción y purificación de DNA	29
VI.4.2 Preparación de oligonucleótidos	31
VI.4.3 Amplificación del gen COL4A5 por PCR	32
VI.4.4 Detección de mutaciones por SSCP	34
VI.4.5 Secuenciación	35
VI.4.6 Análisis con endonucleasas de restricción	36
VII. Análisis de resultados	37
VIII. Resultados	38
VIII.1 Estudio clínico	38
VIII.2 Estudio molecular	39
VIII.2.1 Extracción y purificación de DNA	39
VIII.2.2 Preparación de oligonucleótidos	40
VIII.2.3 Amplificación del gen COL4A5 por PCR	41
VIII.2.4 Detección de mutaciones por SSCP	42
VIII.2.5 Caracterización de mutaciones por secuenciación	42
VIII.2.6 Análisis por endonucleasas de restricción	43
VIII.2.7 Asesoramiento genético	44
IX. Discusión	51
X. Conclusiones	61
XI. Bibliografía	63

A b r e v i a t u r a s

aa	Aminoácido.
AD	Autosómico dominante.
AR	Autosómico recesivo.
α5(IV)	Cadena alfa cinco de la colágena tipo IV.
cDNA	DNA complementario. Producido a partir de RNA.
COL4A5	Gen que codifica para la cadena alfa 5 de la colágena tipo IV.
COOH	Carboxilo terminal.
ddNTP	Dideoxinucleótidos trifosfato.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato.
DO	Densidad óptica.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético.
GATC	Guanina, Adenina, Timina y Citocina.
Gly	Glicina.
HDX	Herencia dominante ligada al cromosoma X.
HGMD	Base de datos de mutaciones genéticas humanas.
IRT	Insuficiencia renal terminal.
kb	Kilobases.
kD	Kilodaltones.
MBG	Membrana basal glomerular.
MPM	Marcador de pesos moleculares.
NC1	Dominio globular carboxilo terminal.
NH₂	Amino terminal.
nm	Nanómetros.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.

RCLB	Amortiguador para lisis de células rojas.
mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
SA	Síndrome de Alport.
SDS	Dodecil-sulfato de sodio.
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla.
UV	Luz ultravioleta.
WCLB	Amortiguador para lisis de células blancas.
Xaa-Yaa	Aminoácidos en posición X o Y.
○	Mujer.
●	Mujer afectada.
↖	Caso índice.

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de las seis cadenas de colágena tipo IV.	8
Tabla 2. Características clínicas de los pacientes captados en este estudio.	39
Tabla 3. Condiciones para la amplificación de cada exón del gen COL4A5.	41

Lista de Figuras

Fig. 1.- Microscopía electrónica de una sección de un glomérulo.	3
Fig. 2.- Micrografía electrónica de la unidad de filtración capilar.	4
Fig. 3.- Estructura de la colágena tipo IV.	7
Fig. 4.- Biosíntesis de la colágena tipo IV.	9
Fig. 5.- Ensamble de la membrana basal.	11
Fig. 6.- Micrografía electrónica de la MBG de un paciente con SA.	14
Fig. 7.- Localización de los genes de la colágena tipo IV.	15
Fig. 8.- Esquematación del promotor bidireccional para los genes COL4A5 y COL4A6.	18
Fig. 9.- mRNA y monómero de $\alpha 5(\text{IV})$.	20
Fig. 10.- Deleciones en los genes COL4A5 y COL4A6.	24
Fig. 11.- Integridad del DNA.	40
Fig. 12.- PCR para los exones 30(194 pb) y 31 (225 pb).	42
Fig. 13.- Análisis de diferentes exones del gen COL4A5 por SSCP.	43
Fig. 14.- Secuenciación del exón 1 del gen COL4A5.	45
Fig. 15.- Secuenciación del exón 30 del paciente 40A1.	46
Fig. 16.- Secuenciación del exón 42 del gen COL4A5.	47
Fig. 17.- Secuenciación del exón 39 del gen COL4A5.	48
Fig. 18.- Restricción con <i>Sau96 I</i> .	49
Fig. 19.- Restricción con <i>Alu I</i> .	50

Resumen:

El Síndrome de Alport (SA) es una enfermedad hereditaria de la colágena tipo IV. Se caracteriza por la presencia de hematuria microscópica, que puede evolucionar a insuficiencia renal terminal (IRT), suele asociarse con daño ocular, como el lenticono o las maculopatías, y con sordera neurosensorial de tonos altos. Se sabe que esta enfermedad generalmente se hereda en forma dominante ligada al sexo (HDX), pero también en forma autosómica tanto dominante como recesiva (AD o AR); aunque estas últimas son raras. Por otro lado, se sabe que la enfermedad es causada por alteraciones de las cadenas alfa (α) de la colágena tipo IV, uno de los principales componentes proteicos de la matriz extracelular. A la fecha, se sabe de la existencia de seis diferentes cadenas α que conforman la molécula de colágena IV [α 1- α 6(IV)] y que éstas son codificadas por diferentes genes ubicados en forma pareada, en tres diferentes cromosomas (α 1 y α 2 en 13q34; α 3 y α 4 en 2q35 y α 5 y α 6 en Xq22). La frecuencia que se ha calculado para el SA-HDX en la población del estado de Uta, USA, es de 1 en 5,000 nacidos vivos, aunque a nivel mundial aún no se ha determinado con exactitud. Su penetrancia es del 100% en varones y 80% en mujeres, debido posiblemente al fenómeno de lionización. El gen que codifica para la cadena α 5 de la colágena tipo IV (COL4A5) está alterado en los pacientes con este síndrome. Dicho gen comprende 51 exones que abarcan un total de 250 Kb, se transcribe en un RNA mensajero (mRNA) de 6,500 pares de bases (pb), que se traduce en una proteína de 158 kD. Dicha proteína consiste en 1,685 aminoácidos (aa) distribuidos en un péptido señal, en la región amino terminal, de 27 residuos; un dominio colágeno

de 1,429 aa con 22 interrupciones por dominios no colagénicos cortos y una región globular carboxilo terminal (NC1) de 229 residuos. Actualmente, se han descrito diferentes tipos de mutaciones que alteran a este gen en poblaciones europeas, asiáticas y norteamericanas.

En este estudio, presentamos el primer análisis con 22 exones del gen COL4A5, mediante la técnica de PCR-SSCP, en 25 pacientes mexicanos con diagnóstico de SA. Identificamos 4 mutaciones diferentes: un codón de terminación en el dominio 7S de la proteína; un cambio de glicina por arginina, una mutación silenciosa en el dominio colágeno y una mutación en el sitio de splicing del intrón 42. Estas mutaciones fueron únicas para cada familia y sólo una de ellas está reportada en la literatura. Se obtuvieron cifras de detección de mutaciones parecidas a las ya reportadas (16% de los pacientes analizados), tomando en cuenta que sólo se analizó el 43% de los exones que conforman al gen COL4A5. Dos de las mutaciones alteran sitios de restricción para las enzimas *Alu I* y *Sau96*, lo cual fue corroborado por digestión de los productos de PCR con las endonucleasas mencionadas y en uno de los casos se logró observar la segregación de la mutación en la familia, con lo cual se brindó un asesoramiento genético de certeza.

I. Introducción:

La evolución de las matrices extracelulares fue un requisito para el desarrollo de los organismos multicelulares. Una entidad especial entre estas matrices la constituyen las membranas basales, que se definen como delgadas estructuras de láminas unidas entre sí, distribuidas ubicuamente en los tejidos corporales. En la mayoría de los tejidos, estas membranas separan células endoteliales y epiteliales del estroma subyacente, pero en ciertos lugares, como en el glomérulo del riñón, separan capas celulares contiguas. Además, rodean adipositos individuales, células musculares y células nerviosas. Las membranas basales frecuentemente forman láminas continuas, aunque también pueden ser discontinuas en algunos tejidos. Su grosor varía entre 20 y 350 nm, pero comúnmente son de 60 a 80 nm. Este tipo de membranas proveen un soporte físico para los tejidos y sirven para su compartimentalización; por otro lado, también se encuentran involucradas en diversos procesos biológicos críticos, incluyendo el tamizaje molecular pasivo, adhesión y migración celular, desarrollo, regeneración y reparación tisular, polarización celular y como reservorio de factores de crecimiento, enzimas y proteínas plasmáticas. En general, las membranas basales son importantes para proveer un armazón a los tejidos y un sustrato en el anclaje celular, aunque también existen otro tipo de membranas basales especializadas, como las glomerulares (MBG), con funciones diferentes como la filtración de macromoléculas presentes en el torrente sanguíneo. En este caso, las MBG forman parte estructural de las unidades de filtración sanguínea llamadas nefronas que, a su vez, forman parte del riñón. El riñón humano contiene cerca de 1.2 millones de nefronas, cada una de las cuales presenta una porción tubular y un corpúsculo compuesto por el glomérulo

rodeado por la cápsula de Bowman, en donde ocurre la ultrafiltración del plasma sanguíneo y la formación de orina (Dunnill M y Halley W, 1973). La sangre entra a los glomérulos a través de la arteriola aferente, la cual se ramifica en asas capilares especializadas alrededor de ejes intercapilares formados por células mesangiales y matriz mesangial (fig. 1). La filtración se lleva a cabo de la luz de las asas capilares al espacio de la cápsula de Bowman (Kasinath BS y Kanwar YS, 1993). Esta unidad de filtración comprende a una MBG situada entre las células del endotelio capilar y las células epiteliales viscerales o podocitos. El endotelio de los capilares glomerulares presentan fenestraciones de 40 a 70 nm de diámetro que permiten el contacto directo entre los constituyentes sanguíneos y la MBG (Takanami H y col., 1991). Los podocitos se adhieren a la MBG por medio de los pedicelos, los cuales se conectan entre sí por medio de delgados diafragmas de 25 a 60 nm de espesor, resultando en una apariencia de cremallera (Rodewald R y Karnovsky MJ, 1974). La microscopía electrónica de la mayoría de las membranas basales (MB) revela una estructura de dos láminas, una traslúcida o lámina rara, que esta en contacto con las células; y otra más electrodensa, la lámina densa, hacia la matriz subyacente. La lámina densa puede perderse como en la córnea; o puede haber una lámina rara interna subendotelial, una lámina densa intermedia y una lámina rara externa subepitelial como en la MBG (Kasinath BS y Kanwar YS, 1993). Esta triple estructura puede deberse a un artificio del procesamiento de las muestras para microscopía electrónica (Goldberg M y Escaig-Haye F, 1986), aunque la apariencia de la MBG que se observa es uniforme (fig. 2).

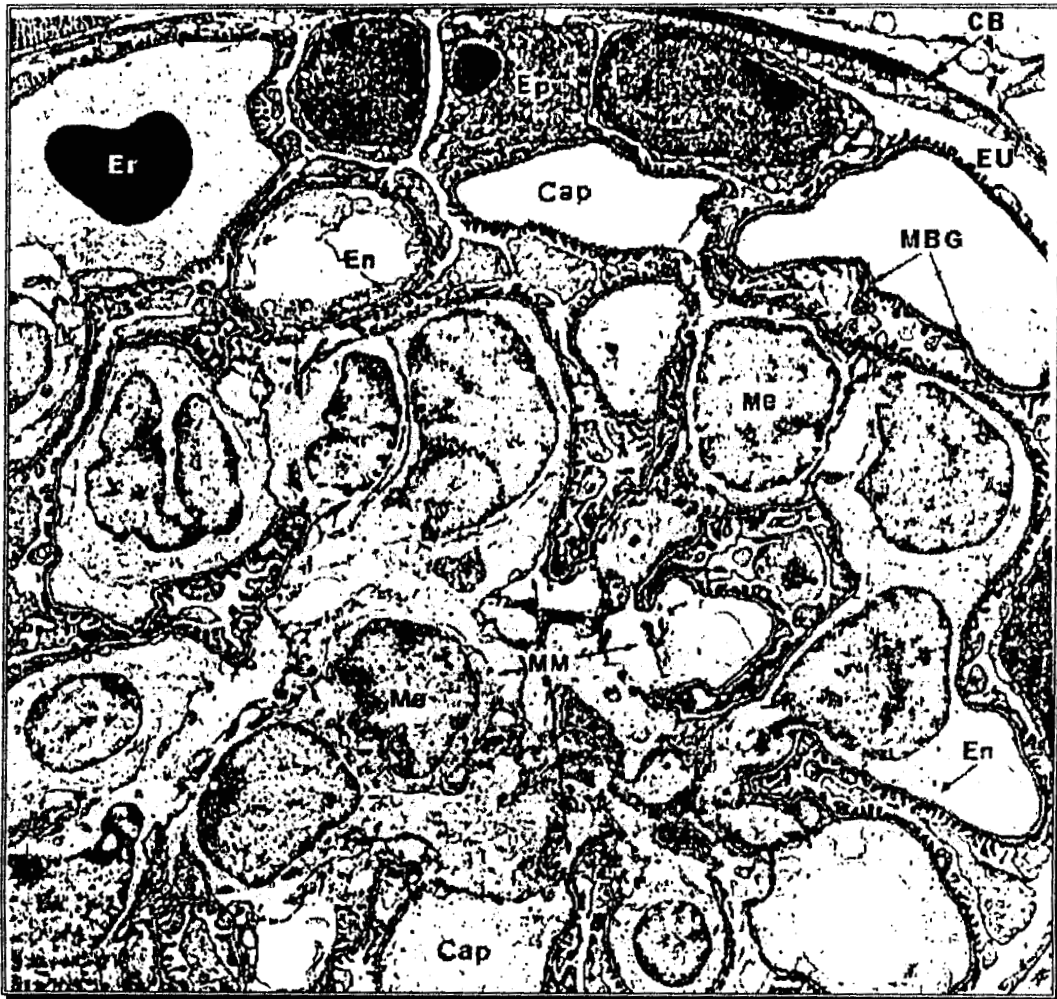


Fig. 1.- Microscopía electrónica de una sección de un glomérulo. Se observan tres tipos de células: el endotelio (En), el epitelio (Ep) y el mesangio (Me); además de la membrana basal glomerular (MBG), la matriz mesangial (MM), la cápsula de Bowman (CB), el espacio urinario (EU), los capilares (Cap) y una célula roja (Er). Tomada y modificada de Pihlajaniemi T, 1996. (1,750X).

Durante el proceso de filtración el plasma pasa sucesivamente a través del endotelio fenestrado, la MBG, los delgados diafragmas epiteliales y después al espacio urinario (Kasinath BS y Kanwar YS, 1993). Bajo condiciones fisiológicas, los elementos celulares y la mayoría de proteínas plasmáticas se retienen en el capilar, mientras el agua, productos nitrogenados de desecho, electrolitos y proteínas de bajo peso molecular, entran al espacio urinario. La porosidad y carga de la MBG son críticas para el proceso de

filtración regulándolo en base al tamaño (Caulfield JP y Farquhar MG, 1978) y carga de las proteínas, de tal manera que las de carga negativa difícilmente son filtradas en comparación con las neutras o las catiónicas que pasan fácilmente (Brenner BM y col., 1978).

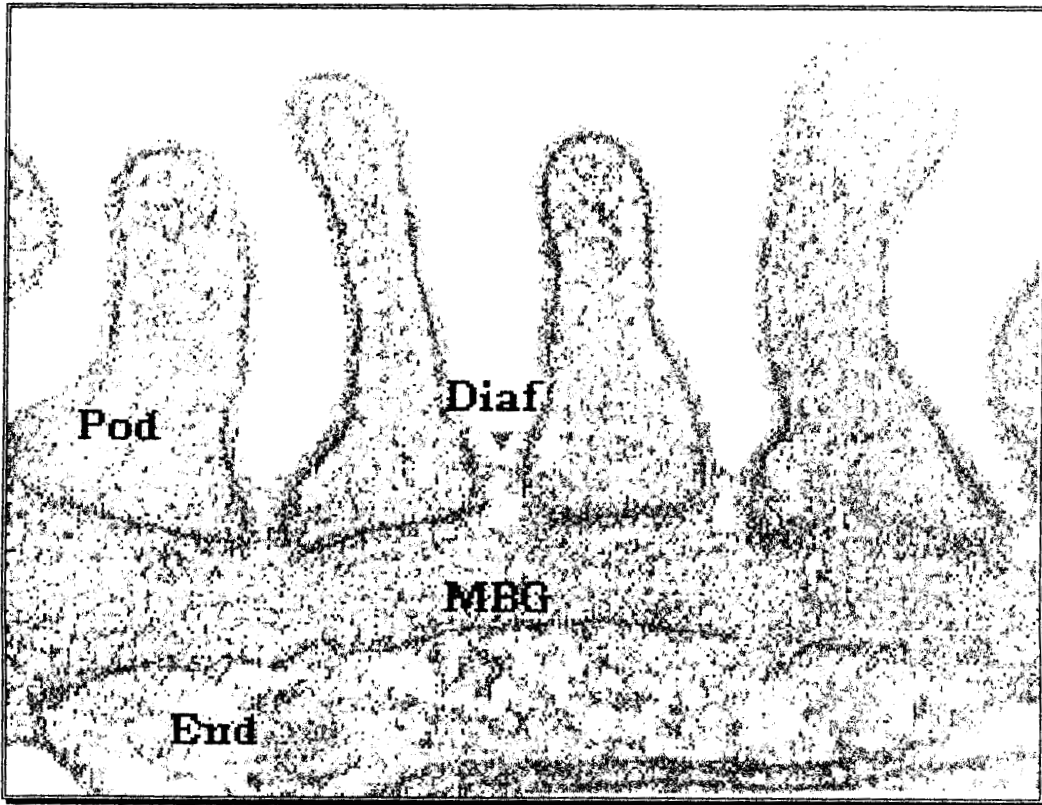


Fig. 2.- Micrografía electrónica de la unidad de filtración capilar. Se observa la membrana basal glomerular (MBG) entre el endotelio capilar fenestrado (End) y los pedicelos epiteliales (Pod) con sus delgados diafragmas (Diaf). Tomada y modificada de Pihlajaniemi T, 1996 (103,200X).

II. Marco Teórico:

La composición molecular de la MBG es muy similar a la de las membranas basales de muchos otros tejidos, aunque presenta algunas características específicas que las otras no tienen. Por ejemplo, está constituida por colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos y

entactina/nidógeno como componentes principales, además de algunas otras proteínas que se presentan en pequeñas cantidades. (Timpl R y Dziadek M, 1986; Timpl R, 1989). Actualmente, se han reconocido isoformas tejido específicas con diferencias en la proporción de los componentes mayores de las membranas basales, en particular en el caso de la colágena tipo IV y laminina, que las caracteriza en su funcionalidad.

II.1 Colágena tipo IV:

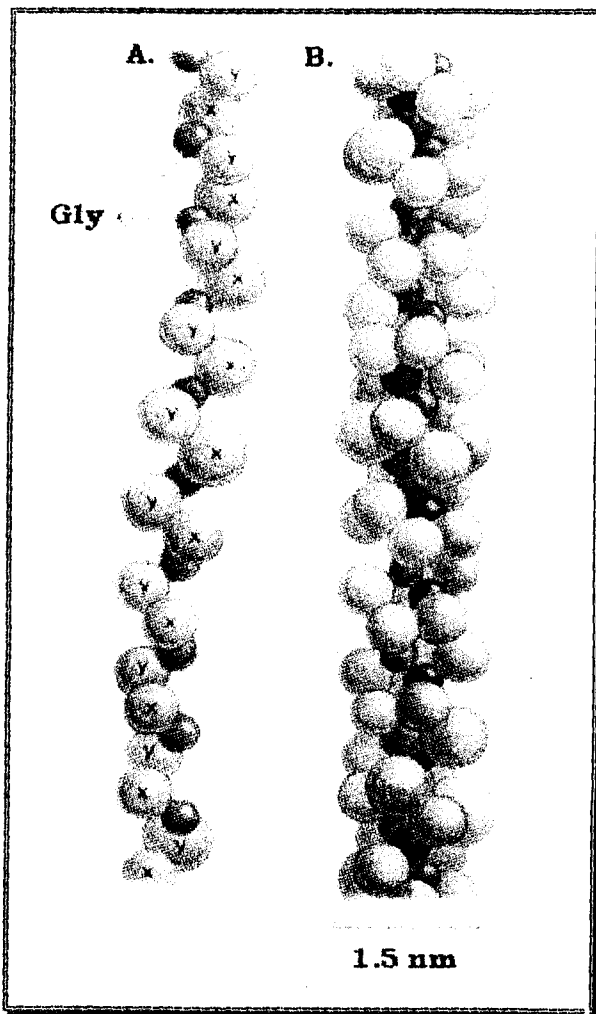
II.1.1 Estructura:

El mayor componente estructural de las MBG es la colágena tipo IV, una proteína que pertenece a una gran familia de colágenas constituida al menos por 19 tipos diferentes (Alberts B y col., 1989; Meyne R y Brewton RG, 1993). El rasgo característico de estas moléculas es su estructura de hélice tricaténaria formada por tres polipéptidos llamados cadenas alfa (α), enrollados entre sí para adoptar la forma de una cuerda (Fig. 3). Al respecto, se han identificado seis tipos genéticamente diferentes de cadenas α de colágena tipo IV, $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$, lo cual posibilita la existencia de diferentes tipos de ensamble de esta molécula en diferentes tejidos (Kivirikko KI, 1993; Zhou J y col., 1993). Por otro lado, se ha observado que las cadenas $\alpha 3(IV)$ y $\alpha 5(IV)$ están sujetas a "splicing alternativo", lo cual puede generar variantes de estos polipéptidos (Bernal D y col., 1993; Heikkilä P y Soininen R, 1996). Estos seis tipos de cadenas α pueden ensamblarse en forma de homotrimeros o heterotrimeros, de tal suerte que la combinación más frecuente de cadenas α detectada en la mayoría de los tejidos son dos cadenas $\alpha 1(IV)$ y una $\alpha 2(IV)$,

$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$; pero también se han detectado homotrimeros de cadenas $\alpha 1(IV)$ (Hudson GB y col., 1993) y $\alpha 3(IV)$ además de la combinación $[\alpha 3(IV)]_2\alpha 4(IV)$ (Saus J y col., 1988; Johansson C y col., 1992; Kleppel MM y col., 1992).

Estructuralmente, las cadenas alfa pueden dividirse en tres dominios: el **7S**, un dominio colagénico menor en el extremo amino terminal (NH_2) que es rico en lisinas y cisteínas; el dominio **colágeno** mayor y el dominio **NC1**, un segmento no colágeno presente en el extremo carboxilo terminal ($COOH$) de cada polipéptido (Timpl R y Dziadek M, 1986; Timpl R, 1989). El dominio colágeno presenta un segmento de unión a filamentos de cerca de 400 nm de largo y el dominio NC1 forma un gran glóbulo en el extremo $COOH$. La secuencia colagénica comprende triplete de aminoácidos repetidos Gly-Xaa-Yaa interrumpidos en varios sitios por secuencias no colagénicas. La presencia de pequeños aminoácidos, como glicina, cada tercer residuo es esencial en todas las cadenas α para ir formando la estructura característica de triple hélice de la colágena (Fig. 3).

La estructura primaria de las seis cadenas $\alpha(IV)$ ya se determinó en el humano y en otros organismos (Pihlajaniemi T, 1996), con lo cual se ha observado que todas las cadenas presentan diferentes grados de homología entre sí, de tal manera que se han formado dos grupos o familias en base a su similitud: clase $\alpha 1(IV)$, como las $\alpha 1,3$ y 5 ; y clase $\alpha 2(IV)$, como la $\alpha 2, 4$ y 6 (Tabla 1).



II.1.2 Biosíntesis:

La síntesis de colágena es un proceso complejo que involucra algunas modificaciones cotraduccionales y postraduccionales catalizadas por diversas enzimas (Kivirikko KI y Myllylä R, 1985). Este proceso se lleva a cabo en dos etapas. Las modificaciones intracelulares que incluyen: a) remoción del péptido señal; b) hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en posición Yaa a 4-hidroxiprolina e hidroxilisina; c) hidroxilación de algunas prolinas en posición Xaa a 3-hidroxiprolina; d) adición de galactosa, o

Fig. 3.- Estructura de la colágena tipo IV. A) Cadena α con la estructura clásica Gly-Xaa-Yaa. B) Molécula de colágena tipo IV formada por tres cadenas α , con un diámetro aproximado de 1.5 nm en su conjunto (Tomado de Alberts B y col., 1989).

galactosa y después glucosa, en algunos residuos de hidroxilisina; e) glicosilación de algunas asparaginas; f) asociación del

dominio no colágeno COOH a través de un proceso regulado por la estructura de dicho dominio, y g) formación de puentes disulfuro intra e intercatenarios (Fig. 4). La selección y alineamiento de las tres cadenas polipeptídicas intracelulares correctas están mediados por los dominios NC1, y el plegamiento de la triple hélice por el dominio COOH. Posiblemente se requiera de la formación de puentes disulfuro intracatenarios en los dominios NC1; sin embargo, no se forman uniones intracatenarias intramoleculares en la triple hélice

intracelular. Las modificaciones extracelulares comienzan cuando el propéptido es secretado al espacio extracelular y sus péptidos de extensión NH₂ y COOH son cortados por N-proteinasa y C-proteinasa, respectivamente. Después, las moléculas de colágena se ensamblan por sí mismas formando filamentos y otros agregados supramoleculares. Finalmente, la lisil oxidasa cataliza la formación de enlaces cruzados entre lisinas e hidroxilisinas de moléculas adyacentes (Timpl R y Dziadek M, 1986; Timpl R, 1989). Las moléculas de colágena tipo IV se caracterizan por numerosos residuos de hidroxilisina y la presencia de 3-hidroxilprolina la cual no se ha encontrado en otras proteínas de mamíferos (Kivirikko KI y Myllylä R, 1985). A diferencia de las colágenas formadoras de fibras, las moléculas de colágena tipo IV no sufren ataque proteolítico después de su secreción extracelular (Timpl R y Dziadek M, 1986; Timpl R, 1989).

Tabla 1. Características de las seis cadenas de colágena tipo IV.

Característica	α1	α2	α3	α4	α5	α6
Número de exones	52	47	--	--	51	46
Producto completamente traducido (pb)	1,669	1,712	1,670	1,690	1,685	1,691
Cadena α madura (pb)	1,642	1,676	1,652	1,652	1,659	1,670
Péptido señal (pb)	27	36	28	38	26	21
Dominio colágeno (pb)	1,413	1,449	1,410	1,421	1,430	1,417
Dominio NC1 (pb)	229	227	232	231	229	228
Interrupciones en el dominio colágeno	21	23	23	26	22	25

II.1.3 Ensamble:

Las moléculas de colágena tipo IV secretadas se ensamblan entre sí en una compleja red (Timpl R y col., 1981; Yurchenco PD y Furthmayr H, 1984). Estas moléculas presentan uniones covalentes por puentes disulfuro y puentes no reducibles derivados de lisil oxidasa, de tal forma que no son fácilmente dissociadas. Se han realizado experimentos de ensamblaje “in vitro” e “in situ” que proveen información de la naturaleza de los agregados. Así pues, se sabe que monómeros de estas moléculas

forman dímeros lineales por asociación de los dominios NC1 de dos moléculas.

Dicha asociación se estabiliza por la

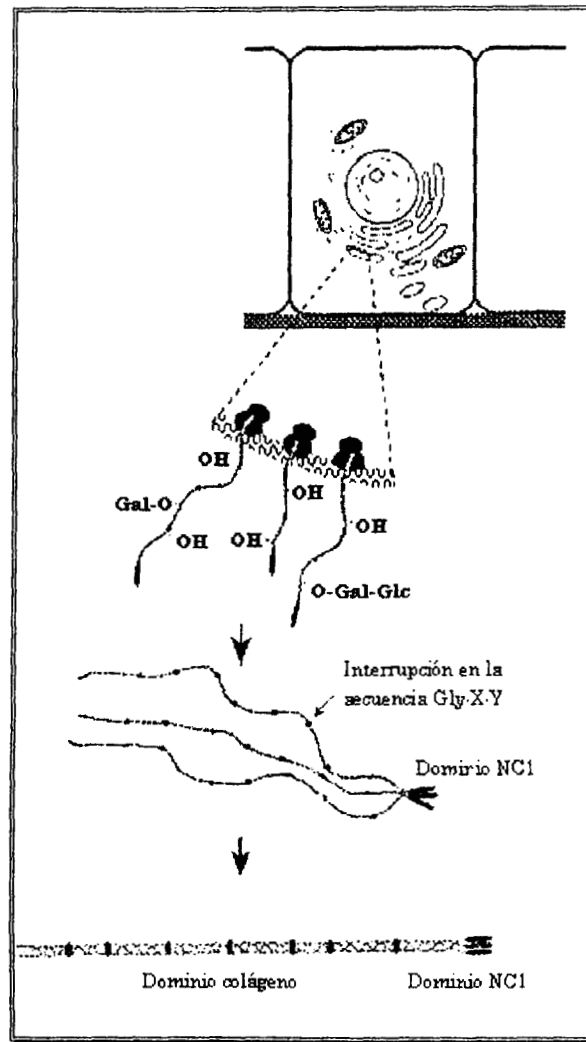


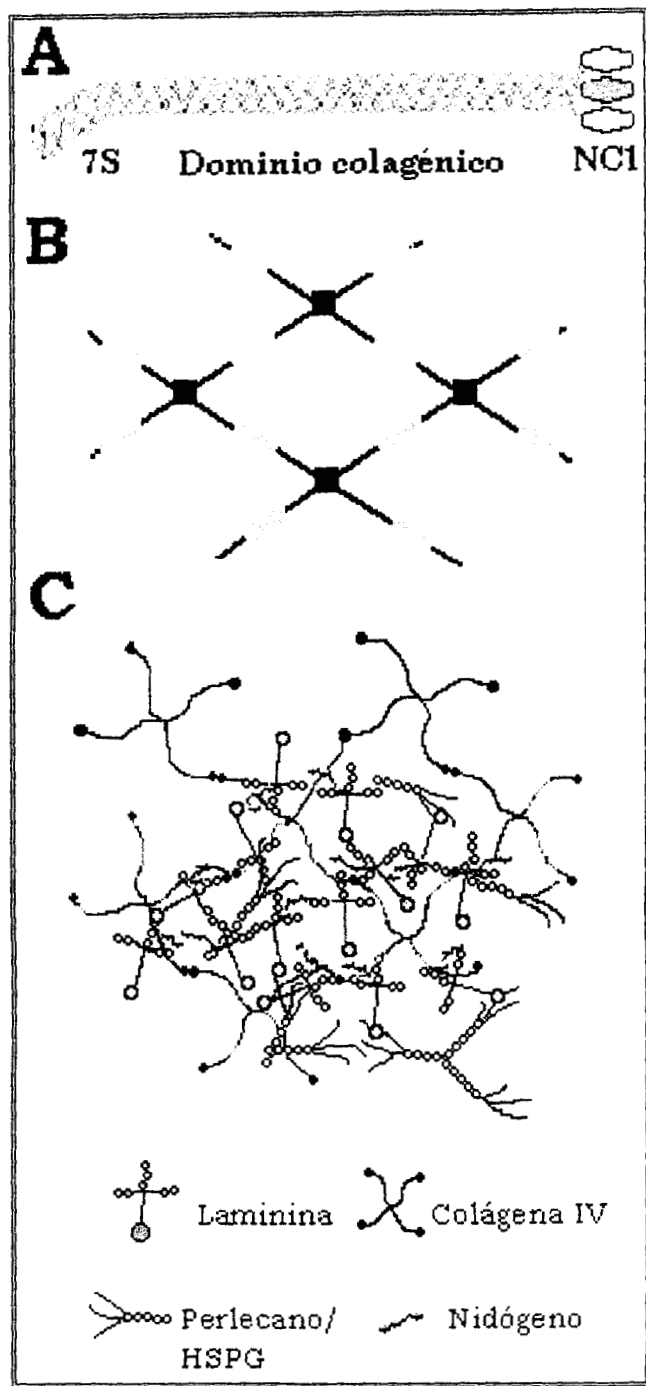
Fig. 4.- Biosntesis de la colágena tipo IV. Se observan las modificaciones postraduccionales, como hidroxilaciones (OH), glicosilaciones (Gal) y glucosilaciones (Glc), la asociación tricaténaria y la molécula madura secretada al espacio extracelular. (Tomado y modificado de Tryggvason K., 1996)

formación de puentes disulfuro, resultando en un complejo NC1 hexamérico estable. Las estructuras tetraméricas se forman por asociación alterna paralela antiparalela de los extremos amino-terminal de cuatro monómeros de triple hélice. Inicialmente, esta estructura se forma por interacciones no covalentes y subsecuentemente se estabiliza por puentes disulfuro y uniones no reducibles derivadas de lisina. La estructura tetramérica es

resistente a degradación proteolítica y adquirió el nombre de dominio 7S por su coeficiente de sedimentación. Además, esta estructura se caracteriza por carbohidratos que posiblemente limiten las interacciones entre las subunidades. Los dímeros y tetrámeros se ensamblan formando una red de filamentos altamente ramificados que incluyen moléculas alineadas lateralmente a lo largo de los dominios de la triple hélice y moléculas enrolladas sobre otras (Fig. 5) (Yurchenco PD y Furthmayr H, 1984). El resultado es una red tridimensional de mallas apretadas que sirven como el soporte estructural mayor de la membrana basal (Timpl R y Dziadek M, 1986; Timpl R, 1989; Yurchenco PD y O'Rear J, 1993).

II.1.4 Localización:

La distribución tisular de la colágena tipo IV esta restringida a las membranas basales. La estequiometría de las cadenas $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 5(IV)$ difiere entre los tejidos, siendo las más abundantes la $\alpha 1(IV)$ y la $\alpha 2(IV)$, aunque todas se encuentran en el riñón (Sariola H y col., 1996). Las cadenas $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$ se presentan en regiones subendoteliales de las MBG y también pueden observarse a nivel mesangial, cápsula de Bowman y membranas tubulares y vasculares; las cadenas $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$ y $\alpha 5(IV)$ se presentan en forma uniforme en las MBG, MB de la cápsula de Bowman y túbulo distal. La cadena $\alpha 6(IV)$ se ubica en la MB de la cápsula de Bowman y túbulos distales y se colocaliza con la $\alpha 5(IV)$ en la MB epidérmica, células del músculo liso y adipositos. La inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para estas dos últimas cadenas muestra tinción débil en las MB del músculo cardiaco y del endotelio sinusoidal hepático (Ninomiya Y y col., 1995).



II.1.5 Función:

La inmunomicroscopía electrónica de la colágena tipo IV consiste en cadenas $\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$, acopladas con secuencias de aminoácidos. Se ha mostrado que las interrupciones en la secuencia repetida Gly-Xaa-Yaa coinciden con el enrollamiento del otro lado de los segmentos rígidos de la triple hélice, de tal manera que las interrupciones no colágenas modulan la flexibilidad de la molécula y son esenciales para permitir la formación de la malla con estructuras rígidas como lo son las fibras. Estas interrupciones también pueden tener otras funciones, como actuar de sitios de unión para otros componentes de las membranas basales.

Además de proveer la fuerza mecánica de las membranas basales y

Fig. 5.- Esquema del ensamble de la membrana basal. A) Monómero de colágena IV con sus tres dominios: 7S, colágeno mayor y NC1; B) Tetrámeros de colágena IV formando una malla en forma de tela de gallinero; C) Ensamble de la membrana basal. La colágena IV sirve como bastidor para la unión de laminina, perlecano, proteoglicanos y nidógeno (Tomado y modificado de Heidet L y col., 1997).

servir de almacén para la unión de otros componentes, la colágena tipo IV esta involucrada en la adhesión celular. Se ha localizado un sitio de unión celular a 100 nm del dominio NH₂ de la molécula, los receptores celulares que interaccionan con esta sección son las integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ (Vandenberg P y col., 1991; Kern A y col., 1993). Las integrinas son una familia de receptores transmembranales que consisten en subunidades α y β que juegan un papel importante en la adhesión celular a los componentes de la matriz extracelular (Ruoslahti E, 1991). El sitio de reconocimiento $\alpha 1\beta 1$ en la colágena $\alpha 1(IV)2$ $\alpha 2(IV)$ se ha ubicado sobre el aspartato de la cadena $\alpha 1(IV)$ y la arginina de la cadena $\alpha 2(IV)$ cada uno de los cuales está cercano al aminoácido en la posición 460 y embebido en un segmento corto de triple hélice estabilizado por puentes disulfuro (Eble JA y col., 1993).

III. Antecedentes:

El síndrome de Alport (SA) es una nefropatía hereditaria que se caracteriza por cambios ultraestructurales típicos en las MBG (Fig. 6); suele acompañarse por hipoacusia neurosensorial y lesiones oculares (Flinter FA y col., 1988). Este síndrome presenta diferentes patrones de herencia que involucran la afección de al menos tres diferentes genes que codifican para las cadenas $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la colágena tipo IV (Barker D y col., 1990; Lemmink HH y col., 1994; Mochizuki T y col., 1994).

III.1 Patogenia:

Las evidencias a cerca de los mecanismos patogénicos del Síndrome de Alport hereditario comenzaron a surgir a principios de los años 70, cuando surgió la microscopía electrónica y se inició la caracterización de la composición estructural de la MBG. Diferentes laboratorios demostraron cambios estructurales en las MBG de los pacientes, que consistían en adelgazamientos y engrosamientos irregulares, acompañados de reticulaciones, laminaciones, espacios electrolúcidos y granulaciones electrodensas (Fig.6)(Hinglais N y col., 1972; Spear GS y Slusser RJ, 1972; Churg J y Shermann RL, 1973). Dichos hallazgos, sugirieron que las mutaciones causantes de la enfermedad afectaban al gen o genes que codificaban para proteínas importantes en la estructura y metabolismo de las MBG. En 1971, Kefalides (Kefalides NA, 1971) demostró por primera vez que la MBG contiene un sólo tipo de colágena, la cual refirió como tipo IV. En ese tiempo se pensaba que este tipo de colágena era un homotrímero de cadenas $\alpha 1(IV)$, el cual formaba bloques para la construcción del esqueleto de las MBG. La identificación de esta proteína estructural única de las MBG llevó a Spear (Spear GS, 1973) a proponer que “el SA posiblemente era causado por mutaciones en el gen que codificaba para la colágena tipo IV”. Actualmente, Pihlajaniemi asevera que la colágena tipo IV de las membranas basales es, de hecho, una gran subfamilia de colágenas, altamente compleja, que contiene al menos seis cadenas α genéticamente diferentes (Pihlajaniemi T, 1996).

Siguiendo a la identificación y clonación de diferentes cDNAs y genes para las cadenas de colágena IV más abundantes [$\alpha 1(IV)$ y $\alpha 2(IV)$] a mediados de los años 80 (Pihlajaniemi T y col., 1985; Hostikka SL y col., 1987) y a la asignación de estos genes al cromosoma 13 (Griffin C-A y col., 1987), se pudo evidenciar que estos genes no causan el

SA. De este modo, los estudios se enfocaron sobre las nuevas cadenas de colágena $\alpha 3(\text{IV})$ y $\alpha 4(\text{IV})$, descritas y secuenciadas por el grupo de Hudson a fines de los años 80 (Butkowski RJ y col., 1987; Saus J y col., 1988).



Fig. 6.- Micrografía electrónica de la MBG de un paciente con SA. Se observa el endotelio vascular (End) con una célula roja (Er), el epitelio (Ep) y la membrana basal glomerular (MBG) con espacios electrolúcidos, laminaciones, granulaciones y engrosamientos (20,000 X).

La cadena $\alpha 3(\text{IV})$ mostró que presenta el epítipo para un autoanticuerpo en el síndrome de Goodpasture (Butkowski RJ y col., 1987). Los pacientes con SA no presentan dicho epítipo en sus MBG (Kleppel MM y col., 1987), lo cual sugirió que la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ estaba involucrada en la etiología del SA. En 1988, tres grupos independientes localizaron el locus de SA en Xq22-26 (Atkin CL y col., 1988; Brunner H y col., 1988; Flinter FA y

col., 1989). Sin embargo, fue hasta 1990 cuando Hostikka y colaboradores (Hostikka SL y col., 1990) por un lado, y Pihlajaniemi y colaboradores (Pihlajaniemi T y col., 1990) por otro, reportaron el aislamiento de cDNA de una nueva cadena de colágena tipo IV, la cadena $\alpha 5(IV)$ y su gen localizado en Xq22. Posteriormente, Barker y colaboradores (Barker D y col., 1990) y Zhou y colaboradores (Zhou J y col., 1991), reportaron las primeras dos mutaciones en COL4A5 en dos pacientes emparentados del estado de Utah. A la fecha, se han detectado más de 180 mutaciones en el gen COL4A5 de pacientes con SA ligado al X (Krawzak M y Cooper DN, 1997). Los genes COL4A3 y COL4A4, los cuales inicialmente eran fuertes candidatos para esta enfermedad, fueron localizados más tarde en el cromosoma 2, y se demostró que están involucrados, como una forma rara autosómica recesiva de este síndrome, al detectarse mutaciones en ambos genes de pacientes con SA (Fig. 7) (Mochizuki T y col., 1994).

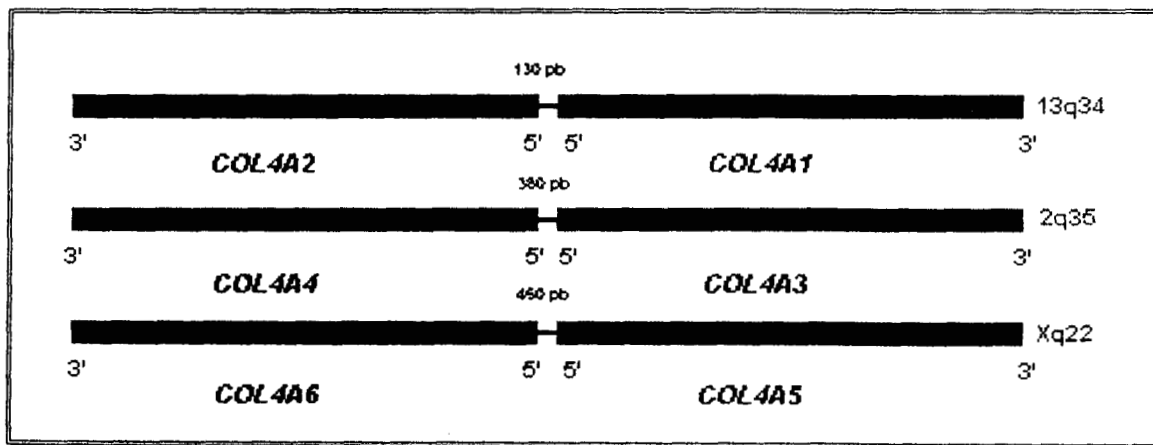


Fig. 7.- Localización de los genes de la colágena IV. Nótese la organización similar en los seis genes: ubicación pareada en tres cromosomas diferentes, arreglo *cabeza con cabeza* (5'-5') en todos ellos, región intragénica de menos de 500 pb. Estas características hacen suponer que tienen un origen común y se formaron por duplicaciones del gen ancestral.

III.2 Síndrome de Alport ligado al cromosoma X:

III.2.1 Genética clínica:

El SA se presenta con una frecuencia de 1 en 5,000 nacidos vivos en el estado de UTAH, USA. Tiene una penetrancia del 100% en varones y del 80% en mujeres. La ausencia de historia familiar en este síndrome se presenta en el 15% de los casos, lo cual puede indicar la frecuencia de mutaciones “de novo”.

Atkin y colaboradores, en 1988, sugirieron una clasificación de esta enfermedad combinando fenotipos con formas de herencia y formaron así seis grupos clínicos, además propusieron que los pacientes que llegan a presentar insuficiencia renal terminal antes de los 31 años de edad se deben considerar como tipo juvenil y aquellos que la presenten después, como tipo adulto. Así pues, la clasificación propuesta es la siguiente:

- I.- Tipo juvenil esporádico con hipoacusia y alteraciones oculares.
- II.- Tipo juvenil con hipoacusia, alteraciones oculares y ligado al cromosoma X.
- III.- Tipo adulto con hipoacusia ligado al cromosoma X.
- IV.- Tipo adulto sin hipoacusia ligado al cromosoma X
- V.- Tipo autosómico dominante con trombocitopatía y sordera.
- VI.- Tipo juvenil autosómico dominante con sordera y alteraciones oculares.

Esta clasificación se ha adoptado ampliamente, sin embargo, se sabe que la expresión fenotípica es más compleja, por lo cual, en el diagnóstico clínico se debe de considerar la heterogeneidad genética de la enfermedad, aunque comúnmente es ligada al X; los varones generalmente presentan una forma del SA más grave que las mujeres; puede haber asociación de defectos en otros órganos y existe un amplio rango en la edad de insuficiencia renal terminal y la sordera. Como se puede observar, la gran heterogeneidad clínica y genética de la enfermedad hacen difícil el diagnóstico, por lo que Flintner y

colaboradores (Flinter FA y col., 1988), propusieron los siguientes criterios clínicos para diagnosticar el SA:

- i) Historia familiar positiva de hematuria y nefropatía progresiva en varones.
- ii) Evidencia de daño en la MBG por microscopía electrónica de biopsias renales.
- iii) Sordera neurosensorial progresiva de altos tonos.
- iv) Alteraciones oculares características (lenticono y maculopatías).

De los criterios anteriores, la evidencia del daño a la MBG es el más relevante, pues se han reportado pacientes con SA que no presentan sordera ni daño ocular e incluso individuos afectados sin historia familiar positiva de hematuria, pero todos ellos con cambios característicos en la MBG.

III.3 Estructura Molecular del Gen COL4A5:

III.3.1 Gen COL4A5:

El gen responsable del SA ligado al cromosoma X, se localiza en el brazo largo del cromosoma X, en la banda 22 (Xq22), consta de aproximadamente 250,000 pb y 51 exones con una longitud que varía entre 27 y 213 pb. El exón 1 contiene 283 pb que incluyen una secuencia, hacia el extremo 5', de 202 pb que no se traduce y otra secuencia de 81 pb que codifica para el péptido señal de la proteína (de 26 residuos de largo); el primer intrón es muy largo y el segundo exón inicia con la secuencia que codifica para el último residuo del péptido señal, una secuencia no colagénica de 14 aminoácidos y dos tripletes Gly-Xaa-Yaa. Los exones 2-47 codifican para el dominio colágeno de la proteína, aunque el exón 47 se ubica en el límite de las secuencias que codifican para el dominio colágeno COOH y del dominio NC1 globular de la proteína, el cual es codificado por los exones 48-51. Estos últimos son idénticos en tamaño y localización de intrones a los del mismo dominio del gen

COL4A1 (Zhou J y col., 1994). Debido a que este gen se localiza cabeza con cabeza con el COL4A6, se presenta un promotor bidireccional para ambos genes, por lo que se transcriben sobre cadenas opuestas de DNA. La región intergénica tiene 442 pb y presenta varios sitios de unión a diferentes factores de transcripción representados por dos cajas CCAAT y dos cajas CTC (secuencias ricas en homopirimidina/purina, CCCCTCCCCCCC), ambas localizadas “río arriba” de los genes COL4A6 y COL4A5 respectivamente. Además existe una caja CTC sobre el primer intrón del COL4A5 (Fig. 8). Los factores de transcripción que se unen a la caja CTC se denominan CTCBF y factor de unión a CTC. El CTCBF está compuesto por dos subunidades, de 75 y 85 kD, necesarias para la interacción secuencia específica con la caja CTC (Heikkilä P, 1996).

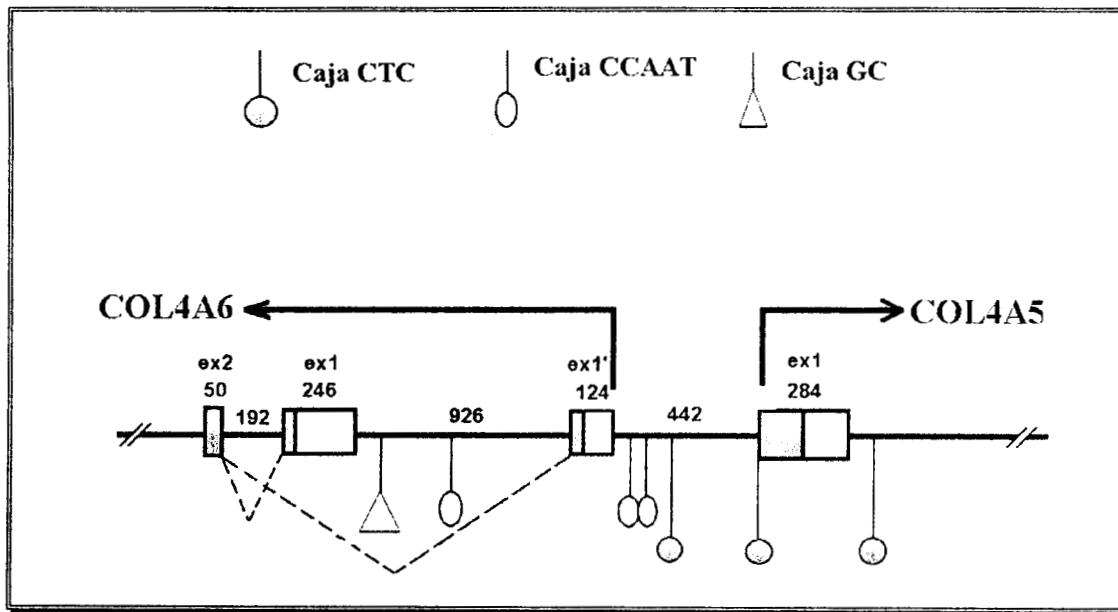


Fig. 8.- Esquemización del promotor bidireccional para los genes COL4A5 y COL4A6. Las cajas representan a los exones y las líneas a los intrones. Su tamaño es en pb. Las áreas sombreadas en los exones representan las secuencias que se traducen. Se observan los elementos de unión a factores de transcripción. Las líneas punteadas indican dos promotores alternativos para el gen COL4A6.

III.3.2 mRNA:

El RNA mensajero de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ presenta aproximadamente 7 kilobases (kb). El producto de este mRNA, completamente traducido, mide 1,685 pb y la proteína que deriva del mismo es de 158 kD. El gen COL4A5 se expresa en la MBG, aunque se ha detectado inmunotinción débil en el tejido conectivo denso, tanto de adultos como de neonatos, en el pulmón (estroma perialveolar), páncreas (estroma pancreático), bazo (pulpa roja) y tinción dudosa en el área perihepatocítica y la basal de la epidermis, todo esto con anticuerpos monoclonales específicos contra la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ (Sariola H y col., 1996). Se sabe que este gen presenta “splicing alternativo” de algunos exones. Saito y colaboradores (Saito A y col., 1994) reportaron la detección de este tipo de “splicing” en el mRNA obtenido de piel y riñón de un hombre adulto normal. El transcrito que se produce pierde el exón 50 que cuando se traduce, resulta en una proteína truncada que pierde 84 pb del dominio carboxi-terminal, incluyendo 5 de sus 12 cisteínas, de tal manera que la cadena no puede incorporarse a la molécula de triple hélice hasta que el alineamiento de las cadenas restantes se inicie en el extremo NC1. Por otro lado, se reportó una inserción de 18 bases entre los exones 41 y 42 del mRNA de riñón de un paciente con SA. Este exón de 18 pb está flanqueado por señales de “splice” consenso y codifica para dos tripletes Gly-X-Y sin alterar el marco de lectura; además, se piensa que el “splicing” es tejido específico porque esta secuencia no se encontró en los linfocitos del mismo paciente, ni tampoco se reporta el significado que pueda tener esta secuencia corta (Guo C y col., 1993).

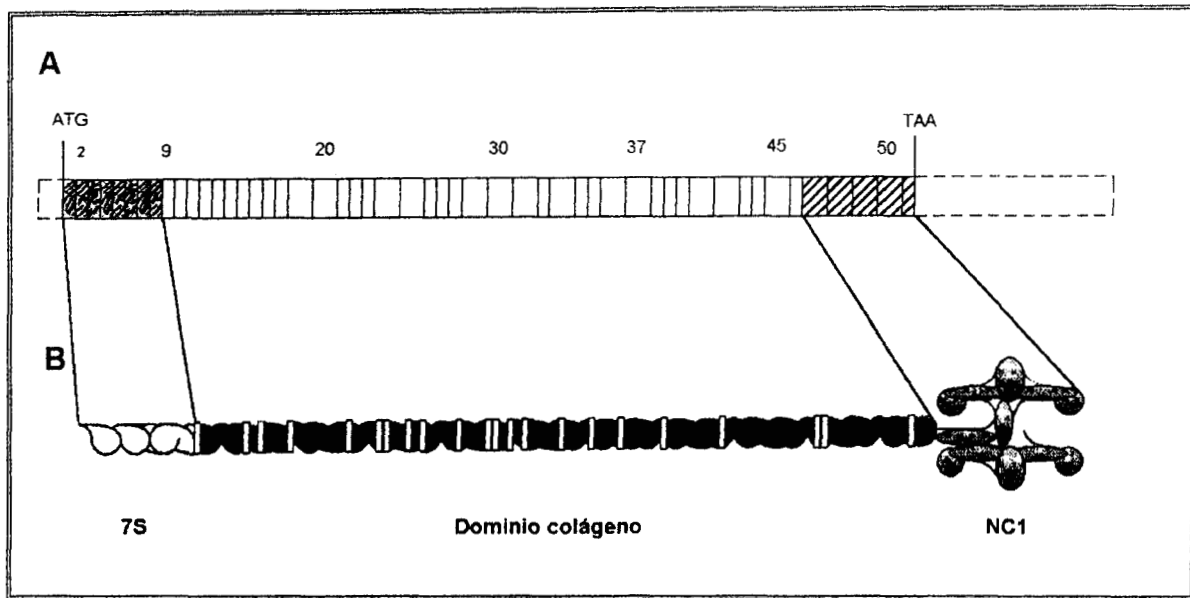


Fig. 9.- RNAm y monómero de $\alpha 5(IV)$. A) El RNAm del COL4A5 tiene 7 kb aproximadamente y 51 exones, se observan las secuencias de inicio y término de la traducción. B) La proteína derivada del RNAm mencionado, tiene 1,685 pb que corresponden al péptido señal de 26 aa (incluido en el dominio 7S), al dominio colágeno de 1,430 residuos con 22 interrupciones no colágenas (rectángulos en blanco de 2 a 11 aa) y al dominio globular NC1 de 229 aa.

III.3.3 Proteína:

El gen COL4A5 codifica para la cadena $\alpha 5(IV)$; sin embargo, cada molécula de colágena tipo IV (monómero) esta compuesta por tres cadenas α . La estequiometría de la triple hélice aún se desconoce y, aunque se ha observado la formación de homotrimeros y heterotrimeros entre las diferentes cadenas α , también se ha observado la formación “in vitro” de heterodimeros de cadenas $\alpha 1(IV)/\alpha 5(IV)$ y $\alpha 3(IV)/\alpha 5(IV)$ (Zhou J y Reeders ST, 1996). La cadena de colágena $\alpha 5$ tipo IV presenta diferentes dominios: en su porción amino terminal se encuentra el péptido señal junto con el dominio 7S, que es rico en cisteínas y están formados por 26 aa; el dominio colágeno, de 1430 aa con estructura colágena característica Gly-Xaa-Yaa, presenta 22 interrupciones por secuencias no

colágenas que varían entre 2 y 11 aa y el dominio no colágeno carboxilo terminal (NC1) de 229 aa, forma un dominio globular (Fig. 9).

La remoción específica del péptido señal crea moléculas maduras, que en el caso de la $\alpha 5(\text{IV})$ es de 1685 aa. El dominio 7S es una región amino terminal corta, no colagénica y rica en cisteínas. La cuarta cisteína de este dominio se encuentra conservada entre las seis cadenas α , y es esencial en la formación puentes disulfuro en el ensamble de tetrámeros de triple hélice.

Las interrupciones no colágenas presentan un alto grado de conservación con respecto a su tamaño y posición. Tienen un papel funcional importante en la MB, pues además de darle flexibilidad, le confieren regulación de la presión a que esta sometida y, algunas de estas interrupciones, sirven como sitios de unión celular o, debido a que presentan cisteínas, sitios de unión intercatenarios.

Los dominios NC1 de las diferentes cadenas de colágena IV, presentan secuencias de aa muy conservados, las cuales son tomadas en cuenta para agrupar a dichas cadenas en dos familias: tipo $\alpha 1$ y tipo $\alpha 2$. Por otro lado, el dominio NC1 presenta doce cisteínas que se unen por seis puentes disulfuro intracatenarios para formar una estructura simétrica (hemi-NC1), la cual es importante para la dimerización de las cadenas α .

Todas las cadenas α de la colágena tipo IV se encuentran ampliamente glicosiladas; presentan alrededor de 50 hidroxilisinas, con sitios de unión para disacáridos a lo largo del dominio colágeno y además, a excepción de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$, presentan asparaginas con sitios de glicosilación en el primer segmento de la triple hélice (Zhou J y Reeders ST, 1996).

III.3.4 Mutaciones en el gen COL4A5:

Actualmente, se han descrito cerca de 200 diferentes mutaciones en pacientes con SA ligado al cromosoma X (Heikkilä P y cols ., 1996; Tryggvason K y col. 1996; Antignac C y col. 1994; Renieri A y col. 1996; Knebelmann B y col. 1996; Kawai S y cols 1996; Lemmink HH y col., 1997; Heiskari N y col., 1997), dichas mutaciones incluyen rearrreglos grandes y pequeños del gen, como deleciones, inserciones, inversiones y duplicaciones, así como cambios de una sola base. Se ha reportado la ausencia total del gen en un sólo caso y también existen reportes en donde la misma mutación puede encontrarse en dos familias aparentemente no relacionadas. La dispersión de mutaciones en el gen COL4A5 se asemeja a la situación reportada para la osteogénesis imperfecta, la cual involucra los genes para la colágena tipo I, y contrasta con otras enfermedades en donde la gran mayoría de los pacientes comparten una mutación, como sucede en la acondroplasia.

En la mayoría de los casos, las mutaciones en el gen COL4A5 pueden explicar los cambios estructurales y fisiopatológicos de la MBG. Dichas mutaciones pueden producir cambios que afectan a la proteína desde la síntesis del transcrito primario hasta la formación de enlaces cruzados entre moléculas individuales de triple hélice en el espacio extracelular. Se sabe que los rearrreglos grandes del gen se encuentran en un 10 a 15% de los casos y que la gran mayoría de las mutaciones reportadas son de tipo puntual. Así pues, las mutaciones reportadas a la fecha sobre este gen en la HGMD (Human Gene Mutation Database Cardiff) muestra que la gran mayoría son mutaciones de sentido erróneo y/o sin sentido (94), seguidas por pequeñas deleciones (41), mutaciones en el sitio de splicing (28), pequeñas inserciones (13), duplicaciones y grandes inserciones (2), rearrreglos gruesos incluyendo inversiones (2) y grandes deleciones (1) (Krawzak M y Cooper DN, 1997). El

38% de las mutaciones de sentido erróneo, consisten en el cambio de una glicina por cualquier otro aminoácido (comúnmente arginina, valina, ácido glutámico o ácido aspártico). Este tipo de mutaciones es característico de las enfermedades hereditarias de la colágena y son responsables del mal plegamiento de la triple hélice y de fallas en las modificaciones post traduccionales de la proteína; por otro lado, se dice que este tipo de mutaciones, junto con algunas que se dan en el sitio de splicing, son características del SA tipo adulto o están relacionadas con la sordera presente en el SA (Heidet L y col., 1997). Todas las mutaciones se han ubicado en forma dispersa a lo largo del gen. No se han detectado puntos calientes en el mismo y son muy pocas las mutaciones idénticas encontradas en dos o más individuos no emparentados (Tryggvason K, 1996). También se han descrito deleciones en el extremo 5' del gen COL4A5 que involucran al extremo 5' del gen COL4A6 contiguo (Antignac C y col., 1992; Zhou J y col., 1993). Este tipo de mutaciones se presentan en pacientes con SA asociado a leiomiomatosis (Fig. 10) (Tryggvason K y col., 1993).

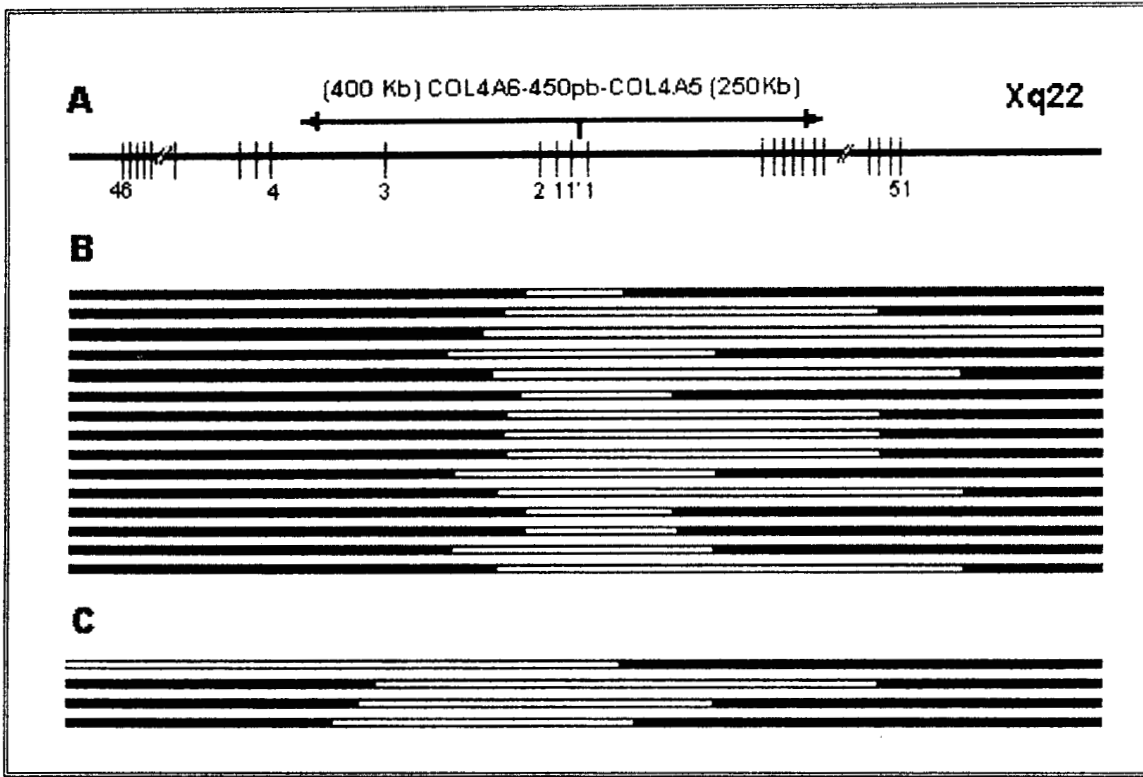


Fig. 10.- Deleciones en los genes COL4A5 y COL4A6. A) Representación esquemática de ambos genes con sus exones, su tamaño y su separación intragénica; B) deleciones en el COL4A5 que abarcan los primeros exones del COL4A6 y producen la asociación SA-leiomiomatosis esofágica difusa; C) deleciones en ambos genes que abarcan más allá del exón 3 del COL4A6 y son variables en el COL4A5. En estos 4 casos, el fenotipo de los pacientes es de SA sin asociación alguna (Tomado y modificado de Heidet L y col., 1997).

IV. Justificación:

Debido a que el SA es un padecimiento progresivo y con expresividad variable, algunas veces el diagnóstico resulta difícil y en ocasiones no logra establecerse. En la mayoría de los casos es necesario emplear métodos invasivos como la toma de biopsias renales para llegar al diagnóstico; sin embargo, no en todos los casos se llega a sospechar la presencia del padecimiento, principalmente en mujeres.

Actualmente se sabe cuáles son los genes responsables de la enfermedad, pero aún es escasa la información sobre las mutaciones que la provocan. La búsqueda de mutaciones o de marcadores moleculares y el conocimiento básico de las enfermedades, es uno de los objetivos más importantes de la medicina actual. Esto adquiere aún más importancia cuando repercute en una aplicación directa sobre el diagnóstico temprano, pronóstico, detección de portadores y la aplicación potencial para tratamientos futuros. Por lo tanto, encontrar las mutaciones en los pacientes con enfermedades progresivas, invalidantes y letales como el SA, se convierte en un objetivo primordial.

V. OBJETIVOS:

V.1 General:

Detectar y caracterizar las mutaciones responsables del síndrome de Alport en pacientes mexicanos y determinar si existe correlación entre el cuadro clínico de los pacientes y el tipo de mutación.

V.2 Particulares:

- Identificar y caracterizar las mutaciones en el gen COL4A5 de pacientes mexicanos con SA.
- Identificar los sitios en donde ocurren con mayor frecuencia las diferentes mutaciones: "puntos calientes".
- Correlacionar el tipo de mutación con el cuadro clínico de los pacientes.
- Establecer el diagnóstico presintomático en las familias informativas.

VI. MATERIAL Y METODOS:

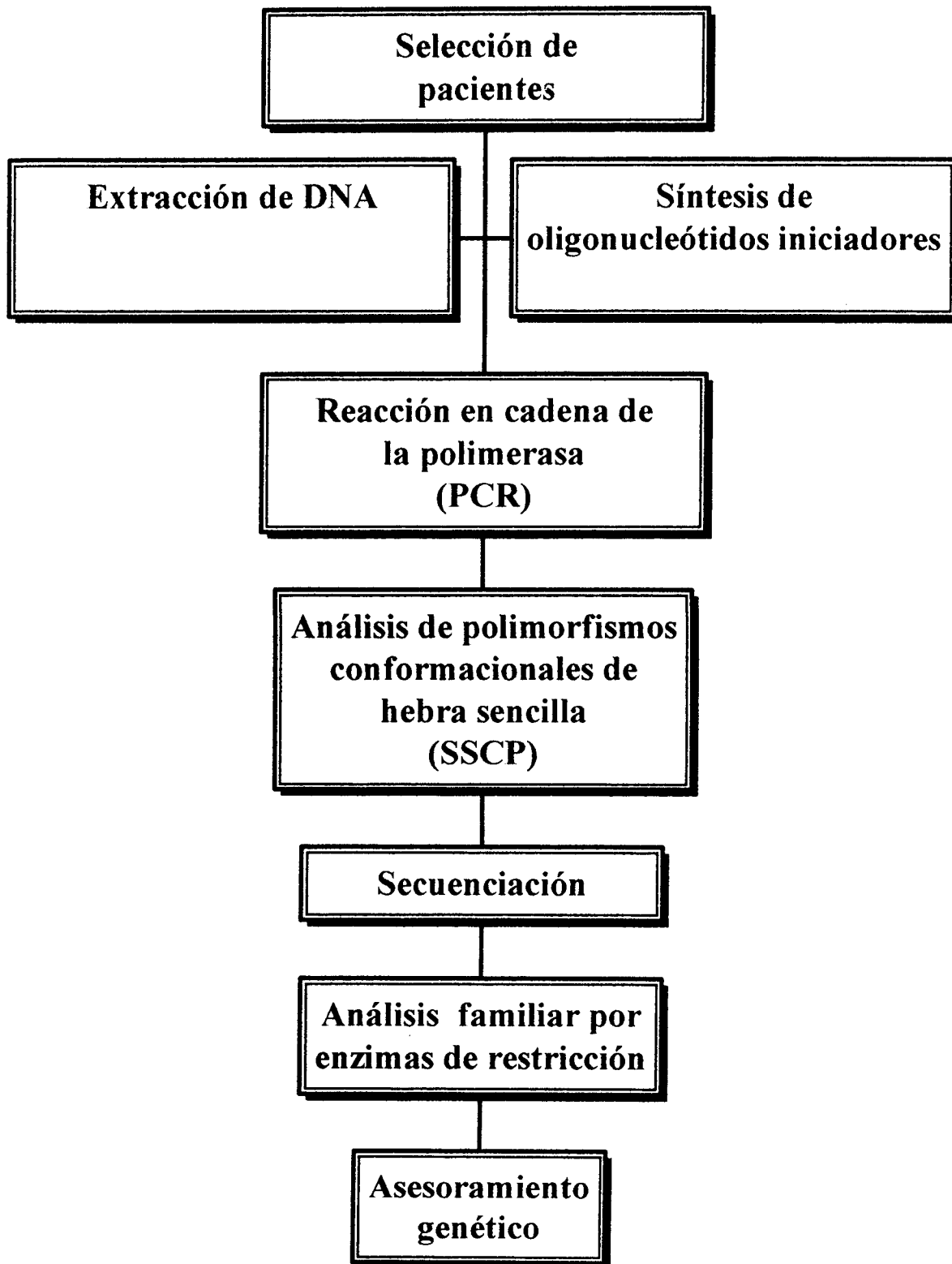
VI.1 Diseño del estudio:

Estudio prolectivo, transversal y descriptivo.

VI.2 Estrategia general:

- Se captaron pacientes diagnosticados clínicamente y por estudios de laboratorio y gabinete con SA, tomando en cuenta los criterios propuestos por Flinter y colaboradores (Flinter FA y col., 1988).
- Se procedió a la obtención de DNA a partir de linfocitos de cada paciente por medio del método de extracción fenólica (Miller y col., 1988), y se determinó la pureza del DNA por espectrofotometría.
- Se buscaron las mutaciones amplificando 22 exones del gen COL4A5, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis, 1990), y se analizaron por la formación de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) (Orita y cols, 1989).
- Una vez detectadas las posibles mutaciones, se caracterizaron por el método de secuenciación por cadena de terminación (Sanger y cols, 1977).
- Las mutaciones que crearon o eliminaron sitios de corte para endonucleasas específicas, se sometieron a análisis por restricción de los productos de PCR tanto en el caso índice como en sus familiares de primer grado.

Estrategia general



VI.3 Estudio clínico:

En el presente trabajo se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico de SA según los criterios establecidos por Flinter y colaboradores (Flinter FA y cols, 1988). Dichos pacientes se captaron en diferentes hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México (INNSZ, INP, INCICH, CMNSXXI y HPEMEX). La muestra constó de 25 casos índice con SA más sus familiares de primer grado. A cada familia se le realizó historia clínica y árbol genealógico.

VI.3.1 Criterios de Inclusión:

Pacientes con diagnóstico de SA, que cumplieran al menos dos de los criterios propuestos por Flinter y sus familiares de primer grado.

VI.3.2 Criterios de Eliminación:

Pacientes en los cuales se presentó alguna falla técnica durante el proceso del estudio que provocó pérdida irrecuperable de la muestra de DNA.

VI.3.3 Criterios de Exclusión:

Pacientes transfundidos en los últimos tres meses o que se encontraran bajo tratamiento médico que pueda interferir en este estudio.

VI.4 Estudio Molecular:

VI.4.1 Extracción y purificación de DNA (Miller y col., 1988):

Se colectó una muestra de 10 a 15 ml. de sangre periférica de cada paciente y de sus familiares de primer grado en tubos de ensayo con EDTA al 5% como anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante 20 min. Se tomó la capa de linfocitos y se pasó a

un tubo de ensayo. Los linfocitos extraídos se lavaron por agitación vigorosa con 5 ml de amortiguador para lisis de células rojas (RCLB), el cual contiene: Tris-HCl 10mM pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10 mM; la mezcla anterior se centrifugó a 3,000 rpm/10 min, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó nuevamente en la misma forma. Posteriormente, se realizó la hidrólisis de linfocitos por incubación a 42°C por 12 horas con 1.5 ml de amortiguador para lisis de células blancas (WCLB), que contiene: Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 10mM pH 8.0, NaCl 50 mM, SDS 0.2% y proteinasa K 200 mg/ml. El DNA se purificó lavando el hidrolizado dos veces por medio de agitación-centrifugación con 3 ml de Fenol saturado pH 7.6, un lavado con 3 ml de Fenol-Cloroformo (v/v) y dos lavados con 3 ml de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), siempre recuperando el sobrenadante para lavarlo con el siguiente reactivo. Finalmente, el DNA se precipitó con una solución de Cloruro de sodio 60 mM en Etanol absoluto a -20°C. El DNA se recuperó con un asa de vidrio y se enjuagó con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secando hasta la evaporación total del etanol y se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada estéril. Por último se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda (λ) de 260 nm. Se cuantificó la concentración de impurezas como fenol y proteínas a una λ de 240 y 280 nm respectivamente. Se consideró como criterio de pureza el cociente DO₂₆₀/DO₂₄₀ y DO₂₆₀/DO₂₈₀ mayor o igual a 1.6, y menor de 2.0. La concentración de DNA en µg/µl se obtuvo multiplicando el valor de DO₂₆₀ por 0.05 (constante) y por la dilución empleada (1:200):

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{DO}_{260})(\text{dilución})(50 \mu\text{g de DNA});$$

$$\text{en donde} \quad 50 \mu\text{g de DNA} = 1 \text{ DO}_{260}$$

Se verificó la integridad del DNA extraído en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml). La electroforesis se corrió a 100 volts por 20 minutos y se observó en un transiluminador con luz ultravioleta.

VI.4.2 Preparación de oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos iniciadores o *primers* que se utilizaron en este análisis fueron donados por la Dra. Corinne Antignac del INSERM, Unidad 423, Hospital Necker, París, Francia, y se diseñaron según las secuencias descritas por Zhou y colaboradores (Zhou J. y col., 1993, 1994). Las secuencias de cada "primer" son las siguientes:

<i>Exón</i>	<i>Secuencia de oligonucleótidos</i>	<i>Tamaño</i>
1F	5' TCA ATT GGT TAG AGC CAG CC-3'	195 pb.
1R	5' AGC GTG AAA GAG CGG TGA TG-3'	
3F	5' TTA CCT TTC ATT CTC ATT TA-3'	143 pb.
3R	5' ATC ATG TTG ACC AAC CAG TA-3'	
5F	5' GTT TAA GGA TTT TAT TTC TT-3'	100 pb.
5R	5' CAT TTC ACT TTT TAC TTT GA-3'	
6F	5' ATT ATA CAT GTG TTA TGT CG-3'	123 pb.
6R	5' TCC ATT TAA TCT TGG GTA GT-3'	
7F	5' TCC ATG CTC TTT ATT TTT AA-3'	113 pb.
7R	5' AAA ATT TGG GAT TAT GAT GA-3'	
9F	5' AGA ACT TCC ATT GAT GGC TTC T-3'	129 pb.
9R	5' GTA TCC AGT GAT TTT CTT TTT T-3'	
30F	5' TTT AAA CTG TAT TTA TTT CTT A-3'	168 pb.
30R	5' TAG AGT AAA TGT GCA TTT TGT A-3'	
31F	5' CTT ATT AAT ATT GAT ATT GTA TT-3'	225 pb.
31R	5' GTT TAA AGT TTT CTC TGA TTT 3'	
36F	5' ATA TTA TAT ACT ACA TAT TTT CAA 3'	191 pb.
36R	5' CTA AAA CTA TAT GCC AAA GAT 3'	
38F	5' TCA TTT TTA AAT TGA GCT CTT TAC 3'	141 pb.
38R	5' AAC AGC AAA CTG TTA TTT TTC ATG 3'	
39F	5' GGT GTA ACC TGC TGT ACT CAA TT 3'	155 pb.
39R	5' AAT AGG AAA AAT GAA AAA CTA CAG 3'	
40F	5' TGT TTT GTT TTG TTT TGT ACT CTG 3'	108 pb.
40R	5' TTG ATT TAG CAT GTT TTA TTA AGG 3'	
42F	5' ATG TCG TCA TTT GCT GTG GAT TA 3'	194 pb.
42R	5' CAT CAG ATA TCT ACT TCC ATT TCC 3'	
43-44F	5' GTA ACA TTA ATG ATG ATT TTA TTT ATT C-3'	336 pb.
43-44R	5' TAT AAC TAT CTT CAG GAA TAA GTC 3'	
45F	5' CCC TTC AAA TTT GTG TGT TTT GTC 3'	189 pb.
45R	5' GAT AAT AAA GAT GAT CTG CAT TGG 3'	
46F	5' TAT TTG AAT GCC TCA TTC TTT TCC 3'	155 pb.
46R	5' ACC AAC AGC ATG TTT TAC TTG TC 3'	

<i>Exón</i>	<i>Secuencia de oligonucleótidos</i>	<i>Tamaño</i>
47F	5' TCT TGT ATA CTG ATT ATT TCG TGG 3'	273 pb.
47R	5' CAG TAG GAA ATT AGA TAT TGA TTA 3'	
48F	5' CTT TAC TGT TTT CTC TCC AAA TCT 3'	242 pb.
48R	5' AAA AGT CAC AGC TAA ATC AAT GCC 3'	
49F	5' ATT ATG TTC CTT CTC CTT TTC CTT 3'	175 pb.
49R	5' ATG ACA AAT GCA AGG AAG AGT GTA 3'	
50F	5' TTG CGG CAC ATT TTT CCT TGT CTT 3'	232 pb.
50R	5' GGA CCT GAA TTA AAG CTA TAA GCA 3'	
51F	5' GAT CTG ATT GTC TTA TTT CTT ATT 3'	191 pb.
51R	5' TAA AGT TGG GGA CAA TGA GAG AG-3'	

VI.4.3. Amplificación del gen COL4A5 por PCR (Mullis y col., 1990):

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación en forma exponencial, de un fragmento de DNA. Se empleó el DNA de cada paciente como molde y los oligonucleótidos arriba mencionados del gen COL4A5 para amplificar cada exón. La mezcla de reacción para PCR se preparó de la siguiente manera:

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>	<i>[Stock]</i>	<i>[Final]</i>
H ₂ O	17.075 µl		
Amortiguador taq	2.5 µl	10 X	1 X
ATGC (bases)	0.25 µl	10 mM c/u	1 mM c/u
Oligonucleótido F	1.0 µl	10 pmol/µl	10 pmol
Oligonucleótido R	1.0 µl	10 pmol/µl	10 pmol
Taq Polimerasa/Stoffel	0.175 µl	10 U/µl	1 U
MgCl ₂	2.0 µl	25 mM	2 mM
DNA	1.0 µl	100 ng/µl	100 ng

Los reactivos se mezclaron siempre en el mismo orden.

- Se colocó el DNA de cada paciente en un tubo de reacción y después se le adicionó la mezcla de reacción.
- Dicha mezcla se homogeneizó suavemente por agitación y se colocó en un ciclador térmico (Thermal Cycler 9600 de Perkin Elmer) con el siguiente programa:

<i>Proceso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
Desnaturalización	94°C	2 min.	1
Desnaturalización	94°C	20 seg.	
Alineación	48°C	20 seg.	35
Extensión	72°C	20 seg.	
Desnaturalización	94°C	12 seg.	
Alineación	55°C	20 seg.	1
Extensión	72°C	1 min.	
Incubación	4°C	Permanente.	

Una vez que concluyó la amplificación, se tomaron 7µl del amplificado y se mezclaron con 3µl de colorante acarreador para verificar el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %, con un corrimiento a 100 volts por 15 min. El gel se tiñó con 1µl de Bromuro de Etidio (5mg/ml), y se observó en un transiluminador (con luz UV). Se utilizó 1µg del marcador de pesos moleculares DNA Leader 100 pb (Boehringer Mannheim) para cotejar el amplificado.

VI.4.4 Detección de mutaciones por SSCP (Orita y col., 1989):

El SSCP es una técnica que se ha empleado para explorar pequeños fragmentos de DNA (de hasta 700 pares de bases), tiene una eficacia para detectar de un 80-85% de secuencias polimórficas que varíen hasta por una sola base y se basa en el movimiento electroforético de la conformación tridimensional que adoptan las cadenas sencillas del DNA. Para este fin, se requirió la elaboración de un PCR marcado (en este caso isotópicamente), y su corrimiento electroforético en un gel no desnaturizante con temperatura y voltaje controlados. La técnica consistió en lo siguiente:

- Se mezclaron los siguientes reactivos en el mismo orden que a continuación se muestra para cada tubo de reacción.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen</i>	<i>Stock</i>	<i>Final</i>
H ₂ O	6.1 µl		
Amortiguador taq.	1.0 µl	10 X	1 X
ATG (bases)	0.1 µl	10 mM c/u	1 mM c/u
Oligonucleótido F	0.4 µl	10 pmol/µl	0.4 pmol
Oligonucleótido R	0.4 µl	10 pmol/µl	0.4 pmol
Taq Polimerasa /Stoffel	0.1 µl	10 U/µl	1 U
MgCl ₂	0.8 µl	25 mM	4 mM
[α- ³² P] dCTP	0.1 µl	10 mM	1 mM
DNA o amplificado	1.0 µl	100 ng/µl	100 ng

- De la misma forma que para el PCR, se adicionó primero el DNA de cada paciente a los tubos de reacción y posteriormente, la mezcla de reacción radioactiva.
- Esta mezcla se sometió a amplificación utilizando el programa ya mencionado.

- Una vez terminada la amplificación con marca radioactiva, se tomaron 1.5µl del amplificado y se colocaron en tubos nuevos de reacción con 9µl de solución STOP, la cual contiene: Formamida al 95%, azul de bromofenol al 0.05%, Xilencianol al 0.05% y EDTA 20 mM. Esta mezcla se desnaturalizó a 99°C por 10 min.
- Se sacó la muestra desnaturalizada del ciclador (a 99°C) y se colocó en un baño de hielo para provocar un choque térmico que permitió obtener la conformación tridimensional de las cadenas abiertas del amplificado.
- Inmediatamente después, se corrieron 2µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 10% con glicerol al 10% a 25°C y 250 volts por 20 horas en amortiguador TBE 0.8 X.
- Una vez concluida la electroforesis, el gel se colocó sobre papel filtro y se cubrió con papel Egapack para secarlo a 80°C por 1 hora en un secador de geles.
- Posteriormente, el gel se colocó en un cartucho de rayos X y se expuso de 12 a 24 hrs. con película Kodak X-OMAT para obtener su autoradiografía y observar su patrón de movimiento electroforético.

VI.4.5 Secuenciación (Sanger y cols, 1977):

Al igual que la PCR, en la secuenciación la síntesis de DNA se inicia a partir de un oligonucleótido, de tal manera que la DNA polimerasa avanza a lo largo del DNA molde incorporando nucleótidos a la cadena naciente; alguno de estos nucleótidos debe estar marcado y los otros modificados (dideoxi), de tal suerte que la síntesis se detiene a diferentes longitudes y de manera aleatoria según el nucleótido modificado que se incorpore. Para obtener información de la secuencia, se realizan cuatro reacciones por separado, utilizando un análogo inhibitorio por reacción (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP). Cuando las muestras se analizan por electroforesis desnaturalizante y autoradiografía (si se utilizó un marcado isotópico), se observan una serie de bandas en diferentes longitudes que corresponden a la localización de cada uno de los

aminoácidos incorporados, debiéndose leer este conjunto de bandas en dirección 5' - 3' de acuerdo al oligonucleótido utilizado.

Los productos amplificados de las muestras que mostraron cambios por el análisis de SSCP, se purificaron por medio de columnas Quiagen, las cuales eliminan los restos de bases, enzima y sales del DNA de doble cadena amplificado y recuperan un 80% del producto de PCR de hasta 500 pb. Una vez limpias, las muestras se secuenciaron directamente con un secuenciador de DNA automatizado de Applied Biosystems (modelo 373A) y un protocolo de secuenciación cíclica dideoxi, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con ambos oligonucleótidos y análogos de bases (dideoxi) marcados con diferentes fluorocromos.

VI.4.6 Análisis con endonucleasas de restricción:

Este tipo análisis se llevó a cabo en los productos de PCR de aquellos pacientes que presentaron una mutación que crea o restringe un sitio de corte para una enzima específica, con el fin de observar la segregación de la mutación en la familia involucrada. La reacción de digestión se llevó a cabo en tubos de reacción con la siguiente mezcla:

Reactivo	Concentración
Producto de PCR	1 µg
Enzima	5 U
Amortiguador de la enzima	1X
H ₂ O	Aforar a 50 µl

La restricción anterior se realizó en el producto de PCR del paciente y de sus familiares de primer grado, además de un control negativo para cada enzima utilizada. La mezcla de restricción se incubó de 2 a 12 horas a 37°C. Posteriormente, se tomaron 20 µl del producto restringido para analizarlos en electroforesis de poliacrilamida.

El exón 30 se restringió con la enzima *Sau96 I* y se observó en un gel de poliacrilamida al 16% a partir de Acril-bisacrilamida 38:2 y como marcador de pesos moleculares (MPM) el Leader de 20 a 200 pb, con incrementos de 20 en 20 pb. El exón 42 se restringió con la enzima *Alu I* y se analizó en un gel de Acril-bisacrilamida (29:1) al 9.2% junto con el MPM Leader de 100 a 1,500 pb, con incrementos de 100 en 100 pb.

VII. Análisis de resultados:

El trabajo se analizó en forma descriptiva.

VIII. Resultados:

VIII.1 Estudio clínico:

Se captaron 25 casos índice con diagnóstico clínico de SA, provenientes de los departamentos de Nefrología de diferentes centros médicos del Distrito Federal. Así pues, 11 de estos casos (44%) fueron referidos del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ); 9 (36%) del Instituto Nacional de Pediatría (INP); 4 (16%) de diferentes hospitales de especialidades del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y 1 (4%) del Hospital Regional Sur de Petróleos Mexicanos (PEMEX).

En cuanto a la distribución por edad y sexo, 16 (64%) fueron varones y 9 (36%) mujeres; 11 (44%) se encontraban entre la primera y segunda década de la vida y 14 (56%) en la tercera década o más de la vida (Tabla 2).

Se analizaron las historias clínicas y se construyeron los árboles genealógicos de cada paciente para documentar el patrón de herencia, confirmándose en 14/25 casos familiares un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X (HDX). El resto fueron casos aislados, por lo que no fue posible confirmar el patrón de herencia, aunque todos ellos reunían varios de los criterios mencionados por Flinter (ver tabla 2). Sólo un caso no presentó historia familiar de hematuria, aunque sí presentó nefropatía progresiva, insuficiencia renal terminal (IRT) en la 3ª década de la vida, sordera y lesiones oculares. Por último, en el paciente 71A1 se observó hematuria microscópica al igual que en su madre y hermana; sin embargo, la microscopía de luz de la biopsia renal no mostró alteraciones; este caso índice presenta nefropatía progresiva, pero no otros signos del SA. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 2.

VIII.2 Estudio Molecular:

VIII.2.1 Extracción del DNA:

Se formó un banco de DNA constituido por los 25 casos índice y 71 familiares de primer grado. Todas las muestras tuvieron una concentración que varió entre 1 y 2 µg/µl (Fig. 11).

Tabla 2. Características clínicas de cada paciente captado en este estudio.

Paciente	Sexo ¹	Historia familiar de hematuria ²	Nefropatía progresiva	IRT ³ (Década)	Lesiones auditivas	Alteraciones oculares
1A1	M	HDX	+	1 ^a	+	+
32A1	M	HDX	+	2 ^a	No	No
40A1	M	No	+	3 ^a	+	+
41A1	M	HDX	+	3 ^a	+	No refiere
45A1	M	1 hermano	+	2 ^a	No	No refiere
46A1	M	HDX	+	3 ^a	+	No refiere
47A1	F	HDX	No	No	+	No
48A1	M	HDX	+	3 ^a	+	+
50A1	F	1 hermano	+	3 ^a	No refiere	No refiere
51A1	F	1 hermano	No	No	No	No
58A1	M	HDX	+	2 ^a	+	+
62A1	M	Mad y Tía	+	2 ^a	+	+
63A1	M	1 hermano	+	2 ^a	+	+
65A1	F	HDX	+	No	No	No
67A1	F	HDX	+	3 ^a	+	No refiere
68A1	M	HDX	+	No	No	No
70A1	M	HDX	+	3 ^a	+	+
71A1	M	Mad y hna.	+	No	No	No
74A1	F	Mad y hna.	+	1 ^a	+	No refiere
79A1	F	Pad y hna	+	1 ^a	No	No refiere
84A1	F	Mad y hnos	+	No	No refiere	No refiere
87A1	F	HDX	+	No	No	No
90A1	M	Mad y hna	+	1 ^a	No refiere	No refiere
93A1	M	HDX	+	2 ^a	+	+
97A1	M	HDX	+	-	+	+

¹M: Masculino; F: Femenino. ²HDX: Herencia dominante ligada al X; Mad: Madre; Pad: Padre; hna(os): Hermana (os). ³IRT: Insuficiencia renal terminal.

VIII.2.2 Preparación de Oligonucleótidos:

Se prepararon los 22 pares de oligonucleótidos iniciadores o "primers" antes mencionados, a una concentración de 10 pmol/ μ l y se almacenaron a -20°C. Los oligonucleótidos para los exones 43 y 44 se sintetizaron juntos debido a su tamaño y cercanía.

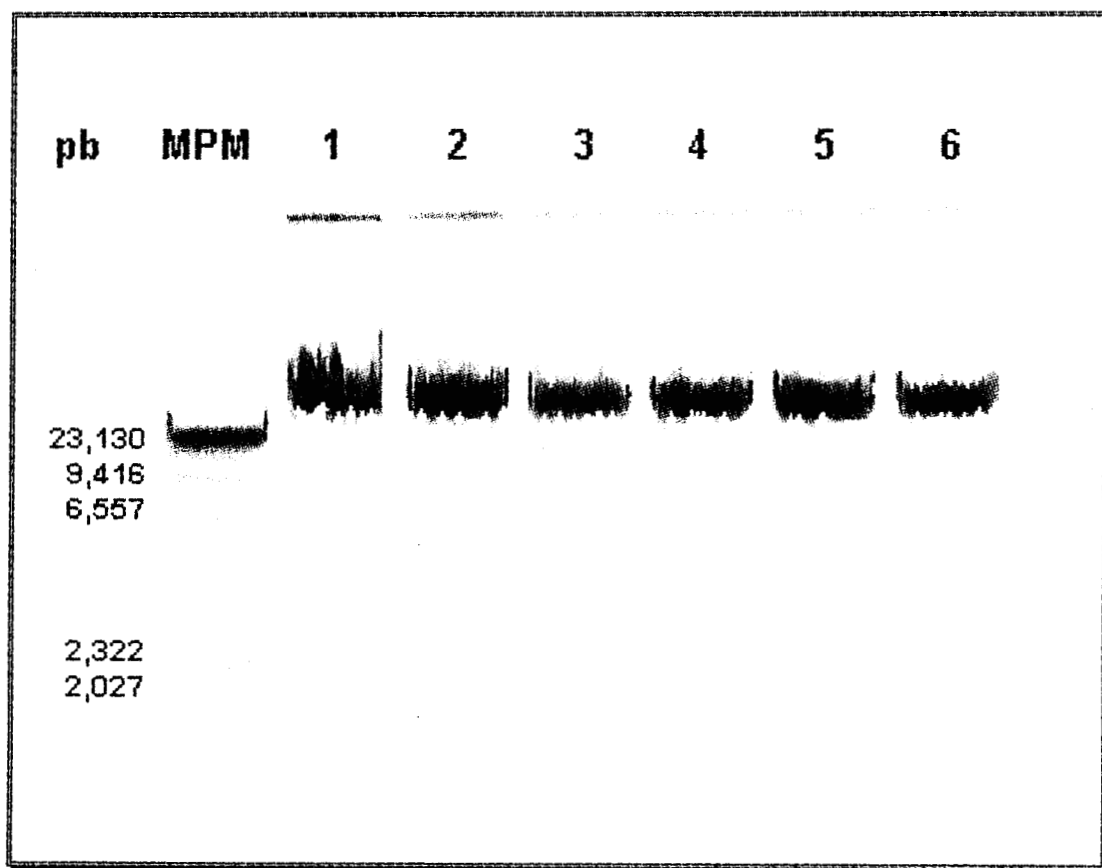


Fig. 11.- Integridad del DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% del DNA genómico de diferentes pacientes con SA (carriles 1-6). Nótese que la migración de todas las muestras está antes de las 23 Kb. El marcador de pesos moleculares (MPM) es el Lambda/*Hind* III.

VIII.2.3 Amplificación del gen COL4A5 por PCR:

Se lograron establecer las condiciones para amplificar todos los exones antes mencionados. Las variantes en cuanto a la temperatura media (T_m) o de alineación para los diferentes programas de PCR y para cada exón se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones para la amplificación de cada exón del gen COL4A5.

<i>Proceso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Exones</i>
Desnaturalización	94°C	Todos.
	58°C	1
Alineación	55°C	9, 39, 40, 45, 46
	49°C	3,6,36, 43-44, 47, 48, 49, 50, 51
	48°C	38, 42
	46°C	5, 7, 30, 31
Extensión	72°C	Todos.

Como se puede observar en la tabla anterior, cada exón presentó condiciones propias de amplificación. La figura 12 muestra el producto de PCR de los exones 30 y 31, de 194 y 225 pb respectivamente, en donde se pudo apreciar la limpieza del amplificado sin presencia de bandas inespecíficas.

222356

VIII.2.4 Detección de mutaciones por SSCP:

Por esta técnica se localizaron cambios conformacionales en cuatro exones diferentes, en el DNA de un total de 4 casos índice no relacionados. Uno de ellos se localizó en el exón 1, el cual codifica para el péptido señal de la proteína y tres en la región del dominio colágeno (exones 30, 39 y 42)(Fig. 13). Esto resulta en un 16% de posibles mutaciones encontradas en la población analizada.

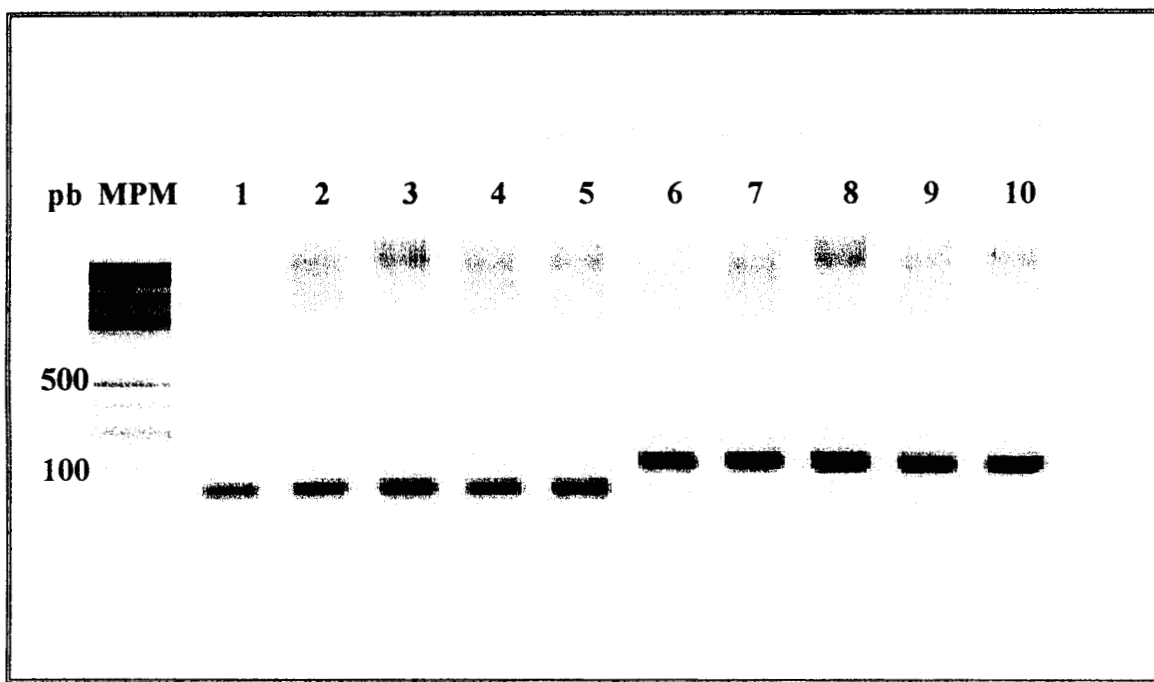


Fig. 12.- PCR para los exones 30 (194 pb) y 31 (225 pb). Carriles 1-5, exón 30; carriles 6-10, exón 31 (Bromuro de Etidio; MPM, Leader 100 pb).

VIII.2.5 Caracterización de mutaciones por Secuenciación:

La caracterización de las posibles mutaciones por medio de la técnica de secuenciación detectó lo siguiente: 1) Mutación G5X en el exón 1 del paciente 2A1 y su madre (1A1), dada por una transversión de T por G que conduce al cambio del codón para

la glicina localizada en la posición 5 por un codón de terminación (Fig. 14); 2) Mutación G822R en el exón 30 del paciente 40A1, en donde se provoca el cambio de una glicina por arginina en la posición 822 y se elimina un sitio de restricción para *Sau96* I (Fig. 15); 3) Mutación 42sp G→C en el exón 42 del paciente 65A1, donde el cambio de G por C alteró el sitio de "splicing" para el intrón 42 y produjo un sitio de corte para *Alu* I (Fig. 16); 4) se detectó una mutación homocigota silenciosa en el exón 39 del paciente 41A1 (E1171E) (Fig. 17).

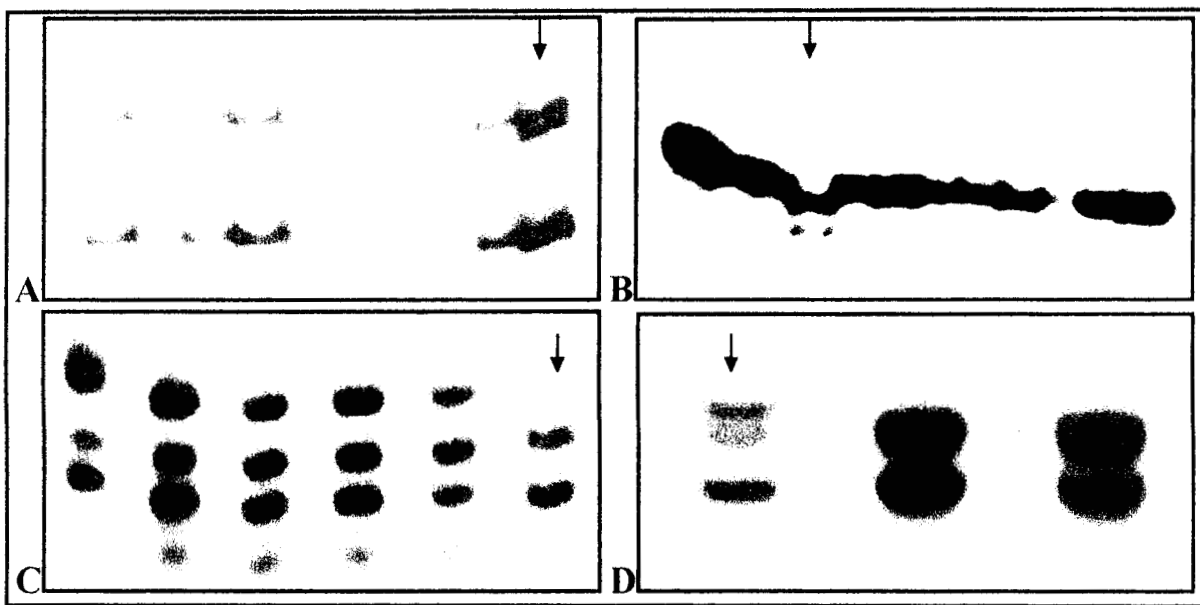


Fig. 13.- Análisis de diferentes exones del gen COL4A5 por SSCP. A) Exón 1, paciente 1A1; B) exon 30 del paciente 40A1; C) exón 39 del paciente 41A1; D) exón 42 del paciente 65A1. La flecha indica el cambio de movilidad comparado con los demás carriles que corresponden al corrimiento de otros pacientes.

VIII.2.6 Análisis con endonucleasas de restricción:

El análisis de secuenciación reveló que la mutación observada en el exón 30 (de 168 pb) del gen COL4A5 del paciente 40A1, elimina un sitio de corte para la enzima *Sau96* I. Este exón presenta seis sitios de corte para dicha endonucleasa, de tal manera que se

generan siete fragmentos: 2 de 9 pb, 2 de 18 pb y tres de 33, 34 y 47 pb respectivamente. La figura 18 muestra un gel de poliacrilamida 38:2 al 16%, en el cual se observa la digestión de dos muestras control (carriles 1 y 3), que presentan tres bandas (47, 34 y 33 pb); y del caso índice, en donde la mutación elimina el sitio de corte para el fragmento de 33 pb el cual queda unido con uno de 9 pb para formar una banda de 42 pb. La imagen que se observa en el gel, es de las bandas de 47, 42 y 34 pb respectivamente, con lo que se corroboró dicha mutación.

Otra de las mutaciones caracterizada por secuenciación, la 42sp G→C, mostró que se crea un sitio de corte para la enzima *Alu* I. Observamos también que dicha mutación es heterocigota, por lo cual se realizó el análisis por digestión enzimática para este exón en la familia y detectamos que la madre y la paciente presentan un sitio de corte que produce un fragmento de 165 pb y uno de 29 pb (que no se observa en el gel), además de presentar el otro alelo intacto (banda de 194 pb), por lo cual comparten la misma mutación. La hermana es homocigota para el alelo normal, al igual que el control femenino sano (Fig. 19).

VIII.2.7 Asesoramiento genético:

El asesoramiento genético se otorgó con certeza a todas las familias que contaron con una mutación caracterizada. En aquellas familias donde se observó un patrón de herencia dominante ligado al X, también se brindó asesoramiento genético.

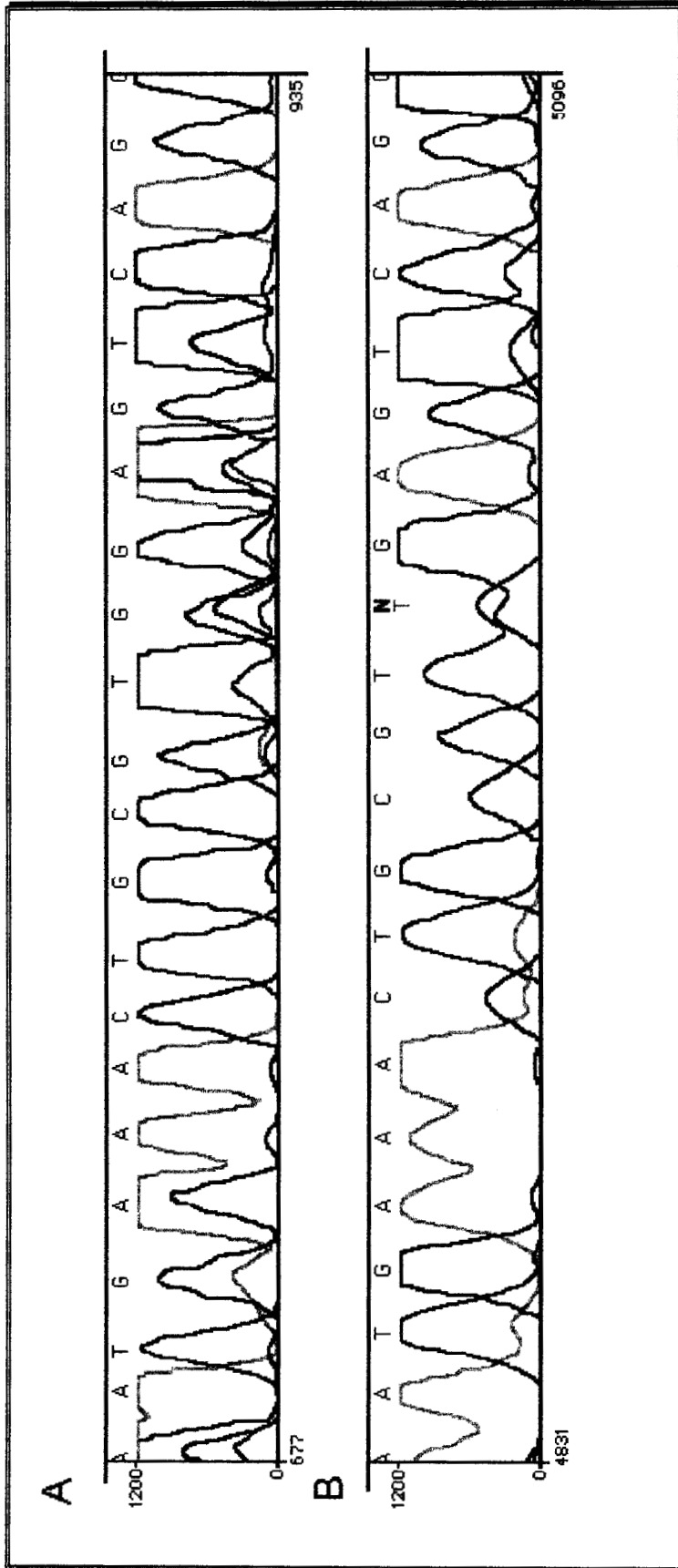


Fig. 14.- Secuenciación del exón 1 del gen COL4A5. A) Secuencia de una muestra control. **B)** sustitución heterocigota en el paciente 1A1. Se indica la base mutada con la letra N y debajo de ésta la base sustituta (T).

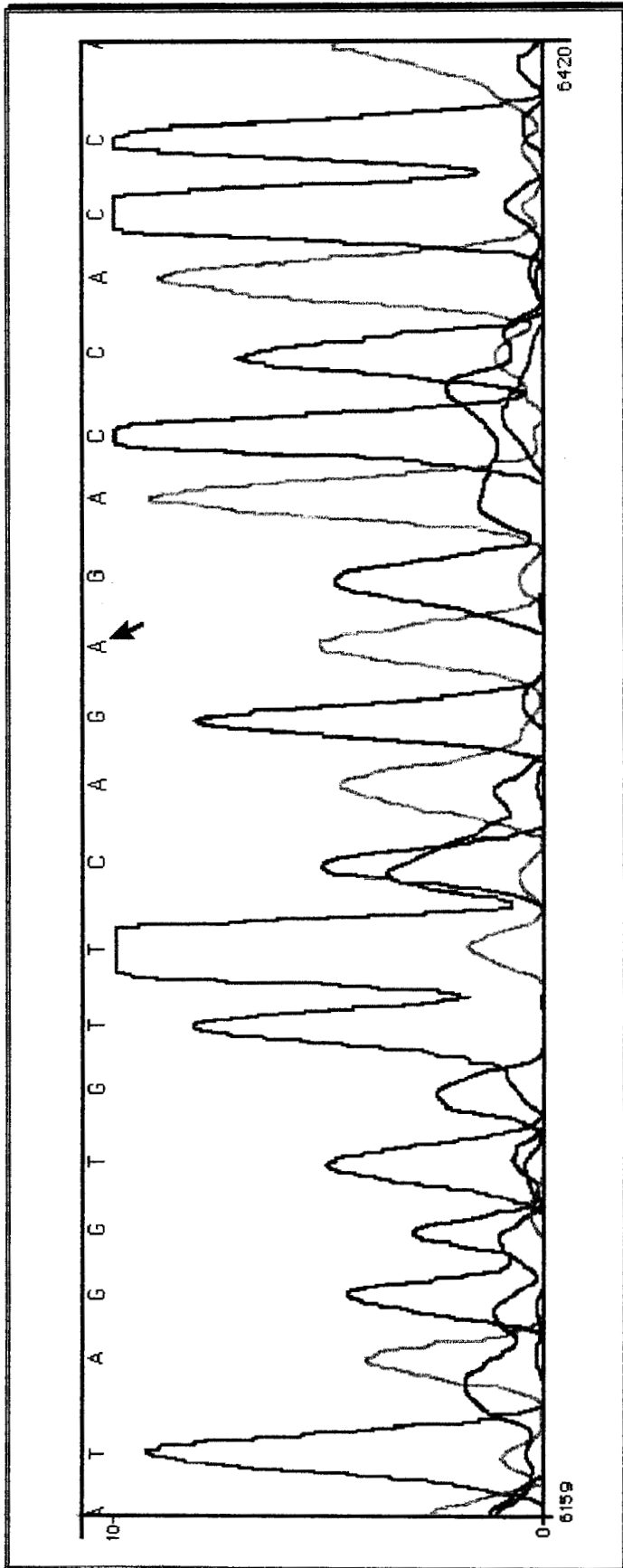


Fig. 15.- Secuenciación del exón 30 del paciente 40A1. El codón 822 GGA que codifica para glicina es cambiado por AGA debido a una sustitución homocigota en la primera base de dicho triplete, por lo cual el aminoácido codificado ahora es arginina. La flecha indica la base sustituta.

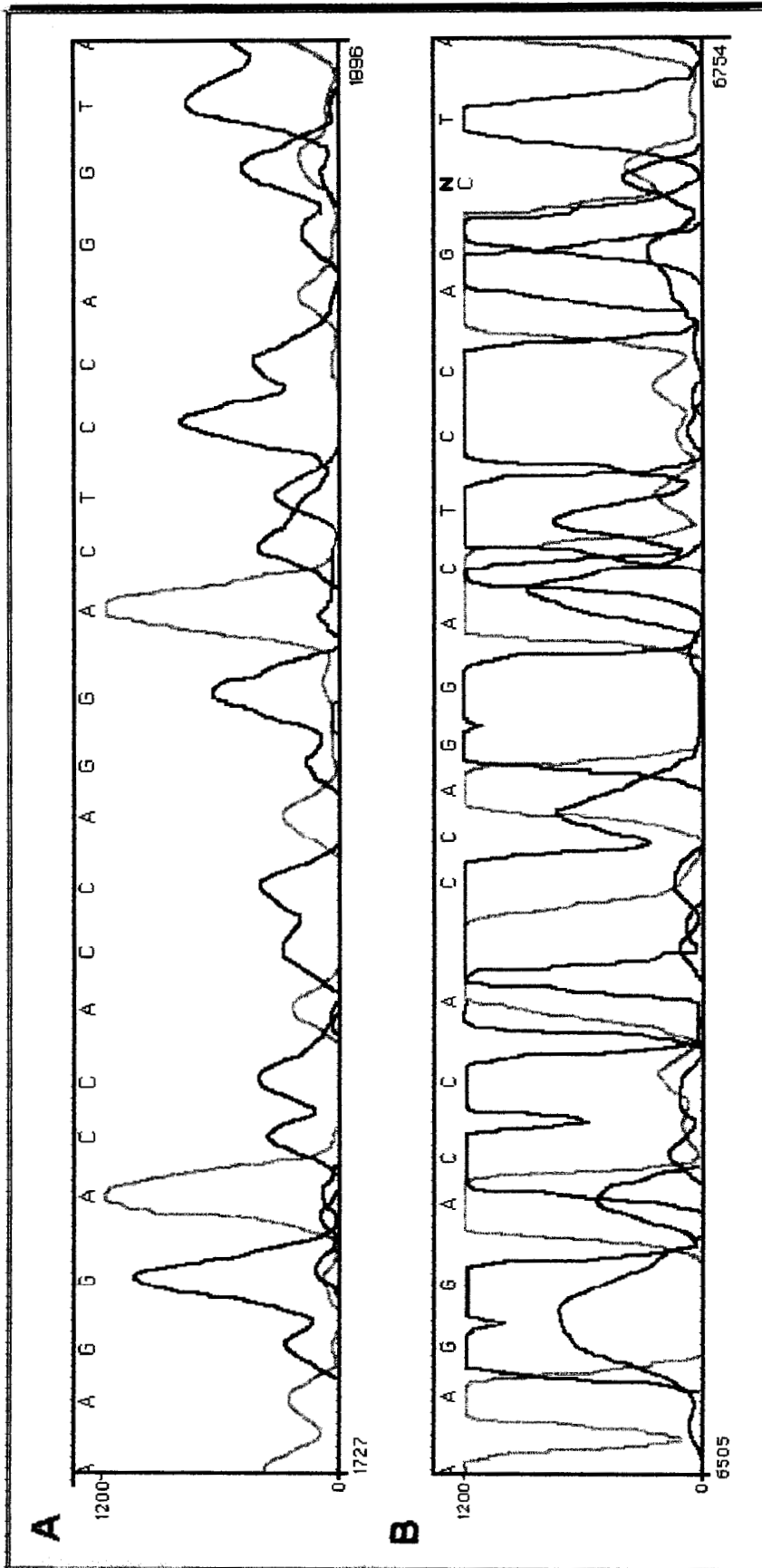


Fig. 16.- Secuenciación del exón 42 del COL4A5. A) Muestra control en donde se observa la secuencia normal para éste exón, **B)** sustitución heterocigota en el paciente 65A1, en donde se observa el cambio de G por C en la primera base intrónica. La letra N indica la base mutada.

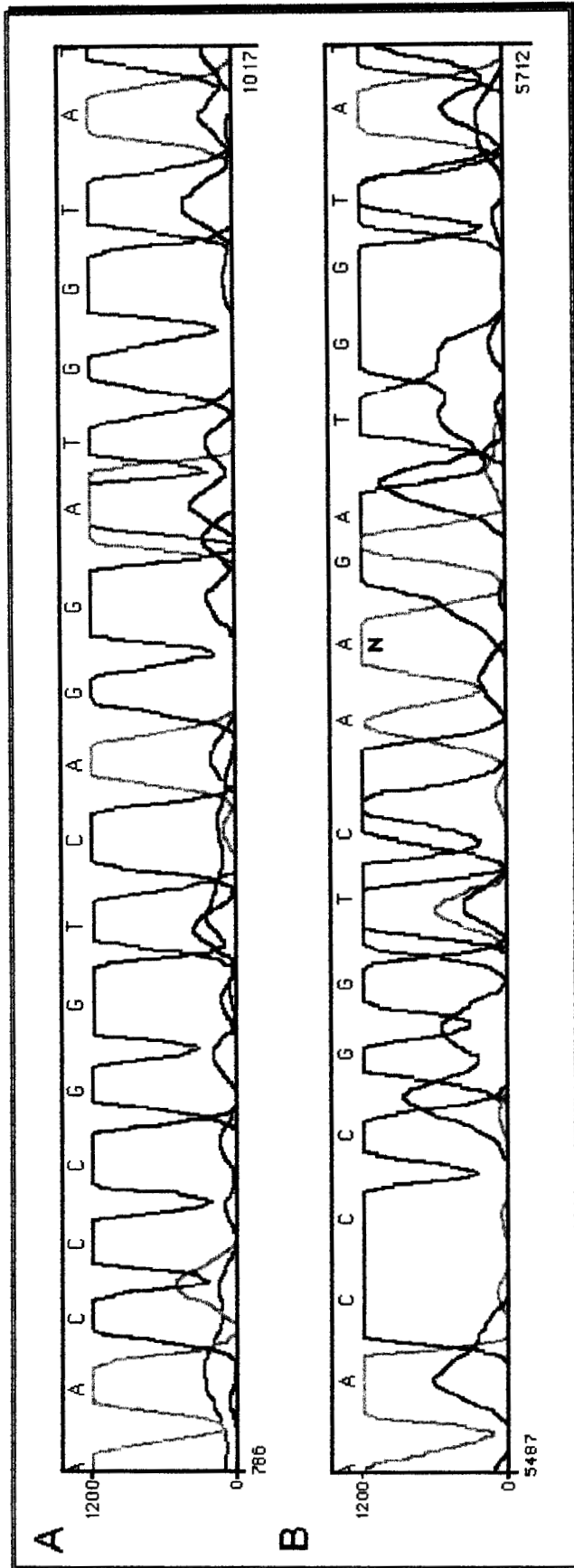


Fig. 17.- Secuenciación del exón 39 del gen COL4A5. A) Secuencia de una muestra control para el exón 39 del COL4A5; **B)** sustitución silenciosa en el paciente 41A1, en donde se observa el cambio de G por A (N) en la tercer base del codón que codifica para glicina.

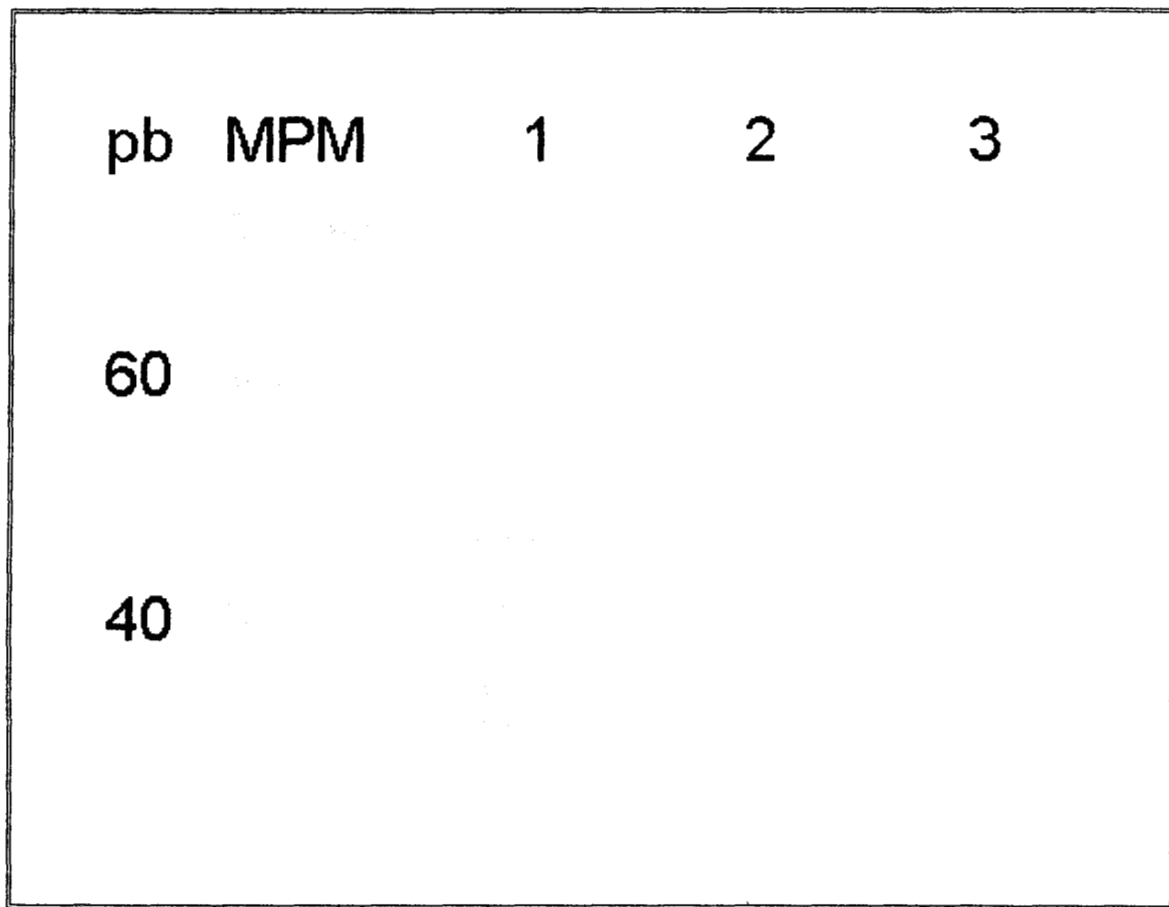


Fig. 18.- Restricción con *Sau96 I*. Carriles 1 y 3, muestras control de una mujer y un hombre sanos para el exón 30 del COL4A5, en los que se observan los fragmentos de 47, 34 y 33 pb que se forman después de la digestión con *Sau96 I*; carril 2, muestra del exón 30 del paciente 40A1 en donde se eliminó el sitio de restricción para *Sau96 I* en el fragmento de 33 pb, el cual queda unido a 9 pb formando la banda de 42 pb que se observa en el gel, además de las bandas de 47 y 34 pb. MPM: Leader 20 pb. Tinción de plata, acril/bisacrilamida 38:2 al 16%.

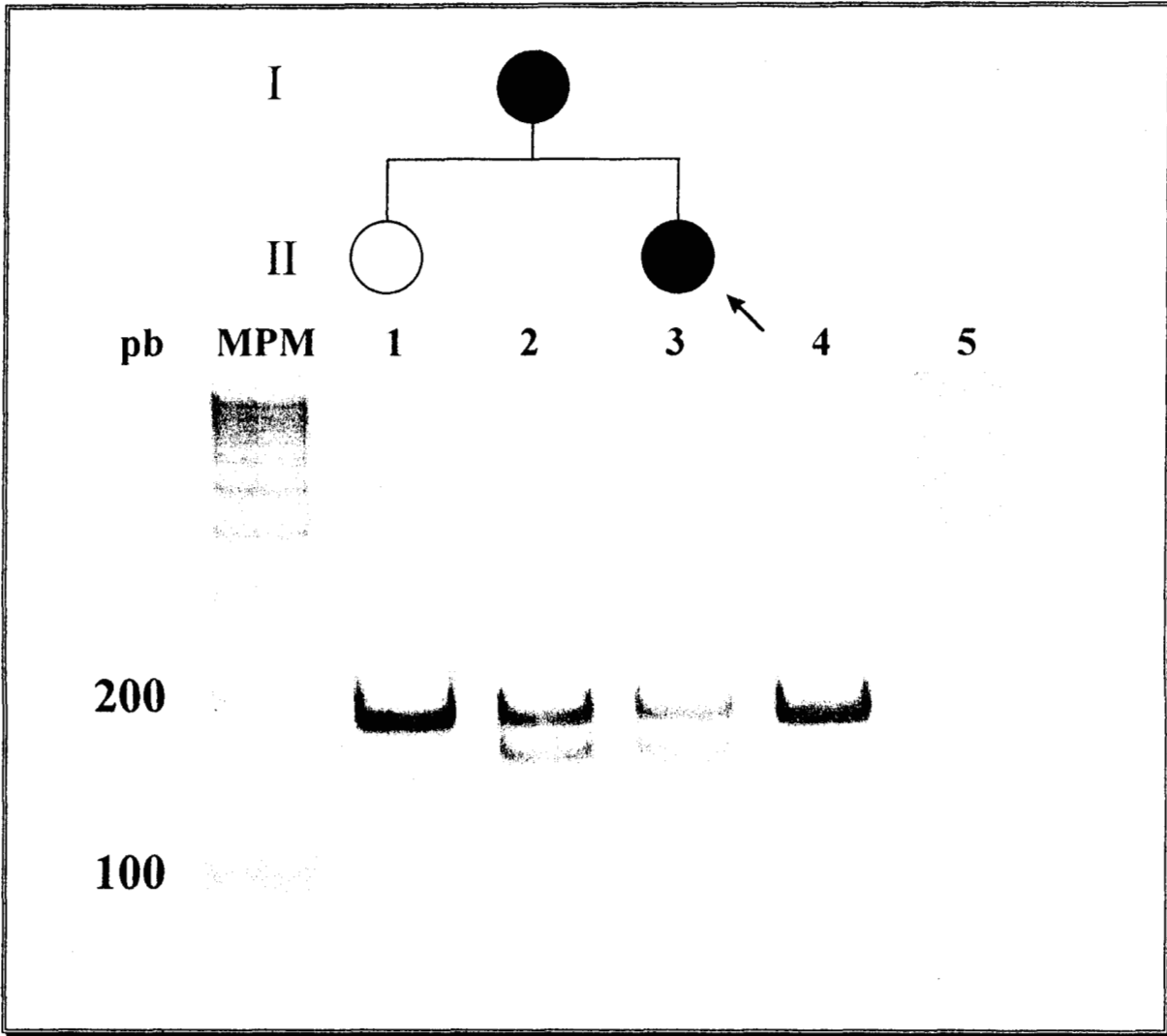


Fig. 19.- Restricción con *Alu I*. Productos de PCR para el exón 42 (194 pb) del COL4A5 de diferentes muestras de DNA digerido con *Alu I*. Carril 1: Hermana; carril 2: madre; carril 3: caso índice; carril 4: control femenino; carril 5: Fago Lambda. Nótense las bandas de los carriles 2 y 3 que corresponden al alelo normal (194 pb) y al alelo mutado (165 pb) con sitio de corte para *Alu I*. MPM: Leader 100pb. Bromuro de etidio, acril/bisacrilamida 29:1 al 9.2%.

IX. Discusión:

El SA es una enfermedad hereditaria de la colágena tipo IV que muestra una gran variabilidad tanto clínica como genética. Se presenta como una enfermedad renal hematórica que generalmente se asocia con sordera y daño ocular. La colágena IV es el principal componente de las membranas basales de ciertas estructuras de los órganos arriba mencionados. Está compuesta por seis diferentes cadenas alfa, las cuales están codificadas por genes ubicados en tres cromosomas diferentes. La forma más común del síndrome se presenta en forma dominante ligada al sexo (HDX), pero también se han reportado pacientes con SA que presentan un patrón de herencia autosómico dominante o recesivo e incluso aquellos que no presentan antecedentes heredofamiliares de hematuria, de los cuales se dice que adquirieron una mutación "de novo". A pesar del gran avance en el conocimiento de esta enfermedad, el diagnóstico clínico aún es difícil de elaborar debido principalmente a la heterogeneidad de la que hablamos arriba y a otros factores como son: el desconocimiento mismo de la enfermedad y la falta de infraestructura adecuada para el diagnóstico molecular o para la realización del análisis por microscopía electrónica de las biopsias renales de los pacientes. Este último sustenta el diagnóstico clínico de SA por el análisis de la ultraestructura de las MBG. La desventaja de esta técnica radica en que presenta todos los riesgos que acarrearán las técnicas invasivas, además de que la interpretación de las imágenes histológicas debe realizarse por un médico especializado y con la experiencia suficiente para apreciar los rasgos característicos del daño a la MBG que se generan por este padecimiento. Por otro lado, es necesario el apoyo de un genetista para elaborar el pedigrí del paciente y describir la forma de herencia del padecimiento, además

de conjuntar los estudios nefrológicos e histopatológicos para confirmar el diagnóstico. Debido a lo anterior, el SA es una enfermedad subdiagnosticada en países como el nuestro. Se sabe de su existencia desde principios de siglo, cuando Hurst y Guthrie estudiaron a una gran familia mormona (familia P), en el estado de Utah, con nefritis hematórica hereditaria. En 1927, Alport consideró a esta enfermedad como un síndrome, al observar que los varones jóvenes además presentaban sordera que acompañaba a la nefritis (Gregory M y col., 1996). Con el desarrollo de la microscopía electrónica, a principios de los años 70, se observaron cambios ultraestructurales en la membrana basal de estructuras del oído interno (órgano de Córti) y en las MBG de biopsias renales de pacientes con SA; por lo cual se pensó en la posibilidad de que algún gen o genes que codificaran para las proteína importantes de la estructura o el metabolismo de la membrana basal, podrían estar involucrados en esta enfermedad (Tryggvason K, 1996). Por otro lado, en 1971 se observó que la MBG contiene un tipo de colágena, a la cual se le denominó como tipo IV y se observó que actúa como almacén de la membrana basal. Así mismo, fue hasta 1978 cuando se definió que la familia P presentaba un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X (Hassted SJ y Atkin CL, 1983). Diez años más tarde se localizó el locus del SA en Xq22 (Flinter FA y col., 1988), reportándose las primeras mutaciones en COL4A5 en 1990 y 91 (Barker D y col., 1990; Zhou J y col., 1991). En la década de los años 80 se identificaron y clonaron los genes para las cadenas más abundantes de colágena IV, la $\alpha 1(\text{IV})$ y $\alpha 2(\text{IV})$ y se asignaron al cromosoma 13. Además, se identificaron también las cadenas $\alpha 3(\text{IV})$ y $\alpha 4(\text{IV})$ y se secuenciaron parcialmente (Butkowski RJ y col., 1987; Saus J y col., 1988); pero se localizaron más tarde en el cromosoma 2 y fue hasta 1994 cuando se reportaron las primeras mutaciones en dichos genes que producen formas autosómicas

raras del SA (Mochizuki T y col., 1994). Como en muchas otras enfermedades, los avances en el conocimiento del SA se han dado de manera intermitente y se ha acentuado en los últimos cuatro años, a raíz de la secuenciación completa del COL4A5 en 1994 (Zhou J y col., 1994). Sin embargo aún no se ha estimado la prevalencia de este síndrome en la población general y sólo se ha estimado la frecuencia genética para la isla de Rodas en 1 de cada 10,000 nacidos vivos y la prevalencia en la población del estado de Utha, USA, en 1 de cada 5,000 nacidos vivos (Gregory M y col., 1996). En México se desconoce la frecuencia de esta enfermedad y se le confunde con alguna otra nefropatía hematúrica, con infecciones de vías urinarias o puede pasar inadvertida, sobre todo en las mujeres. Por otro lado, es necesario observar la microscopía electrónica de las biopsias renales de los pacientes con sospecha de este síndrome para valorar y diagnosticar adecuadamente estos casos, lo cual se dificulta en muchos centros hospitalarios, incluso de tercer nivel, por carecer de la infraestructura adecuada o los insumos necesarios para la realización de esta técnica de costo elevado en nuestro país. Los países desarrollados han implementado técnicas para el diagnóstico de estas enfermedades hereditarias combinando la genética con la biología molecular, de tal manera que se han desarrollado estrategias para localizar con exactitud a los alelos mutados y sustentar las implicaciones que puedan tener en la etiología de la enfermedad. Por otro lado, la identificación directa de las mutaciones provee una contribución significativa al entendimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad, puede utilizarse como una herramienta diagnóstica confiable o para estudios epidemiológicos cuando se extiende a grandes series de pacientes, aunque después de alcanzar esta meta se tenga que pensar en la sensibilidad, el costo y la factibilidad para llevar a cabo el proceso de rastreo a esos niveles. El diagnóstico molecular del SA

comienza por definir clínicamente el fenotipo del paciente, además de realizar un análisis genético de certeza en los familiares. En el SA ligado al sexo comúnmente se emplea el análisis de ligamiento genético, que trata de localizar y evidenciar al gen afectado utilizando marcadores cromosómicos, como una herramienta para el diagnóstico preclínico y de portadoras debido a su eficiencia y rapidez, aunque en muchas ocasiones sólo basta el análisis genético familiar. Posteriormente pueden elegirse diferentes estrategias de detección de mutaciones, tomando en cuenta el sexo del paciente. La detección de mutaciones por Southern blot se emplea comúnmente para identificar grandes mutaciones en genes nuevos, o poco estudiados, y también para analizar muestras de mujeres; también se han empleado otras metodologías como: PCR, RFLPs (fragmentos de longitud polimórfica variable), CMC (corte del desapareamiento químico), DGGE (electroforésis en gradiente desnaturalizante), SSCP y el PTT (prueba de proteína truncada) como herramienta diagnóstica en el SA, aunque la detección de una mutación se debe complementar con su caracterización por medio de la secuenciación del fragmento involucrado y, posteriormente se pueden elaborar protocolos para observar la segregación de la mutación en los miembros de la familia. De aquí la necesidad de analizar a las familias con SA de nuestro país, pues a la fecha no existen reportes en la literatura de grupos mexicanos o extranjeros que se ocupen de esta enfermedad en México, a excepción de los trabajos publicados por García-Torres, en relación al SA asociado a leiomiomatosis esofágica difusa (García-Torres R y Guarner V., 1983; García-Torres R y Orozco L, 1993). En este sentido, este es el primer trabajo que se realiza sobre el análisis molecular de familias con SA en nuestro país con la ayuda de los departamentos de Nefrología de diferentes centros hospitalarios de tercer nivel para el reclutamiento de los pacientes con

SA ligado al cromosoma X. En algunos de ellos no se logró establecer el patrón de herencia debido a los escasos antecedentes familiares; sin embargo, no se descartó la posibilidad de una herencia dominante ligada al sexo en ninguno de ellos, pues ninguno presentó transmisión hereditaria de varón a varón, aunque quedó abierta la posibilidad de presentarse una transmisión de tipo autosómico en alguna de las familias. De los 16 casos restantes, 14 tuvieron un patrón de herencia HDX y sólo uno de ellos no contó con historia familiar de hematuria, pero sí presentó insuficiencia renal terminal en la tercera década de la vida, acompañada de sordera y miopía (Tabla 2). Sin embargo, a este paciente (40A1) se le encontró una mutación en el exón 30 del COL4A5, lo que confirmó el diagnóstico y la forma de herencia.

La búsqueda y caracterización de mutaciones en las enfermedades hereditarias representa una herramienta de gran ayuda para el conocimiento, diagnóstico y posible tratamiento de ellas. Sin embargo, muchas de estas enfermedades presentan grandes dificultades para su estudio debido, principalmente, a la naturaleza propia del gen involucrado. En el SA no se ha documentado una correlación genotipo fenotipo a la fecha. Renieri y col., reportan que las mutaciones de sentido erróneo se asocian significativamente con la IRT en varones mayores de 31 años, pero esta asociación no es significativa entre las mujeres con SA; además comentan que el SA de tipo adulto se relaciona más con mutaciones que afectan a las glicinas y que las mutaciones que alteran el marco de lectura junto con rearrreglos mayores del gen causan el SA de tipo juvenil (Renieri A y col., 1996). Por otro lado, Kawai y col., en un estudio multicéntrico hecho en pacientes japoneses, observan mutaciones que provocan el cambio de una glicina por un mismo aminoácido en diferentes pacientes y en diferentes posiciones, es decir, en un paciente

Gly383Asp, y en otro Gly772Asp; sin embargo, el primero presentó sordera y anomalías de la retina y el segundo no, pero ambos presentan IRT de tipo juvenil (Kawai S y col., 1996). En otro estudio sobre 131 pacientes franceses no emparentados con SA, Knebelmann y col., encuentran todos los diferentes tipos de mutaciones en pacientes con SA tipo juvenil, pero en el tipo adulto sólo observaron sustituciones de glicinas y mutaciones en el sitio de splicing, lo cual concuerda con lo reportado por Renieri y otros autores. Sin embargo, también observa que las consecuencias clínicas de las mutaciones de sentido erróneo junto con las que se dan en los sitios de splicing, son difíciles de predecir (Knebelmann B y col., 1996). Actualmente, se han descrito cerca de 200 diferentes mutaciones en pacientes con SA ligado al cromosoma X (Heikkila P y col., 1996; Tryggvason K y col., 1996; Antignac C y col., 1994; Renieri A y col., 1996; Knebelmann B y col., 1996; Kawai S y col., 1996; Lemmink HH y col., 1997; Heiskari N y col., 1997), de las cuales la gran mayoría pertenecen a mutaciones puntuales de diferentes tipos y sólo el 10% son grandes deleciones (Krawzak M y Cooper DN, 1997). Las mutaciones del gen COL4A5 se han clasificado en tres tipos. El primer tipo involucra a grandes deleciones del gen, lo cual puede provocar la ausencia completa, o de una gran parte de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$. En poblaciones caucásicas, se ha detectado un 10 a 15% de estas mutaciones, pero los reportes de poblaciones japonesas no informan este tipo de mutaciones (Kawai S y col., 1996). En el segundo tipo de mutaciones se incluyen las pequeñas deleciones o inserciones, además de mutaciones de sentido erróneo y en el sitio de splicing. Este tipo de mutaciones provocan la formación de proteínas truncadas o cortas y pueden afectar al dominio NC1 por corrimiento del marco de lectura, lo cual altera la formación de dímeros en la producción de la MB; además estas cadenas cortas pueden afectarse en las modificaciones

postraduccionales, la formación de la triple hélice y su secreción al espacio extracelular. El tercer tipo incluye a las mutaciones puntuales o de bases simples, las cuales están involucradas en la función anómala de la cadena $\alpha 5(\text{IV})$ y representan la mayoría de mutaciones reportadas en esta enfermedad. Todas las mutaciones se han ubicado en forma dispersa a lo largo del gen y, recientemente, se han elaborado análisis sistemáticos de mutaciones puntuales para los 51 exones del COL4A5 por medio de PCR-SSCP (Renieri A y col., 1996; Knebelmann B y col., 1996; Kawai S y col., 1996). Sin embargo, en todos los estudios se reporta un 50% de pacientes con SA sin detección de mutaciones. Entre las causas por las cuales no se detecta la mutación responsable de la enfermedad en todos los pacientes, se encuentra el radio de detección de mutaciones del SSCP que es de aproximadamente el 80% (Grompe M, 1993) y la falta de análisis de la región promotora del gen o de los intrones (Renieri A y col., 1996; Knebelmann B y col., 1996; Kawai S y col., 1996) e incluso del splicing alternativo (Guo C y col., 1993), o la acción de uno o varios genes, desconocidos aún, sobre esta enfermedad (Renieri A y col., 1996). Por otro lado, no se han detectado puntos calientes y son muy pocas las mutaciones idénticas encontradas en dos o más individuos no emparentados.

El SA es una enfermedad que a causado un gran interés a nivel mundial por todas las características mencionadas con anterioridad. En este trabajo detectamos un 16% de mutaciones en el total de nuestra población. Tomando en cuenta que sólo analizamos el 43% del gen COL4A5 (22 exones) y que sólo el 60% de los casos índice presentaron un diagnóstico certero de SA-HDX, podemos decir que el radio de detección de mutaciones por SSCP que obtuvimos es muy parecido al reportado en la literatura internacional. En ese sentido, observamos una sustitución heterocigota en el codón número 5, que codifica para

la primera glicina de la proteína, la cual es una transversión de G por T en la base número 13. Esta mutación produce un codón de terminación (TGA) en el primer exón del gen COL4A5 de un adolescente de 15 años con miopía y sordera (paciente 1A1, tabla 2); no se ha descrito en la literatura y posiblemente provoca la ausencia de la cadena $\alpha 5(IV)$ en la MBG, debido a que este exón codifica para el péptido señal de la proteína. Esta mutación podría explicar el cuadro clínico del paciente que, de acuerdo a los criterios de Atkin (Atkin y col., 1988) es un SA de tipo juvenil. Otra nueva mutación que reportamos aquí, es una mutación puntual que provoca el cambio de glicina por arginina en el exón 30 del COL4A5. Este tipo de mutación está reportada con mayor frecuencia, aunque en diferentes posiciones. Como ya se mencionó con anterioridad, alteran el funcionamiento de las MBG y se dice que comúnmente son detectadas en pacientes con SA tipo adulto. En nuestro caso esta mutación, G822R, fue detectada en un paciente masculino de 52 años de edad, que presentó insuficiencia renal terminal en la 3ª década de la vida y datos clínicos de hipoacusia y alteraciones oculares (paciente 40A1, tabla 2), lo cual concuerda con los datos clínicos de otros pacientes reportados en la literatura con una mutación similar (Knebelmann B y col., 1996). Esta mutación fue corroborada gracias al análisis con la endonucleasa *Sau96* I (Fig. 18).

Las mutaciones en el sitio aceptor o donador de splicing se han relacionado con el SA de tipo adulto en la mayoría de los reportes (Renieri A y col., 1996; Knebelmann B y col., 1996; Kawai S y col., 1996). En este trabajo se detectó este tipo de mutación heterocigota en la primer base del intrón 42 del DNA genómico de una adolescente de 14 años de edad con antecedentes heredofamiliares de hematuria persistente (paciente 65A1, tabla 2). Esta mutación no ha sido reportada a la fecha y puede provocar la pérdida del

exón 42, con lo cual se genera una proteína truncada que distorsiona la estructura de la MBG. Un aspecto importante de esta mutación es que crea un sitio de corte para la enzima *Alu I*, con la cual se logró el análisis de segregación de la mutación en la familia. En este caso, después de la digestión enzimática del producto de PCR, observamos que el patrón electroforético del caso índice, que consistió en la presencia de una banda de 165 pb, y un fragmento de 192 pb que corresponde al alelo normal, es similar al de su madre (portadora obligada), pero no al de su hermana (Fig. 19). La última mutación que informamos aquí, es una mutación de tipo puntual que no afecta al producto proteico final, por lo cual a este tipo de mutaciones (silenciosas) se les denomina "variantes raras" o secuencias que no provocan SA. Se piensa que estas secuencias pueden ser polimórficas y la mutación que afecta a la proteína puede localizarse en otro sitio, por lo cual estos pacientes deben ser sometidos al análisis completo del gen (Renieri A y col., 1996; Knebelmann B y col., 1996; Kawai S y col., 1996). La sustitución silenciosa que aquí reportamos, resultó de un cambio de A por G en la posición 3715, que corresponde al codón 1171 que codifica para glutamina, en un paciente con historia familiar de hematuria con lesiones auditivas e IRT en la tercera década de la vida. Esta mutación fue reportada previamente por Knebelman en un paciente con historia familiar positiva de hematuria con sordera e IRT en la 2^a década de la vida, además de que este paciente compartió otras dos mutaciones en los exones 33 y 41 que consistieron en el cambio de una glicina por valina, en el primero, y de glicina por glutamina en el segundo (Knebelman B y col., 1996).

Como hemos observado, son muchos los esfuerzos que se han hecho para conocer y entender a las enfermedades hereditarias desde diferentes puntos de vista, sin embargo, es difícil comprender los mecanismos de acción y afección de muchas enfermedades como el

SA. Actualmente, los estudios para comprender los mecanismos moleculares de acción en las enfermedades hereditarias, se están dirigiendo hacia las secuencias intrónicas, como en el caso de la hemofilia A y la ataxia de Friedreich, en las cuales se postula que actúan como secuencias que proveen estabilidad al DNA y que la alteración de éstas puede ser responsable de un buen porcentaje de mutaciones en algunos genes (Naylor J y col., 1993; Campuzano V y col., 1996).

El diagnóstico molecular tiene grandes ventajas sobre las técnicas invasivas que se emplean comúnmente para diagnosticar el SA, no sólo por la rapidez y exactitud de las pruebas, sino también por la información que arrojan sobre el conocimiento mismo de la enfermedad, pues cabe mencionar que en éste síndrome aún no se ha encontrado una relación directa entre alguna mutación específica y su frecuencia en la población ni tampoco una correlación fenotipo-genotipo, pues aún es escasa la información que se tiene sobre las mutaciones que se han localizado en forma dispersa sobre este enorme gen.

De acuerdo a nuestros resultados, creemos que la técnica de PCR-SSCP es adecuada para el rastreo sistemático de mutaciones puntuales en amplificadas de hasta 350 pb y que debemos analizar las regiones faltantes del gen en este estudio para poder aumentar el número de mutaciones detectadas, además de seguir intentando el desarrollo de protocolos en los cuales se puedan combinar diferentes técnicas moleculares para un análisis sistemático con un mayor rango de detección de mutaciones que nos ofrezca mayores posibilidades en el conocimiento de esta enfermedad.

X. Conclusiones:

- Cada exón utilizado presentó características particulares de amplificación para el análisis molecular.
- Con el análisis de 22 exones del gen COL4A5 se detectó un 16% de mutaciones en la población estudiada, que proporcionalmente es similar a lo reportado en la literatura.
- Se detectaron tres mutaciones nuevas: G5X en el exón 1, el cual codifica para el péptido señal de la proteína; G822R en el exón 30, ubicado en el dominio colágeno de la proteína y 4126+1G→C, que cambia el sitio donador de splicing en el intrón 42 del dominio colágeno.
- Se observó una sustitución silenciosa, previamente reportada en la literatura (Q1171Q), en uno de nuestros pacientes.
- No se detectaron “puntos calientes” en el gen.
- La mutación G822R concuerda con el fenotipo descrito en la literatura (mutaciones en glicinas detectados en adultos con sordera), pero la 4126+1G→C, que modifica el sitio de splicing y comúnmente se describe en adultos, se detectó en una adolescente con hematuria persistente.
- Se observó la segregación de la mutación 4126+1G→C en la familia de la paciente 65A1 por medio del análisis con la enzima *Alu* I y se brindó asesoramiento genético a la misma.

222356

- La estrategia utilizada en este trabajo permitió confirmar el diagnóstico de SA-HDX en un paciente sin historia familiar de hematuria, por medio de la detección de una mutación “de novo” (G822R).
- Es necesario realizar el análisis completo del gen en todos los pacientes para intentar localizar y caracterizar un mayor número de mutaciones. Así mismo, es necesario el análisis de las secuencias intrónicas y reguladoras del gen para conocer más de esta enfermedad y poder aplicar otro tipo de estrategias para apoyar el diagnóstico molecular del SA.
- Las herramientas de biología molecular resultaron ser un método potente, específico y sensible en el diagnóstico del SA, debido a que no se encontraron mutaciones en los pacientes con patrón de herencia HDX dudoso.

XI. Bibliografía:

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. Molecular Biology of the cell. Segunda Edicion, Garly Publishing, Inc. New York, USA. 1989.pp 802-823.

Antignac C, Knebelmann B, Drouot L, Gros F, Deschênes G, Hors-Cayla MC, Zhou J, Tryggvason K, Grünfeld JP, Broyer M y Gubler MC.1994. Deletions in the COL4A5 collagen gene in X-linked Alport syndrome.J.Clin Invest. 93: 1195-1207.

Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Rousel B, Deschênes G, Gross F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason K y Gubler MC.1992. Alport syndrome and diffuse esophageal leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the COL4A5 collagen gene. Kidney Int. 42:1178-1183.

Atkin CL, Gregory MC y Border WA. Alport syndrome. En: Shrier RW y Gottschalk CW(eds.). Diseases of the Kidney. 4th edition., little Brown & Co, Boston, M. 1988. p.p. 617-641.

Barker D, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skoinick MH, Atkin CL, Tryggvason K. 1990. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science. 248:1224-1227.

Bernal D, Quinones S, Saus J. 1993. The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced. *J Biol Chem.* 268:12090-12094.

Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. 1978. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med.* 298:826-833.

Brunner H, Schröder C, van Bennekom C, Lambermon E, Tuerlings J, Menzel D, Olbing H, Monnens L, Wieringa B, Robers HH. 1988. Localization of the gen for X-Linked Alport's syndrome. *Kidney Int.* 34:507-510.

Butkowsky RJ, Langeveld JPM, Wieslander J, Hamilton J, Hudson BG. 1987. Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem.* 262:7874-7877.

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, et al. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet expansion. *Science.* 271:1423-1427.

Caulfield JP, Farquhar MG. 1978. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest.* 39:505-512.

Churg J y Shermann RL. 1973. Pathologic characteristics of hereditary nephritis. *Arch Pathol.* 95: 374-379.

Dunnill M, Halley W. 1973. Some observations on the quantitative anatomy of the kidney. J Pathol. 110:113-121.

Eble JA, Golbik R, Mann K, Kühn K. 1993. The $\alpha 1\beta 1$ integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$. EMBO J. 12:4795-4802.

Flinter FA, Cameron JS, Chantler C, Houston I, Bobrow M. 1988. Genetics of classic Alport syndrome. Lancet. 2:1005-1007.

Flinter FA, Abbs S, Bobrow M. 1989. Localization of the gene for classic Alport syndrome. Genomics. 4:335-338.

García-Torres R, Guarner V. 1983. Leiomiomatosis del esófago, traqueobronquial y genital asociada con nefropatía hereditaria tipo Alport: Un nuevo síndrome. Rev Gastroenterol Mex. 48:163-170.

García-Torres R, Orozco L. 1993. Síndrome de Alport: nuevos conocimientos. Bol Med Hosp Infant Mex. 50(8):596-602.

Goldberg M, Escaig-Haye F. 1986. Is the lamina lucida of the basement membrane a fixation artifact?. Eur J Cell Biol. 42: 365-368.

Gregory MC, Terreros DA, Barker DF, Fain PN, Denison JC, Atkin CL. Alport Syndrome clinical phenotypes, incidence, and pathology. En: Tryggvason K (ed). Molecular pathology and genetics of Alport Syndrome. Contrib Nephrol. Basel, Karger. 1996. 117, pp 1-28.

Griffin C-A, Emanuel BS, Hansen JR, Cavenee WK, Myers JC. 1987. Human collagen genes encoding basement membrane $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains map to the distal long arm of chromosome 13. Proc Natl Acad Sci USA. 84:512-516.

Grompe M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Nat Genet. 5:111-117.

Guo C, Van Damme B, Van Damme-Lombaerts R, Van den Berghe H, Cassiman JJ, Marynen P. 1993. Defferential 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.

Hassted SJ, Atkin CL. 1983. X-Linked inheritance of Alport syndrome: Family P revisited. Am J Hum Genet. 35:1241-1251.

Heidet L, Forestier L, Antignac C, Gubler MC. 1997. Syndrome d'Alport, une maladie héréditaire du collagène de type IV. Medecine/sciences. 13:28-36.

Heikkilä P, Soininen R. The type IV collagen gene family. En: Tryggvason K (ed). Molecular pathology and genetics of Alport Syndrome. Contrib Nephrol. Basel, Karger. 1996. 117, pp 105-129.

Heiskari N, Zhang X, Zhou J, Leinonen A, Barker D, Gregory M, Atkin CL, Netzer KO, Weber M, Reeders S, Gronhagen-Riska C, Neumann HP, Trambath R, Tryggvason K. 1997. Identification of 17 mutations in ten exons in the COL4A5 collagen gene, but no mutations found in four exons in COL4A6: a study of 250 patients with hematuria and suspected of having Alport syndrome. J Am Soc Nephrol. 7(5):702-709.

Hinglais N, Grünfeld JP y Bois LE. 1972. Characteristics ultrastructural lesions of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). Lab Invest. 27: 473- 487.

Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB y Tryggvason K. 1990. Identification of a distinct type IV collagen α chain with restriction kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X-linked Alport syndrome. Proc Nat Acad Sci USA. 87:1606-1610.

Hostikka SL, Kurkinen M, Tryggvason K. 1987. Nucleotide sequence coding for the human type IV collagen α 2 chain cDNA reveals extensive homology with the NC-1 domain of α 1(IV), but not with the collagenous domain or untranslated region. FEBS Lett. 216:281-286.

Hudson GB, Reeders ST, Tryggvason K. 1993. 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.

Johansson C, Butkowski R, Weislander J. 1992. The structural organization of type IV collagen. Identification of three NC1 populations in the glomerular basement membrane. *J Biol Chem.* 267:24533-24537.

Kasinath BS, Kanwar YS. Glomerular basement membrane: Biology and physiology. In Rohrbach DH, Timpl R (eds): *Molecular and cellular aspects of basement membranes.* San Diego, Academic Press. 1993. pp 89-106.

Kawai S, Nomura S, Harano T, Harano K, Fukushima T, Osawa G and the Japanese Alport Network. 1996. The COL4A5 gene in Japanese Alport syndrome patients: Spectrum of mutations of all exons. *Kidney Int.* 49:814-822.

Kefalides NA. 1971. Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical α -chains. *Biochem Biophys Res Commun.* 45:226-234.

Kern A, Eble J, Golbik R, Kühn K. 1993. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *Eur J Biochem.* 215:151-159.

Kivirikko KI. 1993. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med.* 25:113-126.

Kivirikko KI, Myllylä R. 1985. Post-translational processing of procollagens. *Ann NY Acad Sci.* 460:187-201.

Kleppel MM, Fan WW, Cheong HI, Michael AF. 1992. Evidence for separate networks of classical and novel basement membrane collagen. Characterization of $\alpha 3(\text{IV})$ -Alport antigen heterodimer. *J Biol Chem.* 267:4137-4142.

Kleppel MM, Kashtan CE, Butkowski RJ, et al. 1987. Alport familial nephritis: Absence of 28 kilodalton non-collagenous monomers of type IV collagen in glomerular basement membrane. *J Clin Invest.* 80:263-266.

Knebelmann B, Breillat C, Forestier L, Arrondel C, Jacassier D, Giatras I, Drouot L, Deschenes G, Grunfeld JP, Broyer M, Gubler MC, Antignac C. 1996. Spectrum of mutations in the COL4A5 collagen gene in X-linked Alport syndrome. *Am J Hum Genet.* 59:1221-1232.

Krawczak M, Cooper DN. 1997. The Human Gene Mutation Database. *Trends Genet.* 13:121-122.

Lemmink HH, Mochizuki T, van der Heuvel LP, Schroder CH, Barrientos A, Monnens LAH, van Oost BA, et al. 1994. Mutations in the type IV collagen $\alpha 3$ (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet.* 3:1269-1273.

Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LA, Smeets HJ. 1997. The clinical spectrum of the type IV collagen mutations. *Hum Mutat.* 9(6):477-499.

Meyne R, Brewton RG. 1993. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol.* 5:883-890.

Miller SA, Dykes DD y Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.

Mochizuki T, Lemmink HH, Maryiama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen C, et al. 1994. Identification of mutations in the $\alpha 3$ (IV) and $\alpha 4$ (IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 8:77-82.

Mullis KB. 1990. The usual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262:36-43

Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Gianelli F. 1993. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe hemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet.* 2:1773-1778

Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama K, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T y Sado Y. 1995. Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol.* 130(5):1219-1229.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K. y Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86:2766-2770.

Pihlajaniemi T. Molecular properties of the glomerular basement membrane. En: Tryggvason K (ed). *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome. Contrib Nephrol.* Basel, Karger, 1996. 117.pp 46-79.

Pihlajaniemi T, Pohjalainen ER y Myers J. 1990. Complete primary structure of the triple helical region and the carboxi-terminal domain of a men type IV collagen chain $\alpha 5(\text{IV})$. *J Biol Chem.* 265:13758-13766.

Pihlajaniemi T, Tryggvason K, Myers J, Kurkinen M, Lebo R, Cheung M, Prockop DJ, Boyd CD. 1985. cDNA clones for the pro- $\alpha 1(\text{IV})$ chain of human type IV procollagen reveal an unusual homology of amino acid sequences in two halves of the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem.* 260:7681-7687.

Renieri A, Bruttini M, Galli L, Zanelli P, Neri T, Rossetti S, Turco A, Heiskari N, Zhou J, Gusmano R, Massella L, Banfi G, Scolari F, Sessa A, Rizzoni G, Triggvason K, Pignatti P, Savi M, Ballabio A y De Marchi M. 1996. X-Linked Alport Syndrome: an SSCP-Based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. *Am J Hum Genet.* 58:1192-1204.

Rodewald R, Karnovsky MJ. 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol.* 60:423-433.

Ruoslahti E. 1991. Integrins. *J Clin Invest.* 87:1-5.

Saito A, Sakatsume M, Yamazaki H, Arakawa M. 1994. Alternative splicing in the $\alpha 5(\text{IV})$ collagen gen in human kidney and skin tissues. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 36:19-24.

Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.

Sariola H, Hostikka SL, Lukkarila S. Distribution of type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\alpha 5$ chains in human tissues. En: Tryggvason K (ed). *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome.* *Contrib Nephrol.* Basel, Karger, 1996. 117, pp 130-141.

Saus J, Wieslander J, Langeweld JPM, Quinones S, Hudson PG. 1988. Identification of the Goodpasture antigens as the $\alpha 3(\text{IV})$ chain of collagen IV. *J Biol Chem.* 263:13374-13380.

Spear GS y Slusser RJ. 1972. Alport's Syndrome: emphasizing electromicroscopic studies of the glomerulus. *Am J Pathol.* 69: 212-222.

Spear GS. 1973. Alport's Syndrome: A consideration of pathogenesis. *Clin Nephrol.* 1:336-337.

Takanami H, Naramoto A, Shigematsu H, Ohno S. 1991. Ultrastructure of glomerular basement membrane by quick-freeze and deep-etch methods. *Kidney Int.* 39:659-664.

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K. 1981. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* 120:203-211

Timpl R, Dziadek M. 1986. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol.* 29:1-112

Timpl R. 1989. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem.* 180:487-502.

Tryggvason K. Mutations in type IV collagen genes and Alport syndrome. En: Tryggvason K (ed). *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome. Contrib Nephrol Basel, Karger, 1996.* 117:154-171.

Tryggvason K, Zhou J, Hostikka SL y Shows TB.1993. Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int.* 43:38-44.

Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K, Kühn K. 1991. Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the $\alpha 1\beta 1$ and the $\alpha 2\beta 1$ integrins. *J Cell Biol.* 113:1475-1483

Yurchenco PD, Furthmayr H. 1984. Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry.* 23:1839-1850.

Yurchenco PD, O'Rear J. Supramolecular organization of basement membranes. En: Rohrbach DH, Timpl R (eds). *Molecular and cellular aspects of basement membranes.* San Diego, Academic Press. 1993, pp 19-47.

Zhou J, Hertz JM, Leinonen A y Tryggvason K. 1992. Complete aminoacid sequence of the human $\alpha 5(\text{IV})$ collagen chain and identification of a single base mutation in exon 23 converting glycine-521 in the collagenous domain to cysteine in Alport syndrome patient. *J Biol Chem.* 267:12475-12481.

Zhou J, Hostikka SL, Chow LT. y Tryggvason K. 1991. Characterization of the 3' half of the human type IV collagen $\alpha 5$ gen that is affected in the Alport syndrome. *Genomics.* 9:1-9.

222856

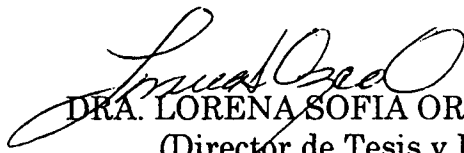
Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, Paepe A, Tryggvason K y Reeders ST. 1993. Deletion of the Paired α 5(IV) and α 6(IV) collagen genes in an inherited smooth muscle tumors. *Science*. 261:1167-1169.

Zhou J, Leinonen A, Triggvason K. 1994. Structure of the human type IV collagen COL4A5 gene. *J Biol Chem*. 269(9):6608-6614.

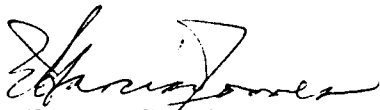
Zhou J y Reeders ST. The α chains of type IV collagen. En: Tryggvason K (ed). *Molecular pathology and genetics of Alport syndrome*. Contrib Nephrol Basel, Karger, 1996. 117:80-104.

Los integrantes del comité tutorial designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobaron la presente tesis el día 29 de Julio de 1998.

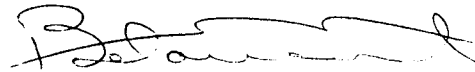
El Comité Tutorial:



DRA. LORENA SOFIA OROZCO OROZCO.
(Director de Tesis y Presidente)



Med. Esp. Romeo García Torres.
(Codirector de Tesis y Vocal)



Dr. Miguel Betancourt Rule.
(Asesor y Secretario)



Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz.
Coordinadora de la Maestría.